

Máira Gazzola Arroyo

“Água de soluções alternativas:
estudo da diversidade de espécies fúngicas”

São José do Rio Preto
2013

Máira Gazzola Arroyo

“Água de soluções alternativas:
estudo da diversidade de espécies fúngicas”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto
2013

Arroyo, Máira Gazzola

Água de soluções alternativas: estudo da diversidade de espécies fúngicas/ Máira Gazzola Arroyo. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2013. 97 f. :14 il. ; 30 cm.

Orientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Fungos. 2. Água de solução alternativa. 3. Poços regulares e irregulares I. Margarete Teresa Gottardo de Almeida. II. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.28

Máira Gazzola Arroyo

“Água de soluções alternativas:
estudo da diversidade de espécies fúngicas”

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador(a)

Prof. Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem
Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro/SP

Prof. Dr. Samir Felício Barcha
Laboratório de Geologia Ambiental-GEA- São José do Rio Preto
UNESP/IBILCE-São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
27 de junho de 2013

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família,
principalmente aos meus pais e irmão,
pois a ajuda e apoio de vocês foram
essenciais para a realização deste
trabalho!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me guiar e me dar forças durante todo este período!

Aos meus pais: A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade não bastaria um obrigada! A vocês que se doaram inteiros e renunciaram seus sonhos para que realizasse os meus. A vocês que iluminaram meus caminhos quando estes se tornaram obscuros e difíceis de lidar. Obrigada por sempre me incentivarem a nunca perder a fé e manter a cabeça erguida acima de tudo! Obrigada pela compreensão durante toda essa trajetória e por acreditar no meu potencial!

Ao meu irmão: Meu amigo de todas as horas, que sempre me apoiou, ajudou e incentivou na execução deste trabalho. Por acreditar em mim e principalmente por ajudar nas dúvidas sobre a formatação do trabalho!

A toda minha família, primos(as), tios(as), vó por sempre torcerem pela realização de meus sonhos!

À minha orientadora pela oportunidade, ajuda, apoio, dedicação e atenção para que esse trabalho pudesse ser realizado. Muito obrigada por todo ensinamento e por fazer parte do meu crescimento pessoal e profissional.

Às minhas amigas de Rio Preto pela amizade, companheirismo, por sempre me apoiarem e pela compreensão nos momentos de ausência. Em especial àquelas que ajudaram na formatação das figuras deste trabalho.

Às amigas de Maringá que mesmo longe, continuaram torcendo para que mais uma etapa de minha carreira profissional fosse realizada.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos amigos do laboratório: Luciângela, Simone, Ju, Maísa, Natalia, Luciani, Eduardo, Luis Paulo, João Paulo e Matheus, que compartilharam comigo ótimos momentos de muita descontração durante esses dois anos, que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste projeto. Em especial a Natalia por me ensinar dia a dia com muita calma, paciência e

dedicação todo o aprendizado para execução deste trabalho e a Luciângela por sempre estar pronta a me ouvir e esclarecer minhas dúvidas!

À Luceli, técnica do laboratório, meu muito obrigada por ser tão prestativa em todos os momentos que precisei.

Às professoras Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira e a Dra. Elza Maria Castilho por participarem da banca de qualificação, contribuindo para melhorar o projeto.

Ao Dr. Maurício Lacerda Nogueira por ceder seu laboratório para as análises de biologia molecular.

À Jaqueline Tanury Macruz Peresi por ser tão bondosa, prestativa e sempre pronta em me ajudar. Por sanar minhas dúvidas com muita paciência e dedicação!

À Margarida Georgina Bassi, diretora do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto por aceitar a parceira do projeto.

À Heloisa da Silveira Paro Pedro por sempre acreditar no meu potencial, pelas dicas e por todo apoio durante o mestrado.

A todos do Adolfo Lutz de São José do Rio Preto que direta ou indiretamente participaram e contribuíram para execução deste trabalho.

Ao Wilson Roberto Faim e todos da Vigilância Sanitária de São José do Rio Preto pela realização das coletas e por toda ajuda.

À Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem e ao Dr. Samir Felício Barcha que aceitaram dispensar seu tempo na correção deste trabalho, adicionando experiência e conhecimento no mesmo.

Ao Dr. José Antônio Cordeiro pela ajuda na execução das análises estatísticas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do IBILCE que contribuíram para meu conhecimento científico e à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela disponibilidade do espaço físico para execução do projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

*Seja quem você for, seja qual a posição social que tenha na vida,
a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força,
determinação e sempre faça tudo com muito amor e fé em Deus,
que um dia você chega lá. De qualquer maneira você chega lá!*

Ayrton Senna

RESUMO

Uma das maiores preocupações para os consumidores é a qualidade da água potável relacionada aos padrões microbiológicos, pois esta é um dos principais veículos de transmissão de patógenos: vírus, bactérias, protozoários e fungos. A atual Portaria nº 2.914/11 do Ministério da Saúde inclui aspectos normativos para os padrões microbiológicos e físico-químicos para as análises de água e define ainda, os tipos de solução alternativa coletiva (SAC) e individual (SAI), destacando alguns pontos de coleta que devem ser contemplados. É possível verificar nesta Portaria a ausência de análises de fungos em água para consumo humano. Águas subterrâneas têm sido usadas como fonte de abastecimento, sendo que seu uso e a construção de poços regulares requerem autorização junto aos órgãos governamentais e cadastro no Sistema de Vigilância Sanitária. No entanto, em alguns Municípios como no caso de São José do Rio Preto muitos poços são construídos de forma irregular, favorecendo a entrada de micro-organismos na água. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ocorrência de espécies fúngicas em água proveniente de soluções alternativas (poços regulares e irregulares) do Município de São José do Rio Preto e correlacionar aos parâmetros físico-químicos e biológicos de susceptibilidade antimicrobiana e ainda, analisar a distribuição de genótipos clonais das leveduras. No período de setembro de 2011 a junho de 2012, 500 ml de água foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto sendo: 52 amostras de água de poços regulares e 107 de poços irregulares. Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas foram utilizadas para definição das espécies fúngicas e análise de susceptibilidade antimicrobiana. As leveduras que apresentaram mais de um isolado foram submetidas ao teste molecular (RAPD). Paralelamente mais 500 ml de água foram coletados e encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto para as análises físico-químicas. Outros parâmetros também foram avaliados: tipo de água (SAC ou SAI), ponto de coleta, concomitante presença de bactérias, estações do ano e ocorrência de chuvas. Poços regulares e irregulares apresentaram contaminação por fungos patogênicos, que independente da origem dos poços, o crescimento fúngico foi observado mesmo em águas com os padrões físico-químicos dentro do limite estabelecido pela Portaria nº 2.914/11. Tipo de água (SAC e SAI), pontos de coleta, concorrência com bactérias, estações do ano e chuva interferem na distribuição de fungos em água, considerados os padrões biológicos individuais. Água dos

poços apresentou positividade para fungos resistentes aos antifúngicos utilizados em prática clínica. Também foi demonstrada a ocorrência de tipos fúngicos clonais em água de ambos os poços, o que sugere contato e dispersão microbiana a partir de uma mesma fonte comum de água. A ocorrência de fungos patogênicos resistentes aos antimicrobianos em água de poços implica na criação de novos documentos regulatórios com a inclusão da análise micológica.

Palavras-chave: fungos, água de solução alternativa, poços regulares e irregulares

ABSTRACT

One of the greatest concerns for consumers is the quality of drinking water related to microbiological standards, because this is one of the most important vehicles of pathogen transmission: viruses, bacteria, protozoa and fungi. The current Directive nº 2.914/11 of Ministry of Health includes normative aspects for microbiological and physico-chemical standards for analysis of water and also defines the types of alternative solutions collective and individual, emphasizing some collection points that must be considered. It is possible to verify in this Directive the absence of analysis of fungi in drinking water. Groundwater it has been used as a source of supply and the use of groundwater and the construction of regular wells requires authorization from governmental agencies and registration in the Health Surveillance System. In some cities, however, such as in São José do Rio Preto many wells are built in an irregular way, facilitating the entry of microorganisms in water. Thus this study aims to evaluate the occurrence of fungal species in water from alternative solutions (regular and irregular wells) in São José do Rio Preto and to correlate to physic-chemical and biological of antimicrobial susceptibility and also to analyze the distribution of clonal genotype of yeasts. From September 2011 to June 2012, 500 ml of water were collected and sent Microbiology Laboratory of Medical School: 52 samples of water from regular wells and 107 from irregular wells. Morphological, physiological and biochemical characteristics were used for definition of fungal species and for analyses of antimicrobial susceptibility. The yeasts that presented more than one isolated were subjected to molecular test (RAPD). At the same time another 500 ml of water were collected and sent to Adolfo Lutz Institute for physico-chemical analyzes. Other parameters were also evaluated: type of water (SAC or SAI), collection points, concomitant presence of bacteria, seasons and rainfall. Regular and irregular wells were contaminated by pathogenic fungi that regardless of the origin of the wells, the fungal growth was observed even in waters with the physico-chemical standards were within the limits established by Directive nº 2.914/11. Type of water (SAC or SAI), collection points, competition with bacteria, seasons and rainfall interfere in the distribution of fungi in water, considering the individual biological standards. Water from wells was positive to fungi resistant to anti-fungal used in clinical practice. It was also demonstrated the occurrence of clonal fungal types in water from both of the wells, suggesting contact and microbial dispersion from a single common source of water. The occurrence of pathogenic fungi resistant to antimicrobial in water from wells implies the creation of new regulatory

documents including the mycological analysis.

Keywords: *fungi, alternative water solution, regular and irregular wells*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização do Aquífero Guarani na América do Sul.....	21
Figura 2 - Representação do Aquífero Bauru no Estado de São Paulo	22
Figura 3 - Representação gráfica da distribuição de poços de água regulares de São José do Rio Preto e identificação quanto à positividade/negatividade de isolamento fúngico	45
Figura 4 - Representação gráfica da distribuição de poços de água irregulares de São José do Rio Preto e identificação quanto à positividade/negatividade de isolamento fúngico	46
Figura 5 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida guilliermondii</i>	64
Figura 6 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida tropicalis</i>	65
Figura 7 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida glabrata</i>	65
Figura 8 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida intermedia</i>	65
Figura 9 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida famata</i>	65
Figura 10 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida lusitaniae</i>	66
Figura 11 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>T. asahii</i> e <i>T. mucoides</i>	66
Figura 12 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à <i>Candida parapsilosis</i>	66
Figura 13 - Representação gráfica da distribuição de poços de água regulares e irregulares de São José do Rio Preto e identificação quanto à positividade/negatividade de isolamento fúngico e representação das amostras com correlações genéticas.....	67
Gráfico 1 - Percentual de águas contaminadas segundo a origem.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistente segundo o protocolo M44-A2.....	37
Tabela 2 - Padrões de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistente segundo o protocolo M27-A3.....	39
Tabela 3 - Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação de testes de susceptibilidade de filamentosos	40
Tabela 4 - Distribuição de espécies fúngicas segundo origem da água.....	48
Tabela 5 - Tipo de água segundo origem, poços, pontos de coleta e crescimento fúngico.....	52
Tabela 6 - Padrões físico-químicos e crescimento fúngico em amostras com valores dentro do limite estabelecido pela Portaria nº 2.914/11.....	53
Tabela 7 – Média das temperaturas segundo origem dos poços.....	56
Tabela 8 – Presença de bactérias e concomitância com fungos	56
Tabela 9 - Coleta e positividade das amostras nas 4 estações do ano segunda origem dos poços.....	57
Tabela 10 – Chuva nas 24 horas antecedente a coleta e positividade das amostras.....	58
Tabela 11 - Perfil de susceptibilidade de leveduras de poços regulares e irregulares frente aos antifúngicos testados.....	59
Tabela 12 - Perfil de susceptibilidade de filamentosos de poços regulares e irregulares frente aos antifúngicos testados.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC - *American Type Culture Collection*

C. - *Candida*

CE - Comunidade Européia

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

DAEE – Departamento de Água e Energia Elétrica

DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

dNTP - Desorribonucleotídeo Trifosfatado (*Desoxynucleoside Triphosphate*)

EPA - *United States Environmental Protection Agency*

FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

g – grama

°C – Graus Celsius

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

KCl - Cloreto de Potássio

km² – quilômetro quadrado

l- litro

M – Molar

mcg – microgramas

mg – miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

MIC – Concentração Inibitória Mínima

> - maior

≥ - maior ou igual

® - Marca Registrada

< - menor

≤ - menor ou igual

µg - micrograma

µl – microlitro

ml – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

MS – Ministério da Saúde

NaCl - Cloreto de Sódio

ng – nanogramas

nm – nanômetro

pmol - picomol

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)

% - porcentagem

pH – Potencial Hidrogeniônico

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*

rpm - rotações por minuto

SAC – Solução Alternativa Coletiva

SAI – Solução Alternativa Individual

SDD – Sensível Dose Dependente

sp. - espécie

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UH – Unidade de Hazen

UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method Arithematic averages*

UT – Unidade de Turbidez

UV – Ultravioleta

V. - Volts

VMP - Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA - HISTÓRICO.....	19
1.2 ÁGUA SUBTERRÂNEA	21
1.3 ÁGUA E FUNGOS	23
1.4 FUNGOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	25
1.5 GENÉTICA MOLECULAR	26
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 COLETA DA ÁGUA E FILTRAÇÃO	33
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS.....	34
4.2.1 Características morfológicas	34
4.2.2 Microcultivo em Corn-Meal com Tween 80.....	34
4.2.3 Provas fisiológicas da identificação das leveduras	34
4.2.3.1 Teste de assimilação de diferentes fontes de carbono	34
4.2.3.2 Teste de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio.....	35
4.2.3.3 Identificação pelo ID 32C (BioMérieux).....	36
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE FILAMENTOSOS.....	36
4.3.1 Características morfológicas	36
4.4 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	36
4.4.1 Método de difusão em disco.....	37
4.4.2 Método de microdiluição para leveduras	38
4.4.3 Método de microdiluição para fungos filamentosos.....	39
4.5 BIOLOGIA MOLECULAR	40
4.5.1 Extração do DNA genômico para leveduras	40

4.5.2 Técnica de RAPD: <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>	41
4.5.2.1 Interpretação dos dados de polimorfismos gerados pelo RAPD	41
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS <i>VERSUS</i> FUNGOS	44
5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS	59
5.3 PERFIL GENOTÍPICO DAS LEVEDURAS	63
6 CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8 ANEXOS	86

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTROLE DA QUALIDADE DA ÁGUA - HISTÓRICO

A qualidade da água tornou-se relevante e de importância para a saúde pública no final do século XIX e começo do século XX em razão das doenças por ela veiculadas (FREITAS; FREITAS, 2005).

No Brasil, na década de 1970, iniciou-se a primeira normatização para a qualidade da água para consumo humano com o Decreto Federal nº 79.367 de 9 de março de 1977, no qual define que o Ministério da Saúde junto de outros órgãos, estabeleça a aprovação de normas relacionadas à proteção de mananciais, serviços de abastecimento público, instalações prediais e o controle da qualidade da água.

Em 1986, cria-se o Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano, cujos principais objetivos foram delineados para prestar auxílio técnico as Secretarias Estaduais de Saúde e definir estratégias a fim de obter apoio para análises físico-químicas e microbiológicas (BRASIL, 2004a).

Foi no ano de 1990, com a criação da Portaria nº 36/MS/GM/90, que o padrão de potabilidade da água foi determinado, sendo que a água potável para estar em condições adequadas ao consumo humano deve atender os padrões físico-químicos e microbiológicos (BRASIL, 1990).

Dez anos mais tarde, precisamente em 29 de dezembro de 2000, um comitê especializado cria a Portaria nº 1.469, que identifica novos critérios à primeira, e, propõe mudanças quanto ao padrão de potabilidade e normas técnicas para os processos de desinfecção. Paralelamente, surgem novas regras para criação dos sistemas de abastecimento de água e soluções alternativas: o primeiro é toda instalação composta por conjunto de obras civis, materiais e equipamentos, destinada à produção e à distribuição canalizada de água potável para populações, sob a responsabilidade do poder público; ao segundo, que inclui toda modalidade de abastecimento coletivo diferente do sistema de abastecimento, como fontes, poços comunitários, instalações de reservatórios de água em condomínios horizontais e verticais (BRASIL, 2000).

Essa Portaria determina ainda que os responsáveis das soluções alternativas de abastecimento mantenham a qualidade da água potável para a população consumidora e

realizem uma avaliação sistemática da qualidade da água, sob perspectiva dos riscos à saúde (BRASIL, 2000).

Em 25 de março de 2004, a Portaria nº 518 define novos conceitos e exigências sobre a Portaria 1.469, com objetivos agora mais restritos (BRASIL, 2004b).

Recentemente, a Portaria MS/GM nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 revoga a Portaria nº 518 (BRASIL, 2011) subdivide os tipos de soluções alternativas coletivas (SAC) e individuais (SAI); ao primeiro, caracterizado como abastecimento coletivo destinado a fornecer água potável, com captação subterrânea ou superficial, com ou sem canalização e sem rede de distribuição; ao segundo, abastecimento de água particular, pertencente aos domicílios residenciais com uma única família. Ainda nesta Portaria, são contemplados alguns pontos de coleta para análise de água: cavaletes e demais pontos de consumo. Nesta mesma proposta, são incluídos aspectos normativos para os padrões microbiológicos e físico-químicos, conforme seguem:

Padrões microbiológicos: a água para consumo humano deve estar ausente de *Escherichia coli* e coliformes totais em 100 ml.

Padrões físico-químicos: o potencial hidrogeniônico (pH), condição ácida ou alcalina do meio com atividade de íons H^+ deve apresentar-se no intervalo de 6,0 a 9,5; a cor, resultante da dissolução de substâncias na água, principalmente de matéria orgânica com Valor Máximo Permitido (VMP) de 15UH(Unidade de Hazen: mg Pt-Co/L); a turbidez, relacionada com a transparência, de acordo com a presença de partículas suspensas na água, com VMP de 5UT (Unidades de Turbidez), o nitrato (N) com VMP de 10mg/L e o cloro residual livre deve estar no limite de 0,2 mg/L a 2 mg/L.

Em relação aos padrões microbiológicos internacionais para água de consumo humano, de acordo com a Directiva 98/88/CE da Comunidade Européia e da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency-EPA*) os critérios microbiológicos consistem numa investigação mais detalhada de determinados grupos microbianos como: *E. coli*, coliformes totais, *Cryptosporidium sp*, *Giardia lamblia*, *Legionella sp*, Enterococos e alguns grupos virais (DIRECTIVA 98/88/CE, 1998; EPA, 2009).

Pode-se observar que tanto os parâmetros nacionais e internacionais não contemplam as análises de fungos filamentosos e leveduras.

1.2 ÁGUA SUBTERRÂNEA

A garantia da saúde humana está relacionada a diversos fatores, entre eles, à qualidade da água. Esta, para estar em condições ideais para o consumo deve atender além dos parâmetros físico-químicos, os padrões microbiológicos que funcionam como indicadores de contaminação (BRASIL, 2011; WHO, 2001).

No Brasil, tem-se utilizado a água subterrânea como fonte de abastecimento público, sendo o Estado de São Paulo o maior usuário deste recurso, com aproximadamente 80% das cidades deste Estado, utilizando total ou parcialmente fontes subterrâneas como forma de abastecimento. O monitoramento dos lençóis freáticos é um importante instrumento para a gestão da qualidade dos recursos hídricos, principalmente em função da expansão das captações e a interconexão entre as águas superficiais e as subterrâneas (CETESB, 2010; RODRIGUES, 2004).

A água subterrânea usada para consumo humano também necessita atender aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Para tanto, a preocupação com a contaminação desta fonte hídrica, está diretamente relacionada com a qualidade de água dos Aquíferos que proporcionam este recurso. O Aquífero Guarani é considerado o maior manancial em extensão de água doce subterrânea do mundo, situando-se na região centro-leste da América do Sul, e ocupa uma área de 1,2 milhões de Km², estendendo-se pelo Brasil (Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás), Paraguai, Uruguai e Argentina, Figura 1 (GIARDIN; FACCINI, 2011).

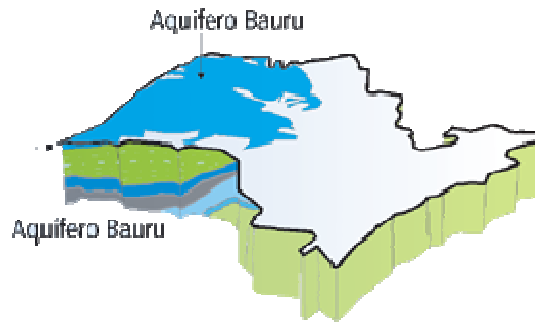
Figura 1 - Localização do Aquífero Guarani na América do Sul



Fonte: CETESB, 2011.

A fonte hídrica responsável por grande parte do abastecimento público dos Municípios e de várias cidades do oeste paulista, incluindo a cidade de São José do Rio Preto, no Estado de São Paulo, é o Aquífero Bauru, que ocupa cerca de 40% do território representado pela Figura 2 (MODESTO et al., 2009; OLIVEIRA; WEDLAND, 2004).

Figura 2 - Representação do Aquífero Bauru no Estado de São Paulo



Fonte: IRITANI; EZAKI, 2008.

Embora considerando segura a origem da água subterrânea dado ao poder de filtração do solo, a contaminação externa por micro-organismos e outros elementos pode surgir. Este evento é comum quando os poços de captação de água são construídos de maneira irregular, e a água localizada na superfície do poço, pode conter micro-organismos potenciais para doenças, o que coloca em risco a saúde da população (AYACH, et al. 2012; CETESB, 2011) tornando-se necessário a criação de protocolos de supervisão constantes, hoje estabelecidos pelas Secretarias Estaduais de Saúde mediante Portarias do Ministério da Saúde.

O uso da água a partir de fontes subterrâneas requer autorização e outorga junto ao Departamento de Águas e Energias Elétricas (DAEE), cabendo a este órgão, a administração e fiscalização da qualidade da água (DAEE, 2011a).

Foi através deste Departamento, que se iniciaram no Brasil em 1972 as pesquisas envolvendo águas subterrâneas, a fim de avaliar a qualidade da mesma. Até este momento, não havia registros ou documentos sobre a hidrologia dos locais para que permitisse a exploração racional e econômica dos recursos naturais, nem tampouco técnicos especializados para perfurações dos poços, o que levou à má utilização de recursos públicos e privados. Após a implantação de regras governamentais, é liberada autorização de perfuração dos primeiros poços a atingir o Aquífero Guarani, e neste contexto, destacam-se as cidades de Presidente Prudente, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto (BORGUETTI et al., 2004, DAEE, 2011b).

Com o crescimento urbano, destituído de um planejamento, surgem habitações

subnormais, denominados loteamentos clandestinos que, habitualmente, carecem de infraestrutura relacionada ao saneamento básico. Dada a esta irregularidade, seguem-se outras, comprometendo a saúde da população que ali reside, a saber: perfuração irregular de poços, ausência de procedimentos de rotina para avaliação da qualidade da água, bem como da investigação dos recursos de implantação (canos perfurados, proximidade com esgoto etc.) (FREITAS, 2000).

Como resultante, tem-se água para consumo humano, contaminada e saúde da população comprometida. Reforça-se aqui, a obrigatoriedade de supervisão destas áreas pelos órgãos públicos, para posterior liberação de licenças e aprovação de obras para infraestrutura (FREITAS, 2000).

1.3 ÁGUA E FUNGOS

A potabilidade da água está relacionada principalmente aos padrões microbiológicos, uma vez que patógenos como algas, bactérias, helmintos, protozoários, vírus e fungos, quando presentes, são prejudiciais à saúde (BARRETO, 2009; BRASIL, 2011; INGERSON-MAHAR; REID; 2012; MACÊDO, 2000; SIQUEIRA et al., 2010). No entanto, segundo a Portaria MS/GM nº 2.914, para qualificação da água, tais padrões valorizam apenas a ocorrência de alguns grupos bacterianos (BRASIL, 2011).

Nas últimas décadas, o encontro de fungos em água tem recebido maior atenção como contaminante de água hospitalar ou de consumo humano. Por serem ubíquos, quando presentes na água podem disseminar os propágulos aos diversos nichos ecológicos e a partir destes contaminarem superfícies, animais e humanos (ANAISSIE et al., 2003; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009). De fato, vários estudos demonstraram a ocorrência de fungos em água potável, em sistema de distribuição, unidades de diálise, tanques de armazenamento de água hospitalar, de torneiras e chuveiros presentes em hospitais (DEFRA, 2011; FIGEL, 2011, WARRIS, et al. 2010).

Os ambientes aquáticos favorecem a sobrevivência dos fungos, uma vez que em condições ideais de nutrientes e físico-químicas: pH, temperatura, umidade, os fungos são capazes de se reproduzirem (KASPRZYK, 2008). E como consequência, redes de conexão, reservatórios, caixa d'água, torneiras e chuveiros, superfícies animadas ou inanimadas, podem albergar diferentes espécies, o que torna esta via, potencial transmissora de doenças

(ANAISSE, et al., 2002; ANAISSE; COSTA, 2001; BITTON, 2005; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; LATGÉ; STEINBACH, 2009; TOTHOVA; MOGONOVA; FRANKOVA, 2001; WARRIS, et al., 2001; WARRIS, et al. 2003).

A relação de fungos com o homem, muitas vezes é prejudicial. Assim, o espectro clínico das infecções fúngicas é bastante variável: superficiais, subcutâneas, sistêmicas ou oportunistas, com padrões leves, graves até mortais. Em paralelo, outros acometimentos podem surgir: alergias e intoxicações (HAGESKAL; LIMA, SKAAR, 2009 SOMENZI; RIBEIRO; MENEZES, 2006).

Valorizados os padrões biológicos dos micro-organismos, muitos se qualificam como patógenos primários, acarretando severos problemas, já que produzem vários fatores de virulência. Outros, dada à debilidade imunológica do hospedeiro (homem e animais), se identificam como oportunistas (CASTRO et al. 2006; GIRMENIA, et al. 2006)

Diversos ambientes, inclusive a água podem se constituir como principal via de aquisição. Uma vez presentes na água, os esporos de fungos filamentosos podem ser inalados pelos indivíduos se instalando no trato respiratório causando infecções na face e pulmões, e, sequencialmente outros órgãos são acometidos: cérebro, fígado, rins, etc. (CARENZI, et al., 2011). De fato, aspergilose broncopulmonar, sinusite alérgica, pneumonia, irritação das mucosas, representam as entidades clínicas mais comuns. Destaca-se aqui, prevalência para os fungos filamentosos: *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*. (CÁRDENAS; CORTES; PARRA, 2008; KANZLER et al., 2008; KUMAR, et al., 2005; REICHENBERGER, et al., 2002; VOJDANI et al., 2003).

Em relação aos fungos leveduriformes, diversas espécies de *Candida* vêm sendo descritas como mais comum etiologia de doenças fúngicas em humanos e animais. Este evento traz *Candida albicans* e não *albicans* como micro-organismos prevalentes em micoses superficiais, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas (JAWETZ; MELNCICK; ADELBERG, 2009; MADIGAN, et al, 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Após a ingestão de água com leveduras, e subsequente presença no sistema gastrointestinal, estas, por translocação atingem a corrente sanguínea, disseminando-se para outros órgãos. Esta condição clínica é mais grave se presente em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, ou que tenha alguma outra doença de base que comprometa o sistema imunológico (FRIDKIN; JARVIS, 1996; KOH, et al., 2008).

Não menos importante, a referência de outros gêneros e espécies fúngicas representarem potencial risco à saúde, considerados os fatores de virulência dos fungos ou a

debilidade imunológica do hospedeiro (CASTRO et al. 2006; GIRMENIA, et al. 2006; HAGESKAL; LIMA, SKAAR, 2009).

Além destas severidades, alguns fungos são capazes de formar biofilmes, polímeros extracelulares que favorecem a aderência a diversos tipos de superfícies. Neste sistema especializado, os fungos têm maior resistência aos produtos de desinfecção, e vivos, liberam seus produtos metabólicos secundários (micotoxinas, antimicrobianos etc.) comprometendo a qualidade da água, tornando-se um problema de saúde pública (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; KELLEY et al. 2003; PERKINS, et al., 2009).

1.4 FUNGOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Nos últimos anos cresce a ocorrência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados abusivamente na prática clínica para o controle das infecções (COSTA, 2006; GARCÍA-MARTOS, et al., 2001; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, et al., 2012; NUNES, et al., 2011; SANTOS, et al., 2009). Quando o paciente apresenta características clínicas particulares, o uso da terapia empírica é universalmente aceito, antes do diagnóstico adequado. O uso de antimicrobianos de espectro estendido constante e de forma inadequada tem levado à seleção de cepas resistentes, o que agrava o controle das infecções microbianas (JÚNIOR, 2008).

Diversos alvos de ação antifúngica são descritos na literatura científica: inibição da síntese de parede celular, membrana, síntese protéica etc.. No entanto, a maioria dos antifúngicos atua impedindo a formação da biossíntese de ergosterol, que é o principal esterol da membrana celular dos fungos. Conhecidos como azólicos, representados por itraconazol, fluconazol, cetoconazol, entre outros, são normalmente eficazes contra uma grande diversidade de fungos patogênicos, bem tolerados no organismo, e assim, considerados a classe de antifúngicos mais utilizados (COWEN, 2008).

De baixa toxicidade, o itraconazol tem demonstrado resultados satisfatórios contra diversos tipos de fungos, principalmente para as espécies de *Candida*, sendo que na maioria dos casos a resistência dos isolados é pouco observada (CASTRO, et al., 2006; GAVALDA; RUIZ, 2003; MENEZES; MENDES; CUNHA, 2009; MÍMICA, et al. 2009). Em se tratando de fungos filamentosos, e à exceção do gênero *Aspergillus*, o itraconazol é o antifúngico mais usado depois de anfotericina B para o tratamento de infecções causadas por esses fungos

(MELLADO; CUENCA-ESTRELLA; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002; MOSQUERA; DENNING, 2002).

O fluconazol, por ter espectro estendido, é o principal fármaco utilizado no tratamento de infecções fúngicas causadas por leveduras oportunistas, entretanto, cepas resistentes a este azólico já foram descritas (ARAÚJO, et al., 2005; NOGUEIRA, 2012). Apresenta ação limitada contra fungos filamentosos: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.* e *Penicillium sp* (CARRILLO-MUÑOZ, 2006 ; CATALÁN-MONTEJO, 2006; CLSI, 2008b; SANTOS-JÚNIOR, et al., 2005; MELLADO; CUENCA-ESTRELLA; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002).

Em relação ao cetoconazol, apresenta amplo espectro de atividade frente a diversas espécies de *Candida*, sendo os casos de resistência raros (BRITO, et al., 2009; MANZANO-GAYOSSO, et al., 2011). Sua ação frente aos fungos filamentosos também é considerada limitada (CARRILLO-MUÑOZ, 2006; MELLADO; CUENCA-ESTRELLA; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002).

Considerado anfotericina B, antifúngico eficaz contra a maioria das espécies fúngicas e, em especial ao gênero *Candida*, é altamente tóxico para o organismo e o fenótipo de resistência é evento raro (BATISTA, BIRMAN; CURY, 1999; CASTRO et al., 2006; GOMES, et al., 2010; MENEZES, MENDES, CUNHA, 2009). Recomenda-se seu uso como tratamento de aspergilose, zigomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, etc. (CATALÁN; MONTEJO, 2006; SEVERO; GUAZELLI; SEVERO, 2010). Entretanto, já foram descritas cepas resistentes de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* e *Fusarium sp* (BLUM, et al; 2008; THERESE, et al., 2006).

1.5 GENÉTICA MOLECULAR

A genética molecular vem sendo adotada como ferramenta diagnóstica em estudos epidemiológicos para identificação e correlação microbiana. Neste sentido, seguem-se vários métodos investigativos, alguns factíveis para rotina laboratorial: RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Embora uma variedade de estratégias da reação de PCR (*polimerase chain reaction*) tenha surgido, a RAPD caracteriza-se como o método mais popular de análise genética de fungos (CAIXETA, et al., 2006; PFALLER, 1990; SOLL, 2000).

Usando-se iniciadores aleatórios de aproximadamente 10 pares de base, o DNA do

genoma é alvo a ser amplificado. Diferentemente, a aplicação da técnica RFLP, fornece maior detalhamento da constituição genética, uma vez que permite reconhecer dentro das regiões amplificadas, subáreas do genoma, pós utilização de enzimas de restrição. Objetivando analisar o cariótipo, portanto, fragmentos maiores que constituem o genoma microbiano, a eletroforese em campo pulsado (PFGE) destaca-se como melhor ferramenta (BART-DELABESSE, et al. 1993; CAETANO-ANOLLES, 1993).

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A inexistência de protocolos no âmbito mundial que avaliem a qualidade da água quanto aos parâmetros micológicos, justifica a relevância deste estudo, uma vez que existe um potencial risco para doenças em humanos e animais, a partir desta origem.

A prática abusiva de abertura de poços em áreas urbanas e rurais, aliada a não regularização e supervisão dos mesmos frente aos órgãos governamentais, pode se constituir em um problema de saúde pública, uma vez que a partir destas fontes, muitas doenças infecciosas, alérgicas e intoxicações poderão surgir.

Nesse sentido, tornam-se necessárias pesquisas que avaliem a ocorrência, distribuição e a variedade de fungos em água de consumo humano, para posterior adoção de medidas de controle de sua disseminação.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a distribuição de espécies fúngicas na água de soluções alternativas (poços regulares e irregulares) do Município de São José do Rio Preto e correlacionar aos parâmetros físicos, químicos e biológicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e comparar as espécies fúngicas isoladas de poços regulares e irregulares;
- Correlacionar a distribuição dos fungos com tipos de água (SAC ou SAI) e pontos de coleta;
- Correlacionar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água (pH, cor, turbidez, nitrato, cloro residual livre, temperatura, bactérias) com fungos;
- Correlacionar a presença de fungos com estações do ano e a ocorrência de chuvas;
- Estudar o fenótipo de susceptibilidade antimicrobiana de fungos leveduriformes e filamentosos;
- Investigar a ocorrência de tipos clonais de fungos leveduriformes por biologia molecular.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DA ÁGUA E FILTRAÇÃO

No período de setembro de 2011 a junho de 2012, 159 amostras de água foram coletadas: 52 coletas de poços regulares (com cadastro junto ao Sistema de Vigilância Sanitária) e 107 coletas de poços irregulares (sem cadastro).

Após fluxo contínuo de escoamento de água, 500 ml foram coletados e encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto para as análises físico-químicas: cor, turbidez e nitrato, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2005). O pH, cloro residual livre e a temperatura foram medidos no momento da coleta pelos profissionais da Vigilância Sanitária.

Paralelamente, 500 ml da mesma amostra de água foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) para as análises micológicas. Seguiu-se o transporte da água em caixas isotérmicas, de acordo com método internacional *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (2012). Para filtração da mesma, utilizaram-se membranas de celulose de 0,45µm de poro e 47 mm de diâmetro, com subsequente colocação na superfície de meio de cultura Ágar Sabouraud OXOID® e Mycobiotic ACUMEDIA®, mantendo-se a temperatura 30°C por 15 dias de incubação (LACAZ, et al. 2002).

Após o crescimento dos fungos, foram selecionadas todas as colônias distintas morfológicamente e quando idênticas, apenas um isolado foi considerado.

Dados de origem da água (SAC ou SAI), ponto de coleta (cavalete, ponto de consumo e direto do poço), presença de bactérias, estações do ano e presença de chuvas nas 24 horas antecedentes a coleta de cada amostra foram registrados.

Todas as amostras de água são de origem subterrânea, entretanto foram coletadas amostras em ponto de consumo superficiais.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

4.2.1 Características morfológicas

As espécies foram identificadas inicialmente segundo os critérios macromorfológicos: seca, úmida, mucóide, sem relevo, presença ou não de pigmento e micromorfológicos: presença de pseudo-hifa e tubo germinativo. Paralelamente padrões bioquímicos foram investigados após triagem estabelecida por CHROMagar *Candida* HIMEDIA® de acordo com Lacaz et al. (2002).

4.2.2 Microcultivo em Corn-Meal com Tween 80

A técnica é baseada no princípio de que a incubação das leveduras em meio Tween 80 sob baixa tensão de oxigênio estimula a produção de conídios e/ou pseudo-filamentação. Após o preparo do ágar fubá com Tween 80, distribuído em lâminas, a semeadura do fungo foi realizada com alça de platina estéril, em 3 estrias paralelas sobre o ágar, de 4 a 4 cm de extensão e equidistantes de 3 a 4 mm umas das outras. As estrias foram recobertas na sua porção central, com lamínula esterilizada. Seguiu-se a incubação em câmara úmida a 30°C por tempo aproximado de 5 dias (LACAZ, et al. 2002).

4.2.3 Provas fisiológicas de identificação das leveduras

Para a identificação das leveduras seguiram-se as provas de assimilação das fontes de carbono e nitrogênio.

4.2.3.1 Teste de assimilação de diferentes fontes de carbono

O teste consiste na habilidade de uma levedura crescer aerobicamente na presença de carboidrato fornecido como única fonte de carbono. Para assimilação em meio sólido foi empregado ágar destituído de qualquer fonte de carbono, adicionado à suspensão da levedura e distribuído em placa. A positividade foi avaliada pela observação do halo de crescimento da levedura frente aos carboidratos: dextrose, galactose, trealose, xilose, lactose, sacarose, celebiose, inositol, melibiose, rafinose, dulcitol e maltose. Uma suspensão de levedura de

cultura recente (24 a 48 horas) foi preparada em 2 ml de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez de acordo com o padrão da escala de McFarland (5).

O meio Yeast Nitrogen Base, preparado de acordo com as normas do fabricante (0,5g de sulfato de magnésio heptahidratado-Synth; 1,0g de fosfato de magnésio monobásico-Merck; 20,0g de dextrose- Synth; 20,0g de ágar- Himedia e 1000 ml de água destilada) foi distribuído em tubos de 20 x 200 mm, contendo 30 ml do meio, a 4°C. No momento do uso, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 50°C em banho-maria. Após a estabilização da temperatura, 1,5 ml da suspensão da levedura foi adicionado ao meio e vertido em placa de Petri esterilizada (150 x 15 mm).

Após solidificar, a placa foi disposta sobre cartela-guia, com os nomes dos açúcares. As placas ficaram incubadas a 25-30°C, durante 24 a 48 horas e a leitura realizada após 48 horas, sendo a positividade observada através do surgimento de halo de crescimento, na área correspondente ao carboidrato assimilado. A dextrose foi utilizada como controle positivo para avaliar a viabilidade do inóculo da levedura (LACAZ, et al. 2002).

4.2.3.2 Teste de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio

A assimilação do nitrogênio permite que as leveduras cresçam aerobicamente na presença de um composto nitrogenado inorgânico fornecido como única fonte de nitrogênio, assim, o teste tem a capacidade de detectar a assimilação de diferentes fontes de nitrogênio para cada espécie.

Empregou-se ágar destituído de qualquer fonte de nitrogênio, adicionado da suspensão da levedura, e distribuído em placa. Após a solidificação, foram distribuídos os compostos nitrogenados: nitrato de potássio e peptona sobre o ágar. Preparou-se uma suspensão recente da levedura (24 a 48 horas) em 1 ml de água destilada esterilizada, ajustando-se posteriormente a turbidez, de acordo com o padrão número 5 da escala de McFarland. Para tal, o meio Yeast Carbon Base foi previamente preparado, de acordo com as normas do fabricante (0,5g de sulfato de magnésio heptahidratado-Synth; 1,0g de fosfato de potássio monobásico-Merck; 5,g de sulfato de amônio-Vetec; 20g de ágar-Himedia e 1000ml de água destilada) e armazenado em tubos de 20 x 200 mm, contendo 20 ml do meio, a 4°C.

No momento do uso, os tubos foram submetidos a uma temperatura de 50°C em banho-maria. Após a estabilização da temperatura, 1 ml da suspensão da levedura foi adicionado a 20 ml do meio e vertidos em placa de Petri de 90 x 15 mm esterilizada. Após

solidificação do meio, a placa ficou disposta sobre cartela-guia, onde pequenas alíquotas de fontes de nitrogênio foram distribuídas equidistantes sobre o ágar.

As placas foram incubadas a 25-30°C, durante 24 a 48 horas com leitura feita por meio de um halo de crescimento em torno das fontes nitrogenadas. A peptona foi utilizada como controle de crescimento do fungo (LACAZ, et al. 2002).

4.2.3.3 Identificação pelo ID 32C (BioMérieux)

O teste de identificação miniaturizado ID32C (BioMérieux) foi realizado nas amostras que não foram identificadas pelas provas descritas acima, com critérios de execução segundo o fabricante. Assim, após o cultivo de 24-48 horas em meio Ágar Sabouraud, colônias foram isoladas e adicionadas a uma ampola do meio de suspensão API® (2mL de solução salina 0,85%), com opacidade equivalente a escala 2 de McFarland. Transferiu-se 250µL desta suspensão para o meio de cultivo API® Meio C. Após homogeneização, foi adicionado 135µL desta suspensão em cada cúpula da galeria do ID 32C.

A galeria foi incubada em estufa de 29°C ± 2, por 72 horas, com leitura visual e, em paralelo, identificação através do programa apiwebTM da BioMérieux.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE FILAMENTOSOS

4.3.1 Características morfológicas

A identificação de fungos filamentosos inicia-se pela observação da morfologia da colônia como cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, seguida das características micromorfológicas (microcultivo) como: tipo de hifa (hialina ou demácea, septada ou cenocítica, forma, disposição) e morfologia dos esporos. O tempo de crescimento foi utilizado para identificação da espécie (LACAZ, et al, 2002).

4.4 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

4.4.1 Método de difusão em disco

As leveduras isoladas da água foram suspensas em solução salina até alcançar a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (inóculo de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL). O meio utilizado foi Mueller-Hinton (HIMEDIA ®) acrescido de 2% de glicose e $0,5 \mu\text{g/mL}$ de azul de metileno. Após preparo, o meio foi distribuído em placas de Petri de modo a formar uma camada de aproximadamente 4 mm. Os inóculos foram aplicados com swab e após 15 minutos de estabilidade, os discos (CECON ®), contendo os antifúngicos itraconazol 10mcg, fluconazol 25mcg, cetoconazol 50mcg e anfotericina B100mcg foram colocados na superfície do meio.

As placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24h e 48 horas. As cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas como controle: *C. glabrata* (2001), *C. parapsilosis* (22019), *C. tropicalis* (13803).

Os critérios de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistente, foram considerados conforme a Tabela 1, segundo o documento do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M44-A2 (CLSI, 2010).

Tabela 1 - Padrões de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistente segundo o protocolo M44-A2

Susceptibilidade	Antifúngicos – Difusão em Disco (mm)			
	Itraconazol	Fluconazol	Cetoconazol	Anfotericina B
Sensível	≥ 20	≥ 19	> 20	≥ 10
SDD	19 a 12	18 a 15	20 a 10	–
Resistente	≤ 11	≤ 14	< 10	< 10

SDD – sensível dose-dependente.

mm– milímetros

$\leq$ – menor ou igual a

$\geq$ – maior ou igual a

4.4.2 Método de microdiluição para leveduras

Os micro-organismos previamente identificados como sensíveis dose-dependentes e resistentes foram reavaliados por microdiluição em caldo, segundo o documento M27-A3 (CLSI, 2008a). Para tal, foi utilizado meio líquido RPMI-1640 (SIGMA ®) tamponado com ácido morfolopropileno sulfônico (MOPS; SIGMA®) e glicose 2%. As leveduras foram previamente subcultivadas em Ágar Sabouraud-Dextrose (OXOID ®) e incubadas por 24 horas a 35° C. A padronização dos inóculos foi realizada utilizando a escala 0,5 de MacFarland e ajuste no espectrofotômetro (Biospectro) em comprimento de onda de 530nm.

Os antifúngicos utilizados foram: anfotericina B (SIGMA®), cetoconazol (Janssen Pharmaceutica, Belgium®), fluconazol (PFIZER®) e itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Belgium®). As concentrações variaram de 0,25 a 128 µg/ml para o fluconazol e de 0,03 a 16 µg/ml para itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços (Cralplast) inoculando-se apenas um antifúngico por placa, da menor para a maior diluição.

As dez concentrações de cada antifúngico preparadas foram colocadas em sentido vertical na placa, nas colunas de 2 a 11. Cada coluna correspondeu a uma concentração diferente. As colunas 1 e 12 foram utilizadas como controle, a 1 controle de esterilidade e a 12, controle de crescimento. O inóculo foi dispensado na quantidade de 100 µl, nas colunas de 2 a 12. As placas foram agitadas em agitador de Micro Placas (MA 562 Marconi) e incubadas a 35°C por 24-48 horas. A leitura foi realizada através do leitor ELISA (Labtech LT-4000 Microplate Reader).

As cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas como controle: *C. glabrata* (2001), *C. parapsilosis* (22019), *C. tropicalis* (13803). Os critérios de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistente, foram considerados conforme a Tabela 2, segundo o documento M27-A3 do CLSI 2008a.

Tabela 2 – Padrões de corte para definição de sensível, sensível dose dependente e resistente segundo o protocolo M27-A3

Susceptibilidade	Antifúngicos - CIMs (µg/ml)			
	Itraconazol	Fluconazol	Cetoconazol	Anfotericina B*
Sensível	≤ 0,125	≤ 8	≤ 0,125	<1
SDD	0,25 e 0,5	16 e 32	0,25 e 0,5	–
Resistente	≥ 1	≥ 64	≥ 1	≥ 1

SDD – sensível dose-dependente.

µg/ml – micrograma por mililitro

≤ – menor ou igual a

≥ – maior ou igual a

* Anfotericina B não possui pontos de corte pelo documento CLSI, 2008. Será utilizado o critério de susceptibilidade segundo estudo de Klein; Ribeiro, 2006.

4.4.3 Método de microdiluição para fungos filamentosos

O documento M38-A2 (CLSI, 2008b) foi utilizado como ferramenta metodológica de investigação da susceptibilidade antifúngica. Após crescimento fúngico em ágar batata-dextrose (OXOID ®) por 7 dias para a maioria das espécies e para *Fusarium sp*, a incubação ocorreu de 48 a 72 horas, a 35° C, e, depois, até o sétimo dia, a temperatura de 25 a 28°C. Cobriu-se cada colônia com 1 mL de solução salina estéril 0,85% e uma suspensão foi preparada com movimentos delicados sobre a cultura (capela de Segurança biológica II-Pachane-Pa40). Para os inóculos de *Aspergillus sp*, adicionou-se subsequentemente uma gota (0,01mL) de Tween 20.

Após deposição das partículas mais pesadas no fundo do tubo (5 minutos), o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e mantido sob agitação constante por 15 segundos. As amostras foram ajustadas em espectrofotômetro (530 nm) e densidade de 0,09 a 0,11 (transmitância de 80-82%) para espécies de *Aspergillus* e *S. schenckii* e de 0,15 a 0,17 (transmitância de 68-70%) para as espécies de *Fusarium*, *P. boydii* e *R. arrhizus* (inóculo de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL). Submeteu-se este inóculo às placas de microdiluição com incubação a 35°C de 46 a 50 horas. A leitura foi feita visualmente e os padrões de corte para itraconazol e anfotericina B foram definidos de acordo com Espinel-Ingroff et al. (2007) como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de ponto de corte sugeridos para interpretação de testes de susceptibilidade de filamentosos

Susceptibilidade	Antifúngicos - CIMs (µg/ml)
------------------	-----------------------------

	Itraconazol	Anfotericina B
Sensível	≤ 1	≤ 1
SDD	2	2
Resistente	≥ 4	≥ 4

SDD – sensível dose-dependente.

$\mu\text{g/ml}$ – micrograma por mililitro

$\leq$ – menor ou igual a

$\geq$ – maior ou igual a

4.5 BIOLOGIA MOLECULAR

Para avaliação da ocorrência de clones, dentro do grupo de leveduras, a técnica de RAPD foi utilizada segundo protocolo descrito por Mariano et al. (2003) com adaptações.

4.5.1 Extração do DNA genômico para leveduras

Uma colônia isolada de cada espécie leveduriforme foi semeada em placa de ágar Sabouraud Dextrose e incubada por até 96 horas a 30°C e a extração de DNA ocorreu segundo protocolo de Bolano et al. (2001) com adaptações.

Todas as colônias foram transferidas para um tubo de microcentrífuga de 2 ml, contendo 500 μl de tampão de lise TENTs e em seguida, adicionou-se um volume de aproximadamente 200 μl de pérolas de vidro (2 mm de diâmetro) e posteriormente foi acrescentado 500 μl de fenol e 500 μl de clorofórmio, respectivamente. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos para a obtenção de uma solução homogênea, e, em seguida, centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Transferiu-se a fase superior a um novo tubo (2 ml), sendo adicionado 500 μl de etanol 100% (Merck gelado a -20°C). O DNA foi precipitado a -20°C overnight, com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos (temperatura ambiente).

Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi suspenso em 500 μl do tampão TE com RNase A (Fermentas; 10 mg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos em banho-maria (B.M. EV: 015). Procedeu-se com adição de 500 μl de fenol e 500 μl de clorofórmio, respectivamente. Nova centrifugação, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo (1,5 ml) previamente identificado e adicionado 20 μl de NaCl (5M), seguido por 500 μl

de etanol 100% (Merck gelado a -20°C). O DNA foi precipitado a -20°C por uma hora. Seguiu-se ao processo de centrifugação, onde o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 70% (Merck gelado a -20°C) centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 40 µl de tampão (TE).

Para analisar a pureza do DNA, foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda 260/280 nm (Biophotometer Eppendorf).

4.5.2 Técnica de RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

Para investigação dos polimorfismos, utilizou-se o iniciador constituído pela sequência é 5'-GATCAAGTCC-3', segundo Mariano et al. (2003) com adaptações. Do total de DNA, 40ng foi adicionado a 25µl da reação contendo 12,7µl de água Milli Q; 2,5µl do tampão KCL; 4µl de dNTP mix (1,25mM de cada dNTP); 3,5 de MgCl₂ a 25 mM; 0,5µl (50pmol) de *primer* B14; 0,13 µl de Tween 20 e 1 unidade de Taq DNA Polymerase (Fermentas) e 1µl de DNA (40ng) foi usado na reação para cada amostra.

O programa de amplificação das amostras seguiu-se com desnaturação a 94°C por 1 minuto, 45 ciclos sendo 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 40°C; 2 minutos a 72°C, uma extensão final de 10 minutos a 72°C. - Termociclador Bio Rad T 100TM Termo Cycler. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x, por 30 minutos a 100V e 150 minutos a 50V, corados com 2µl de brometo de etídio e comparados com o marcador molecular de bandas DNA Ladder de 1 Kb. Uma amostra de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como controle externo.

4.5.2.1 Interpretação dos dados de polimorfismos gerados pelo RAPD

As bandas de DNA foram visualizadas sob iluminação UV e a imagem do gel capturada pelo aparelho L-PIX – Loccus biotecnologia Molecular Imaging-Transilluminator. Os perfis obtidos para cada isolado foram comparados visualmente e analisados por dendrogramas pelo programa GEL COMPARE II versão 6.6 Bionumerics (*Applied Maths*, Kortrijk, Bélgica) de acordo com a similaridade de bandas. O Dice metric foi o método

estatístico escolhido para calcular a similaridade dos coeficientes de pares de amostras. Dendrogramas baseados numa matriz de distância de pares de DNA foram geradas pelo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic averages*) considerando uma tolerância de 2% para comparação das bandas (SOLL, 2000).

As amostras foram classificadas como idênticas (correlação de 100% de similaridade), altamente relacionadas (90%), moderadamente relacionadas (80%) e amostras não relacionadas (<70%) (SOLL, 2000).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas seguiram os testes qui-quadrado de Pearson; qui quadrado da distância de Hellinger, qui-quadrado da razão de máxima verossimilhança e teste de Fisher dependendo da necessidade de cada um para conclusão. Quando $p \leq 0,05$ foi considerada evidência de diferença estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

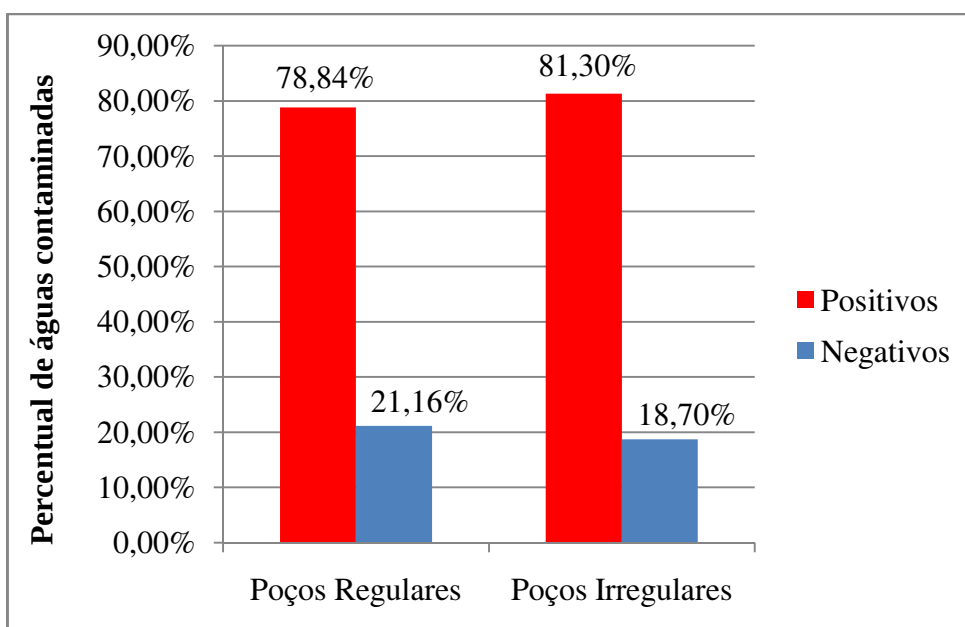
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-QUÍMICOS *VERSUS* FUNGOS

O encontro de fungos em água potável tem aumentado cada vez mais e chamado atenção dos consumidores, entretanto ainda não existem protocolos que avaliem níveis de esporos fúngicos em água para consumo humano (HAGESKAL, et al., 2008).

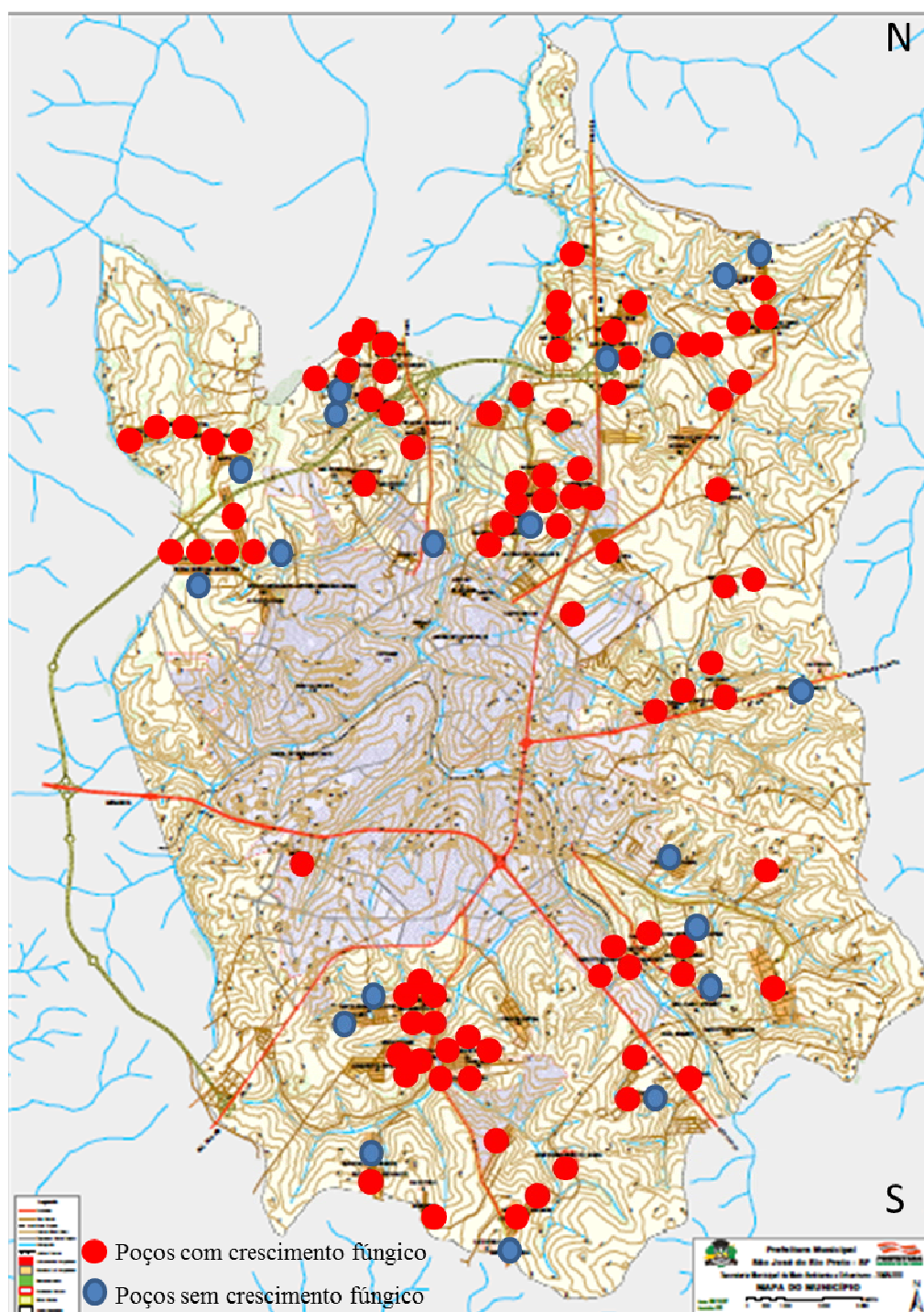
Na presente investigação foi possível observar que a contaminação fúngica ocorreu para a maioria das amostras investigadas (80%), oriundas de soluções alternativas coletivas e individuais. A análise parcial segundo origem – poços regulares e irregulares - revelou valores percentuais altos quanto à positividade de isolamento fúngico: 41 (78,84%) aos poços regulares e 87(81,30%) aos irregulares, como demonstrados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Percentual de águas contaminadas segundo a origem



A localização dos poços regulares e irregulares com e sem crescimento fúngico é demonstrada nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 4 - Representação gráfica da distribuição de poços de água irregulares de São José do Rio Preto e identificação quanto à positividade/negatividade de isolamento fúngico



Fonte: Prefeitura Municipal de São José do Rio Preto.

O controle do crescimento microbiano em sistemas de distribuição de água é essencial para limitar a disseminação de patógenos de veiculação hídrica. Embora, existam protocolos de políticas governamentais sobre abertura e supervisão de poços de água, a análise de fungos na água não é contemplada por nenhum deles.

A detecção de fungos oportunistas ou patógenos primários em água nesta pesquisa, independente da origem, regular ou irregular, ressalta a importância da implantação de novas medidas de controle microbiológico da água de consumo humano. De fato, apesar de poços regulares receberem supervisão periódica quanto à qualidade física e química da água, fica evidente que os parâmetros microbiológicos de qualidade de água não são satisfatórios, uma vez que os fungos ocorreram de modo significativo.

Embora sejam escassos os estudos epidemiológicos que documentem a ligação direta de doenças com sistemas de distribuição de água, os patógenos de veiculação hídrica são capazes de persistirem e reproduzirem neste nicho levando a ocorrência de infecções no trato gastrointestinal, pele, etc. (SZEQZYK, et al., 2000). Os dados da presente investigação apoiam esta afirmativa, uma vez que diversas espécies fúngicas (42 espécies), algumas patogênicas clássicas, foram prevalentes em diversas amostras de água como demonstrado na Tabela 4. É possível verificar a presença de 6 isolados leveduriformes e 47 filamentosos para poços regulares e 38 leveduras e 127 filamentosos para irregulares.

Tabela 4 - Distribuição de espécies fúngicas segundo origem da água

Espécies e gêneros identificados	n (%)	Poços regulares (%)	Poço irregular (%)
<i>Absidia</i> sp	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Acremonium hyalinum</i>	8 (3,66)	4 (7,54%)	4 (2,42)
<i>Acremonium potronii</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Alternaria</i> sp	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Aspergillus caesiellus</i>	2 (0,91%)	1 (1,88)	1 (0,60)
<i>Aspergillus candidus</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Aspergillus clavatus</i>	2 (0,91%)	-	2 (1,21)
<i>Aspergillus flavus</i>	4 (1,83)	1 (1,88)	3 (1,81)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	49 (22,47%)	28 (52,83)	21 (12,72)
<i>Aspergillus japonicus</i>	6 (2,75)	2 (3,77)	4 (2,42)
<i>Aspergillus penicillioides</i>	8 (3,66)	3 (5,66)	5 (3,03)
<i>Aspergillus versicolor</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	8 (3,66)	1 (1,88)	7 (4,24)
<i>Basidiobolus</i> sp	5 (2,29)	-	5 (3,03)
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	1 (0,45)	1 (1,88)	-
<i>Candida famata</i>	2 (0,91%)	-	2 (1,21)
<i>Candida glabrata</i>	2 (0,91%)	-	2 (1,21)
<i>Candida guilliermondii</i>	8 (3,66)	3 (5,66)	5 (3,03)
<i>Candida intermedia</i>	4 (1,83)	-	4 (2,42)
<i>Candida lusitaneae</i>	2 (0,91%)	-	2 (1,21)
<i>Candida parapsilosis</i>	3 (1,37)	1 (1,88)	2 (1,21)
<i>Candida silvicola</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Candida tropicalis</i>	3 (1,37)	-	3 (1,81)
<i>Curvularia</i> sp	4 (1,83)	1 (1,88)	3 (1,81)
<i>Fusarium sacchari</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Fusarium hyalinum</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)

Continuação da Tabela 4 - Distribuição de espécies fúngicas segundo origem da água

Espécies e gêneros identificados	n (%)	Poços regulares (%)	Poço irregular (%)
<i>Fusarium incarnatum</i>	7 (3,21)	1 (1,88)	6 (3,63)
<i>Fusarium solani</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Kodamae ohmeri</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Micélio estéril</i>	13 (5,96)	2 (3,77)	11 (6,66)
<i>Mucor sp</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Paecilomyces marquandii</i>	2 (0,91%)	1 (1,88)	1 (0,60)
<i>Penicillium citrinum</i>	4 (1,83)	-	4 (2,42)
<i>Penicillium commune</i>	19 (8,71%)	-	19 (11,5)
<i>Penicillium decumbens</i>	8 (3,66)	-	8 (4,84)
<i>Penicillium expansum</i>	7 (3,21)	1 (1,88)	6 (3,63)
<i>Penicillium lilacinus</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Penicillium marneffei</i>	2 (0,91%)	2 (3,77)	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	3 (1,37)	-	3 (1,81)
<i>Penicillium spinulosum</i>	4 (1,83)	-	4 (2,42)
<i>Penicillium verruculosum</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Rhodotorula minuta</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Scedosporium dehoogii</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Scytalidium hyalinum</i>	3 (1,37)	-	3 (1,81)
<i>Trichoderma sp</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
<i>Trichosporon asahii</i>	4 (1,83)	-	4 (2,42)
<i>Trichosporon mucoides</i>	2 (0,91%)	-	2 (1,21)
<i>Zygosaccharomyces sp</i>	1 (0,45)	-	1 (0,60)
Total	218	53	165

O encontro de fungos em água foi demonstrado previamente por outros estudos cuja origem das amostras foi variável: bebedouros, água de hemodiálises, de instalações hospitalares, potável e de esgoto doméstico (HAGESKAL, et al., 2006, LEAL et al., 2010, PIRES-GONÇALVES, et al., 2008; SESSEGOLO et al., 2011; VARO et al., 2007).

Corroborando com estes dados, a detecção de espécies de fungo nas águas localizadas superficialmente nos poços pode estar relacionada com fontes externas de contaminação, como ar, insetos, solo e até ao inadequado estado de conservação dos sistemas de canalização que chegam ao consumidor final (COSTA, 2010).

A persistência e crescimento de patógenos na água é uma preocupação central em sistemas de distribuição de água. Por exemplo, as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos prevalentes nesta investigação independente de sua origem, já foram previamente descritas em estudos de caracterização fenotípica e genotípica, revelando alto potencial patogênico (REMENTERIA et al., 2005). Ainda, ponderada a espécie mais comum, *Aspergillus fumigatus*, uma ampla variedade de doenças podem concorrer: micotoxicose, reações alérgicas e doenças sistêmicas com altas taxas de mortalidade (CÁRDENAS; CORTES; PARRA, 2008; REICHENBERGER, et al., 2002; VOJDANI et al., 2003).

Portanto, fica explícita a necessidade de revisão dos documentos formais sobre qualidade microbiológica da água, sugerindo a inclusão de métodos diagnósticos para fungos.

Adicionalmente, nova atenção deve ser dada para elevado número de espécies de *Penicillium* isoladas no estudo atual (9), representada como prevalente: *Penicillium commune*, em águas de poços irregulares. No trabalho de Hageskal, et al. (2006), *Penicillium sp* representou o grupo dominante em água, com destaque à habilidade para formação de biofilme, evento descrito previamente por Doggett et al. (2000).

É conhecido que fungos do gênero *Aspergillus* possuam maior adaptação aos ambientes de alta umidade, e ao *Penicillium*, a capacidade de sobreviver em águas tratadas (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD; 2000). Aí permanecendo, aumentam a chance para formação de biofilme, e consequentemente, a sua manutenção em superfícies inertes. Embora neste estudo, *Penicillium commune*, tenha sido segunda espécie de maior ocorrência (poços irregulares), não há relatos na literatura de isolados desta espécie em água de consumo humano.

Nesta pesquisa, não menos importante, a distribuição de outras espécies de fungos filamentosos em águas, não exclui sua participação como potencial etiologia das doenças infecciosas em humanos e animais, evento também descrito nos estudos de Leal et al. (2010), Pereira et al. (2010) e Quadros et al. (2009). Assim, tanto para poços cadastrados ou não,

espécies ubíquas de água, ar, solo etc. foram aqui reveladas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus japonicus*, *Curvularia sp*, *Alternaria sp*, *Acremonium sp*, *Fusarium sp*, *Paecilomyces sp*, *Penicillium expansum* e Micélio estéril. Além disso, fontes hídricas, de proximidade aos diferentes nichos ecológicos contaminados, podem receber propágulos fúngicos dispersos por vetores, como insetos ou outros animais (ANAISSIE et al., 2003; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; LACAZ et al., 2002; MENEZES; CARVALHO; TRINDADE, 2006; VECCHIA; CASTILHO-FORTES, 2007).

Embora, em episódios menores, a diversidade de espécies de leveduras, aqui observada, corrobora com dados obtidos por pesquisadores europeus. Estas investigações comprovaram que diversas fontes de água na França, de origem potável clorada, apresentaram mais de 50% de leveduras, com destaque ao gênero *Candida* (HINZELIN; BLOCK, 1985). Ainda que os estudos de Costa (2010) e Figel et al. (2011) tenham sido conduzidos de origem hídrica distinta, os valores percentuais de isolamento de leveduras foram semelhantes aos da pesquisa atual. Mesmo assim, destaca-se pelo presente estudo que a água dos poços cadastrados e não cadastrados apresentaram positividade para fungos filamentosos e leveduras: 39 e 4 aos primeiros e 80 e 27 aos últimos, respectivamente.

A detecção de *Aureobasidium pullulans* em água de ambos os poços, corrobora com o resultado do estudo de Costa (2010). Comprova-se ainda, pelo estudo de Rosenzweig, Minnigh, Pipes (1983, 1986) que algumas espécies de leveduras apresentam relativa resistência à inativação e sobrevivência frente ao cloro. Esta sobrevivência pode levar a acumulação em sistemas de distribuição de água. Esta espécie fúngica é encontrada em diversos nichos ambientais, o que favorece seu achado em fontes hídricas (ANDERSEN et al., 2011).

Paralelamente, frente à espécie *C. guilliermondii*, descrita previamente a partir de água potável de creches e asilos (NUNZIO; YAMAGUCHI; 2010), no atual estudo, este achado foi comum, independente de sua origem, o que revela potencial risco à saúde. Dessa forma, pode-se perceber a presença destes fungos na água de diversas origens.

A tabela 5 demonstra o número de coletas segundo tipo de água, poços, pontos de coleta e positividade de crescimento fúngico.

Tabela 5 - Tipo de água segundo origem, poços, pontos de coleta e crescimento fúngico

	SAC						SAI					
	PR			PI			PR			PI		
	PC	CA	DP	PC	CA	DP	PC	CA	DP	PC	CA	DP
Número de amostras coletadas	36	15	0	16	54	1	1	0	0	31	5	0
Amostras com crescimento fúngico	27	13	0	15	43	1	1	0	0	24	4	0

SAC: Solução Alternativa Coletiva; SAI: Solução Alternativa Individual; PR: poços regulares; PI: poços irregulares; PC: ponto de consumo; CA: cavalete; DP: direto do poço

Águas de solução alternativa coletiva (SAC) e individual (SAI) apresentam-se como potencial fonte de aquisição e disseminação de fungos para população, Tabela 5. Se irregulares, as instalações, muitas vezes são precárias, a inexistência de protocolos de manutenção e o manuseio dos reservatórios perante os responsáveis (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2005), aumentam a contaminação. No entanto, valoriza-se a maior distribuição de fungos quando as amostras de água foram originárias de pontos de consumo e cavaletes.

Na atual investigação, a presença de *Aspergillus fumigatus*, foi maior em águas de poços regulares ou irregulares nos SACs ($p=0,02$), e para *A. pullulans* de mesma origem, porém somente aos irregulares ($p=0,043$).

Em relação a SAI, essa forma de abastecimento, na maioria das vezes, pode apresentar risco à saúde da população que consome esta água, dado a ausência de um responsável técnico e de controle de qualidade da mesma (SILVA, 2009). Aqui, as leveduras representaram grupo microbiano prevalente nesses sistemas ($p=0,05$) em ambos os poços.

Considerado o trajeto de distribuição de água a partir de poços (SAC e SAI), seguem os reservatórios, torneiras e até cavaletes. De fato, os micro-organismos presentes em água de poços ou nos reservatórios, contaminam a tubulação, chegando imprópria para o consumo nos cavaletes dos domicílios (LEAL, et al., 2010; SESSEGOLO, et al., 2011). Diferença estatística significativa ($p=0,042$) foi observada para *C. guilliermondii*, sendo que sua presença marcante ocorreu no ponto de consumo de ambos os poços. Já, para *A. fumigatus* (poço irregular), seu isolamento foi determinante em cavaletes ($p=0,037$). Os fungos presentes no solo e no ar podem entrar em contato com a água de poços durante sua construção, quando elaborada sem critérios técnicos (MACHADO, 2006).

Não somente esta etapa seja crítica, mas as torneiras ou cavaletes contaminados com micro-organismos podem constituir-se como fonte de doença infecciosa ou intoxicação.

Reitera-se a afirmativa de que, a limpeza contínua dos pontos de consumo, como torneiras e chuveiros, deva compor a rotina de higienização doméstica, evitando assim o estabelecimento e formação de biofilme.

Verifica-se que a ocorrência de fungos em vários locais, pois estes no decurso da evolução foram capazes de explorar uma grande variedade de habitats. Espécies diferentes, portanto, exigem diferentes condições de crescimento ideal. O modo como os fatores físicos e químicos afetam o crescimento de fungos diferentes tem que ser considerado. A temperatura, a concentração de íons de hidrogénio (pH), a umidade e a luz são alguns dos parâmetros que têm de ser mantidos e controlados (CARLILE, WATKISON; GOODAY, 2001; CHANG; MILES, 2004).

A Tabela 6 demonstra o número de amostras dos padrões físico-químicos dentro e fora dos limites estabelecido pela Portaria nº 2.914/11 e o crescimento fúngico quando os valores apresentaram-se dentro do limite. Os correspondentes valores de cada variável estudada estão presentes nos Anexos 1 e 2.

Tabela 6 - Padrões físico-químicos e crescimento fúngico em amostras com valores dentro do limite estabelecido pela Portaria nº 2.914/11

		Amostras fora do limite		Amostras dentro do limite		Crescimento fúngico em amostras dentro do limite	
		PR	PI	PR	PI	PR	PI
Padrões físico-químicos	pH	2	0	50	107	39	87
	Cor	6	26	46	81	36	69
	Turbidez	3	4	49	103	39	84
	Nitrato	8	5	44	102	34	83
	Cloro	26	107	26	0	20	0

PR: poços regulares, PI: poços irregulares

É provável que sendo satisfeitos os requisitos nutricionais, a maioria dos fungos se desenvolva bem numa ampla gama de pH desde ácido até à neutralidade, por exemplo, pH 4-7. Alguns fungos, tais como os que produzem ácidos orgânicos, são capazes de tolerar mais condições de acidez (CARLILE, WATKISON; GOODAY, 2001; CHANG; MILES, 2004; KAVANAGH, 2005; LEONI, et al., 1999).

Segundo a Portaria nº 2.914/11 do Ministério da Saúde sobre parâmetros de qualidade de água de consumo humano a concentração hidrogeniônica (pH) deve estar nos limites de 6 a

9,5. No presente estudo, à exceção de apenas 2 amostras de poços regulares com pH fora do limite, a maioria apresenta crescimento fúngico, fato observado para as demais amostras dentro dos limites.

A dissolução de substâncias na água, principalmente de matéria orgânica é considerada outro parâmetro de qualidade da água com critérios estabelecidos pela Portaria nº 2.914 do Ministério da Saúde. De acordo com este documento, o valor máximo permitido de cor na água é de 15,0 mg Pt-Co/L (Miligramas de Platino-Cobalto por Litro). Paralelamente, a turbidez, parâmetro de aspecto estético de aceitação ou rejeição do produto, é a medição de resistência da água a passagem de luz provocada pela presença de partículas em suspensão na água, cujo valor máximo permitido é de 5,0 UT.

Tanto para cor quanto turbidez (Tabela 6), a maioria, dentro dos limites permitidos pela Portaria, independente da origem (regulares ou irregulares), apresentou crescimento fúngico. Mais uma vez adverte-se para a necessidade de criar inspeção periódica junto aos programas municipais ou estaduais no que tange a avaliação de águas de poços privados ou públicos. Ainda, a tubulação também pode interferir na alteração de cor e turbidez, sendo que, quando são liberados sais de ferro e manganês, estes são dissolvidos na água, elevando os valores destes parâmetros (BARCHA, 1998), o que traduz a falta de limpeza e manutenção dos poços (CASALI, 2008).

A assimilação do nitrato pelos fungos é o principal processo pelo qual o nitrogênio inorgânico é convertido à forma orgânica (MADIGAN, et al, 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O aumento da concentração de nitrato em águas subterrâneas pode significar proximidade com áreas de lançamento de esgoto em locais onde há falta de saneamento básico, como no caso dos loteamentos clandestinos (LOPES; CAVASOTTO, 2011; PEREIRA-RAMIREZ, et al., 2003; SILVA, et al., 2009). Em área urbana o excesso de nitrato também pode estar vinculado as regiões antigas da cidade onde as tubulações são mais velhas e em locais densamente habitados (BARCHA, 1998).

Na presente investigação, amostras de água de poços regulares e irregulares apresentam concentrações de nitrato fora do limite permitido, valor maior que 10mg/L, como demonstrado na Tabela 6. Diferenças estatísticas significantes ($p=0,001$) ocorreram para grupos de fungos leveduriformes em águas com padrões de nitrato acima do normal, evento esperado segundo características biológicas individuais. Aqui, também é possível observar crescimento fúngico mesmo com a maioria das amostras dentro do limite estabelecido pela Portaria.

Em relação a cloração, esta é o método mais usado na desinfecção da água para consumo humano (LAURENT, 2005). No presente estudo, foi possível observar que metade das amostras dos poços regulares estava com o cloro fora do limite estabelecido pela Portaria, sendo que, a exceção de uma, todas estava com cloro abaixo do permitido. Frente à água coletada de poços irregulares, todas apresentavam concentração de cloro residual livre abaixo do limite estabelecido (Tabela 6). A comparação de poços regulares quanto à supervisão da qualidade de água, revela a necessidade de adoção de alternativas mais eficazes de controle microbiano, e aos irregulares, dada ao excedente número de isolamento fúngico, o conhecimento e instituição de práticas de desinfecção da água.

Na água, sempre avaliado o tempo de exposição, componentes químicos (orgânicos, inorgânicos) e condições físicas (temperatura, pH, etc), interferem diretamente sobre o metabolismo das células microbianas (ROSENZWEIG; MINNIGH; PIPES, 1983; SAMMON et al., 2011). A sobrevivência microbiana está baseada na interação de uma ou mais variáveis acima citadas, e, além disso, tipo e concentração de substância antimicrobiana presente neste ambiente.

Neste estudo, mesmo em água previamente tratada com cloro, alguns fungos filamentosos foram prevalentes sobre os demais, como demonstrados na Tabela 4. Aqui, conceitos biológicos devem ser considerados, explicitando a resistência e a sobrevivência fúngica: estabelecimento de biofilme, concomitante liberação de metabólitos secundários com ação inibitória para alguns e indutores de crescimento para outros, presença de fatores de virulência que favoreçam a presença de grupos individuais, etc.(HAGESKAL et al., 2006; PEREIRA, et al., 2013; PERKINS, et al., 2009).

Corroborando com os estudos de Pereira et al. (2013), Rosenzweig, Minnigh e Pipes (1983), aqui também se comprova a maior resistência de *A. fumigatus* em água clorada, com diferença estatística significativa ($p=0,001$). Assim, nesses estudos de Rosenzweig, Minnigh, Pipes (1983) e Pereira (2013), *A. fumigatus* foi capaz de sobreviver numa concentração de 1,9mg/l e 1mg/l de cloro durante 60 minutos, respectivamente. No presente estudo, frente à espécie *P. commune* ($p=0,042$) e aos grupos leveduriformes ($p=0,006$), a ação inibitória do cloro ficou evidente. Ressalta-se a importância da cloração monitorada, que em alguns casos pode ser eficaz (LEAL, et al., 2010).

De todos os fatores que afetam o crescimento de fungos, a temperatura é certamente um dos mais importantes (COSTA, 2010). Os extremos de temperatura (máxima e mínima) são de grande relevância na determinação da sobrevivência e na distribuição das espécies de fungos na natureza. Temperaturas altas resultam numa inativação enzimática, com um efeito

resultante sobre o metabolismo e, conseqüentemente, sobre o crescimento (KAVANAGH, 2005; INGERSON-MAHAR; REID; 2012). Evento observado na presente pesquisa revelou que as temperaturas obtidas garantem a presença e sobrevivência fúngica (Tabela 7).

Tabela 7 - Média das temperaturas segundo origem dos poços

	Média das Temperaturas
Poços regulares	27,2°C
Poços irregulares	26,31°C

Embora neste estudo, não foi realizada a identificação e contagem de bactérias, sua detecção ocorreu como demonstrado na Tabela 8. Nas 30 amostras que cresceram apenas grupos bacterianos, o crescimento fúngico poderia ter ocorrido, uma vez que a presença de vários organismos num mesmo local pode levar a alterações na taxa de crescimento para ambos devido à competição por nutrientes e condições físico-químicas ideais (MADIGAN, et al., 2010).

Tabela 8 – Presença de bactérias e concomitância com fungos

	Amostras com crescimento bacteriano	Amostras com crescimento bacteriano e fúngico	Amostras apenas com crescimento bacteriano
Poços regulares	32	22	10
Poços irregulares	105	85	20
Total	137	107	30

Neste sentido, quando se comparam poços positivos e negativos para isolamento fúngico, em concomitante análise para bactérias, observa-se que ocorre maior isolamento aos primeiros, quando da ausência de bactérias ($p=0,042$). Valorizando-se características biológicas individuais, fica explícito que a interferência acima descrita para algumas espécies microbiana é positiva e para outras, negativa. Aqui, *A. fumigatus* (ambos os poços) ($p=0,001$) e leveduras (ambos os poços) ($p=0,005$) foram isoladas preferencialmente em água sem grupos bacterianos. Já, *P. commune* (poços irregulares) foi comum em água positiva para bactérias ($p=0,036$). Novamente estima-se que metabólitos secundários de alguns micro-organismos potencializam o desenvolvimento de outros.

Novamente, a falta de inspeção periódica da qualidade de água, bem como inexistência de protocolos de desinfecção, implica em sua maior contaminação. De fato, a falta de manutenção nos sistemas de distribuição e armazenamento de água aumenta os riscos de contaminação por substâncias que ficam suspensas na água, servindo de nutriente para diversos micro-organismos, como as bactérias (CASALI, 2008).

Ainda, a composição química dos tubos que se constitui como canais de distribuição de água podem favorecer o desenvolvimento de grupos bacterianos, pois se os elementos ferro, hidrogênio e fosfatos forem liberados, há promoção do crescimento microbiano, diferentemente ocorre quando a tubulação é composta por cobre, inibindo o crescimento de bactérias (INGERSON-MAHAR; REID; 2012).

Dado ao fato que as variações climáticas estejam fortemente associadas às comunidades de plantas, esta relação, muitas vezes, afeta a natural composição do solo: carbono, temperatura, água, etc.(KASPRZYK, 2008; WALDROP; FIRESTONE 2006). Assim como, as estações do ano também podem interferir na ocorrência de determinados grupos fúngicos. No presente estudo, as coletas foram feitas em diferentes estações do ano como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Coletas e positividade das amostras nas 4 estações do ano segundo origem dos poços

		Coletas			Positividade para fungos		
		PR	PI	Total	PR	PI	Total
Estações do ano	Inverno	3	5	8	0	5	5
	Outono	0	44	44	0	36	36
	Primavera	27	18	45	21	14	35
	Verão	22	40	62	20	32	52

PR: poços regulares, PI: poços irregulares

Os resultados mostraram diferença estatística significativa para os fungos filamentosos, no inverno ($p=0,006$). Dada à ampla ocorrência de fungos em diversos nichos ambientais, no inverno, o vento desempenha importante papel na dispersão de propágulos até as fontes de água (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2004). Embora, consideradas amostras de origem distinta, a detecção de fungos na água nos estudos de Sales et al. (2011) foi também maior no inverno.

Paralelamente, alterações na biomassa microbiana podem surgir em períodos quentes e úmidos, favorecidas pela adaptação e reprodução de espécies fúngicas, e subsequente

dispersão dos mesmo até a água da superfície dos poços (GALLARDO; SCHLESINGER, 1990). Neste sentido, diferenças metabólicas individuais justificam sobrevivência de alguns grupos microbianos em detrimento de morte a outros. De fato, nos estudos conduzidos por Mezzari (2005), Lobato; Vargas e Silveira (2009) e aqui, algumas espécies de fungos filamentosos foram prevalentes no verão, com destaque para *A. fumigatus* (ambos os poços) ($p=0,005$) e *Penicillium commune* (poços irregulares) ($p=0,007$).

Em relação aos fungos leveduriformes isolados de ambos os poços, o outono se destacou como estação de maior identidade com presença fúngica ($p=0,007$), dado discordante com alguns estudos (LEITE, 2009; LOBATO; VARGAS; SILVEIRA, 2009). Reforça-se aqui, que cada espécie apresenta variações metabólicas e fisiológicas facultando sua permanência e reprodução em diversos ambientes (FLORES; ONOFRE, 2010).

Assim como as estações do ano, a umidade é um fator ambiental importante no desenvolvimento dos fungos, pois estes necessitam da água para germinação e esporulação (EMBRAPA, 2009).

A Tabela 10 demonstra o número de coletas nos dias em que choveu e não choveu nas 24 horas antecedentes a coleta e a positividade das amostras. Comparados e analisados os parâmetros chuva *versus* espécie fúngica foi possível encontrar diferença estatística significativa ($p=0,04$) para espécie *A. fumigatus* isolado de ambos os poços. Neste sentido, quando não choveu, diminuiu a frequência de isolamento deste fungo nas amostras de água de ambos os poços.

De fato, de acordo com Samson; Hoekstra e Frisvad (2000), *A. fumigatus* possui maior adaptação para sobrevivência em ambientes de alta umidade. Quando os poços não são fechados corretamente, pode ocorrer da água da chuva entrar no poço trazendo organismos patogênicos e substâncias que favorecem o crescimento dos mesmos (FRANCO; BEUX, 2007).

Tabela 10 - Chuvas nas 24 horas antecedentes a coleta e positividade das amostras

Chuva nas 24 horas antecedente a coleta	Coletas			Amostras com crescimento fúngico		
	PR	PI	Total	PR	PI	Total
Não choveu	30	90	120	23	71	94
Choveu	22	17	39	18	16	34

PR: poços regulares, PI: poços irregulares

5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana frente ao itraconazol, fluconazol, cetoconazol e anfotericina B das espécies de leveduras e de fungos filamentosos foi variável, sendo sensível, sensível dose dependente e resistente, dados apresentados na Tabela 11 e 12 e nos Anexos 3 ao 6.

Tabela 11 - Perfil de susceptibilidade de leveduras de poços regulares e irregulares frente aos antifúngicos testados

	Antifúngicos Leveduras	Itraconazol			Fluconazol			Cetoconazol			Anfotericina B	
		S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	R
Poços Regulares (n=6)	<i>C. guilliermondii</i> (n=3)	-	-	3	2	1	-	3	-	-	3	-
	Demais espécies (n=3)	3	-	-	2	-	1	3	-	-	3	-
Poços Irregulares (n=38)	<i>A.pullulans</i> (n=7)	7	-	-	7	-	-	7	-	-	7	-
	<i>C.guilliermondii</i> (n=5)	-	-	5	5	-	-	5	-	-	5	-
	Demais espécies (n=26)	8	7	11	23	-	3	25	-	1	24	2

S: sensível; SDD: sensível dose-dependente; R: resistente

De acordo com Castro et al. (2006), o itraconazol possui atividade contra muitas espécies de *Candida*. Entretanto, no presente estudo, o evento de resistência foi observado para todos os isolados de *C. guilliermondii*, independente da origem (regular ou irregular). Para regulares, as demais, *A. pullulans*, *C. parapsilosis* e *B. capitatus* apresentaram sensibilidade.

Já, para as demais espécies dos poços irregulares 42,3% apresentaram isolados resistentes a este fármaco: *C.lusitaneae* (1), *T.asahii* (3), *C. tropicalis* (1), *C.glabrata* (1), *R. minuta* (1), *T.mucoides* (1), *C. intermedia* (2) e *C. silvicola* (1), com MICs entre 1 a >16µg/ml (Anexos 3 e 4). E em menor frequência, foi observado o perfil de sensível dose dependência e sensibilidade: 26,93% e 30,77%, respectivamente.

C. guilliermondii é uma das leveduras oportunistas mais frequentes em pacientes imunocomprometidos e com câncer (GIRMENIA, 2006), também isolada de água para

consumo humano de creches e asilos (MACÊDO, et al., 2009; NUNZIO; YAMAGUCHI, 2010). Ponderada esta mesma espécie, o perfil de resistência, aqui revelado, difere de diversos estudos, embora com isolados clínicos Klein (2006), Moreira (2012) e Neufeld et al. (2009).

A inexistência de relatos científicos sobre susceptibilidade de *A. pullulans*, a partir de fontes hídricas, obriga que um paralelo seja estabelecido, a partir de outras vias de aquisição. Assim, em sucos de fruta, ou isolados clínicos (onicomicose, fungemia), o fenótipo de sensibilidade ao itraconazol, foi comum (ARABATZIS, 2012; HAWKES, et al., 2005; MACIEL et al., 2013).

Diferentemente, variações de susceptibilidade a este composto azólico foram descritos para isolados de *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *R. minuta* *C. intermedia*, *T. mucoides* e *T. asahii* a partir de fontes diversas (CHAGAS-NETO et al., 2009; COSTA, 2006; DIAS, et al., 2007; GARCÍA-MARTOS, et al. 2001; MACIEL, et al., 2013; NUNES, et al., 2011; SANTOS, et al., 2009).

Dessa forma, pode-se observar que embora o itraconazol seja muito utilizado no controle de infecções fúngicas por ter baixa toxicidade e amplo espectro de ação, no presente estudo, valoriza-se a interpretação de susceptibilidade antimicrobiana desta espécie, dadas as mudanças aqui observadas (Tabela 11 e Anexos 3 e 4).

O fluconazol constitui-se como fármaco de boa ação contra fungos oportunistas como *C. neoformans* e a maioria das espécies de *Candida*, embora relatos de resistência tenham sido descritos (ARAÚJO, et al., 2005; COLOMBO, et al., 2002; NOGUEIRA, 2012). Foi possível observar que o fenótipo de resistência ocorreu em menor frequência quando comparado ao itraconazol, independente da origem dos isolados. Em poços regulares, a exceção de um isolado *B. capitatus* (16,6%), o fenótipo sensível ao fluconazol ocorreu majoritário. Aos irregulares, apenas 7,89% espécies foram resistentes: *R. minuta* (1), *T. mucoides* (1), *C. intermedia* (1).

A atual pesquisa corrobora com dados da literatura científica segundo baixa frequência de resistência para maioria das espécies aqui encontradas (COLOMBO, et al. 2002; HAWKES, et al. 2005; LIMA, et al., 2009; MANZANO-GAYOSSO, et al., 2011. WINGETER, et al. 2007). À exceção de *C. intermedia*, ressalta-se, aqui em concordância com a literatura científica, a diversidade de espécies fúngicas e padrões de susceptibilidade antimicrobianos mais comuns, e sua participação como etiologia de muitas doenças fúngicas oportunistas (GARCÍA-MARTOS, et al., 2001; JAWETZ; MELNCICK; ADELBERG, 2009;

JUNQUEIRA, et al., 2012; LACAZ, et al., 2002; MACIEL, et al., 2013; NETTLES, et al., 2003; RUAN, et al., 2010; SANCAK, et al., 2009).

Em relação a *T. mucoides*, causador de pneumonias e infecções superficiais (JAWETZ; MELNCICK; ADELBERG, 2009), resultados contrários ao do presente estudo foram encontrados nos trabalhos de García-Martos et al. (2001) e Nettles et al. (2003), entretanto, para *Rhodotorula minuta* que está associada a diversos tipos de infecções, em particular as micoses oculares, o perfil de resistência frente ao fluconazol é considerado um evento comum, corroborando com a atual investigação (GALAN-SÁNCHEZ, et al., 1999; GARCÍA-MARTOS, et al., 2001; LACAZ, et al., 2002).

Cetoconazol apresenta amplo espectro de atividade frente a diversas espécies de *Candida*, sendo os casos de resistência raros (BRITO, et al., 2009; MANZANO-GAYOSSO, et al., 2011). De acordo com alguns estudos (BRITO, et al., 2011, MANZANO-GAYOSSO, et al., 2011; SANTOS, et al., 2009) pode se observar, aqui, à exceção de 1(2,27%) isolado de *T. mucoides* (de poço irregular) que a atividade antimicrobiana deste imidazólico foi eficaz contra todas as leveduras, independente da origem.

Em relação ao poliênico anfotericina B, na atual pesquisa, apenas 2(4,54%) espécies originárias de poços irregulares foram resistentes: *T. mucoide* e *Rhodotorula minuta*. Independentemente da espécie, o raro fenótipo de resistência foi previamente descrito por outros investigadores (ANTUNES, et al., 2004; ARABATZIS, 2012; BATISTA, BIRMAN; CURY, 1999; CASTRO et al., 2006; GOMES, et al., 2010; MACIEL, et al., 2013; MENEZES, MENDES, CUNHA, 2009; WINGETER, et al., 2007).

Em relação aos fungos filamentosos, a condução terapêutica preferencial é ou itraconazol ou anfotericina B, embora constatada a presença de cepas resistentes a estes fármacos (MELLADO; CUENCA-ESTRELLA; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002; MOSQUERA; DENNING, 2002). A Tabela 12 e os Anexos 5 e 6 demonstram os resultados do perfil de susceptibilidade de fungos filamentosos frente aos antifúngicos testados.

Tabela 12 - Perfil de susceptibilidade de filamentosos de poços regulares e irregulares frente aos antifúngicos testados

	Antifúngicos Filamentosos	Itraconazol			Anfotericina B		
		S	SDD	R	S	SDD	R
Poços Regulares (n=39)	<i>A. fumigatus</i> (n=28)	8	13	7	28	-	-
	Demais espécies (n=11)	5	3	3	5	2	4
Poços Irregulares (n=101)	<i>A. fumigatus</i> (n=21)	7	8	6	21	-	-
	<i>P. commune</i> (n=17)	2	5	10	7	2	8
	Demais espécies (n=63)	19	13	31	42	4	17

S: sensível; SDD: sensível dose-dependente; R: resistente

Na presente análise, *Aspergillus fumigatus*, espécie prevalente em ambos os poços, apresentou perfil de susceptibilidade divergente ao itraconazol: aos regulares, a resistência ocorreu em 25%, sensibilidade dose dependência em 46,43% e sensibilidade 28,57%. Aos irregulares, 28,57%, 38,1% e 33,33%, respectivamente.

Para as demais espécies de filamentosos nos regulares pode-se observar que o percentual de resistência e sensibilidade dose dependente foi de 27,27% para cada um e aos irregulares, alto perfil de resistência foi observado frente a este azólico com 49,20% e sensibilidade dose dependência 20,64%.

Embora amostras de origens distintas a este trabalho, *A. fumigatus* revelou ser espécie mais comumente sensível ao itraconazol (CATALÁN-MONTEJO, 2006; CUENCA-ESTRELLA, 2010).

Dada à espécie *P. commune*, segundo filamento mais isolado dos poços irregulares, a resistência ocorreu em 58,82% dos isolados, 29,41% sensibilidade dose dependência e 11,77% sensíveis. São poucos os relatos na literatura científica sobre esta espécie, considerado seu potencial patogênico ao homem (SANTOS, et al. 2011; SARAIVA, et al., 1997) e, em paralelo, nenhuma descrição sobre o perfil de susceptibilidade, o que inviabiliza dados comparativos. No entanto, se considerado o gênero *Penicillium*, este é sensível ao itraconazol (CUENCA-ESTRELLA, et al., 2006; DIEKEMA, et al., 2003) dado divergente ao aqui revelado.

Anfotericina B é o antimicótico de maior espectro, tendo atividade tanto para grupos leveduriformes, quanto para filamentosos. Embora raros, já existem casos de resistência em *Aspergillus sp*, *Trichosporon sp* e *Paecilomyces sp* (CUENCA-ESTRELLA, 2010). Na atual pesquisa, independentemente da origem, todos os isolados de *Aspergillus fumigatus* foram sensíveis a este poliênico. Quanto às demais espécies de poços regulares, o evento de sensibilidade também foi alto: 45,46%.

Frente à *P. commune*, a resistência foi observada em 47,05% e sensibilidade dose dependência de 11,77%, evento não verificado para as demais espécies, no qual a maioria apresentou perfil de sensibilidade: 66,7%. Novamente, dados da literatura frente ao gênero, estão discordantes ao encontrado nesta pesquisa, ponderado o aspecto de sensibilidade à anfotericina B (DIEKEMA, et al., 2003; KUZUCU, et al., 2004; PFALLER, et al., 2002).

O espectro de ação de fluconazol e cetoconazol contra fungos filamentosos é limitado. Assim, frente à *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.* e *Penicillium sp.*, valores de concentração inibitória mínima, são altos (CARRILLO-MUÑOZ, 2006; CATALÁN-MONTEJO, 2006; CLSI, 2008b; MELLADO; CUENCA-ESTRELLA; RODRÍGUZ-TUDELA, 2002). Neste sentido, frente ao fluconazol, todas as amostras de ambos os poços, apresentaram valores de MIC >128 µg/ml. Em relação ao cetoconazol, valores menores de concentração inibitória mínima foram detectados quando comparados ao fluconazol com variação entre 0,03 a >16 µg/ml (Anexos 5 e 6).

No presente estudo, valoriza-se, em isolados fúngicos não clínicos, a dispersão de resistência antifúngica. Em água, este evento é relevante, uma vez que, em diversos segmentos da vida do ser humano e de animais, ela é essencial. Trata-se de um problema de saúde pública, pois a exposição destes patógenos ao homem, em especial aos imunocomprometidos, pode levar a doenças sem perspectiva terapêutica.

5.3 PERFIL GENOTÍPICO DAS LEVEDURAS

As figuras 5 a 12 apresentam os dendrogramas e respectiva imagem do gel para leveduras idênticas (correlação de 100% de similaridade), altamente relacionadas (90%), moderadamente relacionadas (80%) e não relacionadas (<70%).

Foi possível observar para *C. guilliermondii* a formação de 3 grupos clonais, com 100% de similaridade (poço irregular 55 e poço regular 20, poços irregulares 92 e 98, poços regulares 21 e 43). O grupo clonal poço irregular 55 e regular 20 está 89% relacionado com o

isolado 104, de origem irregular, Ainda, o isolado 38 (irregular) com 88,9% de identidade com 21 e 43, ambos de fonte regular (Figura 5). A formação de tipos clonais em amostras de poços irregulares e regulares, localizados em áreas distantes, sugere a disseminação microbiana a partir de fonte comum. Variações genéticas entre grupos clonais devem ser investigadas por outros métodos de biologia molecular, garantindo as informações.

Outros tipos de correlações genéticas ocorreram para a espécie *C. tropicalis*. Neste sentido, os isolados 63 e 93 de poços irregulares apresentaram baixa similaridade (76,9%), entre si e com o isolado 59 (irregular) (Figura 6).

Diferentemente, em relação às espécies *C. glabrata*, *C. intermedia* e *C. famata* não houve correlação genética (Figuras 7, 8 e 9). Considerada a espécie *C. lusitaniae* (18 e 104 de poços irregulares) grau moderado de similaridade foi detectado (80%) (Figura 10). Esses resultados indicam que as diversidades maiores ou menores, ocorram seja por pressão seletiva ou microevolução dentro de uma mesma espécie (COSTA, 2009; SOUZA, 2007).

Quanto à análise de *T. asahii* e *T. mucoides*, as de números 45 e 100 foram clonais de origem de poços irregulares, enquanto que as demais não demonstraram correlação genética (Figura 11).

Padrões genéticos similares (96% e 88,9%) foram observados para *C. parapsilosis* agrupando as amostras 20, 87 (de poços irregulares) e 43 (regular) (Figura 12), o que sugere novamente, origem hídrica comum. Fatores ambientais (temperatura, ação química etc.) podem alterar o genótipo dos micro-organismos gerando polimorfismos intraespecíficos (LEHMANN; LIN; LASKER, 1992; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2003).

Embora o método do RAPD possa ser utilizado para distinguir genótipos, como técnica isolada, nem sempre os resultados são coerentes. A adição de outras ferramentas de biologia molecular poderá garantir os achados.

Figura 5 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida guilliermondii*.

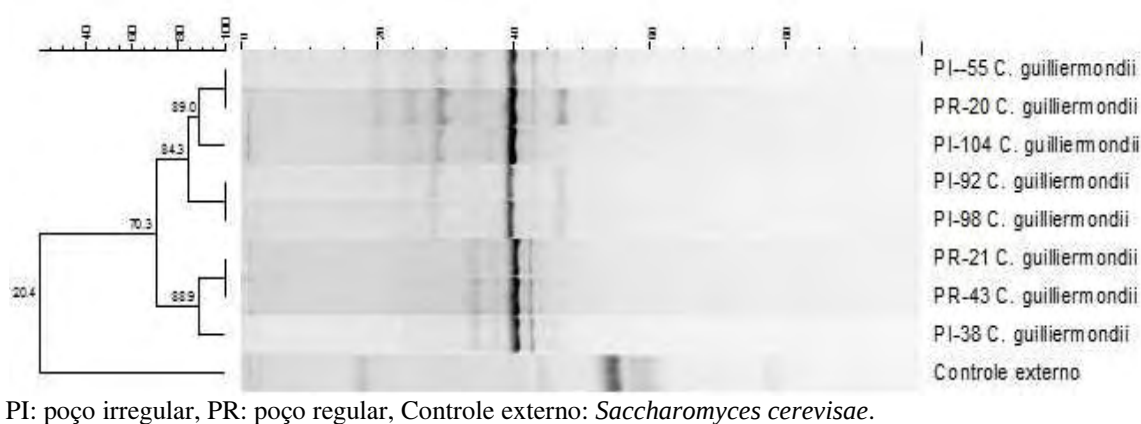


Figura 6 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida tropicalis*.

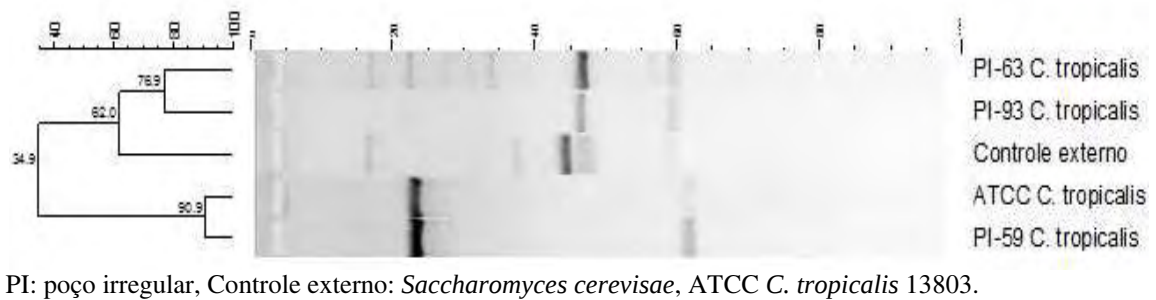


Figura 7 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida glabrata*.

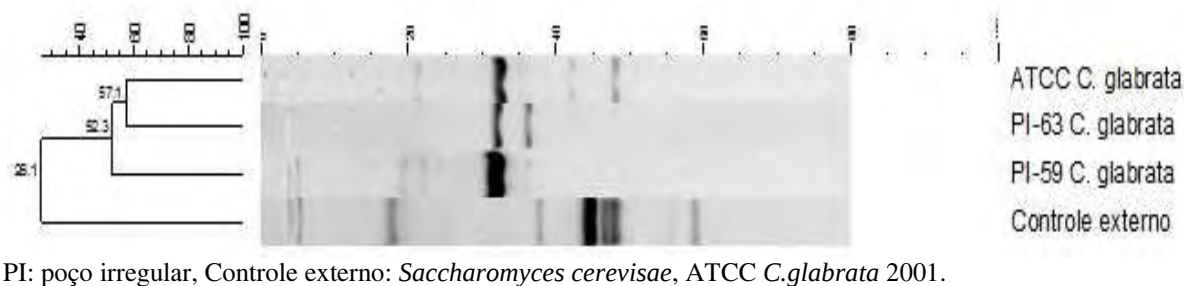


Figura 8 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida intermedia*.

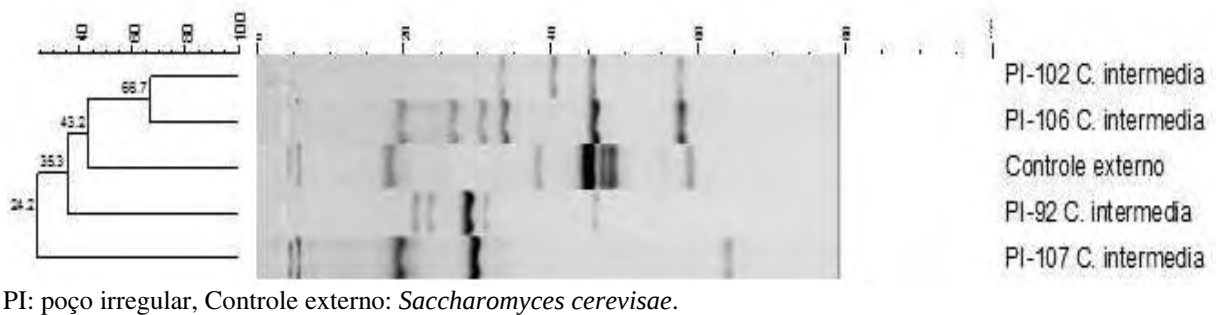


Figura 9 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida famata*.

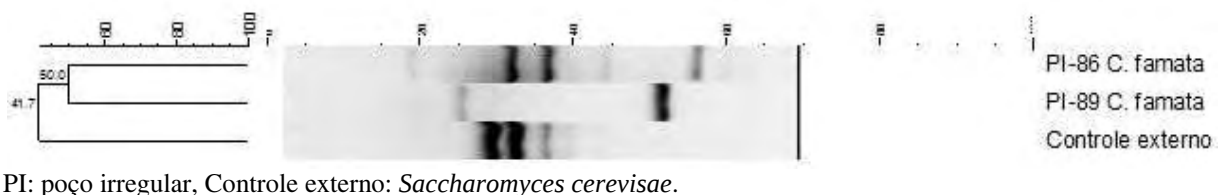


Figura 10 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida lusitanae*

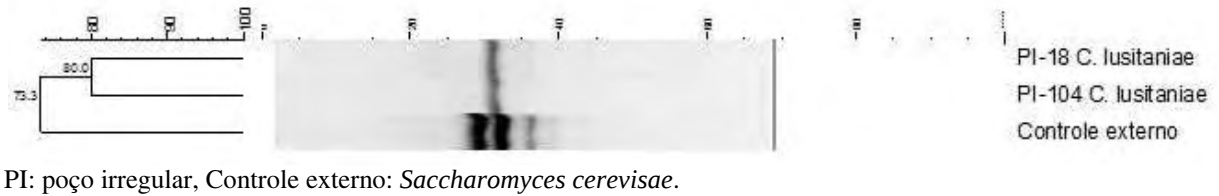


Figura 11 - Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *T. asahii* e *T. mucoides*.

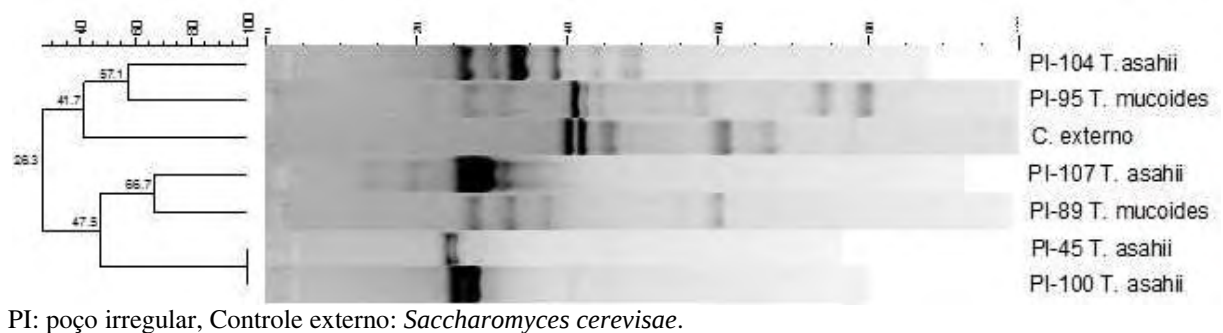
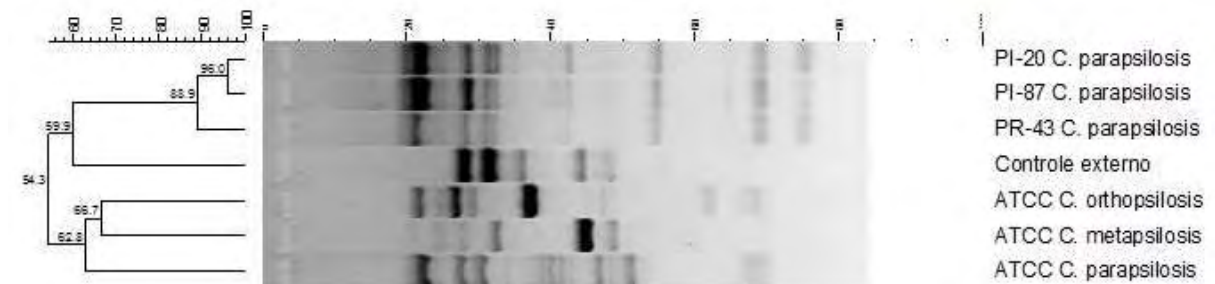


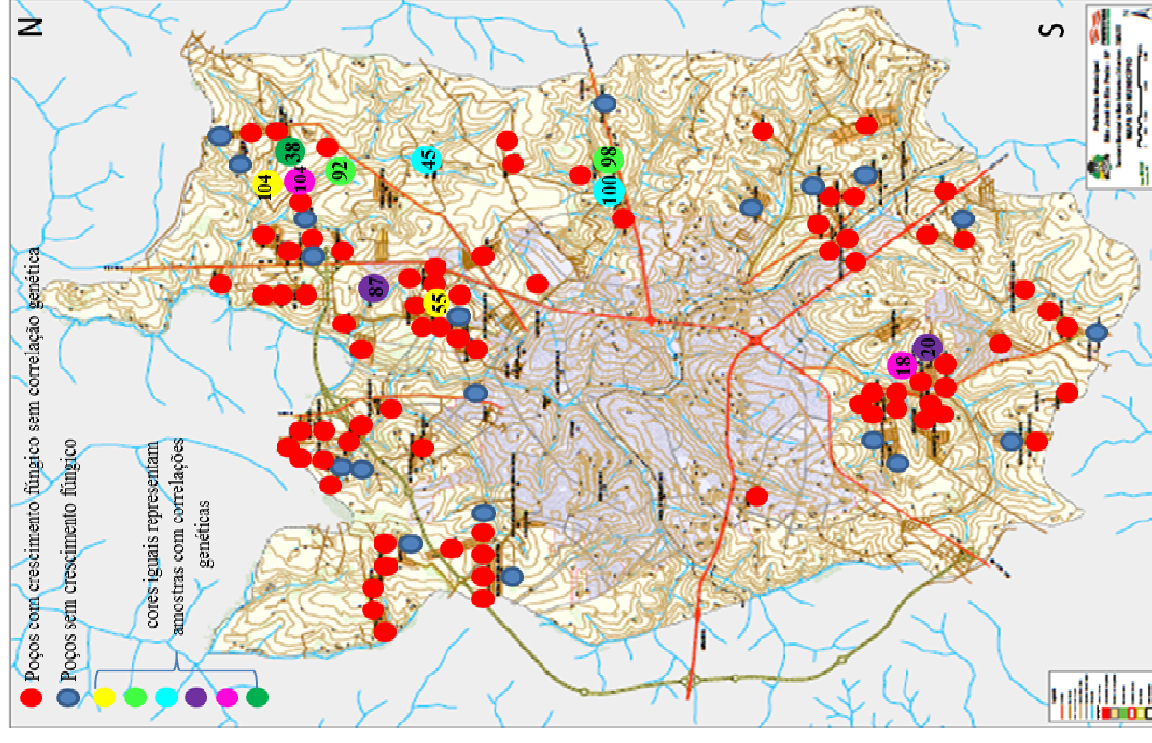
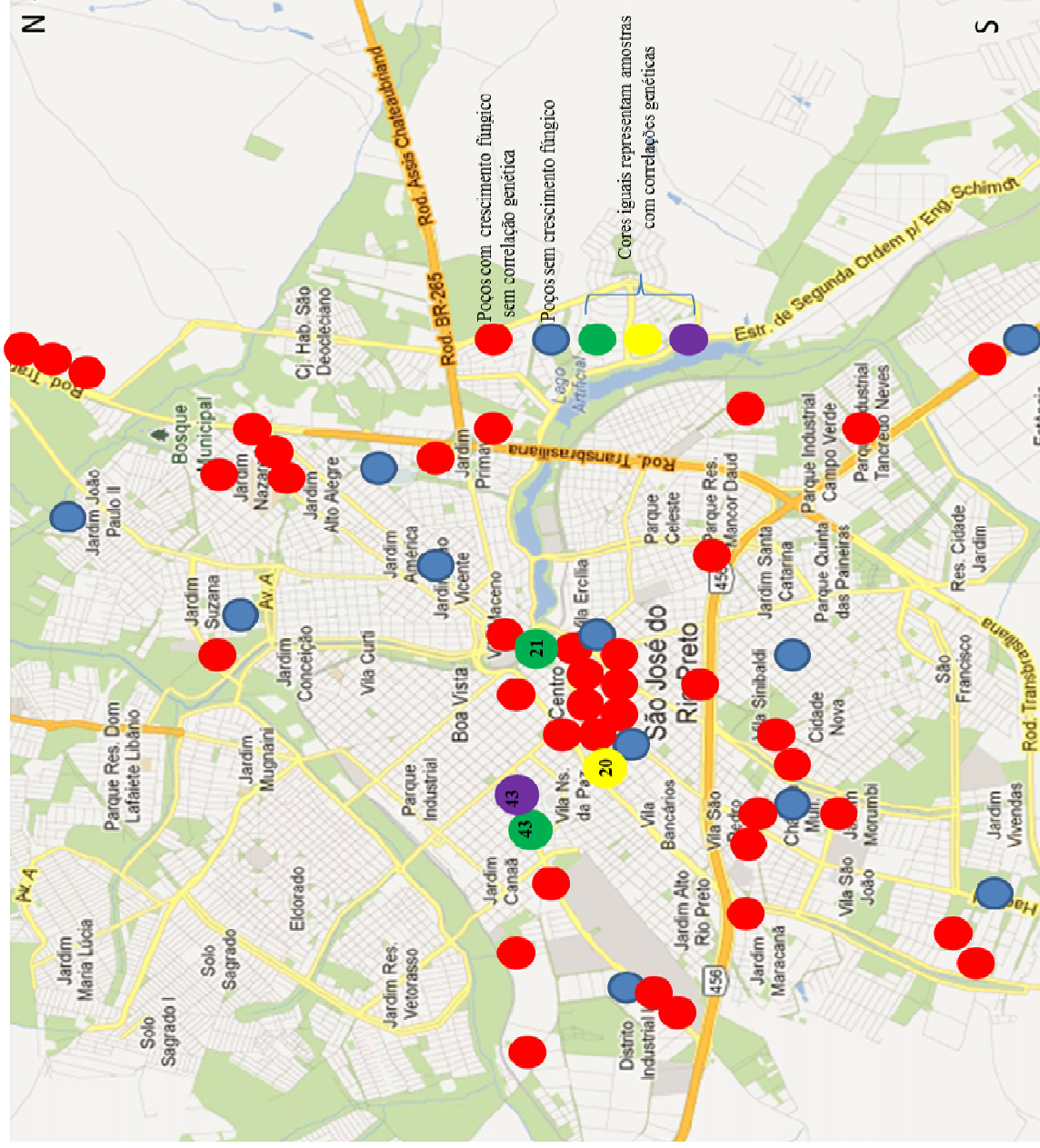
Figura 12: Dendrograma obtido pelo método de análise de grupos UPGMA para o coeficiente de Dice frente à *Candida parapsilosis*.



PI: poço irregular, PR: poço regular, Controle externo: *Saccharomyces cerevisiae*, ATCC *C. parapsilosis* 22019, ATCC *C. orthopsilosis* 96141, ATCC *C. metapsilosis* 96143.

A distribuição de grupos clonais e o correspondente número de identificação são demonstrados na Figura 13. A cor azul demonstra poços sem crescimento fúngico. A vermelha, poços com crescimento, sem correlação genética. As demais cores representam as amostras com similaridade genética, sendo que cores iguais estão correlacionais entre si. É possível observar que clones (similaridade > 80%) foram detectados em águas de mesma origem ou distinta.

Figura 13 – Representação gráfica da distribuição de poços de água regulares (figura da esquerda) e irregulares (figura da direita) de São José do Rio Preto e identificação quanto à positividade/negatividade de isolamento fúngico e representação das amostras com correlações genéticas



Fonte – Prefeitura Municipal de São José do Rio Preto.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Poços regulares e irregulares apresentam contaminação fúngica, sendo que a maioria das espécies é patogênica aos homens e animais;
- Poços regulares, mesmo sendo sob vigilância sanitária revelam inadequação microbiológica para grupos fúngicos;
- O crescimento de fungos independente da origem dos poços é observado mesmo com os padrões físico-químicos dentro do limite estabelecido pela Portaria nº 2.914/11;
- Tipo de água (SAC e SAI), ponto de coleta, concorrência com bactérias, estações do ano e chuva, interferem com a distribuição de fungos em água, considerados os padrões biológicos individuais;
- Águas de poços regulares e irregulares apresentam positividade para fungos resistentes aos antifúngicos utilizados em prática clínica;
- A ocorrência de tipos fúngicos clonais em água de ambos os poços, sugere contato e dispersão microbiana a partir de uma mesma fonte comum de água;
- A ocorrência de fungos patogênicos resistentes aos antimicrobianos em água de poços regulares e irregulares implica na criação de novos documentos regulatórios com a inclusão da análise micológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington: APHA, 2012.

ANAISSE, E.J.; COSTA, S.F. Nosocomial aspergillosis is waterborne. **Clinical Infectious Diseases**, Arkansas, v. 33, n.9, p. 1546-1548, 2001.

ANAISSE, E. J. et al. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. **Clinical Infectious Diseases**, Arkansas, v. 34, n.6, p. 780-789, 2002.

ANAISSE, E. J. et al. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. **Blood**, Washington, v.101: 2542–2546, 2003.

ANDERSEN, B. et al. Associations between Fungal Species and Water-Damaged Building Materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4180-4188, jun. 2011.

ANTUNES, A.G.V. et al. Candidemia in a Brazilian Tertiary Care Hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.5, p.239-241, sep./oct. 2004.

ARABATZIS, M. Hypothyroidism-related onycholysis with *Aureobasidium pullulans* colonization successfully treated with antifungal therapy. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, p. 370–373, 2012.

ARAÚJO, C. R. et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método Cromógeno CHROMagar Candida. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n.1, p.37-42, 2005.

AYACH, L.R. Saúde, saneamento e percepção de riscos ambientais urbanos. **Caderno de Geografia**, v.22, n.37, 2012.

BARÇA, S. F. Água e abastecimento urbano em São José do Rio Preto, SP. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 1998, São Paulo. **Resumos...**São Paulo, 1998, p. 1-11.

BARRETO, E.F. Análise microbiológica da água fornecida a unidades de alimentação de regiões administrativas do Distrito Federal. **Anuário de produção de iniciação científica discente**, v. XII, n. 13, p. 7-15, 2009.

BART-DELABESSE, E. et al. *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n.11, p.2933-2937, nov. 1993.

BATISTA, J. M.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E. Suscetibilidade A Antifúngicos De Cepas De *Candida albicans* Isoladas De Pacientes Com Estomatite Protética. **Revista**

de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 343-348, out./dez. 1999.

BITTON, G. **Wastewater microbiology**, 3. ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005.

BLUM, G. et al. Potential Basis for amphotericin B Resistance in *Aspergillus terreus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.4, p. 1553-1555, apr. 2008.

BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**. v.1, p. 221-24, 2001.

BORGHETTI, N. et al. **Aquífero Guarani - A verdadeira integração dos países do Mercosul**. Curitiba: Imprensa Oficial, 2004.

BRASIL. **Diretriz nacional do plano de amostragem da vigilância ambiental em saúde relacionada à qualidade da água para consumo humano – VIGIÁGUA**. Ministério da Saúde. Brasília, DF, maio, 2005.

BRASIL. **Portaria MS/GM nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde**. Portaria de Potabilidade da Água para Consumo Humano. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, 14 dez. 2011, Seção 1, p. 39-46, 2011.

BRASIL. **Portaria nº 518/GM, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. 2004b.

BRASIL. **Portaria nº 36/GM/MS, de 19 de janeiro de 1990 do Ministério da Saúde**. Aprova normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao consumo humano, 1990.

BRASIL. **Portaria nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000 do Ministério da Saúde**. Aprova o padrão de potabilidade da água de consumo humano e dá providências. Diário Oficial da União, 29 dez. 2000.

BRASIL. **Programa Nacional em Vigilância em Saúde Ambiental relacionado a qualidade da água para consumo humano**. Ministério da Saúde. Brasília, 2004a.

BRITO, E.H.S. et al. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2655-2664, dez. 2009.

BRITO, G.N.B. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. oral isolates from HIVpositive patients and control individuals. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p. 28-33, jan./feb. 2011.

CAETANO-ALLÓLES, G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. **Genome Research**, v. 3, p. 85-94, 1993.

CAIXETA, et al. Tipos de Marcadores moleculares. In: CAIXETA, E. T.; BORÉM, A. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. cap. 1, p. 9-78.

CÁRDENAS, M.X.; CORTES, J.A.; PARRA, C.M. *Aspergillus spp.* in risk areas of transplant patients in a university hospital. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p. 232-236, 2008.

CARENZI, L.R. et al. Mastoidite Fúngica em Paciente com SIDA: Relato de Caso. **Arquivos do Instituto de Otorrinolaringologia**, v.15, n.2, p. 245-248, abr/maio/jun. 2011.

CARLILE, Michael J.; WATKINSON, Sarah. C.; GOODAY, Graham. W. **The Fungi**. 2. ed. Hungary: Academic Press, 2001.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-139, jun. 2006.

CASA, R. T.; REIS, E. M. ZAMBOLIM, L. Dispersão Vertical e Horizontal de Conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydi*. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 2, mar/ abr. 2004.

CASALI, C.A. **Qualidade da água para consumo humano ofertadas em escolas e comunidades rurais da região central do Rio Grande do Sul**. 2008. 173f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Rio grande do Sul, 2008.

CASTRO, T. L. et al. Mecanismo de resistência das *Candida sp* e antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n.9/10, 2006.

CATALÁN, M; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p.39-49, 2006.

CHAGAS-NETO, T.C. et al. Bloodstream Infections Due to *Trichosporon spp.*: Species Distribution, *Trichosporon asahii* Genotypes Determined on the Basis of Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Sequencing, and Antifungal Susceptibility Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n. 4, p. 1074-1081, apr. 2009.

CHANG, Shu-Ting; MILES, Philip, G. **Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact**. 2. ed. Florida: CRC Press, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts**: approved guideline M44-A2. *CLSI*, Wayne, PA, USA, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: approved standard-third edition M27-A3. *CLSI*, Wayne, PA, USA, 2008a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008b.

COLOMBO, A.L. et al. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **Brazilian Journal Infectious Disease**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 118-123, jun. 2002.

COMISSÃO DAS UNIDADES EUROPEIAS (CEE). Norma 98/83/CEE, **Directiva do Conselho, de 3 de novembro de 1998, relativa à qualidade da água para consumo humano**, 1998. Disponível em < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:PT:PDF>>. Acesso em: 15 out. 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Águas Subterrâneas. Aquífero Guarani**. 2011. Disponível em:< <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/qualidade-da-agua-subterranea/63-guarani>>. Acesso em: 20 mar. 2013.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas subterrâneas do Estado de São Paulo 2007-2009**. São Paulo: CETESB, 2010.

COSTA, C.R.B.L. **Monitorização de agentes fúngicos na água e superfícies de piscinas cobertas, no distrito de Lisboa. Importância para a saúde pública**. 2010. 156f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

COSTA, K. R. C. **Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida* sp isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral**. 2009. 59f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

COSTA, K. R. C. **Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras de saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal**. 2006. 113f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

COWEN, L.E. The evolution of fungal drug resistance: modulation the superficiais. Anais trajectory from genotype from phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.3, p.187-198, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistências. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v. 23, n.4, p. 169-176, 2010.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n.3, p. 917-921, 2006.

DECRETO N. 79.367 de 9 de março de 1977. **Dispõe sobre normas e o padrão de potabilidade de água e dá outras providências.** 1977.

DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT FOOD ANDRURAL AFFAIRS - DEFRA. **A review os fungi in drinking water and the implications for human health.** Final Report, apr. 2011.

DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA - DAEE. **Portal do Departamento de Água e Energia Elétrica**, 2011b. **Apoio ao Município. Água subterrânea.** Disponível em: http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=76:piscinas-em-obra&catid=40:programas>. Acesso em: 20 mar. 2013.

DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA - DAEE. **Portal do Departamento de Água e Energia Elétrica**, 2011a. **Outorga. Conceitos.** Disponível em: http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=68%3Ao%20utorgas&catid=41%3Ao%20utorga&Itemid=30>. Acesso em: 14 out. 2012.

DIAS, L. et al. Perfil de susceptibilidade in vitro a drogas antifúngicas pelo método de E-TEST de leveduras do gênero *Candida* obtidas de secreções vaginais de pacientes gestantes no HGU de Cuiabá/MT. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, v. 1, 2007, Recife. **Resumo...**Pernambuco, 2007, p. 324-324.

DIEKEMA, D. J. et al. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 448 Recent Clinical Isolates of Filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3623-3626, ago. 2003.

DOGGETT, M.S. Characterization of Fungal Biofilms within a Municipal Water Distribution System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.3, p. 1249-1251, mar. 2000.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Comunicado técnico. Mancha-Púrpura do Alho e da Cebola: Doença Difícil de Controlar.** Brasília, DF, 2009.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with Voriconazole, Posaconazole, Itraconazole, Amphotericin B e Caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.6, p.1811-1820, 2007.

EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Water: Drink water contaminants**, 2009. Disponível em < <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#Microorganisms>>. Acesso em: 15 out. 2012.

FIGEL, I.C. **Avaliação microbiológica em sistemas de água de diálise em clínicas especializadas de Curitiba, PR.** 2011. 114f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FLORES, L.H.; ONOFRE, S.B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de terapia de saúde na cidade de São Francisco Beltrão-PR. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 5, n.2, p.22-26, jul./dez. 2010.

FRANCO, J.; BEUX, M.R. **Relatório de estágio supervisionado em Farmácia Industrial**. Laboratório de Análises físico-químicas e microbiológicas. Urbano Agroindustrial, Jaraguá do Sul, jun. 2007.

FREITAS, J. C. Loteamentos Clandestinos: uma proposta de prevenção e repressão. In: FREITAS, J. C. (coord.). **Temas de direito urbanístico 2**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado: Ministério Público do Estado de São Paulo, v. 2, p. 334, 2000.

FREITAS, M.B.; FREITAS, C.M. A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 993-1004, 2005.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n.4, p. 499-511, oct. 1996.

GALAN-SÁNCHEZ, F. et al. Microbiological Characteristics and Susceptibility Patterns of Strains of *Rhodotorula* Isolated from Clinical Samples. **Mycopathologia**, v. 145, p. 109-112, 1999.

GALLARDO, A.; SCHLESINGER, W.H. Estimating microbial biomass nitrogen using the fumigation-incubation and fumigation-extraction methods in a warm-temperate forest soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 7, p. 927-932, 1990.

GARCÍA-MARTOS, P. et al. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.19, p. 249-256, 2001.

GAVALDA, J.; RUIZ, I. Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infección invasiva por *Candida spp*. **Enfermedades Infecciosas Microbiológicas y Clínicas**, v. 21, n. 9, p. 498-508, 2003.

GIARDIN, A.; FACCINI, U. Identificação de células do fluxo local no aquífero Botucatu: estudo de caso do vale do Rio Taquari, RS, Brasil. **Águas Subterrâneas**, São Paulo, v. 25, n.1, p.15-28, 2011.

GIRMENIA, C. et al. *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2458-2464, 2006

GOMES, C.L. et al. Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida spp* isoladas de urina de pacientes com Candidúria em Iguatu-Ceará. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 3, p. 223-225, 2010.

GUITIÉRREZ-MARTÍNEZ, et al. Estudio *in vitro* de antimicóticos contra cepas de *Candida* aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. **Dermatologia Revista Mexicana**, v. 56, n. 2, mar/abr. 2012.

HAGESKAL, G. et al. Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water. **Applied and environmental microbiology**, v.72, n.12,. p. 7586–7593, dec. 2006.

HAGESKAL, G. et al. Exploring the species diversity of trichoderma in norwegian drinking water systems by DNA arcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 6, p. 1178-1188, 2008.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological research**, v.113, p.165-172, 2009.

HAWKES, M. et al. Aureobasidium pullulans infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, p. 209-213, 2005.

HINZELIN, F.; BLOCK, J. C. Yeasts and filamentous fungi in drinking water. **Environmental. Technology Letters**, v. 6, p. 101-106, 1985.

INGERSON-MAHAR, M.; REID, A. **The microbiology of water distribution systems: a report on na American Academy of Microbiology Colloquium**. Boulder, Colorado, april, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Captítulo VIII: Águas. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, v.1, 2005. 408 p.

IRITANI, M. A.; EZAKI, S. **Águas subterrâneas do Estado de São Paulo**. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente. Instituto Geológico. São Paulo, 2008.

JAWETZ; MELNICK; ADELBERG. **Microbiologia Médica**. 24.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2009. 820p.

JÚNIOR, R.F.P. et al. Análise da identidade molecular de cepas selvagens e mutantes de *Candida* resistentes a fluconazol e anfotericina B. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., E ENCONTRO LATINOAMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 8., 2008. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

JUNQUEIRA, J.C. et al. Oral colonization by yeast in HIV-Positive patients in Brazil. Rev. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 17-24, jan./febr. 2012.

KANZLER, D.; et al. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p.165-169, 2008.

KASPRZYK, I. Aeromycology-main research fields of interesting during the last 25 years. **Annals Agricultural Environmental Medicine**, v.15, n.1, p.1-7, 2008.

KAVANAGH, K. **Fungy. Biology and application.** John Wiley & Sons, Ltd, Ireland, 2005.

KELLEY, J. et al. Identification and control of fungi in distribution systems. Denver: **Awwa Research Foundation And American Water Works Association**, 125 p., 2003.

KLEIN, N. M. **Ocorrência e suscetibilidade a drogas antifúngicas de *Candida não-albicans*, no hospital universitário Cassiano Antônio de Moraes, Vitória-ES.** 2006. 131f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.

KOH, A. Y. et al. Mucosal Damage and Neutropenia Are Required for *Candida albicans* Dissemination. **Plos Pathogens**, v.4, n. 35, p. 1-10, feb. 2008.

KUMAR, P. et al. Smear Morphology of Cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. **Cryptopath**, v. 16, p. 143-146, 2005.

KUZUCU, C. et al. Comparison of the Semisolid Agar Antifungal Susceptibility Test with the NCCLS M38-P Broth Microdilution Test for Screening of filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42. n.3, p. 1224-1227, mar. 2004.

LACAZ, Carlos da Silva. et al. **Tratado de micologia médica.** 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LATGÉ, J.P.; STEINBACH, W.J. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **American Society of Microbiology Press**, Washington, D.C, 2009.

LAURENT, P. **Household drinking water systems and their impact on people with weakened immunity.** MSF-Holland. Public Health Department, feb. 2005.

LEAL, A.F.G. et al. Ocorrência de fungos filamentosos de Importância médica em água de bebedouros. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n.4, p.576-579, 2010.

LEHMANN, P. F. LIN, D. LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, 1992.

LEITE, N. Avaliação das condições microbiológicas do ar ambiente em unidades de restauração. Resultados preliminares. **XV Congresso de Zootecnia**, Portugal, 2009.

LEONI, R. et al. Risk of infection associated with microbiological quality of public swimming pools in Bologna, Italy. **Public health**, v. 113, p. 227-232, 1999.

LIMA, K. M. et al. Espécies e suscetibilidade antifúngica *in vitro* de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 18, n. 2, p.89-97, mar./abr. 2009.

LOBATO, R.C.; VARGAS, V.S.; SILVEIRA, E.S. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no sul do Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 11, n. 2, p. 21-28, 2009.

LOPES, A.C.; CAVASOTTO, T. **Caracterização química e físico-química de efluente da indústria de explosivos nitroaromáticos**. Trabalho de conclusão de curso. Pato Branco, 2011.

MACÊDO, D. P. C. et al. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 188-191, 2009.

MACÊDO, José Antônio Barros. **Águas & Águas**. Juiz de Fora, MG: Ortofarma, 2000.

MACHADO, A. P. S. **Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água**. 2006. 50f. Dissertação (Mestrado). Universidade do Minho, Portugal. 2006.

MACIEL, N. O. P. et al. The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. **International Journal of Food Microbiology** , v. 160, p. 201-205, 2013.

MADIGAN, M.T., et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

MANZANO-GAYOSSO, P. et al. Levaduras causantes de onicomicosis en cuatro centros dermatológicos mexicanos y su sensibilidad antifúngica a compuestos azólicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 1, p. 32-35, 2011.

MARIANO, P. L. S. A et al. *Candida dubliniensis* Identification in Brazilian Yeast Stock Collection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.4, p.: 533-538, jun. 2003.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. Importancia clínica de los mecanismos de resistência de los hongos filamentosos a los antifúngicos. **Enfermedades Infecciosas e Microbiologia Clínica**, v. 20, n. 10, p.523-30, 2002.

MENEZES, E. A.; CARVALHO, P. G.; TRINDADE, E. C. P. M. Fungos anemófilos causando alergia respiratória em pacientes na cidade de Fortaleza, Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v, 40, n.2, p. 79-84, 2006.

MENEZES, E.A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F.A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n. 3, p. 354-355, 2009.

MEZZARI, A. **Fungos anemófilos em Porto Alegre, RS**. 2002. 74f. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS. 2002.

MÍMICA, L. M. J. et al. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes

de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, fev. 2009.

MODESTO, R. P. et al. Evolução das concentrações de nitrato do Sistema Aquífero Bauru no Estado de São Paulo – 1992 a 2007. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEIO AMBIENTE SUBTERRÂNEO, 1., **Anais...**, 2009.

MOREIRA, D. **Perfil fenotípico, diferenciação molecular, produção de enzimas e sensibilidade aos antifúngicos de amostras de leveduras isoladas em três grupos, amostrais: mulheres assintomáticas, com candidíase vulvovaginal primária e recorrente**. 2012. 155f. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

MOSQUERA, J.; DENNING, D. W. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobiology Agents Chemotherapy**, v.46, n. 2, p. 556-557, 2002.

NETTLES, R. E. et al. Successful treatment of *Trichosporon mucoides* infection with fluconazole in a heart and kidney transplant recipient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p.63-66, 2003.

NEUFELD, P. M. et al. Prevalência e Susceptibilidade in vitro a Itraconazol e Anfotericina B de Isolados Clínicos de *Candida*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n.2, p. 119-125, 2009.

NOGUEIRA, F. L. C. **Prevalencia de espécies do gênero Candida isoladas a partir de diferentes amostras clínicas e perfil de susceptibilidade in vitro ao fluconazol**. 2012. 15f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, 2012.

NUNES, E.B. et al. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 23-30, 2011.

NUNZIO, B.; YAMAGUCHI, M.U. Prevalência de fungos em água para consumo humano de asilos e creches em Maringá-PR. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.2, p. 113-134, maio/ago. 2010.

OLIVEIRA, J.N.; WENDLAN, E. Estudo sobre a mudança dos NE em São José do Rio Preto, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 13., **Anais...**, 2004.

PEREIRA, F.O. et al. Microbiota fúngica do solo e ar atmosférico na região da Borborema, estado da Paraíba, Brasil. **Revista de Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 2, p. 123-126, 2010.

PEREIRA-RAMIREZ, O. et al. Influência da carga orgânica, aplicada no pós-tratamento de águas residuárias de suinocultura por contactores biológicos rotatórios e reator anóxico. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 413-420, out/dez. 2003.

PEREIRA, V.J. et al. Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. **Water research**, v.47, p. 517-523, 2013.

QUADROS, M.E. et al. Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: Estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.3, p. 431-438, jul/set. 2009.

PERKINS, S. D. et al. Potentially pathogenic bacteria in shower water and air of a stem cell transplant unit. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.16, p. 5363-5372, 2009.

PFALLER, M. A. et al. Antifungal Activities of posaconazole, ravuconazole, and voriconazole compared to those of itraconazole and amphotericin B against 239 Clinical isolates of *Aspergillus* spp. and other filamentous fungi: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1032-1037, abr. 2002.

PFALLER, M.A. et al. The use of biotyping and DNA fingerprinting in typing *Candida albicans* from hospitalized patients. **Diagnostic Microbiology Infectious**, v. 13, n. 481-89, 1990.

PIRES-GONÇALVES, R. H. et al. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 542–547, 2008.

REICHENBERGER, F. et al. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. **European Respiratory Journal**, v. 19, p. 743–755, 2002.

REMENTERIA, A. et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, n. 1, p. 1-23, mar. 2005.

RODRIGUES, V.R. Uma reflexão sobre dois importantes instrumentos de gestão de recursos hídricos subterrâneos: licença para perfuração de poços tubulares e outorga de direito de recursos hídricos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 13., **Anais...**, 2004.

ROSENZWEIG, W.D.; MINNIGH, H.A.; PIPES, W. O. Chlorine Demand and Inactivation of Fungal Propagules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 182-186, 1983.

ROSENZWEIG, W.D.; MINNIGH, H.A.; PIPES, W. O. Fungi in potable water distribution systems. **Journal of the American Water Works Association**. v. 78, p. 53–55, 1986.

RUAN, S. H. et al. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. **International Journal of Infection**, v.14, n. 2, p. 147-149, feb. 2010.

SALES, et al. Micota no ar da unidade de terapia intensiva e centro cirúrgico de um hospital universitário. **Bioikos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 109-115, jul./dez. 2011.

SAMMON, N.B et al. Three potential sources of microfungi in a treated municipal water supply system in Sub-Tropical Australia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, p. 713-732, 2011.

SAMSON, R.; HOEKSTRA, E.; FRISVAD, J. Introduction to food and airborne fungi. 6th Edition. **CBS**. p. 389, 2000.

SANCAK, B. et al. Investigation of in vitro activities of fluconazole, itraconazole and voriconazole against clinical isolates of *Blastoschizomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*) by two different methods. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 43, n.2, p.269-276, apr. 2009.

SANTOS-JÚNIOR, I. D. et al. Características gerais da ação,do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 15, n. 3, p. 189-197, jul./set. 2005.

SANTOS, K. L. et al. Isolamento de fungos de equipamentos radiográficos odontológicos. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.59, n.3, p.411-416, jul./set. 2011.

SANTOS, L.S. et al. Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. In: **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba. 2009.

SARAIVA, A.A.F. et al. **Comunidade de fungos filamentosos na Lagoa do Araçá Recife, Pernambuco**. Parte da dissertação (Mestrado). Universidade Regional do Cariri, Recife, 1997.

SESSEGOLO, T. et al. Microbiota fúngica em amostras de água potável e esgoto doméstico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 301-306, jan./mar. 2011.

SEVERO, C.B.; GUAZELLI, L.S.; SEVERO, L.C. Curso de atualização-Micoses. Capítulo 7- Zigomicoses. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 1, p. 134-141, 2010.

SILVA, A. C. C. Estudo do monitoramento da qualidade da água para consumo humano no DF no ano de 2009. 2009. 164f. Dissertação (Mestrado). Universidade Católica de Brasília, DF, 2009.

SILVA, A.C. et al. Impacto físico-químico da deposição de esgotos em fossas sobre as águas de Aquíferos freáticos em JI-Paraná-RO. **Revista de estudos ambientais**, v.11, n. 2, p. 101-112, jul./dez. 2009.

SIQUEIRA, L.P. et al. Avaliação microbiológica da água de consumo empregada em unidades de alimentação. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 15, n.1, p.63-66, 2010.

SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clinical Microbiology**, v. 13, p. 332-70, 2000.

SOMENZI, C.C.; RIBEIRO, T.S. MENEZES, A. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. **NewsLab**, v.77, 2006.

SOUZA, F. B. C. **Estudo da colonização e variabilidade genética de leveduras do gênero Candida isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de down**. 2007. 108f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SZEWZYK, R. U. et al. Microbiological safety of drinking water. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 87-121, 2000.

THERESE, K. L. et al. In-vitro susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal isolates. **Original Article**, v.4, n.4, p. 273-279, 2006.

TOTHOVA, L.; MOGONOVA, E.; FRANKOVA, E. Microscopic fungi in the petroleum contaminated groundwater. **Section Cellular and Molecular Biology**, v. 56, n.4, p. 373-387, 2001.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

VARO, S.D. et al. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 326-331, mai-jun, 2007.

VECCHIA, A. D.; CASTILHO-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.2, p. 324-327, 2007.

VOJDANI, A. et al. Antibodies against molds and mycotoxins following exposure to toxigenic fungi in a water-damaged building. **Archives of Environmental Health**, v. 58, n. 6, p. 324-336, 2003.

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique, B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. **Revista e Ampliada** 3.ed. Mercado aberto: Porto Alegre, 2003. 421p.

WALDROP, M. P.; FIRESTONE, M. K. Seasonal Dynamics of Microbial Community Composition and Function in Oak Canopy and Open Grassland Soils. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 470-479, oct. 2006.

WARRIS, A. et al. Molecular Epidemiology of *Aspergillus fumigatus* Isolates Recovered from Water, Air, and Patients Shows Two Clusters of Genetically Distinct Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9, p. 4101-4106, 2003.

WARRIS, A. et al. Point-of-use filtration method for the prevention of fungal contamination of hospital water. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, p. 56-59, 2010.

WARRIS, A. et al. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 47, n.2, p.143-148, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Water for health: taking charge**, 2001. Disponível em:<http://www.who.int/water_sanitation_health/wwdreport.pdf>. Acesso em: 3 abr. 2013.

WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. Revista da **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, mai/jun. 2007.

ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo 1 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 52 poços regulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços regulares	Turbidez VMP=5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10mg/L
1	< 0,5	< 5,0	8,8	1,04	25,6	< 0,2
2	< 0,5	< 5,0	8,4	0,71	26	0,91
3	6,86	32,11	6,3	0,04	25,6	3,39
4	< 0,5	< 5,0	6	0,12	26,7	1,28
5	< 0,5	< 5,0	6,8	0,09	25	6,85
6	< 0,5	< 5,0	8	0,82	26,1	1,13
7	< 0,5	< 5,0	8,3	0,03	26,2	2,94
8	1,02	9,55	7,8	0,02	29,3	7,44
9	< 0,5	< 5,0	8,5	0,89	28,9	0,50
10	1,72	25,67	8,2	0,02	25,6	2,11
11	< 0,5	< 5,0	7,5	0,21	23,9	2,71
12	< 0,5	< 5,0	7,7	0,43	26	5,25
13	< 0,5	< 5,0	8	0,25	24,1	7,81
14	< 0,5	< 5,0	8,8	0,69	25,3	8,56
15	0,76	10,67	7,5	0	24,3	14,87
16	< 0,5	< 5,0	7,7	0,29	26,5	9,30
17	< 0,5	< 5,0	8,1	0,43	27,2	8,72
18	< 0,5	< 5,0	7,5	0,54	27,4	7,54
19	6,27	100,67	7	0,02	27,6	18,20
20	< 0,5	< 5,0	8,2	0	28,7	18,31
21	< 0,5	< 5,0	7,5	0,01	27,2	17,74
22	< 0,5	< 5,0	7,6	0,45	25,9	8,23
23	< 0,5	< 5,0	7,3	0,52	28	6,99

Continuação do Anexo 1 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 52 poços regulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços regulares	Turbidez VMP=5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10mg/L
24	2,01	27,56	7,5	0	30,6	7,69
25	0,54	6,00	7,2	0,4	27	15,25
26	< 0,5	< 5,0	8,3	0,18	27	9,23
27	< 0,5	< 5,0	8,6	0,41	28,3	12,01
28	1,01	17,77	8,4	0	28,4	2,69
29	< 0,5	< 5,0	8	1,99	28,5	6,61
30	< 0,5	8,78	7,7	0	28,4	0,36
31	< 0,5	< 5,0	6,3	0,14	27,1	12,94
32	1,52	26,99	7,4	0,03	27	2,16
33	< 0,5	5,99	7,2	0,04	28,7	0,92
34	< 0,5	< 5,0	9	0	27,2	< 0,2
35	< 0,5	< 5,0	8,8	0,31	26,1	0,22
36	< 0,5	5,44	8,2	0,62	26,3	3,31
37	< 0,5	< 5,0	7,7	0,17	28	1,45
38	< 0,5	< 5,0	7,8	0,87	26,9	2,18
39	< 0,5	< 5,0	7,9	0,45	27,6	2,30
40	< 0,5	< 5,0	7,1	0,47	27,2	2,01
41	< 0,5	< 5,0	7,8	0,45	23,5	4,20
42	< 0,5	< 5,0	5,8	0,42	26,7	0,95
43	0,62	9,11	5,8	0	26,5	10,50
44	< 0,5	< 5,0	7,9	0,72	27,2	< 0,2
45	0,67	11,33	8,5	2,20	30,8	< 0,2
46	< 0,5	< 5,0	7,2	0,86	31,5	< 0,2
47	< 0,5	< 5,0	7,5	0,46	29,1	1,98

Continuação do Anexo 1 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 52 poços regulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços regulares	Turbidez VMP=5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10mg/L
48	0,66	7,89	6,8	0,04	26,4	1,95
49	< 0,5	< 5,0	6,9	0,39	27,7	3,12
50	1,03	11,45	7,1	0,02	28,5	0,58
51	10,86	13,11	8,2	0,04	28,1	8,79
52	<0,5	<0,5	7,2	0,02	30,4	7,92

Anexo 2 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 107 poços irregulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços Irregulares	Turbidez VMP=5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2,0mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10 mg/L
1	4,93	36,33	8,2	0,05	26,3	< 0,2
2	< 0,5	< 5,0	7,8	0	26,9	< 0,2
3	1,16	11,88	6,4	0,08	27,5	1,41
4	0,6	9,0	6,3	0,07	25	1,49
5	< 0,5	< 5,0	6,6	0,1	27,3	< 0,2
6	5,05	58,55	6,6	0	24	0,44
7	3,57	45,55	6,7	0,03	27	0,51
8	< 0,5	< 5,0	7,7	0,01	25,9	0,89
9	1,07	12,33	7,1	0,02	27,4	2,38
10	0,93	12,45	7,7	0,02	26,2	1,74
11	0,76	8,22	8,6	0	23,5	0,31
12	1,74	23,89	6,5	0	22,8	1,33
13	< 0,5	< 5,0	7,8	0	26,1	1,20
14	1,67	23,11	7,8	0	25	7,96
15	< 0,5	< 5,0	7,8	0	26	6,12

Continuação do Anexo 2 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 107 poços irregulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços Irregulares	Turbidez VMP= 5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2,0mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10 mg/L
16	1,18	17,66	7,3	0	25,8	14,29
17	< 0,5	< 5,0	8,5	0	25,2	0,23
18	< 0,5	< 5,0	7,2	0	26,6	2,13
19	< 0,5	< 5,0	8,2	0	26,7	1,32
20	< 0,5	< 5,0	8	0,1	28,1	6,00
21	< 0,5	< 5,0	8,5	0,04	27	0,60
22	< 0,5	6,66	8,1	0	26,6	1,35
23	< 0,5	< 5,0	7,3	0,07	28,3	1,42
24	< 0,5	< 5,0	7,8	0	27,1	4,04
25	< 0,5	< 5,0	7,5	0,02	28,7	6,22
26	< 0,5	7,88	6,3	0,06	25,4	4,83
27	0,89	14,99	7,1	0,07	25,1	6,31
28	1,42	24,55	6,1	0,04	26,4	6,96
29	< 0,5	< 5,0	8	0,06	25,3	1,92
30	< 0,5	< 5,0	7	0,07	26	5,97
31	< 0,5	< 5,0	9,1	0,79	28,2	4,58
32	< 0,5	< 5,0	7,7	0,07	26,3	2,19
33	0,74	7,89	8	0	25	4,08
34	0,99	11,00	8,2	0	26,6	1,47
35	1,73	21,89	8	0	26,4	4,56
36	< 0,5	< 5,0	8,7	0,05	25,8	0,37
37	1,2	15,00	7,7	0,01	25,8	< 0,2
38	< 0,5	< 5,0	8,2	0,03	26	3,22
39	1,78	25,11	8,1	0,05	30,1	1,42
40	0,92	10,33	7	0	28,2	5,18

Continuação do Anexo 2 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 107 poços irregulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços Irregulares	Turbidez VMP= 5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2,0mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10 mg/L
41	2,34	30,45	6,6	0	27,2	4,33
42	< 0,5	< 5,0	6,5	0	28	2,32
43	< 0,5	< 5,0	7,1	0	27,8	< 0,2
44	< 0,5	< 5,0	7	0	27,1	0,42
45	0,71	8,88	7,4	0,02	28,7	3,78
46	1,11	11,89	7,1	0,02	30	< 0,2
47	< 0,5	5,56	7,3	0,06	29,7	< 0,2
48	8,12	86,78	6,3	0	22,1	15,60
49	< 0,5	< 5,0	7,4	0	27,3	1,33
50	0,87	11,22	6,7	0	27,4	0,51
51	< 0,5	< 5,0	6,8	0	27,6	0,25
52	< 0,5	< 5,0	6,4	0	28,9	< 0,2
53	< 0,5	< 5,0	7,6	0	28,9	< 0,2
54	3,51	46,44	7,1	0	25,8	1,36
55	0,70	8,45	6,8	0	25,2	13,64
56	0,53	5,11	7,1	0	27,9	1,42
57	0,77	12,00	7,5	0	26,6	12,38
58	11,40	105,87	6,9	0	27,3	1,46
59	3,82	25,67	6,6	0	26,3	0,80
60	6,61	5,67	7,4	0	26,4	8,71
61	1,30	15,89	7,1	0	26	2,24
62	1,36	18,78	6,9	0	28,1	3,80
63	3,30	4,67	6,6	0	25,8	1,78
64	3,36	11,57	6,6	0	27	1,64
65	2,19	26,89	7,4	0	27	< 0,2

Continuação do Anexo 2 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 107 poços irregulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços Irregulares	Turbidez VMP= 5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2,0mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10 mg/L
66	1,08	6,33	7,1	0	26,8	< 0,2
67	< 0,5	< 5,0	7,1	0	26,2	< 0,2
68	0,61	< 5,0	6,7	0	24,8	< 0,2
69	1,27	9,44	6,7	0	26,7	< 0,2
70	0,88	< 5,0	6,7	0	27,5	< 0,2
71	< 0,5	< 5,0	6,6	0	28	< 0,2
72	< 0,5	< 5,0	6,5	0	28,8	2,73
73	< 0,5	< 5,0	6,6	0	28,1	1,89
74	< 0,5	< 5,0	6,7	0	26,5	< 0,2
75	0,95	9,00	7,0	0	30,1	0,21
76	< 0,5	< 0,5	6,6	0	26,3	< 0,2
77	2,10	30,11	6,8	0	27,8	< 0,2
78	2,45	35,00	6,4	0	28,8	1,26
79	1,45	19,00	6,7	0	29,1	3,64
80	< 0,5	4,11	6,9	0	30,5	0,43
81	2,10	28,33	6,5	0	28,9	7,87
82	2,37	31,45	6	0	28,4	4,00
83	< 0,5	< 5,0	6,8	0	23	2,99
84	1,17	13,89	6,3	0	26,4	0,28
85	0,71	8,67	6,7	0	25,3	< 0,2
86	0,52	3,78	7	0	25	< 0,2
87	0,62	8,11	6,8	0	26,8	3,06
88	0,83	10,44	6,3	0	23,4	0,64
89	< 0,5	< 5,0	8,4	0	25,6	2,22
90	0,82	< 5,0	7,6	0	25,5	0,9

Continuação do Anexo 2 - Tabela dos valores dos padrões físico-químicos apresentados nos 107 poços irregulares: VMP: Valor máximo permitido, UT: Unidade de Turbidez, UH: Unidade Hazen (mg Pt-Co/L).

Poços Irregulares	Turbidez VMP= 5,0 UT	Cor VMP=15UH	pH 6,0 a 9,5	Cloro residual livre 0,2 a 2,0mg/ml	Temperatura °C	Nitrato VMP: 10 mg/L
91	< 0,5	< 5,0	7,6	0	25,7	3,61
92	< 0,5	< 5,0	7,3	0	22,3	2,37
93	< 0,5	5,67	6,4	0	24,2	12,76
94	0,77	13,67	6,8	0	24,3	1,06
95	< 0,5	9,00	7,4	0	24,1	0,23
96	2,79	35,00	7,8	0	22,7	1,73
97	< 0,5	7,78	7,9	0	24,2	3,04
98	0,88	12,11	7,8	0	22,2	3,93
99	< 0,5	5,78	7,3	0	24,3	1,58
100	< 0,5	< 5,0	7,5	0	27,2	4,91
101	< 0,5	10,78	8,2	0	23,5	< 0,2
102	1,00	11,45	7,9	0	23,6	3,67
103	< 0,5	< 5,0	6,9	0	22,8	0,25
104	1,57	17,00	6,4	0	26,7	0,33
105	2,64	35,11	7,1	0	23	2,17
106	4,54	48,89	7,1	0	22,8	6,04
107	1,33	14,00	6,8	0	24,2	2,55

Anexo 3 - Resultados do antifungigrama por disco difusão e por microdiluição de leveduras isoladas de poços regulares.

Espécies	Disco Difusão(mm)				Microdiluição(µg/ml)			
	itra	fluco	ceto	anfo	Itra	fluco	ceto	anfo
PR-20 <i>C. guilliermondii</i>	16	30	37	15	1	-	-	-
PR-21 <i>C. guilliermondii</i>	11	18	36	15	4	32	-	-
PR-34 <i>B. capitatus</i>	26	s/ halo	30	25	-	64	-	-
PR-43 <i>C. parapsilosis</i>	20	30	50	21	-	-	-	-
PR-43 <i>C. guilliermondii</i>	11	33	43	18	1	-	-	-
PR-43 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,06	0,5	0,06	0,03
ATCC <i>C. parapsilosis</i> 22019					0,5	2	0,125	0,125

PR= poços regulares, mm= milímetros, µg/ml= micrograma/microlitro

itra= itraconazol, fluco= fluconazol, ceto= cetoconazol, anfo= anfotericina B

Anexo 4 - Resultados do antifungigrama por disco difusão e por microdiluição de leveduras isoladas de poços irregulares.

Espécies	Disco Difusão(mm)				Microdiluição(µg/ml)			
	itra	fluco	ceto	anfo	itra	fluco	ceto	anfo
PI-18 <i>C. lusitaniae</i>	15	35	40	18	1	-	-	-
PI-20 <i>C. parapsilosis</i>	17	25	43	14	0,25	-	-	-
PI-23 <i>K. ohmeri</i>	20	27	40	21	-	-	-	-
PI-38 <i>C. guilliermondii</i>	15	30	48	15	2	-	-	-
PI-38 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,06	0,25	0,03	0,06
PI-43 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,03	0,5	0,03	0,03
PI-45 <i>T. asahii</i>	14	21	28	16	4	-	-	-
PI-47 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,125	0,5	0,03	0,03
PI-55 <i>C. guilliermondii</i>	17	26	38	17	4	-	-	-
PI-57 <i>Zygosaccharomyces sp</i>	15	35	39	28	0,25	-	-	-
PI-59 <i>C. tropicalis</i>	19	28	31	15	>16	-	-	-
PI-59 <i>C. glabrata</i>	21	19	31	17	-	-	-	-
PI-63 <i>C. tropicalis</i>	15	26	30	11	0,25	-	-	-
PI-63 <i>C. glabrata</i>	11	19	30	13	4	-	-	-
PI-66 <i>R. minuta</i>	s/halo	s/halo	25	s/halo	>16	>128	-	>16
PI-66 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,125	0,25	0,06	0,03
PI-81 <i>R. glutinis</i>	37	28	39	20	-	-	-	-
PI-85 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,06	0,25	0,03	0,03
PI-86 <i>C. famata</i>	40	40	35	18	-	-	-	-
PI-87 <i>C. parapsilosis</i>	19	20	38	13	0,25	-	-	-
PI-89 <i>T. mucoides</i>	15	19	27	19	0,5	-	-	-
PI-89 <i>C. famata</i>	24	24	40	24	-	-	-	-
PI-91 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,03	0,25	0,06	0,03
PI-92 <i>C. guilliermondii</i>	18	36	48	12	2	-	-	-
PI-93 <i>C. tropicalis</i>	20	33	40	14	-	-	-	-
PI-95 <i>T. mucoides</i>	s/halo	s/halo	17	s/halo	>16	>128	>16	4
PI-95 <i>C. silvícola</i>	19	25	43	24	>16	-	-	-
PI-98 <i>C. guilliermondii</i>	13	25	35	15	2	-	-	-
PI-98 <i>C. intermédia</i>	19	33	42	15	0,125	-	-	-
PI-100 <i>T. asahii</i>	14	23	33	12	8	-	-	-
PI-102 <i>A. pullulans</i>	-	-	-	-	0,03	0,5	0,06	0,06
PI-102 <i>C. intermédia</i>	14	19	28	19	0,25	-	-	-
PI-104 <i>T. asahii</i>	13	22	25	12	8	-	-	-
PI-104 <i>C. lusitaniae</i>	23	42	48	25	-	-	-	-
PI-104 <i>C. guilliermondii</i>	12	27	40	14	8	-	-	-
PI-106 <i>C. intermédia</i>	15	25	27	14	2	-	-	-
PI-107 <i>C. intermédia</i>	11	s/halo	26	20	4	>128	-	-
PI-107 <i>T. asahii</i>	15	22	29	15	0,5			
ATCC <i>C. glabrata</i> 2001					2	32	0,25	0,125
ATCC <i>C. parapsilosis</i> 22019		27			0,5	2	0,125	0,125
ATCC <i>C. tropicalis</i> 13803					0,125	8	0,06	0,06

PI= poços irregulares, mm= milímetros, µg/ml= micrograma/microlitro

itra= itraconazol, fluco= fluconazol, ceto= cetoconazol, anfo= anfotericina B

Anexo 5- Resultados da microdiluição de filamentosos isolados de poços regulares.

Espécies	Microdiluição(µg/ml)			
	itra	fluco	ceto	anfo
PR-4 <i>A. caesiellus</i>	1	>128	16	0,125
PR-4 <i>Curvularia sp</i>	1	>128	>16	1
PR-8 <i>A. fumigatus</i>	0,06	>128	>16	0,25
PR-8 <i>A. penicilioides</i>	0,125	>128	2	4
PR-8 <i>A. japonicus</i>	>16	>128	>16	>16
PR-10 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	8	0,25
PR-11 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	8	0,125
PR-13 <i>A. fumigatus</i>	0,125	>128	>16	0,5
PR-14 <i>F. incarnatum</i>	>16	>128	>16	2
PR-15 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	16	0,5
PR-17 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	>16	0,125
PR-19 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	8	0,06
PR-19 <i>A. flavus</i>	2	>128	4	0,5
PR-22 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PR-22 <i>A. japonicus</i>	4	>128	>16	0,06
PR-23 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	>16	0,25
PR-24 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	8	0,125
PR-26 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,06
PR-27 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	8	0,125
PR-28 <i>P. marquandii</i>	>16	>128	>16	>16
PR-29 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	>16	0,25
PR-31 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,5
PR-32 <i>A. fumigatus</i>	0,125	>128	>16	0,5
PR-33 <i>A. fumigatus</i>	8	>128	>16	0,5
PR-35 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PR-36 <i>A. fumigatus</i>	0,5	>128	16	0,25
PR-38 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PR-39 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,5
PR-40 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	16	0,125
PR-41 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	>16	0,125
PR-42 <i>A. fumigatus</i>	16	>128	>16	0,125
PR-43 <i>P. marneffe</i>	>16	>128	4	>16
PR-44 <i>A. fumigatus</i>	8	>128	16	0,125
PR-45 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PR-46 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PR-47 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,125
PR-49 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,25
PR-50 <i>A. penicilliioides</i>	2	>128	4	2
PR-51 <i>P. expansum</i>	2	>128	4	0,5

PR= poços regulares, µg/ml= micrograma/microlitro

itra= itraconazol, fluco= fluconazol, ceto= cetoconazol, anfo= anfotericina B

Anexo 6 - Resultados da microdiluição de filamentosos isolados de poços irregulares.

Espécies	Microdiluição(µg/ml)			
	itra	fluco	ceto	anfo
PI-2 <i>Curvularia sp</i>	>16	>128	>16	0,25
PI-2 <i>A. potronii</i>	>16	>128	>16	0,25
PI- 3 <i>S. hyalinum</i>	>16	>128	>16	4
PI-5 <i>P. decumbens</i>	4	>128	0,03	0,06
PI-6 <i>S. hyalinum</i>	0,5	>128	>16	>16
PI-7 <i>P. decumbens</i>	4	>128	2	0,06
PI-8 <i>A. japonicus</i>	1	>128	0,25	0,06
PI-9 <i>Mucor sp</i>	2	>128	16	0,25
PI-11 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	8	0,25
PI-12 <i>A. fumigatus</i>	0,5	>128	16	1,25
PI-12 <i>A. penicillioides</i>	16	>128	8	1
PI-12 <i>F. hyalinum</i>	>16	>128	>16	2
PI-13 <i>A. caesiellus</i>	1	>128	>16	1
PI-14 <i>A. japonicus</i>	4	>128	>16	0,125
PI-17 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	16	0,125
PI-19 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	16	0,125
PI-19 <i>A. japonicus</i>	4	>128	>16	0,06
PI-19 <i>A. clavatus</i>	0,125	>128	2	1
PI-20 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,5
PI-21 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,125
PI-23 <i>F. incarnatum</i>	8	>128	>16	2
PI-25 <i>A. fumigatus</i>	>16	>128	16	0,125
PI-26 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	>16	0,25
PI-26 <i>A. versicolor</i>	2	>128	4	0,5
PI-26 <i>A. candidus</i>	2	>128	4	4
PI-27 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PI-27 <i>A. flavus</i>	1	>128	8	0,5
PI-29 <i>F. sacchari</i>	>16	>128	>16	1
PI-30 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	16	0,25
PI-31 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,5
PI-31 <i>A. penicillioides</i>	1	>128	8	0,5
PI-31 <i>P. spinulosum</i>	2	>128	1	0,06
PI-33 <i>P. decumbens</i>	>16	>128	>16	>16
PI-34 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	>16	0,25
PI-35 <i>A. fumigatus</i>	16	>128	>16	0,125
PI-36 <i>S. apiosperman</i>	2	>128	1	4
PI-36 <i>P. decumbens</i>	1	>128	2	>16
PI-40 <i>F. incarnatum</i>	>16	>128	>16	0,06
PI-42 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	16	1,25
PI-42 <i>P. decumbens</i>	>16	>128	>16	>16
PI-43 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	16	1
PI-46 <i>Absidia sp</i>	1	>128	16	2
PI-48 <i>A. japonicus</i>	2	>128	8	0,5
PI-49 <i>A. penicillioides</i>	1	>128	8	0,25
PI-49 <i>A. clavatus</i>	0,5	>128	2	0,5
PI-49 <i>P. expansum</i>	2	>128	8	>16
PI-50 <i>P. decumbens</i>	1	>128	8	0,5
PI-50 <i>P. spinulosum</i>	1	>128	8	0,5
PI-50 <i>S. dehoogii</i>	16	>128	8	>16
PI-51 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	>16	0,125

PI= poços irregulares, µg/ml= micrograma/microlitro

itra= itraconazol, fluco= fluconazol, ceto= cetoconazol, anfo= anfotericina B

Continuação do Anexo 6 - Resultados da microdiluição de filamentosos isolados de poços irregulares.

Espécies	Microdiluição(µg/ml)			
	itra	fluco	ceto	anfo
PI-53 <i>Trichoderma sp</i>	1	>128	2	2
PI-54 <i>S. hyalinum</i>	>16	>128	8	0,06
PI-55 <i>P. citrinum</i>	0,5	>128	4	0,5
PI-55 <i>P. spinulosum</i>	1	>128	2	1
PI-55 <i>P. commune</i>	>16	>128	>16	0,06
PI-56 <i>P. commune</i>	>16	>128	>16	2
PI-57 <i>F. incarnatum</i>	>16	>128	>16	4
PI-61 <i>F. solani</i>	>16	>128	>16	>16
PI-62 <i>P. commune</i>	2	>128	8	1
PI-63 <i>A. fumigatus</i>	1	>128	>16	0,25
PI-64 <i>P. commune</i>	2	>128	1	0,125
PI-66 <i>A. penicillioides</i>	2	>128	>16	4
PI-66 <i>P. citrinum</i>	2	>128	4	0,06
PI-67 <i>P. commune</i>	2	>128	4	0,125
PI-68 <i>P. expansum</i>	2	>128	8	8
PI-68 <i>P. verruculosum</i>	1	>128	8	1
PI-69 <i>A. fumigatus</i>	4	>128	16	0,125
PI-70 <i>S. hyalinum</i>	>16	>128	2	1
PI-70 <i>F. incarnatum</i>	>16	>128	>16	>16
PI-71 <i>P. purpurogenum</i>	0,25	>128	8	0,125
PI-74 <i>P. purpurogenum</i>	1	>128	2	0,125
PI-75 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,06
PI-76 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,06
PI-78 <i>Curvularia sp</i>	>16	>128	>16	>16
PI-79 <i>A. fumigatus</i>	2	>128	>16	0,25
PI-83 <i>P. decumbens</i>	4	>128	1	0,03
PI-83 <i>P. commune</i>	16	>128	>16	16
PI-84 <i>P. commune</i>	>16	>128	>16	>16
PI-85 <i>P. purpurogenum</i>	>16	>128	8	1
PI-85 <i>P. commune</i>	8	>128	>16	2
PI-86 <i>P. expansum</i>	>16	>128	>16	0,06
PI-86 <i>P. commune</i>	4	>128	4	0,06
PI-87 <i>P. commune</i>	2	>128	0,5	>16
PI-89 <i>A. flavus</i>	1	>128	8	0,25
PI-89 <i>P. commune</i>	4	>128	2	>16
PI-93 <i>A. flavus</i>	2	>128	8	0,25
PI-93 <i>A. penicillioides</i>	8	>128	2	0,06
PI-94 <i>P. commune</i>	2	>128	1	8
PI-95 <i>P. commune</i>	1	>128	0,5	>16
PI-96 <i>P. expansum</i>	2	>128	1	0,125
PI-99 <i>P. commune</i>	4	>128	1	8
PI-99 <i>P. spinulosum</i>	>16	>128	8	0,03
PI-100 <i>P. expansum</i>	8	>128	1	0,06
PI-101 <i>P. commune</i>	>16	>128	1	>16
PI-101 <i>P. citrinum</i>	4	>128	8	0,06
PI-101 <i>F. incarnatum</i>	>16	>128	>16	>16
PI-103 <i>P. commune</i>	0,25	>128	>16	0,06

PI= poços irregulares, µg/ml= micrograma/microlitro

itra= itraconazol, fluco= fluconazol, ceto= cetoconazol, anfo= anfotericina B

Continuação do Anexo 6 - Resultados da microdiluição de filamentosos isolados de poços irregulares.

Espécies	Microdiluição($\mu\text{g/ml}$)			
	itra	fluco	ceto	anfo
PI-104 <i>P. expansum</i>	>16	>128	>16	>16
PI-105 <i>F. incarnatum</i>	>16	>128	8	0,5
PI-105 <i>P. citrinum</i>	2	>128	4	0,5
PI-107 <i>P. commune</i>	8	>128	>16	0,125

PI= poços irregulares, $\mu\text{g/ml}$ = micrograma/microlitro

itra= itraconazol, fluco= fluconazol, ceto= cetoconazol, anfo= anfotericina B