



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANA GOMES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE LEVEDURAS ISOLADAS
DO SOLO SOBRE O CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Londrina
2017

GIOVANA GOMES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE LEVEDURAS ISOLADAS
DO SOLO SOBRE O CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C331a Carvalho, Giovana Gomes de.
Avaliação da influência de leveduras isoladas do solo sobre o crescimento in vitro de *Paracoccidioides brasiliensis* / Giovana Gomes de Carvalho. - Londrina, 2017.
71 f. : il.

Orientador: Mário Augusto Ono.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose - Fungo - Tese. 2. Micose - Tese. 3. Leveduras isoladas - Solo - Tese. 4. *Paracoccidioides brasiliensis* - Tese. I. Ono, Mário Augusto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

GIOVANA GOMES DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE LEVEDURAS ISOLADAS DO
SOLO SOBRE O CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Paracoccidioides
brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de novembro de 2017.

Dedico este trabalho a meus pais,
minha rocha e proteção.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Mario Augusto Ono pela oportunidade, paciência e ensinamentos de grande valor para a realização deste trabalho e crescimento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudo.

À professora Dr^a. Eiko Nakagawa Itano e ao professor Dr. Zoilo Pires de Camargo, pelo auxílio com os isolados de *Paracoccidioides* spp. À professora Dr^a. Daniele Sartori, por toda a atenção e auxílio com técnicas moleculares.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental por todo o conhecimento transmitido.

Ao técnico de laboratório Nilson de Jesus Carlos, sempre muito atencioso e prestativo.

À Rafaela Macagnan pela coleta das amostras de solo, o que tornou possível a realização deste trabalho. Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Imunologia Animal da UEL, Aline M. Omori, Igor S. Suguiura, Tatiane F. Petroni e Larissa Justino pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos colegas de curso pela amizade e auxílio nas disciplinas.

A meus pais, Victor H. de Carvalho e Aurora A. G. de Carvalho, e meus irmãos, Gabriel G. de Carvalho e Miguel G. de Carvalho, por todo o incentivo e carinho.

Ao meu companheiro, Lucas R. M. Ishiuchi, por toda paciência e carinho, mesmo frente às adversidades.

A Deus, pela força e perseverança nos momentos difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram na realização deste projeto.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

“O sucesso é a soma de pequenos
esforços – repetidos dia sim, e no outro
dia também.”

Robert Collier

CARVALHO, Giovana Gomes de. **Avaliação da influência de leveduras isoladas do solo sobre o crescimento *in vitro* de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Fungos do gênero *Paracoccidioides* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose, uma micose granulomatosa sistêmica endêmica na América Latina. O Brasil é o país com o maior número de casos e os mais acometidos pela doença são trabalhadores rurais do sexo masculino. O habitat de *Paracoccidioides* spp. ainda não está definido, embora estudos sugiram que o fungo habite o solo. O estudo sobre a interação deste patógeno com outros organismos presentes no solo pode fornecer dados importantes sobre o nicho ecológico do fungo e a dificuldade de seu isolamento a partir de amostras ambientais. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência de leveduras isoladas de amostras de solo sobre o crescimento de *P. brasiliensis* (Pb18 e B-339). As amostras de solo foram coletadas em três cidades localizadas na região Sul brasileira: Mauá da Serra (n=8) e Loanda (n=5), Paraná e Joaçaba (n=8), Santa Catarina. Foi avaliado o crescimento de *P. brasiliensis* em: (1) co-cultivo com as leveduras; (2) em meio de cultura contendo sobrenadante de cultivo filtrado ou autoclavado, produzido pelas leveduras em monocultura; e (3) em meio de cultura contendo sobrenadante de co-cultivo de leveduras e *P. brasiliensis*. Adicionalmente, foi realizada a avaliação semiquantitativa da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e análise da atividade de compostos voláteis produzidos pelas leveduras. Dezenove leveduras inibiram o crescimento do Pb18 entre 89 e 100% e 17 leveduras inibiram B-339 entre 95 e 100% no ensaio de co-cultivo em meio sólido. Os sobrenadantes de cultivo das leveduras apresentaram maior efeito inibitório sobre B-339. Quatro leveduras isoladas de Mauá da Serra foram utilizadas nos ensaios posteriores. Três destas leveduras foram identificadas como *Meyerozyma caribbica* e uma como *Candida* sp. Os isolados de *M. caribbica* apresentaram produção de compostos voláteis inibitórios sobre *P. brasiliensis* e produção de proteases e lipases extracelulares, o que não foi observado com o isolado de *Candida* sp. Os sobrenadantes de co-cultivo na concentração de 75% apresentaram maior potencial inibitório sobre Pb18 (16,2 a 25,5% de inibição) e B-339 (43,7 a 57,8%). Os resultados sugerem que a inibição do crescimento de *Paracoccidioides* spp. por leveduras do solo pode ser um dos fatores que dificultam o isolamento do fungo a partir de amostras de solo.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose; co-cultivo; antagonismo; enzimas hidrolíticas.

CARVALHO, Giovana Gomes de. **Evaluation of the influence of yeasts isolated from soil on the *in vitro* growth of *Paracoccidioides brasiliensis***. 2017. 70 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Fungi of *Paracoccidioides* genus are the etiologic agents of paracoccidioidomycosis, a systemic granulomatous mycosis endemic in Latin America. Brazil is the country with the highest number of cases and male rural workers are the most affected by the disease. The habitat of *Paracoccidioides* spp. is not yet defined, although studies suggest that the fungus inhabits the soil. The study on the interaction of this pathogen with other organisms present in the soil can provide important information about the ecological niche of the fungus and the difficulty of its isolation from environmental samples. This study aimed to evaluate the influence of yeasts isolated from soil samples on the growth of *P. brasiliensis* (Pb18 and B-339). Soil samples were collected in three cities located in southern Brazil: Mauá da Serra (n=8) and Loanda (n=5), Paraná and Joaçaba (n=8), Santa Catarina. The growth of *P. brasiliensis* was evaluated in: (1) co-cultivation with yeasts; (2) in culture medium containing filtered or autoclaved culture supernatant, produced by the yeasts in monoculture; and (3) in culture medium containing yeast and *P. brasiliensis* co-culture supernatant. Furthermore, a semiquantitative evaluation of the production of extracellular hydrolytic enzymes and analysis of the activity of volatile compounds produced by yeasts were performed. Nineteen yeasts inhibited Pb18 growth between 89 and 100% and 17 yeasts inhibited B-339 between 95 and 100% in the solid medium co-culture assay. The yeast culture supernatants showed the greatest inhibitory effect on B-339. Four yeasts isolated from Mauá da Serra were used in the subsequent assays. Three of these yeasts were identified as *Meyerozyma caribbica* and one as *Candida* sp. The *M. caribbica* isolates showed production of inhibitory volatile compounds on *P. brasiliensis* and production of extracellular proteases and lipases, which was not observed with the *Candida* sp isolate. The co-culture supernatants at a concentration of 75% showed greater inhibitory potential on Pb18 (inhibition of 16,2 to 25,5%) and B-339 (43,7 to 57,8%). The results suggest that inhibition of *Paracoccidioides* spp. growth by yeasts on the soil may be impairing the attempts of the isolation of this pathogen from soil samples.

Key words: paracoccidioidomycosis; co-culture; antagonism; hydrolytic enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Morfologia de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	17
Figura 2	– Distribuição geográfica das espécies de <i>Paracoccidioides</i>	19
Figura 3	– Localização das cidades de coleta das amostras de solo.....	28
Figura 4	– Esquema da inoculação dos isolados de levedura do solo e de <i>P. brasiliensis</i>	32
Figura 5	– Esquema da produção e processamento do sobrenadante de cultivo das leveduras do solo	34
Figura 6	– Percentual de crescimento do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Mauá da Serra	42
Figura 7	– Percentual de crescimento do isolado B-339 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Mauá da Serra	42
Figura 8	– Percentual de crescimento do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Loanda	43
Figura 9	– Percentual de crescimento do isolado B-339 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Loanda	43
Figura 10	– Percentual de crescimento do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Joaçaba.....	44
Figura 11	– Percentual de crescimento do isolado B-339 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Joaçaba.....	44
Figura 12	– Percentual de crescimento do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de co-cultivo.....	48
Figura 13	– Percentual de crescimento do isolado B-339 de <i>P. brasiliensis</i> em meio contendo sobrenadante de co-cultivo.....	48
Figura 14	– Teste semiquantitativo da atividade de proteases e lipases presentes no sobrenadante do co-cultivo da levedura 50.1 e o isolado B-339 de <i>P. brasiliensis</i> (M50.1 + B-339)	52

Figura 15 – Percentual de crescimento do isolado Pb18 de <i>P. brasiliensis</i> sob influência de compostos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras.....	53
Figura 16 – Percentual de crescimento do isolado B-339 de <i>P. brasiliensis</i> sob influência de compostos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de levedura do solo.....	29
Tabela 2 – Inibição do crescimento dos isolados de <i>P. brasiliensis</i> em co-cultivo com as leveduras do solo.....	40
Tabela 3 – Correlação entre o crescimento das leveduras do solo e o percentual de inibição de <i>P. brasiliensis</i>	41
Tabela 4 – Identificação das leveduras isoladas do solo selecionadas	47
Tabela 5 – Índice enzimático da atividade de proteases e lipases extracelulares produzidas por leveduras isoladas do solo	50
Tabela 6 – Atividade de proteases e lipases em sobrenadantes de cultivo de leveduras isoladas do solo	51
Tabela 7 – Atividade de proteases e lipases em sobrenadantes de co-cultivo de leveduras isoladas do solo e <i>P. brasiliensis</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
µg	Micrograma(s)
µM	Micromolar(es)
ANOVA	<i>Analysis on variance</i> (Análise de variâncias)
BDA	Batata dextrose ágar
BHI	<i>Brain-heart infusion</i> (Infusão cérebro-coração)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CaCl ₂ .7H ₂ O	Cloreto de cálcio hepta-hidratado
cm	Centímetro(s)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
ex.	Exemplo
HCl	Ácido clorídrico
Hz	Hertz
IE	Índice enzimático
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaçador transcrito interno)
L	Litro(s)
M	Molar(es)
MC	Média de crescimento
mg	Miligrama(s)
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (Concentração mínima inibitória)
min	minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimolar(es)
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i> ([3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio])
NaCl	Cloreto de sódio
n	Número

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)
ng	Nanograma(s)
°C	Graus Celsius
P	Forma de processamento
p	Peso
pb	Pares de base
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo de comprimento de fragmento de limitação)
rpm	Rotações por minuto
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
seg	Segundo(s)
T	Temperatura
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
v	Volume
YCB	<i>Yeast carbon base medium</i> (Meio base de carbono para leveduras)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	MORFOLOGIA, CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>PARACOCCIDIOIDES</i>	17
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	20
1.3	DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE <i>PARACOCCIDIOIDES</i> DE AMOSTRAS DO AMBIENTE	21
1.4	INFECÇÃO POR <i>P. BRASILIENSIS</i> EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES	22
1.5	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> DA INTERAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS	23
1.6	LEVEDURAS DO SOLO	24
1.7	<i>PARACOCCIDIOIDES</i> E LEVEDURAS DO SOLO	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	ISOLADOS DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	28
3.2	COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO	28
3.3	ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DAS AMOSTRAS DE SOLO	29
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA DAS LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO	30
3.5	<i>NESTED</i> PCR	30
3.6	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO	31
3.7	CO-CULTIVO EM MEIO SÓLIDO.....	32
3.8	CULTIVO DE <i>P. BRASILIENSIS</i> EM MEIO CONTENDO SOBRENADANTE DE CULTURAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO	33
3.9	CULTIVO DE <i>P. BRASILIENSIS</i> EM MEIO CONTENDO SOBRENADANTE DE CO- CULTIVO	34
3.10	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS VOLÁTEIS	35
3.11	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE <i>P. BRASILIENSIS</i> E DAS LEVEDURAS ISOLADAS DO SOLO.....	35
3.12	PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES	36
3.12.1	Proteases	36

3.12.2	Lipases	37
3.12.3	Ação de Enzimas Hidrolíticas Extracelulares em Sobrenadantes de Co-cultivo.....	37
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	CO-CULTIVO EM MEIO SÓLIDO (PAREAMENTO EM PLACA).....	39
4.2	ATIVIDADE DE SOBRENADANTE DE CULTIVO DAS LEVEDURAS DO SOLO	41
4.3	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO SOLO	46
4.4	EFEITO DE SOBRENADANTE DE CO-CULTIVO SOBRE O CRESCIMENTO DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	47
4.5	ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES	50
4.5.1	Produção de Proteases e Lipases por Leveduras Isoladas do Solo.....	50
4.5.2	Atividade de Proteases e Lipases em Sobrenadante de Cultivo e Co-cultivo.....	51
4.6	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS VOLÁTEIS	53
5	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

Os fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica mais prevalente e endêmica na América Latina (BRUMMER et al., 1993; THEODORO et al., 2012). A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz ao analisar lesões bucais de dois pacientes em São Paulo, Brasil (LUTZ, 1908). Esta doença possui elevada importância na saúde pública, uma vez que apresenta grande potencial incapacitante e pode levar o paciente a óbito quando não diagnosticada e tratada corretamente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

1.1. Morfologia, classificação e distribuição geográfica de *Paracoccidioides*

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* possuem termodimorfismo, desenvolvendo-se a 25°C sob a forma de micélio, com aparência macroscópica cotonosa e branca (Figura 1 – A). Microscopicamente, exibe hifas finas e septadas e clamidoconídios terminais ou intercalados (Figura 1 – B). Nos tecidos do hospedeiro, a 37°C, apresenta forma de levedura. Em meio de cultura as leveduras formam colônias cerebriformes de coloração creme (Figura 1 – C) e ao microscópio observa-se células arredondadas ou ovais com brotamentos únicos ou múltiplos (Figura 1 – D) (BRUMMER et al., 1993).

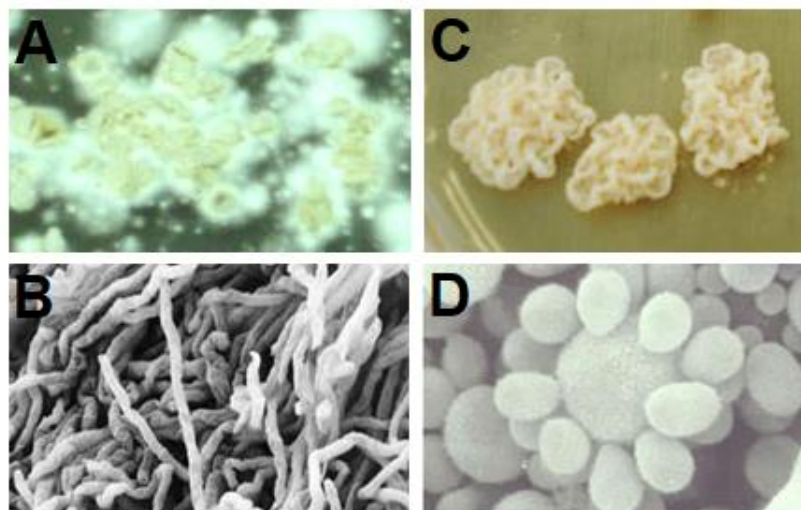


Figura 1 – Morfologia de *Paracoccidioides brasiliensis*. Aspectos macro e microscópico

de *P. brasiliensis* a 23°C (A e B) e 37°C (C e D). Fonte: modificado de Imagens do Conhecimento – UFMG¹ (A e C); SAN-BLAS, 2006 (B e D).

Fungos do gênero *Paracoccidioides* pertencem à família Onygenaceae (filo Ascomycota, classe Euromycetes, ordem Onygenales), a mesma de outros fungos patogênicos para humanos como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* e *Lacazia loboi*, que é considerada espécie-irmã de *Paracoccidioides* (BIALEK et al., 2000; HERR et al., 2001; SAN-BLAS et al., 2002; RICHINI-PEREIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2009).

Em 2004 houve a separação de um clado da família Onygenaceae com a criação da família Ajellomycetaceae, onde foram realocados os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (UNTEREINER et al., 2004). Os membros destes gêneros são adaptados a hospedeiros vertebrados, possuem termodimorfismo e apresentam produção de artroconídios (BAGAGLI et al., 2008). Acredita-se que estas espécies possam ter evoluído em associação com hospedeiros vertebrados, apresentando uma fase saprófita no solo ou em fezes e uma fase parasitária em tecidos do hospedeiro (HERR et al., 2001; UNTEREINER et al., 2004; BAGAGLI et al., 2006).

Estudos filogenéticos utilizando genealogia multi loci permitiram a classificação do gênero *Paracoccidioides* em duas espécies: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009). *P. brasiliensis* é um complexo formado por quatro espécies crípticas² denominadas S1, PS2, PS3 (MATUTE et al., 2006) e PS4 (MUÑOZ et al., 2016). A espécie S1 é amplamente distribuída pela América do Sul, sendo encontrada principalmente no Brasil e Argentina. A PS2 tem sido identificada no Brasil e Venezuela. A espécie PS3 aparentemente é restrita à Colômbia e a PS4 tem sido reportada somente na Venezuela (MATUTE et al., 2006; THEODORO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2016) (Figura 2).

Um estudo recente baseado em análises morfológicas e de sequências de loci mitocondriais ainda propõe uma nova reclassificação taxonômica

¹ CRUZ, R. C. Substâncias inibem ação de fungo causador de micose. Disponível em: <<https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/Imagens/Areas/Ciencias-Biologicas/Substancias-inibem-acao-de-fungo-causador-de-micose/#cont>>. Acesso em 13 abr. 2017.

² Espécies crípticas são espécies morfológicamente idênticas, ou seja, que possuem diferenças morfológicas imperceptíveis por identificação micológica clássica, mas que geneticamente possuem diferenças e estão reprodutivamente isoladas.

1.2. Paracoccidioidomicose

A PCM é a micose sistêmica mais importante na América Latina (BRUMMER et al., 1993). A taxa de incidência é de 1-3 casos para cada 100.000 habitantes e a taxa de mortalidade é de 1,4/milhão (COUTINHO, 2002; BOCCA et al., 2013). Casos esporádicos tem sido descritos fora das áreas endêmicas em pacientes que viveram ou visitaram a América Latina (VAN DAMME et al., 2006; BOUSQUET et al., 2007; MAYAYO et al., 2007; WALKER et al., 2008).

A maioria dos casos são descritos no Brasil (aproximadamente 80%), seguido por Colômbia, Venezuela e Argentina (BRUMMER et al., 1993; SAN-BLAS et al., 1993; 2002; WANKE & LONDERO, 1994; MC EWEN et al., 1995; RAMOS-E-SILVA & SARAIVA, 2008). No Brasil a PCM é considerada a oitava causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO et al., 2002) e a maioria dos casos tem sido relatados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (BRUMMER et al., 1993). Aproximadamente 51% das 3.583 mortes confirmadas no Brasil por micoses sistêmicas entre 1996-2006 foram causadas por PCM (PRADO et al., 2009). Estima-se ainda que 10 milhões de pessoas podem estar infectadas (MC EWEN, 1995). De acordo com Martinez (2010), a estimativa de 3.360 novos casos por ano reflete a fatalidade e taxas de mortalidade atribuídas à PCM no Brasil.

A infecção ocorre provavelmente pela inalação de propágulos fúngicos do ambiente (BUSTAMANTE et al., 1985). Ao atingirem os pulmões, convertem-se em leveduras (MC EWEN et al., 1987) e podem se disseminar para outros tecidos por via hematogênica ou linfática. Geralmente a infecção é assintomática e o fungo pode permanecer latente no hospedeiro por anos em lesões pulmonares residuais e linfonodos mediastinais (FRANCO et al., 1986). Má nutrição, consumo de álcool e tabagismo são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da doença (SILVA-VERGARA et al., 2000).

A doença pode se manifestar nas formas aguda ou crônica (FRANCO et al., 1987). A forma aguda/subaguda ou juvenil é a mais grave, uma vez que se desenvolve rapidamente e acomete majoritariamente crianças e jovens de ambos os sexos. Há o comprometimento de órgãos retículo-endoteliais, pele e ossos. Esta forma representa cerca de 10% de todos os casos (RESTREPO et al.,

2012; 2015).

A PCM crônica ou adulta é a mais prevalente, representando 80% dos casos. Possui progressão lenta e acomete principalmente indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 e 50 anos, que executam ou executaram atividades relacionadas ao manejo do solo (MARQUES, 2003). A infecção pulmonar é a manifestação clínica mais comum, seguido da disseminação para outros órgãos e tecidos como mucosas, linfonodos, fígado e baço. Pode haver também o acometimento mucocutâneo com lesões ulceradas de expansão lenta, envolvendo geralmente a face, em especial a região nasal e oral (RESTREPO et al., 2012, 2015).

A PCM doença afeta mais homens adultos que mulheres, com razão de 13:1 (RESTREPO, 2012, 2015; COLOMBO et al., 2011; BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013). O estrogênio, hormônio produzido em maior quantidade nas mulheres, inibe a conversão da forma de micélio para levedura, podendo este ser um dos fatores que explique esta diferença (SHANKAR et al., 2011). Entre pacientes crianças e jovens não é observada essa predominância, com razão de 1 a 2 homens para cada mulher (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Os medicamento classicamente utilizados no tratamento da PCM são a anfotericina B, sulfonamidas, como o sulfametoxazol, e derivados azólicos como cetoconazol, imidazol e fluconazol (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; TRAVASSOS, TABORDA & COLOMBO, 2008).

1.3. Detecção e isolamento de *Paracoccidioides* de amostras do ambiente

Embora muitos aspectos da PCM estejam esclarecidos, o habitat de *Paracoccidioides* ainda não está definido. A maioria dos isolados de *Paracoccidioides* spp. são provenientes de amostras clínicas, porém fatores como o longo período de latência, que pode chegar a décadas, e a migração dos pacientes dificultam a identificação do período e local exato da infecção (RESTREPO, 2000; SHINKANAI-YASUDA et al., 2006).

Acredita-se que o fungo cresça saprofiticamente no solo, semelhante a outros patógenos termodimórficos como *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*, cuja associação com o solo já foi determinada (ZEIDBERG et al., 1952;

KIRKLAND et al., 1996). No entanto, os relatos de isolamento de *P. brasiliensis* da natureza são escassos e não possuem reprodutibilidade, o que dificulta a identificação das características do seu nicho ecológico.

Isolados ambientais de *P. brasiliensis* foram obtidos a partir de amostras de solo na Argentina (NEGRONI, 1966), Venezuela (ALBORNOZ, 1971) e Brasil (SHOME & BATISTA, 1963; SILVA-VERGARA et al., 1998). O fungo também foi isolado a partir de amostras de ração canina contaminada com solo no Brasil (FERREIRA et al., 1990). O emprego de técnicas de biologia molecular permitiu um grande avanço na detecção de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solo e aerossol, porém sem seu isolamento (THEODORO, 2005; ARANTES et al., 2013; 2016).

Estudos epidemiológicos sugerem que *Paracoccidioides* spp. encontra-se na natureza em locais com temperatura amena (<27°C) e sem grandes alterações. Em altitudes mais elevadas (>800 m); clima temperado, com verões chuvosos e invernos secos; regiões mais úmidas, perto de rios e lagos e com taxa de precipitação média a alta (2000–2999 mm/ano). Em áreas nativas, com solos férteis e presença de florestas tropicais e subtropicais (CALLE et al., 2001; RESTREPO, MC EWEN & CASTAÑEDA, 2001; BAGAGLI et al., 2003; NASCIMENTO, 2005; NEVES et al., 2006; RESTREPO, GÓMEZ & TOBÓN, 2012; RESTREPO, TOBÓN & CANO, 2015). O fungo tem sua adaptação favorecida em solos ricos em matéria orgânica, com pH ácido e baixo teor de alumínio trocável (RESTREPO et al., 1985; TERÇARIOLI et al., 2007). Terçarioli e cols (2007) demonstraram *in vitro* que isolados de *P. brasiliensis* conseguem se desenvolver bem tanto em solos argilosos quanto arenosos quando em umidade elevada.

1.4. Infecção por *P. brasiliensis* em animais domésticos e silvestres

Vários estudos demonstraram a infecção por *P. brasiliensis* em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres, como cães (MÓS & FAVA-NETTO, 1974; ONO et al, 2001; RICCI, et al 2004; SILVEIRA et al., 2006; CANTEROS et al., 2010; FONTANA et al., 2010; FARIAS et al, 2011), gatos (OLIVEIRA et al., 2013), equinos (CONTI-DIAZ et al, 1972; COSTA & FAVA-NETTO, 1978; CORTE et al, 2009), bovinos (GUTIERREZ et al, 1974; SILVEIRA et al, 2008), ovinos e caprinos (COSTA & FAVA-NETTO, 1978; OLIVEIRA et al, 2011;

FERREIRA et al., 2013), galinhas (OLIVEIRA et al, 2011), coelhos (BELITARDO et al., 2014a), suínos (BELITARDO et al., 2014b), macacos (JOHNSON, et al 1977; COSTA et al, 1995; CORTE et al, 2007) e roedores silvestres (SBEGHEN et al., 2015).

A infecção tem sido demonstrada principalmente em tatus (NAIFF et al., 1986 e 1989; MACEDO et al., 1998; BAGAGLI et al., 1998; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; FERNANDES et al., 2004). O tatu possui o hábito de cavar túneis e vive em tocas escavadas no solo (BOCCA et al., 2013). Além disso há vários relatos de isolamento de *P. brasiliensis* deste animal e o fungo também foi detectado em amostras de solo de tocas em áreas endêmicas da PCM, reforçando a hipótese de que o solo é o habitat de *Paracoccidioides* spp. O tatu também possui a temperatura corpórea ideal para o crescimento do fungo e imunidade celular relativamente baixa (BOCCA et al., 2013), podendo ser utilizado como marcador epidemiológico da doença (BAGAGLI et al., 2003; ARANTES et al., 2016).

1.5. **Análise *in vitro* da interação entre microorganismos**

A influência de microrganismos sobre o crescimento de fungos presentes no solo pode ser avaliada utilizando diversas metodologias. Alguns exemplos são o co-cultivo ou pareamento, ensaio de compostos voláteis e o uso de sobrenadante de cultivo contendo metabólitos do microrganismo antagonista.

Muotoe-Okafor & Gughani (1997) avaliaram a interação *in vitro* entre *Histoplasma capsulatum* var *duboisii* e outros fungos isolados de amostras de solo por meio do co-cultivo. Com esta técnica foi possível observar que as espécies *Aspergillus fumigatus* e *Microsporium gypseum* inibiram completamente o crescimento do fungo. Houve inibição parcial com *Leythophora mutabilis* e inibição mútua com *Wangiella dermatitidis*. A cultura filtrada de *Chrysosporium indicum* também inibiu o crescimento do patógeno.

Mc Donough e cols (1973) demonstraram por meio do co-cultivo em solo estéril e em meio de cultura com *B. dermatitidis* previamente semeado que espécies de *Streptomyces* e *Bacillus* isolados do solo inibem o crescimento de *B. dermatitidis*.

Furlani e cols (2007), por sua vez, avaliaram a atividade de células,

cultura autoclavada e cultura filtrada de *Bacillus* spp. no biocontrole de *Colletotrichum acutatum* e puderam observar com estas técnicas que todos os isolados bacterianos inibiram o crescimento do fungo. Também verificaram que o cultivo bacteriano ativo e a cultura filtrada foram os tratamentos mais eficazes na inibição, com redução na produção de colônias, germinação de conídios e crescimento fúngico.

Isaias de cols (2014) também analisaram a ação antagônica de *Trichoderma* spp. e de seus metabólitos bioativos contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. Foi realizado o ensaio de pareamento e na avaliação dos metabólitos não-voláteis foi utilizado sobrenadante de cultivo filtrado do fungo incorporado ao meio de cultura fundente. Também foi avaliada a termoestabilidade dos metabólitos, no qual os filtrados de cultura foram submetidos a aquecimento a 121°C antes de serem incorporados ao meio de cultivo. Houve inibição do crescimento de *S. rolfsii* e *V. dahliae* quando confrontados com 20 isolados de *Trichoderma*. No ensaio a ação de vários metabólitos não-voláteis e metabólitos termoestáveis de isolados de *Trichoderma* não influenciaram no crescimento de *S. rolfsii*.

Um estudo de Ferraz e cols (2016) combinou o uso de diversos ensaios como pareamento, produção de compostos voláteis, uso de sobrenadantes de cultivo filtrado e autoclavado, atividade *killer*, competição por nutrientes e produção de enzimas hidrolíticas para avaliar a capacidade de biocontrole de leveduras sobre o fungo *Geotrichum citri-aurantii*. Com o emprego destas técnicas, os autores puderam observar que nenhum dos isolados de levedura analisados produziram compostos voláteis ou compostos inibitórios em sobrenadantes de cultivo em quantidade suficiente para inibir o crescimento de *G. citri-aurantii*. Também não houve competição por nutrientes, no entanto três leveduras apresentaram atividade *killer* e produção de enzimas hidrolíticas, sendo apontadas como o provável mecanismo de biocontrole do patógeno.

1.6. Leveduras do solo

O solo é um dos ambientes mais adequados para o crescimento microbiano (CAVALCANTI et al., 2006), compreendendo diversas espécies de bactérias, protozoários, nematóides, fungos, entre outros organismos que interagem entre si. Um grama de solo contém até dez bilhões de microrganismos, incluindo

entre 1.000 e 10.000 espécies de procariotos desconhecidos (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001).

As leveduras são fungos unicelulares e importantes membros de muitos ecossistemas, contribuindo significativamente para a biodiversidade (FLEET, 1998). São encontradas principalmente nos primeiros 10 cm de profundidade do solo, em consequência de sua habilidade em crescer aerobicamente em uma grande diversidade de compostos de carbono. Podem variar entre menos de 10 a 10⁶ células cultiváveis por grama de solo (DO CARMO-SOUSA, 1969; PHAFF & STARMER, 1987). Dentre as funções das leveduras neste ambiente estão a decomposição, o aprimoramento do crescimento de plantas, contribuição no processo de mineralização, manutenção da estrutura (agregação) do solo e transformação de nutrientes (BOTHA, 2011).

O desenvolvimento e sobrevivência das leveduras em seu ambiente não depende somente das características e habilidades individuais específicas, mas é o resultado das interações com a comunidade microbiana do solo (BOTHA, 2006). Uma vez que as leveduras coexistem com diversos organismos no solo, vários tipos de associações podem ocorrer, como cooperação (ex. simbiose com raízes de plantas e outros microrganismos rizosféricos), predação (são presas para micro-artrópodes, nematóides, protistas, bactérias, entre outros), antagonismo contra predadores do solo (como nematóides), competição (com outros fungos e bactérias por nutrientes, ferro) e amensalismo (principalmente contra outros fungos, pela produção de micocinas) (BOTHA, 2011).

No entanto, mesmo com todas as funções biológicas das leveduras no meio ambiente já descritas, muito ainda necessita ser elucidado a respeito do modo de ação de leveduras em ambientes específicos e seu comportamento antagônico em relação a outros organismos (ROSA-MAGRI et al., 2011).

1.7. *Paracoccidioides* e leveduras do solo

Em sua fase saprófita, *Paracoccidioides* spp. pode estar interagindo com outros microrganismos presentes no solo, como as leveduras, que podem ser capazes de inibir seu crescimento. Por possuir crescimento lento quando comparado a outros fungos e alta demanda nutricional (RESTREPO, 1985), seu desenvolvimento também se tornaria limitado neste ambiente, culminando na

dificuldade de seu isolamento deste tipo de amostra.

Foi evidenciado que o crescimento do fungo pode ser inibido *in vitro* por diferentes defensivos agrícolas, o que poderia dificultar seu isolamento de áreas agrícolas (ONO et al., 2002). Queiroz-Telles (2008) aponta que o aumento expressivo das plantações de cana-de-açúcar na região sudeste do Brasil pode contribuir para a diminuição na incidência da PCM em decorrência das práticas agrícolas normalmente empregadas neste tipo de cultivo, como a larga utilização de pesticidas e a queima do plantio. A queima do plantio pode elevar significativamente a temperatura do solo e muitos fungicidas agrícolas utilizados são derivados azólicos. A combinação destas práticas pode afetar vários microrganismos presentes no solo, incluindo *Paracoccidioides* spp.

Os fatores acima citados prejudicam a detecção do fungo em áreas agrárias. Por esta razão, o estudo da interação entre *Paracoccidioides* spp. e outros microrganismos provenientes de solo, especialmente em áreas preservadas, se faz necessário. A compreensão destas interações pode fornecer dados importantes sobre o nicho ecológico do fungo e a dificuldade de seu isolamento a partir deste tipo de amostra, bem como auxiliar na elucidação de mais aspectos da ecoepidemiologia da PCM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o antagonismo entre leveduras isoladas de amostras de solo e isolados de *P. brasiliensis in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar leveduras de amostras de solo de duas localidades do Paraná e uma de Santa Catarina.
- Avaliar o antagonismo entre leveduras isoladas do solo e isolados de *P. brasiliensis* por meio da técnica de co-cultivo em meio sólido e pela produção de compostos voláteis.
- Obter sobrenadante de cultivo de leveduras isoladas do solo e do co-cultivo de leveduras com isolados de *P. brasiliensis*.
- Avaliar o efeito de sobrenadante de cultivo de leveduras e co-cultivo sobre o crescimento de *P. brasiliensis*.
- Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas pelas leveduras isoladas do solo.
- Identificar as leveduras isoladas do solo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados de *P. brasiliensis*

Foram utilizados dois isolados de referência de *P. brasiliensis*: B-339 (RESTREPO-MORENO & SCHNEIDAU, 1967) e Pb18 (TEIXEIRA et al., 1987), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo (UNIFESP). Estes isolados pertencem à espécie críptica S1 e foram mantidos em ágar Sabouraud dextrose (Acumedia®, Lansing, USA) a 36°C, com repiques semanais.

3.2. Coleta das amostras de solo

Amostras de solo foram coletadas em diferentes localidades em áreas nativas das cidades de Mauá da Serra, Loanda (Paraná) e Joaçaba (Santa Catarina) (Figura 3).

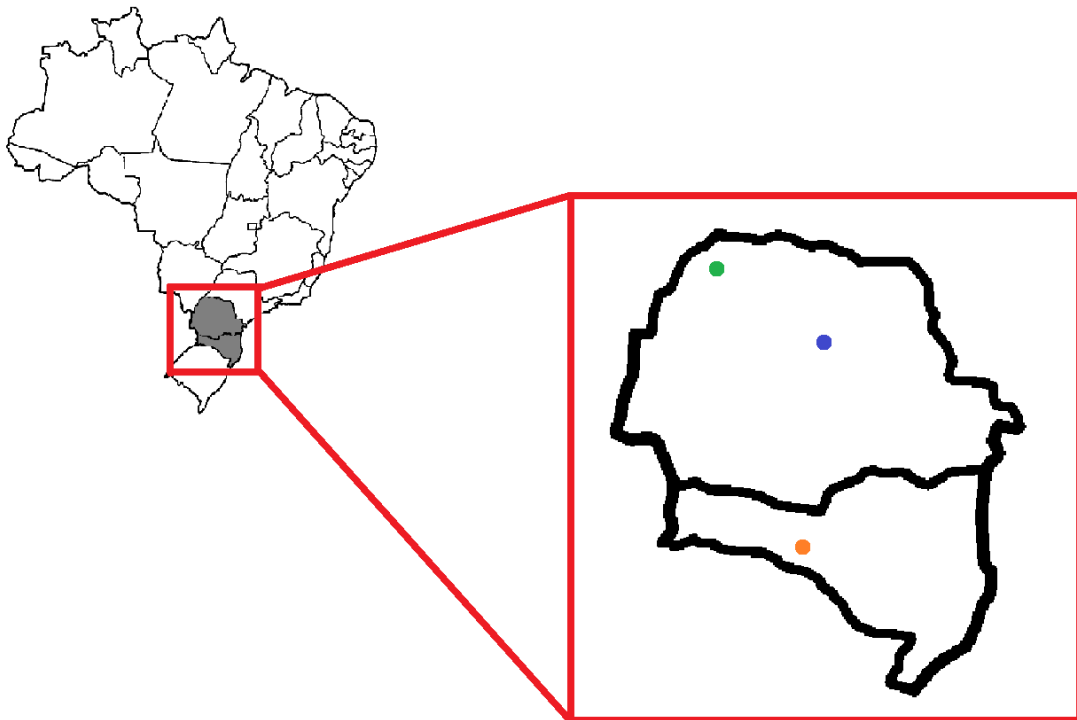


Figura 3 – Localização das cidades de coleta das amostras de solo. Mapa dos estados do Paraná e Santa Catarina com a localização das cidades de Mauá da Serra (ponto azul), Loanda (ponto verde) e Joaçaba (ponto laranja). Fonte: o autor.

As amostras foram coletadas a uma profundidade de até aproximadamente oito centímetros utilizando espátula, acondicionadas em frascos plásticos estéreis com tampa e trazidas ao Laboratório de Imunologia Animal da UEL para processamento e análise.

3.3. Isolamento das leveduras das amostras de solo

As amostras do solo foram diluídas a 1:10 (p/v) em solução salina 0,9% estéril contendo cloranfenicol a 50 mg/L e agitadas a 100 rpm durante 10 min. Após 1 min de repouso, foram semeados 100 µL do sobrenadante de cada amostra em placas de Petri contendo ágar Sabouraud, em duplicata, e incubadas a 36°C, sendo acompanhadas por 20 dias para a observação do aspecto morfológico das colônias formadas e isolamento das leveduras.

Para os experimentos foram utilizadas 21 colônias de leveduras isoladas das amostras de Mauá da Serra (n=8), Loanda (n=5) e Joaçaba (n=8) (Tabela 1). Todos os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud a 36°C.

Tabela 1 – Isolados de levedura do solo. Nomenclatura dos isolados utilizados neste estudo e características do local de coleta das amostras de solo correspondentes.

Cidade	Nomenclatura	Características do local de coleta
Mauá da Serra	M1.3 ^a	Próximo a riacho
	M6.1 ^a	Próximo a riacho
	M7.0	Próximo a estrada
	M8.0	Região de banhado
	M50.1	Raiz de árvore
	M96.1	Toca de tatu
	M99.3	Toca não-tatu
	M99.5 ^a	Toca não-tatu
Loanda	L3b1b	Região arbórea mista
	L7b6	Toca de tatu
	L37a2b	Toca de tatu
	L53a2	Toca de tatu
	L61b4	Canavial

	J1d	Próximo a riacho
	J7a	Toca de tatu
	J13d	Toca de tatu
Joaçaba	J13g	Toca de tatu
	J14a	Toca de tatu
	J17a	Toca de tatu
	J18b2	Toca de tatu
	J19b	Toca de tatu

Fonte: o autor.

3.4. Extração de DNA das leveduras isoladas do solo

Fragmentos de colônias cultivadas por 7 dias foram depositadas em microtubos e homogeneizadas em 200 µL de tampão de lise (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0). Foram adicionadas seis pérolas de vidro e 200 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1). Os tubos foram homogeneizado a 30 Hz por 3 min em agitador TissueLyser (Qiagen, Hilden, Alemanha), duas vezes. Após a homogeneização, 200 µL de Tris-EDTA (100:10) pH 8,0 foi adicionado, seguido de centrifugação (12.000 rpm, 10 min) e transferência da fase aquosa para novo microtubo.

O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado, centrifugado, lavado duas vezes com etanol 70% e incubado a 40°C por até 20 min para secar. O *pellet* foi eluído em 20 µL de água ultrapura e a concentração de DNA foi mensurada utilizando espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher®, Wilmington, USA). Como controle positivo foi extraído DNA do isolado B-339 de *P. brasiliensis* e como controle negativo, água ultrapura. As amostras foram diluídas à concentração de 10 ng/µL.

3.5. Nested PCR

A técnica de *Nested PCR* foi realizada para averiguar a presença de *Paracoccidioides* spp. nas amostras de levedura do solo. Na primeira reação foram utilizados os *primers* externos ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TEA TAT GC-3') e ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), dispostos entre as regiões gênicas 18S e 28S (WHITE et al., 1990), gerando um fragmento de 634 pb. Os *primers*

internos foram o Pb ITS-E (5'-GAG CTT TGA CGT CTG AGA CC-3') e Pb ITS-R (5'-AAG GGT GTC GAT CGA GAG AG-3'), produzindo um fragmento de 387 pb (THEODORO, 2005). No termociclador, cada reação apresentou um período inicial de desnaturação por 10 min, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 30 seg, anelamento por 30 seg e 72°C por 45 seg; seguido de extensão final de 72°C por 10 min. A temperatura de anelamento na primeira reação foi de 60°C e na segunda, 62°C.

As reações foram realizadas utilizando 15 µL de água ultrapura, 2,5 µL de tampão, 1 µL do *primer forward* e 1 µL do *reverse* a 10 ng/µL cada, 0,75 µL de cloreto de magnésio a 50 mM, 3,0 µL de mix de dNTPs a 1,25 micromolar (µM), 0,25 µL da enzima Taq polimerase (Invitrogen™ by Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 2,5 µL do DNA molde a 10 ng/µL. Como controle negativo em todas as reações foi utilizada água ultrapura e como controle positivo, DNA de *P. brasiliensis*.

Os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e coloração por prata. O tamanho dos fragmentos foi estimado baseado na comparação com *ladder* de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, USA).

3.6. Identificação das leveduras isoladas do solo

Amostras de DNA de isolados de levedura do solo selecionados (M6.1a, M7.0, M50.1 e M96.1) foram submetidos à uma segunda etapa de PCR utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TEA TAT GC-3'). A amplificação procedeu-se com desnaturação inicial por 5 min a 95°C, 34 ciclos de: 95°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 45 seg; e extensão final por 5 min a 72°C.

Os amplicons foram purificados com acetato de amônio, seguindo o seguinte protocolo: em um microtubo contendo 20 µL de produto da PCR foi adicionado 20 µL de acetato de amônio 7,5 M. Após homogeneização, foi acrescentado 60 µL de etanol absoluto gelado e homogeneizado novamente. O microtubo foi incubado a temperatura ambiente por 20 min, centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado ao *pellet* 100 µL de etanol 70% gelado, centrifugado e o sobrenadante descartado. O microtubo foi incubado a 37°C por 15 min para secagem. O *pellet* foi eluído em 10 µL de água ultrapura e o DNA foi quantificado utilizando o aparelho NanoDrop™ Lite (Thermo

Fisher®, Wilmington, USA).

O sequenciamento das amostras foi executado no Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas da UEL. As reações foram realizadas utilizando o kit *Big Dye® Terminator Sequencing* (Thermo Fisher Scientific, USA). As sequências foram analisadas utilizando o software Bioedit versão 7.2.6 e comparadas com sequências do banco de dados GenBank (NCBI – U. S. National Library of Medicine, Bethesda MD, EUA) utilizando a ferramenta BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.7. Co-cultivo em meio sólido (pareamento em placa)

Com o auxílio de alça reta, os isolados de leveduras do solo foram inoculadas de forma puntiforme no centro de placas contendo ágar Sabouraud e cultivadas por sete dias a 36°C. Após este período, foram adicionados quatro fragmentos de *P. brasiliensis* (Pb18 ou B-339) a 1,5 cm de distância da colônia central (Figura 4). Por motivos de segurança, foi utilizado o patógeno leveduriforme.

Placas controle foram montadas sem a presença da colônia de isolado de levedura do solo. O experimento foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas a 36°C por 14 dias.

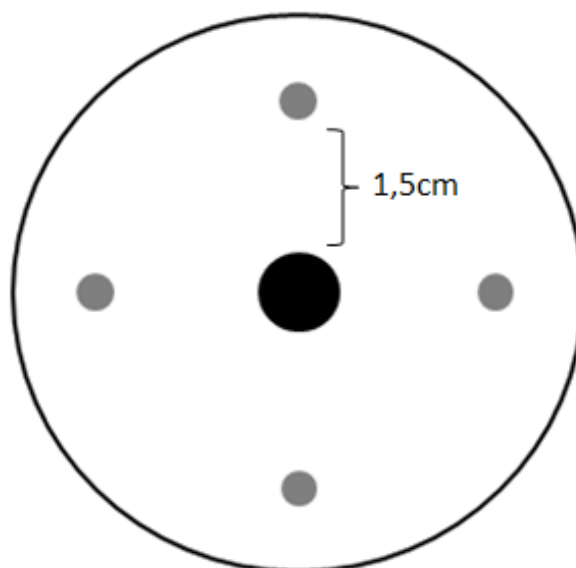


Figura 4 - Esquema da inoculação dos isolados de leveduras do solo e de *P. brasiliensis*. O círculo preto ao centro representa a localização da levedura do solo e os círculos cinza, fragmentos dos isolados de *P. brasiliensis*. Fonte: o autor.

3.8. Cultivo de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de culturas de leveduras isoladas do solo

Para avaliar a produção de compostos antifúngicos pelas leveduras, um fragmento de colônia dos isolados de leveduras do solo cultivada por 7 dias em meio ágar Sabouraud foi transferido para erlenmeyers contendo 250 mL de meio BHI caldo e incubado a 25°C e 100 rpm por 5 dias. Para a extração do sobrenadante, os cultivos foram centrifugados a 5.000 rpm por 30 min a 4°C e os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22 µm de poro (Millipore®, Billerica, USA) (Figura 5).

Para avaliar a produção de compostos antifúngicos termoestáveis, um fragmento de colônia dos isolados de leveduras do solo foi adicionado a 250 mL de meio BHI caldo e incubado a 25°C e 100 rpm por 5 dias, como descrito anteriormente. Para a extração do sobrenadante, o cultivo foi filtrado em papel filtro e autoclavado a 121°C por 20 min (Figura 5). Como controle, foram realizados os mesmos procedimentos – autoclavagem ou filtração – com erlenmeyers contendo somente o meio BHI caldo.

Os sobrenadantes foram incorporados ao meio ágar Sabouraud fundente na proporção de 50% (v/v) e vertidos em placas de Petri estéreis. Após a solidificação do meio, foram inoculados quatro fragmentos de *P. brasiliensis* (Pb18 ou B-339) em pontos equidistantes entre si. As placas foram incubadas por 14 dias a 36°C (Figura 5). O experimento foi realizado em duplicata.

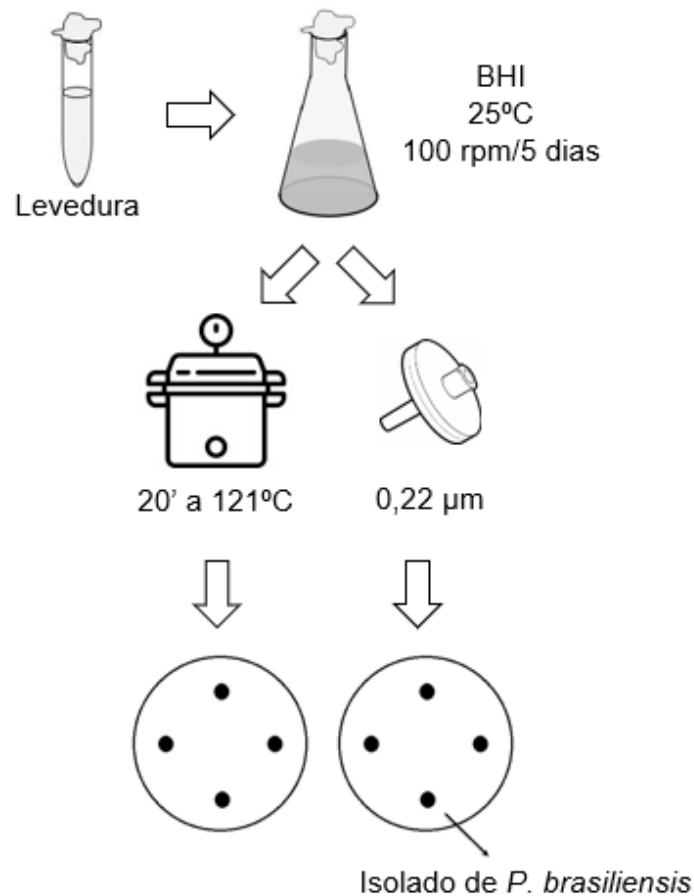


Figura 5 - Esquema da produção e processamento do sobrenadante de cultivo das leveduras do solo. Fonte: o autor.

3.9. Cultivo de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de co-cultivo

Foram utilizados neste ensaio quatro isolados de leveduras do solo selecionados: M6.1a, M7.0, M50.1 e M96.1, de Mauá da Serra. Para a produção do pré-inóculo, um fragmento de colônia de levedura cultivada por 7 dias em meio ágar Sabouraud foi transferido para um erlenmeyer contendo 250 mL de meio BHI caldo e incubado a 25°C e 150 rpm por 24 horas.

Após este período, foi adicionado em erlenmeyers contendo 250 mL de meio BHI caldo: 9 mL do pré-inóculo de isolado de levedura do solo ajustado a 10^7 células/mL + 1 mL de suspensão de *P. brasiliensis* (Pb18 ou B-339) a 10^6 células/mL. Os erlenmeyers foram incubados a 25°C e 100 rpm por 5 dias.

Para a extração do sobrenadante do co-cultivo, os meios foram centrifugados a 5.000 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em

membrana de 0,22 µm de poro (Millipore®, Billerica, USA). Os sobrenadantes foram incorporados ao meio ágar Sabouraud fundente nas proporções de 25, 50 e 75% (v/v) e vertidos em placas de Petri estéreis. Como controle, um erlenmeyer contendo somente meio BHI caldo foi processado sob as mesmas condições citadas para a obtenção dos sobrenadantes e incorporado ao meio ágar Sabouraud fundente nas mesmas proporções que os sobrenadantes de cultivo das leveduras isoladas do solo (25, 50 e 75%).

Após a solidificação do meio, quatro fragmentos de *P. brasiliensis* (Pb18 ou B-339) foram inoculados em pontos equidistantes entre si. As placas foram incubadas por 14 dias a 36°C. O experimento foi realizado em duplicata.

3.10. Produção de compostos antifúngicos voláteis

Os isolados de leveduras do solo selecionados (M6.1a, M7.0, M50.1 e M96.1) foram cultivados simultaneamente com *P. brasiliensis* em placas de Petri bipartidas contendo meio ágar Sabouraud.

Com auxílio de alça reta, cada isolado de levedura foi inoculado de forma puntiforme em um dos lados da placa e um fragmento de *P. brasiliensis* (Pb18 ou B-339) foi adicionado ao outro. Placas controle foram confeccionadas sem a presença de isolado de levedura. Após incubação por 14 dias a 36°C, o crescimento de *P. brasiliensis* foi avaliado. Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.11. Avaliação do crescimento de *P. brasiliensis* e das leveduras isoladas do solo

A mensuração do diâmetro das colônias de *P. brasiliensis* e das leveduras isoladas do solo foi realizada nos dias 0 e 14 após a inoculação dos fragmentos de Pb18 e B-339 nas placas. Para tal, foram tomadas duas medidas por colônia em eixos perpendiculares entre si utilizando régua milimetrada e calculado o diâmetro médio.

O crescimento das colônias foi avaliado a partir do cálculo do diâmetro final (dia 14) menos o diâmetro inicial (dia 0). O cálculo do percentual de crescimento de *P. brasiliensis* foi realizado em comparação ao controle, no qual o

diâmetro médio do grupo controle correspondeu a 100% de crescimento.

3.12. Avaliação semiquantitativa da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por leveduras isoladas do solo

Quatro isolados de levedura do solo (M6.1a, M7.0, M50.1 e M96.1) foram analisadas quanto à capacidade de produzir proteases e lipases extracelulares. O meio teste para detecção da atividade de proteases foi produzido de acordo com o protocolo de Dingle, Teid & Solomons (1953) e a detecção da atividade de lipases foi realizada utilizando a metodologia de Sierra (1957).

3.12.1. Proteases

A produção de proteases foi avaliada a partir da inoculação das leveduras em meio ágar-gelatina-leite contendo 1,8% ágar, 1,0% gelatina, 1,0% leite desnatado. Soluções de gelatina, leite e ágar foram preparadas separadamente e misturadas sob condições assépticas antes de serem vertidas em placas de Petri estéreis.

A solução de gelatina foi preparada a partir da adição de 5 g de gelatina incolor em 50 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0). Após a incubação por 5 min a 25°C, a solução foi aquecida para a dissolução completa da gelatina e esterilizada a 121°C por 15 min.

A solução de leite desnatado foi preparada com a solubilização de 5 g de leite desnatado em 50 mL de água destilada. A solução foi esterilizada sob vapor fluente por 30 min, por 2 dias consecutivos.

A solução de ágar foi preparada com a mistura de 9 g de ágar em 400 mL de tampão citrato-fosfato e autoclavada a 121°C por 15 min.

Isolados de leveduras cultivados por 48 horas em meio ágar Sabouraud foram utilizadas. Após a solidificação do meio, cada isolado de levedura foi inoculado de forma puntiforme no centro das placas. A detecção da atividade ocorreu com a formação de um halo translúcido ou esbranquiçado ao redor da colônia.

Após 7 dias a 25°C, as colônias e os halos foram mensurados em dois eixos perpendiculares entre si utilizando régua milimetrada e calculado o

diâmetro médio. Com estes valores foi realizado o cálculo do índice enzimático (IE), definido como o diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia ($IE = D_{\text{halo}}/D_{\text{colônia}}$) (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

3.12.2. Lipases

A produção de lipases foi avaliada a partir da adição dos isolados de leveduras do solo em meio contendo 17 g/L de ágar, 10 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl, 0,1 g/L CaCl₂·2H₂O e o substrato tween 20 a 10 mL/L.

O tween 20 foi esterilizado separadamente por 15 min a 121°C e adicionado ao meio sob condições assépticas antes de ser vertido em placas de Petri estéreis.

Leveduras isoladas do solo cultivadas por 48 horas foram inoculadas da mesma forma que no ensaio de proteases. Após sete dias a 25°C as placas foram incubadas a 4°C por 12 horas. A detecção da produção de lipases ocorreu com a formação de um halo de cristais de sal de cálcio do ácido láurico ou formação de zona clara ao redor da colônia. As colônias e halos foram mensurados para a determinação do IE.

3.12.3 Ação de enzimas hidrolíticas extracelulares em sobrenadantes de co-cultivo

Neste ensaio foi avaliado se a presença de *P. brasiliensis* no meio de cultura contendo levedura isolada do solo estimula a levedura a produzir uma quantidade maior de enzimas hidrolíticas. Os sobrenadantes filtrados do co-cultivo de leveduras isoladas do solo (M6.1a, M7.0, M50.1 e M96.1) e *P. brasiliensis* (Pb18 e B-339) foram avaliados quanto à presença das enzimas hidrolíticas proteases e lipases.

Para tal, placas contendo os meios ágar-gelatina-leite e meio tween foram perfuradas no centro. Nos poços formados foram adicionados 100 µL de sobrenadante puro e incubado por 3 dias a 25°C, sendo recarregado com 100 µL de sobrenadante a cada 12 horas, de acordo com Fedatto (2004) com modificações.

Após este período, as placas do teste de lipase foram incubadas a

4°C por 12 horas para a visualização do halo. Os halos formados nas placas dos testes de lipase e protease foram mensurados utilizando régua milimetrada.

3.13. Análise estatística

O cálculo dos percentuais de crescimento de *P. brasiliensis* foi realizado a partir da comparação com o controle, cujo crescimento é igual a 100%. Desta forma, a fórmula para calcular o percentual de crescimento foi: % crescimento = $([100 * \text{diâmetro médio da colônia teste}] / \text{diâmetro médio do controle})$.

A avaliação da diferença entre os grupos no ensaio de co-cultivo em meio sólido foi realizada por meio do teste ANOVA *one way* seguido pelo pós-teste de Tukey de comparações múltiplas (software GraphPad Prism 6). Também foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre o crescimento das leveduras do solo e o percentual de inibição de *P. brasiliensis*.

Nos ensaios com sobrenadantes de cultivo, no teste de compostos voláteis e nos ensaios de atividade de proteases e lipases, a diferença entre os grupos e controles foi realizada por meio do teste ANOVA *one way* seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A análise do crescimento de *P. brasiliensis* em meio de cultura contendo sobrenadante de co-cultivo foi executada utilizando o teste ANOVA *two way* seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Em todos os testes foram considerados significativos os valores em que $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de solo foram coletadas em áreas preservadas, uma vez que dados demonstram condições desfavoráveis para o crescimento de *P. brasiliensis* e de outros microrganismos em áreas agrícolas (ONO et al., 2002; QUEIROZ-TELLES, 2008).

Após o isolamento das leveduras, foi averiguada a presença de *Paracoccidioides* spp. nestes isolados por meio da reação de *Nested* PCR, uma vez que o DNA extraído diretamente de algumas amostras de solo dos três locais de coleta exibiram positividade para o fungo (dados não publicados). Não foi constatada a presença de *Paracoccidioides* spp. nas leveduras isoladas do solo utilizadas, não apresentando a banda correspondente ao fragmento de 387 pb.

4.1. Co-cultivo em meio sólido

A interação direta entre as leveduras do solo e *P. brasiliensis* foi avaliada pelo método de pareamento em placa. A Tabela 2 apresenta a média de crescimento e percentual de inibição dos isolados de *P. brasiliensis* em co-cultivo com as leveduras do solo.

A presença das leveduras inibiu significativamente o crescimento de Pb18 e B-339 em relação ao controle ($p < 0,0001$). As leveduras de Mauá da Serra inibiram o isolado Pb18 entre 97,8 e 99,4% e as de Loanda, acima de 94,3%. Seis leveduras de Joaçaba inibiram o Pb18 acima de 89,8%.

O crescimento de B-339 foi inibido por todos os isolados de leveduras de Mauá da Serra em mais de 87,9%. Quatro leveduras de Loanda inibiram B-339 entre 97,5 e 99,6% e cinco amostras de Joaçaba, entre 95,8 e 99,7%. Os isolados J14a e J17a apresentaram percentuais de inibição do crescimento de *P. brasiliensis* menores, porém sendo ainda significativos.

Tabela 2 – Inibição do crescimento dos isolados Pb18 e B-339 de *P. brasiliensis* em co-cultivo com leveduras do solo. Média do crescimento e percentual de inibição dos isolados em relação ao controle.

Levedura do solo	Pb18		B-339	
	MC ± DP (mm)	Inibição (%)	MC ± DP (mm)	Inibição (%)
M1.3a	0,19 ± 0,12	98,1	0,00 ± 0,12	100,0
M6.1a	0,22 ± 0,21	97,8	0,00 ± 0,09	100,0
M7.0	0,16 ± 0,19	98,4	0,00 ± 0,12	100,0
M8.0	0,16 ± 0,13	98,4	0,09 ± 0,19	98,8
M50.1	0,19 ± 0,12	98,1	0,09 ± 0,13	98,8
M96.1	0,09 ± 0,13	99,0	0,16 ± 0,23	97,9
M99.3	0,12 ± 0,21	98,8	0,06 ± 0,13	99,2
M99.5a	0,06 ± 0,12	99,4	0,09 ± 0,19	98,8
L3b1b	0,25 ± 0,19	97,5	0,19 ± 0,21	97,5
L7b6	0,13 ± 0,19	98,7	0,03 ± 0,13	99,6
L37a2b	0,56 ± 0,55	94,3	4,75 ± 0,53	36,7
L53a2	0,09 ± 0,13	99,0	0,04 ± 0,27	99,5
L61b4	0,00 ± 0,09	100,0	0,13 ± 0,19	98,3
J1d	0,09 ± 0,19	99,0	0,03 ± 0,19	99,6
J7a	1,00 ± 0,46	89,8	0,31 ± 0,35	95,8
J13d	0,06 ± 0,23	99,4	0,02 ± 0,09	99,7
J13g	0,16 ± 0,13	98,4	0,03 ± 0,26	99,6
J14a	3,34 ± 0,88	65,9	4,00 ± 0,71	46,7
J17a	4,59 ± 1,10	53,1	5,34 ± 0,38	28,8
J18b2	0,22 ± 0,16	97,8	2,66 ± 0,68	64,6
J19b	0,63 ± 0,40	93,6	0,19 ± 0,18	97,5

ANOVA *one way* seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,0001$). MC= média de crescimento. DP= desvio padrão. Controle = placa sem a presença de isolado de levedura do solo.

Adicionalmente, houve fraca correlação entre o crescimento dos isolados de leveduras do solo e o percentual de inibição de Pb18 e B-339 (Tabela 3). Isto é, a capacidade de inibição apresentada pelas leveduras utilizadas neste estudo não se mostrou relacionada ao tamanho de sua colônia.

Tabela 3 – Correlação entre o crescimento das leveduras isoladas do solo e o percentual de inibição de *P. brasiliensis*.

Isolados de <i>P. brasiliensis</i>	r
Pb18	0,28
B-339	0,31

Teste de correlação de Pearson, r= coeficiente de correlação.

4.2. Atividade de sobrenadante de cultivo das leveduras do solo

Neste ensaio foi avaliada a atividade dos metabólitos presentes nos sobrenadantes de cultivo das leveduras isoladas do solo sobre o crescimento de *P. brasiliensis*, uma vez que no ensaio de pareamento em placa todos os isolados de leveduras inibiram significativamente o crescimento de *P. brasiliensis*. Os isolados de leveduras do solo foram cultivados a 25°C, temperatura semelhante à que *Paracoccidioides* spp. se desenvolve na natureza. O sobrenadante foi obtido a partir da filtração do meio de cultivo, com a remoção das células. A termoestabilidade dos metabólitos presentes nos sobrenadantes também foi avaliada, com a utilização de sobrenadantes submetidos à autoclavagem.

O crescimento de Pb18 (Figuras 6, 8 e 10) e B-339 (Figuras 7, 9 e 11) foi afetado de formas diferentes pela presença do sobrenadante das leveduras no meio de cultura. Apresentaram atividade inibitória significativa sobre Pb18 os sobrenadantes filtrados M96.1 (Figura 6) e L3b1b (Figura 8) e o sobrenadante autoclavado J1d (Figura 10), com percentuais de inibição de 26,3, 25,8% e 55,5%, respectivamente.

Inibiram o crescimento de B-339 os sobrenadantes filtrados M6.1a (31,9%), M8.0 (18,9%), M99.3 (33,5%) e o autoclavado M50.1 (46,9%) (Figura 7); assim como os sobrenadantes filtrados J1d (24,4%), J7a (20,9%) e J13d (37,4) (Figura 11). B-339 se mostrou mais sensível à inibição pelos sobrenadantes das leveduras isoladas do solo.

Figura 6 - Percentual de crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Mauá da Serra. Sobrenadantes produzidos 25°C, autoclavados ou filtrados. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001; ****= p<0,0001). Controle = meio sem sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo.

Figura 7 - Percentual de crescimento do isolado B-339 de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Mauá da Serra. Sobrenadantes produzidos 25°C, autoclavados ou filtrados. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001; ****= p<0,0001). Controle = meio sem sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo.

Figura 8 - Percentual de crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Loanda. Sobrenadantes produzidos 25°C, autoclavados ou filtrados. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001; ****= p<0,0001). Controle = meio sem sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo.

Figura 9 - Percentual de crescimento do isolado B-339 de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Loanda. Sobrenadantes produzidos 25°C, autoclavados ou filtrados. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001; ****= p<0,0001). Controle = meio sem sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo.

Figura 10 - Percentual de crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Joaçaba. Sobrenadantes produzidos 25°C, autoclavados ou filtrados. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$). Controle = meio sem sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo.

Figura 11 - Percentual de crescimento do isolado B-339 de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadante de cultivo das leveduras de Joaçaba. Sobrenadantes produzidos 25°C, autoclavados ou filtrados. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$). Controle = meio sem sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo.

Os sobrenadantes das leveduras M6.1a e M8.0 apresentaram efeitos opostos sobre B-339 dependendo da forma de processamento: enquanto os sobrenadantes filtrados inibiram o crescimento, os autoclavados estimularam (Figuras 6 e 7). Ainda, alguns sobrenadantes quando filtrados exibiram inibição e, quando autoclavados, o crescimento de *P. brasiliensis* não apresentou diferença com o controle. Este efeito ocorreu com os sobrenadantes das leveduras M96.1 (Figura 6) e L3b1b (Figura 8) sobre Pb18, assim como os sobrenadantes M99.3 (Figura 7), J1d, J7a e J13d (Figura 11) sobre B-339. Estes dados indicam a possível presença de metabólitos termolábeis nos sobrenadantes das leveduras isoladas do solo, cultivadas em monocultura.

Houve sobrenadantes que também apresentaram efeito positivo no crescimento de *P. brasiliensis*. Tanto os sobrenadantes filtrados quanto autoclavados das leveduras M99.3 (Figura 6) e L53a2 (Figura 8) estimularam o crescimento de Pb18, entre 23,5 e 50%. Os sobrenadantes filtrados das leveduras L7b6 (Figura 8) e J17a (Figura 10) favoreceram o crescimento de Pb18 em 41,1 e 33,8%, respectivamente.

Estimularam o crescimento de B-339 os sobrenadantes autoclavados M1.3a (Figura 7), L37a2b (Figura 9), J14a e J18b2 (Figura 11), com percentuais de 47,5, 38,1, 60 e 50%, respectivamente. Nenhum sobrenadante filtrado estimulou o crescimento de B-339. Adicionalmente, favoreceram o crescimento tanto de Pb18 quanto B-339 o sobrenadante da levedura J13g autoclavado, com percentuais de 29,2% (Figura 10) e 51,3% (Figura 11), respectivamente; assim como os sobrenadantes autoclavados e filtrados de L61b4, entre 17,7 e 50,6% (Figuras 8 e 9).

Os percentuais de inibição do crescimento de *P. brasiliensis* no ensaio com sobrenadante de cultivo das leveduras isoladas do solo foram inferiores aos apresentados no ensaio de pareamento em meio sólido. Ainda, alguns sobrenadantes exibiram atividade estimulatória sobre *P. brasiliensis*. Estas divergências na resposta podem estar relacionadas às diferenças na produção de metabólitos bioativos pelos isolados de leveduras do solo.

A coexistência de diversos microrganismos que dividem o mesmo nicho pode afetar o crescimento, adaptação, morfologia e padrões de desenvolvimento dos organismos (SANDLAND et al., 2007), assim como sua

habilidade de sintetizar proteínas e metabólitos secundários. A produção de metabólitos secundários bioativos, portanto, possui um papel importante na sobrevivência de microrganismos em um ambiente competitivo (KNIGHT et al., 2003), sendo que vários destes metabólitos atuam como defesa dos microrganismos contra fatores que geram estresse.

No entanto, genes responsáveis pela expressão de metabólitos que aumentam a competitividade no meio ambiente podem estar silenciados em condições não naturais de cultivo (PETTIT, 2009). A maioria dos trabalhos utilizando leveduras de solo são conduzidos *in vitro* ou utilizando microcosmos, sob condições controladas e sem variação dos fatores ambientais que podem influir no metabolismo das leveduras na natureza (BOTHÁ, 2006).

Levando em consideração estes fatores, a produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica pelas leveduras isoladas do solo pode ter sido estimulada no co-cultivo com *P. brasiliensis*, resultando em maiores percentuais de inibição, como observado no ensaio de pareamento em meio sólido. A competição ou antagonismo que ocorre em co-cultivo é utilizado para aumentar significativamente a produção dos compostos constitutivamente presentes e/ou a um acúmulo de compostos críticos que não são identificados em monoculturas (MARMANN et al., 2014).

4.3. Seleção e identificação de leveduras do solo

Quatro isolados de leveduras de Mauá da Serra foram selecionados para dar continuidade aos experimentos. Estas leveduras foram identificadas a partir do sequenciamento das regiões ITS, que se encontram entre os genes das subunidades 18S, 5,8S e 28S do DNA ribossomal. Essa região é altamente conservada intraespecificamente, no entanto é variável entre diferentes espécies, permitindo a diferenciação ao nível específico (FUNGARO, 2000).

A Tabela 4 apresenta as leveduras selecionadas, sua identificação, o percentual de similaridade entre a região sequenciada analisada e a sequência comparada depositada no banco de dados do NCBI e o *e-value* correspondente (acesso em 20 set. 2017).

Tabela 4 – Identificação das leveduras isoladas do solo selecionadas.

Isolados de levedura	Identificação	% similaridade	e-value
M6.1a	<i>Candida</i> sp.	99,0	0,0
M7.0	<i>Meyerozyma caribbica</i>	99,0	0,0
M50.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100,0	0,0
M96.1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100,0	0,0

Acesso ao banco de dados do NCBI em 20 set. 2017.

O isolado de levedura do solo M6.1a foi identificado como pertencente ao gênero *Candida*, enquanto os isolados M7.0, M50.1 e M96.1 foram identificados como *Meyerozyma caribbica* (anamorfo *Candida fermentati*). O gênero *Candida* compreende uma ampla gama de espécies que tem sido estudadas desde sua ação como patógenos humanos até suas aplicações em biotecnologia e biocontrole, por sua capacidade de produzir enzimas e outros metabólitos com atividade biológica (HILBER-BODMER et al., 2017). *M. caribbica*, por sua vez, faz parte do complexo de espécies de *M. guilliermondii* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005) e apresenta ação enzimática e fermentativa (DANIEL et al., 2009), além de grande potencial no controle biológico de fungos, em especial fitopatógenos (ROMI et al., 2014). Sua forma anamorfa, *C. fermentati*, é reconhecida como um patógeno humano (AL-SWEIH et al., 2015).

4.4. Efeito de sobrenadante de co-cultivo sobre o crescimento de *P. brasiliensis*

Com este experimento foi investigado se o co-cultivo das leveduras isoladas do solo com *P. brasiliensis* em meio líquido induz as leveduras a produzir maiores concentrações de metabólitos com atividade antifúngica. As Figuras 12 (Pb18) e 13 (B-339) apresentam os percentuais de crescimento de *P. brasiliensis* em meio contendo sobrenadantes de co-cultivo.

Figura 12 - Percentual de crescimento do isolado Pb18 em meio contendo sobrenadante de co-cultivo. 25%, 50% e 75% indicam a proporção (v/v) de sobrenadante incorporado ao meio de cultura. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$). Controle = placas contendo meio BHI nas proporções de 25, 50 e 75%.

Figura 13 - Percentual de crescimento do isolado B-339 em meio contendo sobrenadante de co-cultivo. 25%, 50% e 75% indicam a proporção (v/v) de sobrenadante incorporado ao meio de cultura. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$). Controle = placas contendo meio BHI nas proporções de 25, 50 e 75%.

Neste ensaio o sobrenadante de co-cultivo foi filtrado e utilizado na confecção de meio sólido nas proporções de 25, 50 e 75% (v/v) para avaliar se a atividade inibitória presente nos sobrenadantes de co-cultivo apresentava perfil dose-dependente. Para efeitos de comparação, o crescimento de ambos os isolados de *P. brasiliensis* foi avaliado em placas contendo sobrenadantes de todos os co-cultivos realizados.

O sobrenadante M96.1 + Pb18 foi o único que inibiu o crescimento de Pb18 em todas as concentrações, entre 18,3 e 29,2%. Os sobrenadantes M6.1a + Pb18, M6.1a + B-339 e M7.0 + Pb18 nas proporções de 25 e 75% inibiram o Pb18. Curiosamente, os sobrenadantes M6.1a + Pb18 e M96.1 + B-339 a 50% estimularam o crescimento deste isolado em 26 e 17,9%, respectivamente. Os sobrenadantes M7.0 + B-339 e M50.1 + B-339 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Nenhum sobrenadante apresentou perfil de inibição dose-dependente (Figura 12).

O crescimento de B-339 foi inibido entre 20,3 e 58,6% pelos sobrenadantes M7.0 + B-339 e M50.1 + Pb18 em todas as concentrações. Apresentaram resposta inibitória dose-dependente sobre B-339 os sobrenadantes M7.0 + Pb18, M7.0 + B-339, M96.1 + Pb18 e M96.1 + B-339. Somente o sobrenadante M50.1 + B-339 a 25% estimulou o crescimento de B-339, em cerca de 30% (Figura 13).

Os metabólitos presentes nos sobrenadantes M6.1a + Pb18 e M6.1a + B-339 exibiram maior atividade inibitória sobre Pb18 do que B-339. No entanto, o sobrenadante M6.1a + Pb18 a 50% inibiu o crescimento de B-339 e estimulou o de Pb18. Apesar destes casos, B-339 mais uma vez se mostrou mais sensível à inibição que Pb18, apresentando os maiores valores de inibição.

O co-cultivo aumentou a atividade inibitória dos sobrenadantes, M7.0, M50.1 (+Pb18) e M96.1 sobre o crescimento de B-339 em comparação à monocultura destes isolados de levedura do solo. Não houve alteração significativa nos percentuais de inibição de Pb18.

4.5. Análise semiquantitativa da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares

4.5.1. Produção de proteases e lipases por leveduras isoladas do solo

A produção de enzimas pode estar diretamente relacionada com o antagonismo entre microrganismos, pois estes podem alterar o ambiente com seus produtos metabólicos, assegurando sua dominância no habitat com a criação de condições desfavoráveis para a sobrevivência de outros organismos (GOLUBEV, 2006). Os microrganismos, em culturas mistas, produzem diversas enzimas como proteases, β -1,3-glucanases e quitinases que podem levar à degradação da parede celular de hifas de microrganismos competidores (GUTHRIE & CASTLE, 2006; ALMEIDA et al., 2007; SÁNCHEZ et al., 2007) e atuarem como indutores da produção de metabólitos secundários (SHIN et al., 1998). A ação de lipases, em conjunto, pode atuar para a desestabilização das estruturas celulares externas.

Para a avaliação da produção de proteases e lipases extracelulares foram utilizados os quatro isolados de leveduras selecionados, sendo cultivados a 25 e 36°C para analisar a influência da temperatura no crescimento das colônias e formação do halo de degradação. Os resultados encontram-se sob a forma de índice enzimático (IE), na Tabela 5.

Tabela 5 – Índice enzimático da atividade de proteases e lipases extracelulares produzidas por leveduras isoladas do solo.

	IE protease 25°C	IE protease 36°C	IE lipase 25°C	IE lipase 36°C
M6.1a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a	0,0 ± 0,00 a
M7.0	0,9 ± 0,09 b	1,9 ± 0,03 bc	1,4 ± 0,03 c	1,8 ± 0,00 c
M50.1	0,7 ± 0,00 c	0,6 ± 0,00 ab	1,3 ± 0,00 c	2,4 ± 0,09 d
M96.1	0,0 ± 0,00 a	2,1 ± 0,69 c	0,2 ± 0,07 b	0,9 ± 0,00 b

IE= índice enzimático, calculado como diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia de levedura ($IE = D_{\text{halo}}/D_{\text{colônia}}$). Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A avaliação do potencial enzimático de fungos em meio sólido é comumente avaliada por meio do IE, um parâmetro semiquantitativo. Os microrganismos podem ser considerados produtores potenciais de enzima quando

IE $\geq 2,00$ (LEALEM & GASHE, 1994; STAMFORD et al., 1998; TERRA, 2008). Os isolados que apresentam os maiores IE nos meios de crescimento, portanto, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA et al., 2006).

O isolado de levedura M6.1a, *Candida* sp., não apresentou produção das enzimas hidrolíticas avaliadas. Os isolados M7.0 e M96.1 exibiram maior produção de proteases e lipases a 36°C do que a 25°C e M50.1 apresentou maior atividade de lipase quando incubada a 36°C. As maiores atividades a 25°C foram encontradas com os isolados M7.0 e M50.1. No entanto, valores de IE $\geq 2,00$ foram observados apenas com o isolado M96.1 no ensaio de protease e M50.1 no teste de lipase, a 36°C.

4.5.2. Atividade de proteases e lipases em sobrenadante de cultivo e co-cultivo

A produção de proteases e lipases foi avaliada nos sobrenadantes filtrados de cultivo dos quatro isolados de levedura do solo selecionados (M6.1a, M7.0, M50.1 e M96.1) em monocultura (Tabela 6) e em co-cultivo com *P. brasiliensis* (Tabela 7). Este ensaio foi realizado somente a 25°C, com o intuito de mimetizar a condição ambiental destes microrganismos.

Tabela 6 – Atividade de proteases e lipases em sobrenadantes de cultivo de leveduras isoladas do solo.

	Diâmetro do halo protease (cm)	Diâmetro do halo lipase (cm)
M6.1a	1,6 \pm 0,08 a	0,0 \pm 0,00 a
M7.0	1,5 \pm 0,29 a	0,0 \pm 0,00 a
M50.1	1,5 \pm 0,07 a	0,0 \pm 0,00 a
M96.1	1,7 \pm 0,13 a	0,0 \pm 0,00 a

Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Atividade de proteases e lipases em sobrenadantes de co-cultivo de leveduras isoladas do solo e *P. brasiliensis*.

	Diâmetro do halo protease (cm)	Diâmetro do halo lipase (cm)
M6.1a + Pb18	0,0 \pm 0,00 a	3,4 \pm 0,18 c
M6.1a + B-339	0,0 \pm 0,00 a	0,0 \pm 0,00 a
M7.0 + Pb18	0,0 \pm 0,00 a	3,6 \pm 0,12 c

M7.0 + B-339	0,0 ± 0,00 a	4,3 ± 0,11 e
M50.1 + Pb18	0,0 ± 0,00 a	4,1 ± 0,04 de
M50.1 + B-339	3,2 ± 0,07 b	2,7 ± 0,02 b
M96.1 + Pb18	0,0 ± 0,00 a	4,2 ± 0,07 de
M96.1 + B-339	0,0 ± 0,00 a	3,8 ± 0,19 cd

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas por letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os sobrenadantes de cultivo das leveduras isoladas do solo apresentaram valores de diâmetro do halo de degradação entre 1,5 e 1,7 cm no teste de proteases. No ensaio de lipases, a formação de halo no meio de cultura não foi detectável para nenhum dos sobrenadantes testados.

Somente o sobrenadante do co-cultivo do isolado de levedura M50.1 e B-339 (M50.1 + B-339) apresentou formação de halo de degradação tanto no ensaio protease quanto de lipase (Figura 14). O sobrenadante M6.1a + B-339 não apresentou formação de halo em ambos os testes. Os demais sobrenadantes de co-cultivo apresentaram somente atividade de lipase detectável, não havendo formação visível de halo no teste de protease. Com exceção do sobrenadante do co-cultivo M6.1a + B-339, que não exibiu atividade de lipase, todos os sobrenadantes apresentaram diâmetros de halo acima de 2,7 cm.

A atividade de lipases observada nos sobrenadantes de co-cultivo, porém não nos sobrenadantes das monoculturas, indica que a produção de lipases pelas leveduras isoladas do solo e a elevada atividade observada no sobrenadante de co-cultivo pode ser um dos mecanismos presentes no antagonismo das leveduras a *P. brasiliensis* no ambiente. No entanto, além da produção de enzimas hidrolíticas, outros mecanismos antagônicos podem estar envolvidos, como a produção de compostos voláteis.

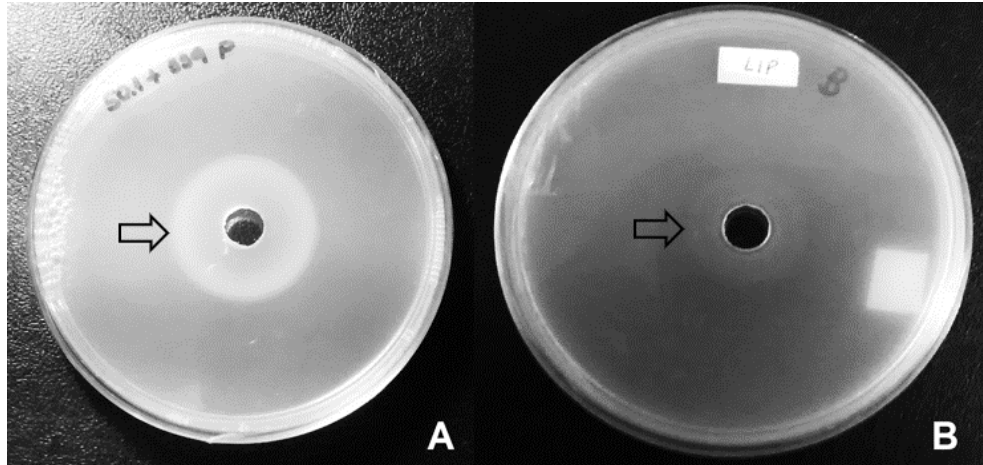


Figura 14 - Teste semiquantitativo da atividade de proteases e lipases presentes no sobrenadante do co-cultivo da levedura M50.1 e o isolado B-339 de *P. brasiliensis* (M50.1 + B-339). Halos formados (seta vazada) no ensaio de protease (A) e lipase (B).

4.6. Produção de compostos antifúngicos voláteis

Visando verificar a produção de compostos antifúngicos voláteis pelas leveduras isoladas do solo, foi realizado um ensaio utilizando placas bipartidas, as quais impedem a troca de metabólitos não-voláteis pelo meio de cultura.

Os resultados obtidos mostram que o isolado de levedura M96.1 inibiu o crescimento de *P. brasiliensis* em 60,4% (Pb18) e 92,8% (B-339). B-339 ainda apresentou crescimento reduzido em cerca de 90% pelos isolados de leveduras M7.0 e M50.1 (Figuras 12 e 13), mostrando-se mais sensível à inibição que Pb18.

As leveduras que apresentaram produção de compostos voláteis com atividade antifúngica pertencem à mesma espécie, *M. caribbica*. O isolado M6.1a, pertencente à espécie *Candida* sp., não influenciou no crescimento de *P. brasiliensis*.

Figura 15 - Percentual de crescimento do isolado Pb18 de *P. brasiliensis* sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$). Controle = placa sem a presença do isolado de levedura do solo.

Figura 16 - Percentual de crescimento do isolado B-339 de *P. brasiliensis* sob influência de compostos antifúngicos voláteis produzidos pelos isolados de leveduras. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ****= $p < 0,0001$). Controle = placa sem a presença do isolado de levedura do solo.

Apesar de pertencerem à mesma espécie críptica, a variabilidade genética entre Pb18 e B-339 pode ser um dos fatores que explica as diferentes respostas nos ensaios realizados. Roberto e cols (2016), utilizando a técnica de RFLP, demonstraram uma possível reclassificação do isolado B-339 como

pertencente à espécie críptica PS3, reforçando as diferenças observadas no presente estudo. Da mesma forma, Muñoz e cols (2016) demonstraram a presença de cinco linhagens distintas filogeneticamente do gênero *Paracoccidioides*, com B-339 pertencendo ao grupo PS3.

Na literatura há poucos estudos sobre a atividade de compostos fúngicos contra *Paracoccidioides*. Mendes e cols (2016) analisaram a ação antifúngica de extratos brutos de fungos isolados do deserto do Atacama sobre *P. brasiliensis* (Pb18) com revelação pela técnica de MTT e ensaio de microdiluição em caldo para determinação do MIC. Dentre os 78 isolados fúngicos utilizados, um isolado de *Aspergillus felis* apresentou atividade inibitória promissora sobre Pb18, com valor de MIC= 15,6 µg/mL. Esta atividade foi amplificada quando realizadas alterações nas condições de cultivo do fungo.

Campos e cols (2011) isolaram e identificaram micotoxinas tricotecenos no extrato bruto do fungo endofítico *Fusarium* sp. e avaliaram a atividade inibitória contra várias cepas de *Paracoccidioides*, dentre elas Pb18 e B-339, por meio da técnica de microdiluição em caldo. A toxina T-2 apresentou MIC= 160 nmol/L para Pb18 e 320 nmol/L para B-339 e uma mistura contendo os componentes 8-*n*-butyrylneosolaniol e 8-*n*-isobutyrylneosolaniol (65:35) apresentou valores de MIC de 640 e 490 nmol/L para Pb18 e B-339, respectivamente. Como controles positivos, os autores realizaram o mesmo ensaio utilizando anfotericina B e bactrim (trimetoprima-sulfametoxazol). A anfotericina B, que é um dos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da PCM, apresentou MIC= 62 nmol/L para Pb18 e B-339. O bactrim, produto primariamente bactericida, obteve valores de MIC= 300.000 nmol/L para Pb18 e 75.000 nmol/L para B-339.

Johann e cols (2012) testaram o derivado bifenílico altenusina presente no extrato do fungo *Alternaria* sp., isolado de folhas da planta *Trixis vauthieri* DC (Asteraceae), contra 11 isolados de *Paracoccidioides* utilizando a mesma metodologia que o trabalho citado anteriormente. A altenusina apresentou atividade antifúngica elevada, com MIC= 15,6 e 1,9 µg/mL para Pb18 e B-339, respectivamente. Em concordância com o trabalho de Campos e cols (2011) e Johann e cols (2012), no presente estudo o isolado B-339 se mostrou mais sensível à inibição que Pb18.

Neste estudo pode-se observar a ação de compostos com atividade antifúngica produzidos por leveduras provenientes de amostras ambientais. Após

experimentos utilizando sobrenadantes de cultivo, foi investigado a ação específica de proteases e lipases extracelulares e compostos voláteis. No entanto, outros compostos produzidos por leveduras podem estar atuando na resposta inibitória contra *P. brasiliensis*, como as toxinas *killer*.

É praticamente nulo o número os trabalhos na literatura envolvendo a ação de toxinas *killer* sobre *Paracoccidioides*. Travassos e cols (2004) avaliaram a atividade um decapeptídeo *killer* sintético contra células de Pb18. A síntese deste peptídeo foi baseada na sequência de um anticorpo anti-idiopático recombinante de cadeia única que age como mimótopo funcional de uma toxina *killer*. Foi observado após 12 horas de incubação a inibição completa das células leveduriformes de *P. brasiliensis* a 39 ng de peptídeo/levedura, quando não houve mais recuperação de CFU.

Há trabalhos envolvendo a atividade de toxinas *killer* contra fungos patogênicos. Utilizando a levedura *Pichia anomala*, foi observada a produção de uma toxina *killer* com atividade fungistática sobre isolados de *C. albicans* (SAWANT & AHEARN, 1990; THEISEN, MOLKENAU & SCHMITT, 2000). Similarmente, Vadkertiová & Sláviková (2007) demonstraram que espécies de basidiomicetos e ascomicetos isolados de amostras ambientais (folhas, água e solo) possuem atividade *killer* sobre as espécies patogênicas *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Buzzini & Martini (2001) analisaram o efeito de extrato bruto de toxinas *killer* produzidas por isolados de *C. maltosa*, *Debaryomyces hansenii* e *P. anomala* contra espécies patogênicas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Stephanoascus* e *Trichosporon* e observaram um amplo espectro de atividade inibitória das toxinas no crescimento das espécies estudadas.

Os resultados deste estudo apontam que a atividade antifúngica das leveduras isoladas do solo pode ocorrer pela sinergia entre os compostos bioativos produzidos por estes organismos. Os sobrenadantes que inibiram o crescimento de *P. brasiliensis* possuem potencial de uso para o desenvolvimento de novos antifúngicos naturais para a terapia da PCM. Desse modo, mais estudos são necessários para a identificação dos metabólitos e das condições que podem estar atuando nestas interações, bem como analisar isolados de *P. brasiliensis* pertencentes a outras espécies crípticas e isolados de *P. lutzii*.

A partir dos sobrenadantes que auxiliaram no crescimento de *P. brasiliensis* pode-se buscar o isolamento dos compostos bioativos para serem utilizados no desenvolvimento de um meio de cultura que auxilie no isolamento do fungo a partir de amostras ambientais.

4. CONCLUSÕES

Todos os isolados de leveduras do solo inibiram significativamente o crescimento de *P. brasiliensis* no ensaio de co-cultivo em meio de cultivo sólido.

Os metabólitos presentes nos sobrenadantes de cultivo das leveduras isoladas do solo apresentaram atividades variadas sobre o crescimento de *P. brasiliensis*, sendo que o isolado B-339 se mostrou mais sensível à inibição.

O isolado de *Candida* sp. (M6.1a) não apresentou produção de compostos voláteis e atividade de enzimas hidrolíticas, no entanto o sobrenadante do co-cultivo de M6.1a + Pb18 exibiu atividade lipolítica.

As leveduras identificadas como *M. caribbica* (M7.0, M501. e M96.1) apresentaram atividade de compostos voláteis e produção de proteases e lipases, porém os sobrenadantes de co-cultivo exibiram apenas atividade lipolítica observável. O sobrenadante de co-cultivo M50.1 + B-339 foi o único que também apresentou atividade proteolítica.

Os dados indicam que as leveduras possuem a capacidade de

produzir metabólitos com modo de ação diferentes, levando à inibição do crescimento de *P. brasiliensis* e dificultando seu isolamento a partir de amostras de solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-253, 1971.

ALMEIDA, F. B. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolitic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1189-1193, 2007.

AL-SWEIH, N.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, S.; VAYALIL, S.; CHANDY, R.; KHAN, Z. *Candida fermentati* as a cause of persistent fungemia in a preterm neonate successfully treated by combination therapy with amphotericin B and caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1038-1041, 2015.

AOKI, H.; ITO-KUWAS, S.; NAKAMURA, K. K.; KATO, J.; NINOMIYA, K.; VIDOTTO, V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 128, p. 143-150, 1994.

- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, p. 83-92, 2013.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; BOSCO, S. M.; BAGAGLI, E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 2016.
- BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, p. 344–351, 2006.
- BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–223, 2003.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I. R.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z. P.; GOMES, G.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Med Hyg**, v. 58, p. 505-512, 1998.
- BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M.; MC EWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008.
- BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; BORGES, I. K.; DE OLIVEIRA, G. G.; SBEGHEN, M. R.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Detection of Antibodies Against *Paracoccidioides brasiliensis* in Free-Range Domestic Pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2 p. 91-95, 2014.
- BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; SBEGHEN, M. R.; DE OLIVEIRA, G. G.; WATANABE, M. A. E.; DE CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222-227, 2014.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BOLLELA, V. R.; DA FONSECA, B. A.; MARTINEZ, R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, p. 313–318, 2013.
- BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A.; BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3190–3193, 2000.
- BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SATO, P. K.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; SOARES FELIPE, M. S. Paracoccidioidomycosis: eco-

epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, p. 1177–1191, 2013.

BOTHA, A. Yeasts in soil. In: ROSA, C. A.; PETER, G. (Eds). **The yeast handbook. Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 221-240.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 1-8, 2011.

BOUSQUET, A.; DUSSART, C.; DROUILLARD, I; CHARBEL, E. C.; BOIRON, P. Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis. **Med Mal Infect**, v. 37, Suppl 3, p. S210–S214, 2007.

BRANDSBERG, J. W. Fungi found in association with *Histoplasma capsulatum* in a naturally contaminated site in Clarksburg, Maryland, U.S.A. **Sabouraudia**, v. 6, n. 3, p. 246-54, 1968.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Rev**, v. 6, p. 89–117, 1993.

BU'LOCK, J. D. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. **Adv Applied Microbiology**, v. 3, p. 293–342, 1961.

BUSTAMANTE, B.; MC EWEN, J. G.; TABARES, A. M.; ARANGO, M.; RESTREPO, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 23, p. 407-414, 1985.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. **Medical Mycology**, v. 39, p. 479-482, 2001.

CALLE, D.; ROSERO, S.; OROZCO, L. C.; CAMARGO, D.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiol Infect**, v. 126, n. 2, p. 309–315, 2001.

CAMPOS, F. F.; JOHANN, S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M.; ROSA, L. H.; CALIGIORNE, R. B.; CISALPINO, O. S.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Antifungal activity of trichothecenes from *Fusarium* sp. against clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses**, v. 54, p. 122-129, 2011.

CANTEROS, C. E.; MADARIAGA, M. J.; LEE, W.; RIVAS, M. C.; DAVEL, G.; IACHINI, R. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: Seroepidemiological study in dogs. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 14-19, 2010.

CARRERO, L. L.; NIÑO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v.45, n. 5, p.605-12, 2008.

- CAVALCANTI, M. A.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Filamentous fungi isolated from soil in districts of the Xingó region. **Braz Acta Bot Bras**, v. 20, n. 4, p. 831–837, 2006.
- COLOMBO, A. L.; TOBON, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, p. 785–798, 2011.
- CONTI-DIAZ; I. A.; ALVAREZ, B. J.; GEZUELE, E.; GONZALEZ MARINI, H.; DUARTE, J.; FALCÓN, J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 16, n. 6, p. 372-376, 1972.
- CORREDOR, G. G.; CASTA-O, J. H.; PERALTA, L. A.; D'EZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 16, p. 216-220, 1999.
- CORTE, A. C.; ITANO, E. N.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. **Semina Ciências Agrárias**, v. 30, p. 441-446, 2009.
- CORTE, A. C.; SVOBODA, W. K.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; LUDWIG, G.; AGUIAR, L. M.; PASSOS, F. C.; MARON, A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, n. 5, p. 225–228, 2007.
- COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; FAVA NETTO, C.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 39-42, 1995.
- COSTA, E., FAVA NETTO, C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil: Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. *Sabouraudia*. **Sabouradia**, v. 16, p. 103-111, 1978.
- COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M. O.; SABORZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno Saúde Pública Rio de Janeiro**, p. 1441-1454, 2002.
- DANIEL, H. M.; VRANCKEN, G.; TAKRAMA, J. F.; CAMU, C.; DE VOS, P.; VUYST, L. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 5, p. 774–783, 2009.
- DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polyssacharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 4, n. 8, p. 149-155, 1953.

DO CARMO-SOUSA, L., Distribution of yeasts in nature. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J.S. (Eds.) **The Yeasts, Biology of Yeasts**. 1 ed., vol. 1. London: Academic Press, 1969, p. 79-105.

FARIAS, M. R.; CONDAS, L. A.; RIBEIRO, M. G.; BOSCO, S. M.; MURO, M. D.; WERNER, J.; THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, p. 147–52, 2011.

FEDATTO, L. M. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira. Dissertação (Mestrado em Biomtecnologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, f. 68, 2015.

FERNANDES, G. F.; DEPS, P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CAMARGO, Z. P. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Medical Mycology**, v. 42, p. 363-368, 2004.

FERRAZ, L. P.; CUNHA, T. D.; DA SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiol Res**, v. 188-189, p. 72-79, 2016.

FERREIRA, J. B.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; OLIVEIRA, G. G.; OMORI, A. M.; BELITARDO, D. R.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 95–99, 2013.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M. B.; MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brasil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, p. 253–256, 1990.

FLEET, G. H. Microbiology of alcoholic beverages. In: WOOD, B. J. (ed.). **Microbiology of fermented food**. V. 1. London: Blackie Academic & Professional, 1998, p. 217-262.

FONTANA, F. F.; SANTOS, C. T. B.; ESTEVENS, F. M.; ROCHA, A.; FERNANDES, G. F.; AMARAL, C. C.; DOMINGUES, M. A.; CAMARGO, Z. P.; SILVA-VERGARA, M. L. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis Infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, p. 159-165, 2010.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-32, 1987.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p. 12-16, 2000.

FURLANI, A. C. F. A.; CAMARGO, M.; PANIZZI, R. C.; PEREIRA, C. F. Activity of cells, filtered and autoclaved bacterial broth of *Bacillus* spp. as biological control agents of *Colletotrichum acutatum*. **Científica (Jaboticabal)**, v. 35, n. 2, p. 196-200, 2007.

GOLUBEV, W. I. Antagonistic interactions among yeasts. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* [Eds. ROSA, C. A.; PETER, G.], **Berlin: Springer Verlag**, p. 197-219, 2006.

GUTHRIE, J. L.; CASTLE, A. J. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 961-967, 2006.

GUTIERREZ, A. H.; CEBALLOS, G. C.; FERRER, H. I. P. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidiodomicosis en ganado lechero del Valle del Aburra. **Antioq Med**, v. 24, p. 339-358, 1974.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HERR, R. A.; TARCHA, E. J.; TABORDA, P. R.; TAYLOR, J. W.; AJELLO, L.; MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 309–314, 2001.

HILBER-BODMER, M.; SCHMID, M.; AHRENS, C.; FREIMOSER, F. Competition assays and physiological experiments of soil and phyllosphere yeasts identify *Candida subhashii* as a novel antagonist of filamentous fungi. **BMC Microbiology**, v. 17, a. 4, 2017.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

JOHANN, S.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A.; PEREZ, P.; CISALPINO, P. S.; ZANI, C. L.; COTA, B. C. Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, p. 205-209, 2012.

JOHNSON, W. D.; LANG, G. M. Paracoccidiodomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 368-371, 1977.

KIRKLAND, T. N.; FIERRE, J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. **Emerg Infect Dis**, v. 2, p. 192-199, 1996.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 446-458, 2003.

LACAZ, C. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco, M., Lacaz, C., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds.), Paracoccidioidomycosis. **Boca Ratón: CRC Press**, p. 1-11, 1994.

LACHANCE, M. A. & STARMER, W. T. Ecology and Yeasts. In: KURTZMAN & FELL (eds). **The Yeast, a Taxonomic Study**. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. **Bras Med**, v. 22, p. 141-144, 1908.

MACEDO, R.; LACERA, M.; TRILLES REIS, R. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. **Anais do II Congresso Brasileiro de Micologia**. Rio de Janeiro. Abstract 182, 1998.

MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN, W.; WANG, B.; PROKSCH, P. Co-Cultivation - A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: Atualização Epidemiológica, Clínica e Terapêutica. **Anbras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 135-150, 2003.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p.480, 2010.

MATUTE, D. R.; MC EWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v.23, p.65-73, 2006.

MAYAYO, E.; LÓPEZ-ARACIL V.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; MAYAYO, R.; DOMÍNGUEZ, M. Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, n. 1, p. 44-46, 2007.

MC DONOUGH, E. S.; DUBATS, J. J.; WISNIEWSKI, T. R.; WALLENFANG, M. A.; MC NAMARA, W. J. Soil streptomycetes and bacteria related to lysis of *Blastomyces dermatitidis*. **Sabouraudia**, v. 11, n. 3, p. 244-50, 1973.

MC EWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidiodomycosis induced by inhalation of conidia. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 25, p. 165-75, 1987.

MC EWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, p. 305-306, 1995.

MENDES, G.; GONÇALVES, V. N.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; KOHLHOFF, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L.; COTA, B. B.; ROSA, L. H.; JOHANN, S. Antifungal activity of extracts from Atacama Desert fungi against *Paracoccidioides brasiliensis* and identification of *Aspergillus felis* as a promising source of natural bioactive compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 209-217, 2016.

MÓS, E. N. & FAVA-NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidiodomicose. I - Possível papel dos cães: Estudo sorológico e anatomo-patológico. **Revta Inst Med Trop**, v. 16, p. 154-159, 1974.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; TAYLOR, J. W.; CLAY, O. K.; MCEWEN, J. G.; CUOMO, C. A. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, 2016.

MUOTOE-OKAFOR, F. A. & GUGNANI, H. C. In vitro interactions between *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* and other fungi. **Mycoses**, v. 40, p. 309-312, 1997.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C. L.; BARRET, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. Paracoccidiodomicose enzootica em tatu (*Dasypus novencinctus*) no Estado do Pará. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, V. 28, p. 19-27, 1986.

NASCIMENTO, E. Isolamento e caracterização de microssatélites no fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, f. 96, 2005.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med Argent**, v. 53, p. 2831-2, 1966.

NEVES, L. S.; PETRONI, T. F.; FEDATTO, P. F.; ONO, M. A. Paracoccidiodomycosis in wild domestic animals. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 481-488, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, G. G.; BELITARDO, D. R.; BALARIN, M. R. S.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3, p. 299-302, 2013.

OLIVEIRA, G. G.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; BELITARDO, D. R.; SILVEIRA, L. H.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63-68, 2012.

OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L. H.; ITANO, E. N.; SOARES, R. M.; FREIRE, R. L.; WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, p. 197–202, 2011.

OLIVEIRA, H. C.; ASSATO, P. A.; MARCOS, C. M.; SCORZONI, L.; PAULA E SILVA, A. C.; SILVA, J. F.; SINGULANI, J. L.; ALARCON, K. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. *Paracoccidioides*-host Interaction: An Overview on Recent Advances in the Paracoccidioidomycosis. **Front Microbiol**, v. 25, n. 6, p. 1319, 2015.

ONO, M. A.; ITANO, E. N.; MIZUNO, E. H.; CAMARGO, Z. P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, v. 40, p. 493–499, 2002.

ONO, M. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MORAIS, H. A.; TRAPP, S. M.; BELITARDO, D. R.; CAMARGO, Z. P. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39, p. 277-282, 2001.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 83, n. 1, p. 19-25, 2009.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Eds.). **The Yeasts, Biology of Yeasts**. 2 ed., v. 1. London: Academic Press, p. 123-180, 1987.

QUEIROZ-TELLES F: Influence of alternating coffee and sugar cane agriculture in the incidence of paracoccidioidomycosis in Brazil. **Biomedica**, v. 28, supl. 1, p. 129, 2008.

RAMOS-E-SILVA, M; SARAIVA L. E. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin**, v. 26, p. 257–269, 2008.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, p. 303–311, 2012.

- RESTREPO, A.; McEWEN J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**. Colômbia. v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.
- RESTREPO, A.; TOBON, A.; CANO, L. *Paracoccidioides brasiliensis*. In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. BENNETT, J.E.; DOLIN, R.; BLASER, M.J. (eds), 8 edição. **Elsevier**: Philadelphia, PA; p. 2995–3002, 2015.
- RESTREPO-MORENO, A.; SCHNEIDAU JR., D. Nature of the skin-reactive principle in culture filtrates prepared from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Bacteriology**, v. 93, p. 1741-1748, 1967.
- RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; FRANCO M. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, p. 379-383, 2004.
- RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; BAGAGLI, E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 636–643, 2009.
- ROMI, W.; KEISAM, S.; AHMED, G.; JEYARAM, K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC Microbiology**, v. 14, a. 52, 2014.
- ROSA-MAGRI, M. M.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CECATO-ANTONINI, S. R. C. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. **Braz Arch Biol Technol**, v. 54, p. 1–5, 2011.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for procaryotes. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, p. 39-67, 2001.
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, 711-713, 1988.
- SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 31, p. 99-113, 1993.
- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v.40, p. 225–242, 2002.
- SAN-BLAS, G.C. Academia Biomédica Digital: De interés. 2006. Disponível em: <<http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=12&m=2&n=435&e=436>>. Acesso em: 13 abr. 2017.
- SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G. J. *In vitro* antagonismo of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma lingibrachiatum*. **Mycopathologia**, v. 163, p. 49-58, 2007.

- SANDBLAND, G. J.; RODGERS, J. K.; MINCHELLA, D. J. Interspecific antagonism and virulence in hosts exposed to two parasite species. **J Invertebr Pathol**, v. 96, p. 43-47, 2007.
- SBEGHEN, M. R.; ZANATA, T. B.; MACAGNAN, R.; DE ABREU, K. C.; DA CUNHA, W. L.; WATANABE, M. A.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 435-440, 2015.
- SHANKAR, J.; RESTREPO, A.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, p. 296–313, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.
- SHIN, C. S.; KIM, H. J.; KIM, M. J.; JU, J. Y. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 576-581, 1998.
- SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife (Brazil). **Rev Fac Med Uni Ceara**, v. 3, p. 90–94, 1963.
- SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influencia of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van leewenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 193-9, 2000.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTÍNEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 36, p. 37-42, 1998.
- SILVEIRA, L. H.; DOMINGOS, I. H.; KOUCHI, K.; ITANO, E. N.; SILVA, E. A.; LANDGRAF, V. O.; WERNECK, S. M.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, v. 162, p. 325-329, 2006.
- SILVEIRA, L. H.; PAES, R. C.; MEDEIROS, E. V.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 165, p. 367–371, 2008.
- SINGH, A.; LUTHRA, U.; SAXENA, R. K. Brief review on bioactive metabolites of fungus isolated from soil. **Imp J Interdisc Res**, v. 3, n. 2, p. 1460-1466, 2017.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

STEENBERGEN, J. N. & CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infect**, v. 5, p. 667-675, 2003.

STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D.; MALLIARIS, S. D.; CASADEVALL, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3478-88, 2004.

SWANT, A. D.; AHEARN, D. G. Involvement of a cell wall receptor in the mode of action of anti-candida toxin of *Pichia anomala*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, p. 1331-1335, 1990.

TEIXEIRA, H. C.; CALICH, V. L.; SINGER-VERMES, L. M.; D'IMPERIO-LIMA, M. R.; RUSSO, M. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. **Braz J Med Biol Res**, v. 20, p. 587-589, 1987.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylog Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, 2009.

TERÇARIOLI, G. R.; BAGAGLI, E.; REIS, G. M.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MACORIS, S. A. G.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol**, v. 7, p. 1-8, 2007.

TERRA, M. F. Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciência Biológicas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, f. 60, 2008.

THEISEN, S.; MOLKENAU, E. & SCHMITT, M. J. Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Willipsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential. **J Microbiol Biotechnol**, v. 10, p. 547-550, 2000.

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M.; ARAÚJO, J. P.; BOSCO, S. M.; MACORIS, S. A.; PADULA, L. O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725-729, 2005.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographical Aspects. **Plos One**. São Paulo. v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P.; COLOMBO, A. L. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, p. 251-262, 2008.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9-25, 2017.

UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWISH, J.; et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associate Onygenales. **Mycology**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.

VADKERTIOVÁ, R., SLÁVIKOVÁ, E. Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, p. 39-43, 2007.

VAN DAMME, P. A.; BIERENBROODSPOT, F.; TELGTT, D. S.; TELGT, D. S.; KWAKMAN, J. M.; DE WILDE, P. C.; MEIS, J. F. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands. **Medical Mycology**, v. 44, p. 13–18, 2006.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 463–469, 2005.

WALKER, S. L.; PEMBROKE, A. C.; LUCAS, S. B.; VEGA-LOPEZ, F. Paracoccidioidomycosis presenting in the UK. **Brazilian Journal of Dermatology**, v. 158, p. 624–626, 2008.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: *Paracoccidioidomycosis* (FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G.), **Boca Ratón: CRC Press**, p. 109-120, 1994.

ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L.; DILLON, A.; RUNYON, L. C. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **American Journal of Public Health**, v. 42, p. 930-935, 1952.