



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

JULIANE CARINA DA SILVA ARAUJO

**EFEITO DELETÉRIO DE AGROTÓXICOS EM ESPÉCIES DE CANDIDA
REPRESENTANTES DA MICROBIOTA HUMANA**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
BACHARELADO EM ENFERMAGEM
NÚCLEO DE ENFERMAGEM

JULIANE CARINA DA SILVA ARAUJO

**EFEITO DELETÉRIO DE AGROTÓXICOS EM ESPÉCIES DE CANDIDA
REPRESENTANTES DA MICROBIOTA HUMANA**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Idjane Santana de Oliveira

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Giane da Paz Ferreira Silva, CRB-4/977

A732e Araújo, Juliane Carina da Silva.

Efeito deletério de agrotóxicos em espécies de *Candida* representantes da microbiota humana / Juliane Carina da Silva Araújo. - Vitória de Santo Antão, 2019.

39 folhas. : il.

Orientadora: Idjane Santana de Oliveira.

TCC (Graduação em Enfermagem) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Enfermagem, 2019.

Inclui anexo e referências.

1. Microbiota humana. 2. *Candida* (*C. albicans* e *C. krusei*). 3. Agrotóxicos. I. Oliveira, Idjane Santana de (Orientadora). II. Título.

579 CDD (23.ed)

BIBCAV/UFPE- 41/2019

JULIANE CARINA DA SILVA ARAUJO

**EFEITO DELETÉRIO DE AGROTÓXICOS EM ESPÉCIES DE CANDIDA
REPRESENTANTES DA MICROBIOTA HUMANA**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 06/06/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Idjane Santana de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. Leandro Finkler
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Msc^ª. Zailde Carvalho dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Sua presença e graça em minha vida não teria chegado até aqui.

Ao meu filho, *Paulo Neto*, por ser uma benção em minha vida e também minha inspiração e força diária.

Aos meus pais, *Roseno* e *Marluce*, por todo apoio ofertado ao longo da minha trajetória.

Ao meu esposo, *Paulo Júnior*, por todo seu companheirismo.

Às minhas amigas do coração, *Enferloves*, que percorram junto a mim todas as fases e períodos da graduação, estendendo-se a vida extra-acadêmica, na qual os laços criados jamais serão desfeitos.

À minha brilhante orientadora, *Idjane*, por todo suporte muito além do técnico e científico. Ao meu colega de laboratório, *Jackson*, e a *Anna*, técnica do laboratório de Microbiologia e Imunologia do Centro Acadêmico de Vitória.

À comissão avaliadora por terem se disponibilizado a participar da ocasião.

RESUMO

O aumento da comercialização e utilização de agrotóxicos na agricultura brasileira é preocupante por repercutir diretamente na saúde humana e ambiental. Os estudos laboratoriais para liberação de agrotóxicos envolvem apenas testes *in vitro* frente às células humanas. Atualmente é conhecido que a microbiota humana (bactérias e fungos) tem papel fundamental no equilíbrio funcional de várias atividades biológicas do corpo, influenciando desde sistema imune a sistema nervoso central. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo testar o efeito deletério de alguns agrotóxicos frente a duas espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. krusei*) e determinar a concentração mínima inibitória (CIM) que mata essas leveduras. Foram realizados ensaios *in vitro* de microtitulação em placas usando concentrações variadas em diluição seriada dos seguintes agrotóxicos: metomil, carbendazim e tebuconazol. A CIM (0,31mg/μL) para o agrotóxico metomil foi igual para as duas espécies de *Candida* testadas. A CIM do carbendazim foi diferente para *C. albicans* (0,39mg/μL) e *C. krusei* (0,04mg/μL), indicando ser a *C. albicans* mais resistente que *C. krusei* ao agrotóxico. Não foi possível definir a CIM para o tebuconazol até as concentrações mais diluídas testadas, indicando ser o valor abaixo de 0,01mg/μL. As doses de IDA (ingestão diária aceitável) total para adulto (70kg) ou criança (20kg) estavam bem acima da CIM de todos os agrotóxicos testados, indicando que baixas concentrações desses agrotóxicos foram suficientes para matar as leveduras testadas e que o valor aceitável de ingestão diária estão altos. Desta forma, o fato de que nenhum agrotóxico dentre os estudados apresentaram-se seguros para consumo dentro da ingestão diária permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, há necessidade urgente de reflexão das doses diárias de consumo humano permitida para esses agrotóxicos, bem como ampliar os testes para um painel maior de micro-organismos e testar todos os agrotóxicos que são usados na agricultura brasileira.

Palavras-chaves: Microbiota. Agrotóxico. Microdiluição. Leveduras.

ABSTRACT

The increase in the commercialization and use of agrochemicals in Brazilian agriculture is of concern because it has a direct impact on human and environmental health. Laboratory studies for the release of pesticides involve only *in vitro* tests against human cells. It is now known that the human microbiote (bacteria and fungi) plays a fundamental role in the functional balance of various biological activities of the body, influencing the immune system from the central nervous system. Thus, the present study had as objective to test the deleterious effect of some agrochemicals against two species of *Candida* (*C. albicans* and *C. krusei*) and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) that kills these yeasts. *In vitro* microtiter plate assays were performed using varying concentrations in serial dilution of the following agrochemicals: methomyl, carbendazim and tebuconazole. The CIM (0.31mg/μL) for methyl agrototoxic was the same for the two *Candida* species tested. The MIC of carbendazim was different for *C. albicans* (0.39mg/μL) and *C. krusei* (0.04mg/μL), indicating that *C. albicans* was more resistant than *C. krusei* to the pesticide. It was not possible to define the MIC for tebuconazole until the most diluted concentrations tested, indicating a value below 0.01mg/μL. Total adult (70 kg) or child (20 kg) IDA doses were well above the MIC of all pesticides tested, indicating that low concentrations of these pesticides were sufficient to kill the yeasts tested and that the acceptable value of daily intake are high. Thus, the fact that no pesticides among the studied were safe for consumption within the daily intake allowed by ANVISA, there is an urgent need to reflect daily doses of human consumption allowed for these pesticides, as well as to expand the tests for a larger panel of microorganisms and test all the agrochemicals that are used in Brazilian agriculture.

Key words: Microbiota. Pesticide. Microtiter. Yeasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teste de microtitulação em caldo da atividade antifúngica *in vitro* de agrotóxicos frente à *Candida albicans*.

Figura 2 - Teste de microtitulação em caldo da atividade antifúngica *in vitro* de agrotóxicos frente a *Candida krusei*.

LISTA DE ABREVIACÖES

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde coletiva
AGCC	Ácidos Graxos De Cadeia Curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM	Concentração Inibitória Mínima
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INCA	Instituto Nacional do Câncer
TTC	Trifeniltetrazólio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória de agrotóxicos frente as espécies de levedura da microbiota humana considerando a ingestão diária permitida pela ANVISA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Agrotóxicos e Impactos dos Agrotóxicos na Saúde.....	14
2.2 Microbiota Humana	15
2.3 Microbiota Fúngica.....	17
3 OBJETIVOS.....	19
4 ARTIGO	20
5 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO A.....	34

1 INTRODUÇÃO

O Brasil desempenha um importante papel no agronegócio, sendo atualmente considerado o maior consumidor mundial de agrotóxicos, embora não seja o maior produtor agrícola mundial (GALINDO; PORTILHO, 2015). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015), o Brasil consome em média 5,2 kg de agrotóxicos por habitante por ano, estima-se que na safra 2023/2024 o Brasil ultrapasse a marca de 250 milhões de toneladas produzidas. (BRASIL, 2014).

Os agrotóxicos foram inseridos na agricultura a partir de 1950, acompanhado de fertilizantes e outras tecnologias (WHEELER, 2002). O governo brasileiro adotou a monocultura e o uso intensivo de agrotóxicos como política agrícola de modernização no campo, incentivada por meio de isenções fiscais cedidas às indústrias químicas formuladoras de agrotóxicos (ALVES FILHO, 2000). Se, por um lado, o uso de pesticidas aumenta a eficiência do campo, conferindo ao Brasil a liderança na produção de importantes culturas agrícolas, por outro gera preocupação pelos prejuízos que podem causar ao ambiente, em função dos riscos de contaminação do solo e de mananciais, e à saúde da população, diretamente, com o manuseio (aplicação ou preparo), como indiretamente, através dos alimentos ou água contaminados. (VASCONCELOS, 2018).

Instituições como Associação Brasileira de Saúde coletiva (ABRASCO, 2015) e Instituto Nacional do Câncer (INCA 2015) têm alertado quanto ao risco de desenvolvimento de variados tipos de câncer em consequência do uso indiscriminado de agrotóxicos. Os efeitos maléficos dos agrotóxicos destacados pelo INCA (2015) incluem infertilidade, impotência sexual, abortos, malformações, neurotoxicidade, alterações hormonais e imunológicas, além de efeitos sobre o sistema o sistema nervoso entérico, que por sua vez exerce influência no sistema nervoso central e nas vias neurais de comunicação entre esses dois extremos do Eixo Cérebro-Intestino (ZORZO, 2017).

Sabe-se da importância da microbiota humana, sendo esta composta por micro-organismos que colonizam o corpo humano. Em contrapartida não é dada a devida notoriedade dos efeitos dos agrotóxicos nessa microbiota, não existindo estudos na literatura mostrando a ação dos agrotóxicos na microbiota humana.

O corpo humano é colonizado por micro-organismos que, em seu conjunto é denominado microbiota. Esse ecossistema microbiano exerce papel fundamental na manutenção do estado de saúde do hospedeiro, enquanto há um equilíbrio na relação comensal. Os micro-organismos da nossa microbiota em geral apresentam efeito protetor. Mas, quando transferida de um local para outro do corpo, podem causar infecção. Os micro-organismos que compõem a microbiota normal podem receber benefícios do hospedeiro, como suplementação alimentar, meio ambiente estável, temperatura constante, proteção e transporte. Por outro lado, o hospedeiro obtém dos micro-organismos alguns benefícios, como maturação do sistema imunológico e manutenção da fisiologia intestinal. O benefício mais importante é a colonização bem adaptada da microbiota normal, que exclui micro-organismos patogênicos (WALLACE et al, 2014). Ademais, a microbiota é fundamental para a manutenção do estado de saúde do hospedeiro, uma vez que atua sobre os processos imunológicos, fisiológicos e metabólicos do corpo humano (GERRITSEN et al., 2011).

Dentre a composição da microbiota humana, encontramos os fungos filamentosos e leveduriformes. Algumas espécies de *Candida* são leveduras geralmente inofensivas para o homem, podendo causar infecção em pacientes imunocomprometidos, tornando-se oportunista. Dentre as espécies de *Candida* responsáveis por infecções superficiais ou sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, embora a *C. albicans* seja a espécie mais isolada, outras espécies são responsáveis por aproximadamente 35% a 65% dos casos de candidemia e *C. krusei* está nessa lista, sendo parte do grupo emergente de espécies de *Candida* de importância epidemiológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agrotóxicos e Impactos dos Agrotóxicos na Saúde

O século XX caracterizou-se, entre outros aspectos, por um intenso e contínuo processo de mudanças na agricultura, cujo resultado final tem sido, dentre outros, o aumento da produtividade pela necessidade de alimentar um contingente populacional cada vez maior e aumentar a lucratividade na indústria agrícola. Tal processo embasa a chamada "Revolução Verde" entendido como um conjunto de estratégias e inovações tecnológicas que, por um lado, provoca aumento da produtividade e por outro fomenta o desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização de solos, utilização de agrotóxicos e mecanização agrícola.

A utilização dos agroquímicos no campo, em especial os agrotóxicos, intensificou-se a partir da Segunda Guerra Mundial. Onde as indústrias vislumbravam a agricultura como meio de aumentar sua lucratividade, adotando as técnicas da revolução verde: começaram a investir em técnicas para o melhoramento de sementes; empresas de produtos químicos responsáveis por abastecer a indústria bélica norte-americana começaram a incentivar a produção e o uso de agrotóxicos como herbicidas, fungicidas, inseticidas e fertilizantes químicos e, começou a ser adotado, também, o uso de maquinário pesado no campo.

No contexto brasileiro, o governo militar também adotou as bases do modelo da Revolução Verde como meio de aumentar sua produtividade agrícola. Os agrotóxicos no Brasil são regidos pela Lei nº 7.802/1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002, segundo o mesmo, o termo "agrotóxico" é definido como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002, sem paginação).

Em relação aos impactos à saúde envolvidos ao processo produtivo do agronegócio, os de maior relevância para a saúde humana e ambiental são as poluições e/ou contaminações e as intoxicações agudas e crônicas relacionadas à aplicação de agrotóxicos, presente em todas as etapas da cadeia produtiva. (ABRASCO, 2017). No cenário brasileiro entre os anos de 2007 e 2015, foram notificados 84.206 casos de intoxicação por agrotóxicos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), sendo que em 2014 foi identificada a maior incidência de casos, de 6,26 por 100 mil habitantes (ALMEIDA et al, 2017).

O uso de agrotóxicos não é somente uma questão econômica, de produção agrícola. Transformou-se em um problema nacional de saúde pública e preservação da natureza, pelos malefícios decorrentes do seu uso indiscriminado. Os agroquímicos são vistos como substâncias tóxicas com muitos impactos à saúde humana, além de serem bastante perigosos; o seu uso exagerado e irresponsável pode intoxicar, tanto diretamente, com o manuseio (aplicação ou preparo), como indiretamente, através dos alimentos ou água contaminados (SANTOS, 2013).

Os efeitos maléficos dos agrotóxicos destacados pelo INCA (2015) incluem infertilidade, impotência sexual, abortos, malformações, neurotoxicidade, alterações hormonais, além de efeitos sobre o sistema imunológico. Outro alerta é que os resíduos não se encontram apenas nos alimentos *in natura*, os alimentos processados industrialmente também se encontram inclusos na lista de preocupações, como por exemplos biscoitos, salgadinhos, pães, cereais matinais, lasanhas, pizzas, e afins; pois utiliza ingredientes como trigo, milho e soja (INCA, 2015).

Para isso, é preciso revisar questões, e entender melhor os danos causados por este produto à saúde humana. Também, é de suma importância buscar alternativas ecologicamente menos impactantes que substituam o uso desses produtos químicos. (SANTOS, 2013).

2.2 Microbiota Humana

Entende-se por microbiota uma população de organismos microscópios (vírus, bactérias, fungos, e protozoários) que habitam um órgão do corpo ou parte do corpo de uma pessoa (RAMIREZ, 2017). A composição desse ecossistema microbiano é dinâmica e fortemente influenciada por uma série de fatores que

incluem espécies microbianas adquiridas no nascimento, genética do hospedeiro, uso de antibióticos e fatores imunológicos e dietéticos (DUQUE, 2016).

A microbiota se interage com o ser humano através de relações do tipo mutualismo, quando o hospedeiro é protegido contra invasores e este produz nutrientes essenciais no desenvolvimento do sistema imunológico; comensalismo, quando não há detecção de benefício ou malefício; e oportunismo, quando doenças são causadas. Dessa forma, a maioria dos componentes da microbiota normal é inofensiva a indivíduos saudáveis e constitui um dos mecanismos de defesa contra enfermidades (MACHADO, 2008). Bem como é fundamental para a manutenção do estado de saúde do hospedeiro, uma vez que atua sobre os processos imunológicos, fisiológicos e metabólicos do corpo humano (GERRITSEN et al., 2011). O processo imunológico consiste na modulação do sistema imune, estimulando a imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos, esse benefício acontece porque a microbiota interage com as células epiteliais intestinais e provoca uma resposta constante do sistema imunológico. A função metabólica consiste na síntese de ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato e acetato) e síntese de vitaminas B e K. Além disso, a microbiota é responsável pela resistência contra a colonização de microrganismos patogênicos por meio da proteção ecológica ocupando os sítios de adesão celulares da mucosa e pela manutenção das funções motoras do trato gastrointestinal (GERRITSEN et al., 2011; MAIA, 2018).

Estudos recentes utilizando modelos animais vêm demonstrando a influência da relação entre a microbiota e o sistema nervoso entérico, que por sua vez exerce influência no sistema nervoso central e nas vias neurais de comunicação entre esses dois extremos do Eixo Cérebro-Intestino. Evidências sugerem que as alterações da microbiota podem estar relacionadas ao neurodesenvolvimento, ao comportamento, à cognição, à gênese de doenças mentais, como transtorno do espectro autista, depressão, ansiedade e esquizofrenia, além de resposta orgânica exacerbada ao stress. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), por exemplo, são capazes de estimular o Sistema Nervoso Autônomo Simpático e a secreção mucosa de serotonina, influenciando a memória e a capacidade de aprendizado. Assim como a microbiota está relacionado à resposta ao stress, estímulos estressantes no início da vida influenciam a microbiota. (ZORZO, 2017).

A microbiota normal, ao sofrer distúrbios, pode trazer sérios prejuízos, como a multiplicação de microrganismos patogênicos causadores de doenças, por isso, as espécies de microrganismos residentes no indivíduo devem sempre se manter em equilíbrio para funcionarem como barreira efetiva contra organismos patogênicos e oportunistas (BEDANI; ROSSI, 2009). Como artifício para estabelecer o equilíbrio dessas populações benéficas, Bedani e Rossi (2009) cita alguns fatores importantes, como: competição por nutrientes e por sítios de adesão, inibição de um grupo por meio dos produtos metabólicos de outro, além de predação e parasitismo.

2.3 Microbiota Fúngica

Pertencentes a população da microbiota humana estão os fungos. Eles são microrganismos eucarióticos, heterotróficos e possuem parede celular. Quando apresentam núcleo único são leveduras e, quando apresentam vários, são fungos filamentosos e formam micélio. Os fungos podem ter morfologia diferente segundo as condições nutricionais e a temperatura as quais são expostas (TRABULSI, 1991).

Leveduras do gênero *Candida* são constituintes presentes da microbiota da pele e mucosa do homem, desde o nascimento. A relação de convivência levedura/hospedeiro ocorre ao longo da vida, porém quaisquer alterações na homeostase do organismo humano, como mudanças orgânicas, físico-químicas, fisiológicas ou patológicas tanto da pele como nas mucosas, favorecem a manifestação infecciosa deste fungo leveduriforme (RIBEIRO, 2004). Em condições adequadas as *Candidas* estão presentes no organismo humano numa relação comensal, ou seja, sem que prejuízos sejam causados à saúde humana (CARDOSO, 2004).

Atualmente o gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes de leveduras, que colonizam diversos sítios corpóreos, tais como, orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (SCHULZE, 2009). Candidíase ou candidose é uma micose causada por leveduras do gênero *Candida*, e esta atingem superfícies cutâneas e membranas mucosas resultando em infecções, como, candidíase oral, candidíase vaginal, intertrigo, paroníquia e onicomicoses (ROSSI, 2011). Uma vez que as espécies do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana, infecções pelas mesmas são consideradas oportunistas, tornando-se patogênicas caso ocorram

alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Alguns fatores individuais contribuem para as infecções por *Candida*, dentre os quais se podem destacar: o rompimento das barreiras cutâneas e mucosas, disfunção dos neutrófilos, defeito na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (BARBEDO, 2010).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Realizar ensaio *in vitro* para definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de alguns agrotóxicos, isoladamente, frente a espécies de *Candida sp.* e saber se a IDA total para adulto (70kg) e criança (20kg) possui efeito deletério contra as leveduras testadas.

Objetivos Específicos:

- Cultivar espécies de fungos da microbiota humana de pele, orofaringe, nasal, trato gastrointestinal e região vaginal.
- Realizar ensaio *in vitro* em microplacas da ação dos agrotóxicos frente aos micro-organismos isolados na dose da IDA.

4 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **PHYSIS**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO.

EFEITO DELETÉRIO DE AGROTÓXICOS EM ESPÉCIES DE CANDIDA REPRESENTANTES DA MICROBIOTA HUMANA

*Juliane Carina da Silva Araujo*¹; *Idjane Santana Oliveira*².

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

² Laboratório de microbiologia e imunologia / Centro Acadêmico de Vitória (CAV) / UFPE, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão – PE, Brasil.

Autor correspondente: julianecarina@hotmail.com.br

Resumo

O aumento da comercialização e utilização de agrotóxicos na agricultura brasileira é preocupante por repercutir diretamente na saúde humana e ambiental. Os estudos laboratoriais para liberação de agrotóxicos envolvem apenas testes in vitro frente as células humanas. Atualmente é conhecido que a microbiota humana (bactérias e fungos) tem papel fundamental no equilíbrio funcional de várias atividades biológicas do corpo, influenciando desde sistema imune a sistema nervoso central. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo testar o efeito deletério de alguns agrotóxicos frente a duas espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. krusei*) e determinar a concentração mínima inibitória (CIM) que mata essas leveduras. Foram realizados ensaios in vitro de microtitulação em placas usando concentrações variadas em diluição seriada dos seguintes agrotóxicos: metomil, carbendazim e tebuconazol. A CIM (0,31mg/μL) para o agrotóxico metomil foi igual para as duas espécies de *Candida* testadas. A CIM do carbendazim foi diferente para *C. albicans* (0,39mg/μL) e *C. krusei* (0,04mg/μL), indicando ser a *C. albicans* mais resistente que *C. krusei* ao agrotóxico. Não foi possível definir a CIM para o tebuconazol até as concentrações mais diluídas testadas, indicando ser o valor abaixo de 0,01mg/μL. As doses de IDA (ingestão diária aceitável) total para adulto (70kg) ou criança (20kg) estavam bem

acima da CIM de todos os agrotóxicos testados, indicando que baixas concentrações desses agrotóxicos foram suficientes para matar as leveduras testadas e que o valor aceitável de ingestão diária estão altos. Desta forma, o fato de que nenhum agrotóxico dentre os estudados apresentaram-se seguros para consumo dentro da ingestão diária permitida pela ANVISA, há necessidade urgente de reflexão das doses diárias de consumo humano permitida para esses agrotóxicos, bem como ampliar os testes para um painel maior de micro-organismos e testar todos os agrotóxicos que são usados na agricultura brasileira.

Palavras-chaves: microbiota, agrotóxico, microdiluição, leveduras,

Introdução

O Brasil desempenha um importante papel no agronegócio, sendo atualmente considerado o maior consumidor mundial de agrotóxicos, embora não seja o maior produtor agrícola mundial (GALINDO, PORTILHO, 2015). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015), o Brasil consome em média 5,2 kg de agrotóxicos por habitante por ano. Em 2017, os agricultores brasileiros usaram 540 mil toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos, cerca de 50% a mais do que em 2010 (VASCONCELOS, 2018).

O aumento do uso desses produtos está relacionado à evolução da produção agrícola – a safra de grãos saltou de 149 milhões de toneladas em 2010 para 238 milhões em 2017 – e da expansão no país da monocultura, sistema que altera o equilíbrio do ecossistema e afeta a biodiversidade, favorecendo o surgimento de pragas e doenças. (VASCONCELOS, 2018).

Se, por um lado, o uso de pesticidas aumenta a eficiência do campo, conferindo ao Brasil a liderança na produção de importantes culturas agrícolas, por outro gera preocupação pelos prejuízos que podem causar ao ambiente, em função dos riscos de contaminação do solo e de mananciais, e à saúde da população, diretamente, com o manuseio (aplicação ou preparo), como indiretamente, através dos alimentos ou água contaminados. (VASCONCELOS, 2018).

Instituições como Associação Brasileira de Saúde coletiva (ABRASCO, 2015) e Instituto Nacional do Câncer (INCA 2015) têm alertado quanto ao risco de desenvolvimento de variados tipos de câncer em consequência do uso

indiscriminado de agrotóxicos. Os efeitos maléficos dos agrotóxicos destacados pelo INCA (2015) incluem infertilidade, impotência sexual, abortos, malformações, neurotoxicidade, alterações hormonais e imunológicas, além de efeitos sobre o sistema o sistema nervoso entérico, que por sua vez exerce influência no sistema nervoso central e nas vias neurais de comunicação entre esses dois extremos do Eixo Cérebro-Intestino (ZORZO, 2017).

Sabe-se da importância da microbiota humana, sendo esta composta por micro-organismos que colonizam o corpo humano. Em contrapartida não é dada a devida notoriedade dos efeitos dos agrotóxicos nessa microbiota, não existindo estudos na literatura mostrando a ação dos agrotóxicos na microbiota humana.

O ecossistema microbiano exerce papel fundamental na manutenção do estado de saúde do hospedeiro, enquanto há um equilíbrio na relação comensal. Os micro-organismos da nossa microbiota em geral apresentam efeito protetor. Mas, quando transferida de um local para outro do corpo, podem causar infecção, assim como dependendo da imunidade do indivíduo, pode se estabelecer as infecções oportunistas. Os micro-organismos que compõem a microbiota normal podem receber benefícios do hospedeiro, como suplementação alimentar, meio ambiente estável, temperatura constante, proteção e transporte. Por outro lado, o hospedeiro obtém dos micro-organismos alguns benefícios, como maturação do sistema imunológico e manutenção da fisiologia intestinal. O benefício mais importante da existência da microbiota é a colonização bem adaptada dessa microbiota, excluindo os micro-organismos patogênicos (WALLACE et al, 2014). Ademais, a microbiota é fundamental para a manutenção do estado de saúde do hospedeiro, uma vez que atua sobre os processos imunológicos, fisiológicos e metabólicos do corpo humano (GERRITSEN et al., 2011).

Dentre a composição da microbiota humana, encontramos os fungos filamentosos e leveduriformes. Algumas espécies de *Candida* são leveduras geralmente inofensivas para o homem, podendo causar infecção em pacientes imunocomprometidos, tornando-se oportunista. Banbara et al 2019 observaram que dentre os micro-organismos que compõe o microbioma da cavidade oral de indivíduos saudáveis, *Candida* sp foi o gênero fúngico mais prevalente, seguido do gênero *Cladosporium*. Dentre as espécies de *Candida* responsáveis por infecções

superficiais ou sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, embora a *C. albicans* seja a espécie mais isolada, outras espécies são responsáveis por aproximadamente 35% a 65% dos casos de candidemia e *C. krusei* está nessa lista, sendo parte do grupo emergente de espécies de *Candida* de importância epidemiológica.

Diante dessa análise, sugere-se a problemática entre o consumo de agrotóxicos e seu impacto nos fungos, especialmente nas espécies de *Candida sp.*, da microbiota humana que habitam a pele, orofaringe, trato gastrointestinal e região vaginal, levando em consideração a Ingestão Diária Aceitável (IDA) permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Acredita-se nos possíveis efeitos destrutivos à microbiota humana frente ao uso abusivo dos produtos químicos para o controle de pragas agrícolas, visto que os testes realizados para aprovação de agrotóxicos envolvem apenas testes *in vitro* com células humanas e em geral no campo usa-se mais do que o limite permitido. O presente trabalho teve como objetivo realizar ensaio *in vitro* para definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de alguns agrotóxicos, isoladamente, frente a espécies de *Candida sp.* e saber se a IDA total para adulto (70kg) e criança (20kg) possui efeito deletério contra as leveduras testadas.

Metodologia

Trata-se de uma pesquisa do tipo experimental, utilizando-se de fungos leveduriformes colonizadores da microbiota humana do gênero *Candida*, a saber: *Candida albicans* e *Candida krusei*. Essas leveduras foram selecionadas devido sua relevância epidemiológica e clínica na microbiota humana.

Os agrotóxicos utilizados continham princípios ativos distintos e foram escolhidos por serem bastante comercializados no Brasil. As concentrações testadas variaram a partir da concentração informada no rótulo do fabricante numa diluição seriada fator 1:2, a saber: Carbendazim (25mg/μL a 0,24mg/μL), fungicida; Tebuconazol (10mg/μL a 0,01mg/μL), fungicida; Tiram (10mg/μL a 0,01mg/μL), fungicida e Metomil (10mg/μL a 0,01mg/μL), considerado inseticida e acaricida.

Os ensaios *in vitro* para testar a atividade deletéria dos agrotóxicos frente as leveduras foram realizados em teste de microdiluição em caldo sabouraud adaptado da norma técnica M27-A2 da ANVISA, CSLI (2002). Foram distribuídos 100 μL de

meio de cultura (caldo Sabouraud) em toda placa de microtitulação. Em seguida, adicionou-se 100 µL dos agrotóxicos no primeiro poço da coluna 2 e feita diluição seriada em duas linhas para cada agrotóxico. Depois, acrescentou-se aos poços teste 2 µL da suspensão de levedura em todos os poços da microplaca. A suspensão de levedura foi preparada em solução salina estéril a 0,9%, usando a escala padrão de Mac Farland correspondente ao tubo 0,5 que contém $1,5 \times 10^6$ ufc/mL. Desta suspensão, foi preparada diluição 1:10 com salina estéril e utilizada nos ensaios. Para controle de crescimento microbiano, foi utilizado meio de cultura mais suspensão microbiana. Como controles de atividade deletéria contra os microorganismos foram reservados poços contendo meio de cultura, suspensão microbiana e solução antifúngica (2 µL de fluconazol – 1 mg/mL). Para os controles de esterilidade dos agrotóxicos foram usados poços contendo meio de cultura e agrotóxico. Os testes foram realizados com filas duplas para cada agrotóxico por placa e placas duplicadas. Após incubação por 18h a 37°C, os testes foram revelados com 50 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Em seguida, incubação das placas a 37°C por 1h. Cada ensaio microbiano foi realizado em placas diferentes e em momentos distintos.

Resultados e Discussão

Após a realização dos experimentos, em duplicata na placa, em placas duplicadas e em momentos distintos, testando *in vitro* os diferentes agrotóxicos frente às leveduras representantes da microbiota humana, *Candida albicans* e *C. krusei* foram encontrados os resultados descritos abaixo e sumarizados na Tabela 1, e nas Figuras 1 e 2.

Para a *Candida albicans* e *C. krusei* o agrotóxico metomil, inseticida classe toxicológica I, com classe de risco ambiental classe II (produto muito perigoso) apresentou uma concentração mínima inibitória de 0,31mg. Esse resultado indica que até 0,31mg desse agrotóxico é capaz de matar essas espécies de *Candida*. Considerando que a ingestão diária permitida pela ANVISA por kg de peso corporal é 0,03mg para esse agrotóxico e que portanto a ingestão diária total permitida para um adulto de 70kg ou criança de 20kg, seria respectivamente 2,1 e 0,6mg, observou-se que essas doses permitidas pela ANVISA tem potencial deletério sobre

essas espécies de levedura importantes na microbiota da pele, vagina, e outras partes do corpo. Ver Tabela 1, Figura 1 e 2, linhas A e B.

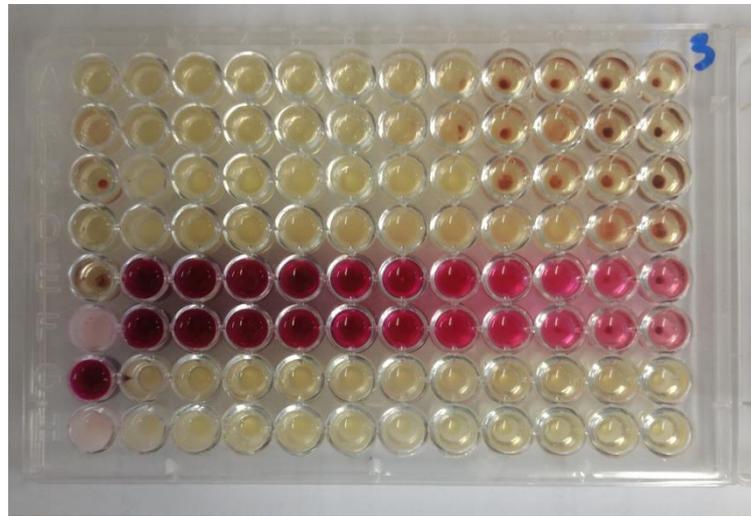
Tabela 1: Concentração mínima inibitória de agrotóxicos frente as espécies de levedura da microbiota humana considerando a ingestão diária permitida pela ANVISA.

Agrotóxico	IDA diária mg/kg p.c.	IDA diária total (mg) Adulto 70kg	IDA diária total (mg) Criança 20kg	CIM (mg/μL) <i>C. albicans</i>	CIM (mg/μL) <i>C. krusei</i>
Met	0,03	2,1	0,6	0,31	0,31
Carb	0,02	1,4	0,4	0,39	0,04
Teb	0,03	2,1	0,6	ND Abaixo de 0,01	ND Abaixo de 0,01

Legenda: Met – Metomil, Carb – Carbendazim, Teb – Tebuconazol. IDA – ingestão diária aceitável. CIM – concentração mínima inibitória. ND – não definida.

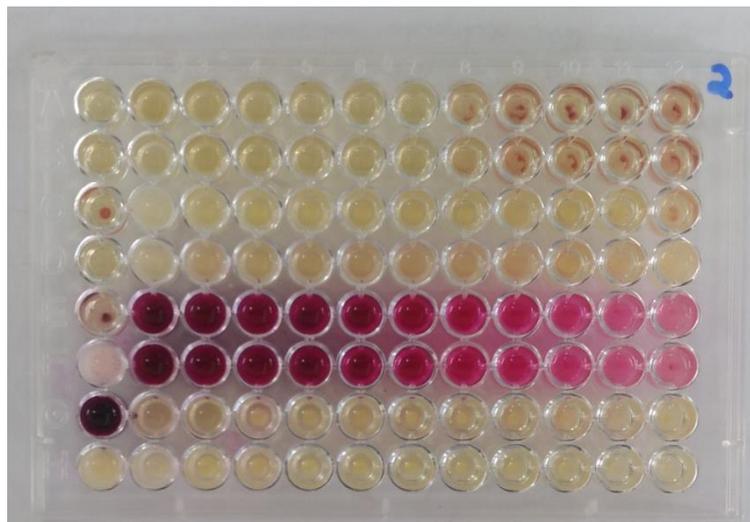
Em relação ao agrotóxico carbendazim, fungicida sistêmico, classe toxicológica III, classe de risco ambiental III (produto perigoso), a concentração mínima inibitória observada nos ensaios foi diferente para cada espécie de *Candida*, conforme mostra Tabela 1, a saber: *C. albicans* CIM de 0,39mg e *C. krusei* 0,04mg. Esse resultado mostra que *C. albicans* é mais resistente a esse fungicida que a *C. krusei*. Ver Figura 1 e 2 linhas C e D. Além do mais, tanto quanto o metomil, esse fungicida tem efeito deletério sobre essas espécies de leveduras, numa concentração de inibição bem acima da ingestão diária permitida pela ANVISA por kg de peso corporal (Tabela 1), indicando que é necessário pequena concentração desse agrotóxico para matar as leveduras, com conseqüente perturbação da microbiota. Mais uma vez a ingestão diária de carbendazim total permitida pela ANVISA calculada para adulto ou criança, indica destruição dessas espécies de leveduras.

Figura 1. Teste de microtitulação em caldo da atividade antifúngica *in vitro* de agrotóxicos frente a *Candida albicans*.



Legenda: Revelação de atividade antifúngica com TTC 2% : Incolor - Não houve crescimento microbiano. Cor vermelha: Houve crescimento microbiano. 1ª Coluna: A1- meio de cultura; B1 e C1 – controles de crescimento microbiano (meio + suspensão levedura); D1 e E1 – controle antifúngico (meio + suspensão fúngica + fluconazol); F1, G1 e H1 – meio + agrotóxico. A2 e B2 até A12 e B12 – Metomil, C2 e D2 até C12 e D12 – Carbendazim, E2 e F2 até E12 e F12 – Tiram (desconsiderar), G2 e H2 até G12 e H12 - Tebuconazol.

Figura 2. Teste de microtitulação em caldo da atividade antifúngica *in vitro* de agrotóxicos frente a *Candida krusei*.



Legenda: Revelação de atividade antifúngica com TTC 2% : Incolor - Não houve crescimento microbiano. Cor vermelha: Houve crescimento microbiano. 1ª Coluna: A1- meio de cultura; B1 e C1 – controles de crescimento microbiano (meio + suspensão levedura); D1 e E1 – controle antifúngico (meio + suspensão fúngica + fluconazol); F1, G1 e H1 – meio + agrotóxico. A2 e B2 até A12 e B12 – Metomil, C2 e D2 até C12 e D12 – Carbendazim, E2 e F2 até E12 e F12 – Tiram (desconsiderar), G2 e H2 até G12 e H12 - Tebuconazol.

Para o agrotóxico tebuconazol, fungicida sistêmico, classe toxicológica IV, classe de risco ambiental II (produto muito perigoso) não foi possível encontrar a CIM, uma vez que houve atividade antimicrobiana até a última concentração testada na placa (0,01mg), indicando que a CIM estará abaixo de 0,01mg, matando também em baixíssima concentração de agrotóxico as leveduras em estudo. Esse resultado é uma informação ainda mais preocupante, pois a ingestão diária (IDA) permitida pela ANVISA por kg de peso corporal para esse agrotóxico composto é 0,03mg, ou seja, a IDA total de um adulto de 70kg e criança de 20kg será respectivamente de 2,1mg e 0,6mg, bem acima da CIM, conforme Tabela 1. Figura 1 e 2 linhas G e H.

Para o agrotóxico tiram, fungicida classe toxicológica II, classe de risco ambiental II (produto muito perigoso), em virtude da cor vermelha do agrotóxico não foi possível definir nenhuma CIM e portanto, apesar desse agrotóxico constar nas Figuras 1 e 2, linhas E e F, não foi avaliada sua atividade deletéria frente as espécies de leveduras testadas.

Os resultados observados nesse trabalho preocupam uma vez que a *Candida* foi o gênero fúngico mais prevalente encontrado na microbiota da cavidade oral de indivíduos saudáveis em estudo realizado por Bandara *et al* 2019.

Associado a esses resultados, há uma tendência a aumentar tanto o uso quanto o consumo de agrotóxicos, diante da atual política governamental de liberação de mais agrotóxicos, uma vez que a fiscalização é deficiente e o efeito do uso abusivo de agrotóxicos irá repercutir diretamente na saúde humana e ambiental.

Conforme mostrado na Tabela 1 os três agrotóxicos apresentaram ação destrutiva em baixas concentrações, perturbando a microbiota fúngica e tornando o indivíduo microbiologicamente frágil, uma vez que o equilíbrio da microbiota, especialmente a intestinal tem importância comprovada no funcionamento do sistema imune (Santos, 2018).

Coker *et al* (2018) observaram correlação direta entre alteração da microbiota fúngica entérica e câncer colon retal, (CCR) fazendo com que em pacientes com câncer predominem espécies e gêneros fúngicos não ocorrentes ou prevalentes em indivíduos saudáveis. Algumas espécies fúngicas com potencial valor diagnóstico de

CCR são: *Aspergillus flavus*, *Debaromyces fabryi*, *Aspergillus sydowii*, *Monilophthora perniciososa*, entre outras espécies.

Kurimori *et al* (2013) em estudo com pacientes diabéticos observou-se que a microbiota desses pacientes apresentaram mais colonização por *C. albicans* (20%) que a microbiota de pacientes não diabéticos (8%). Isso ocorre possivelmente devido ao fato de pacientes diabéticos ter imunidade mais baixa que a média da população normal e ser o sistema imune um dos principais reguladores da população de *Candida* na microbiota humana.

Considerando a importância da microbiota fúngica para o bom funcionamento do corpo humano, e ainda o fato de que nenhum agrotóxico dentre os estudados apresentaram-se seguros para consumo dentro da ingestão diária permitida pela ANVISA, uma vez que houve efeito deletério sobre as leveduras em baixas concentrações desses agrotóxicos. Há necessidade urgente de reflexão das doses diárias de consumo humano permitida para esses agrotóxicos, bem como ampliar os testes para um painel maior de micro-organismos e todos os agrotóxicos que são usados na agricultura brasileira.

Referências

ABRASCO, Associação Brasileira de Saúde Coletiva, Dossiê Abrasco, 2015. Disponível em: <http://abrasco.org.br/dossieagrototoxicos>. Acesso em: 25/01/2017.

BANDARA, H. M. H. N., PANDUWAWALA, C. P., SAMARANAYAKE L. P. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. **Oral Diseases**. 25:363–371, 2019.

CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras - M27-A2**. 2. ed. CLSI, Wayne: USA, 2002.

COKER, O.O. et al. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. **Gut**. 68:654–662, 2019.

INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2015. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 01/03/2018.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Posicionamento do INCA Acerca dos Agrotóxicos. Acesso em: 20 de abr. de 2018.

GALINDO, F.; PORTILHO, F. “O Peixe Morre pela Boca”: Como os Consumidores Entendem os Riscos dos Agrotóxicos e dos Transgênicos na Alimentação. **Sustentabilidade em Debate** - Brasília, v. 6, n. 2, p. 73-87, mai/ago 2015.

GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G.T.; DE VOS, W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 209-240, 2011.

KURIMORI, H.Y., LIMA, S.M.R.R., TAMURA, K.Y., YAMADA, S.S., NAVARINI, A., UEDA, S.M.Y. Microbiota vaginal de mulheres após a menopausa, assintomáticas, portadoras e não portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**. 58:59-63, 2013.

NAVARRO-ARIAS, M. J. et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**. 12:783–794, 2019.

SANTOS, L. A. A microbiota intestinal e sua relação com o sistema imunológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 2, p. 2, ago./dez. 2018.

VASCONCELOS, Y. Alternativas na mesa. Disponível na Internet. <revistapesquisa.fapesp.br/2018/09/18/alternativas-na-mesa/>. Set 2018.

WALLACE, K. L.; ZHENG, L.; KANAZAWA, Y.; SHIH, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol**. 2014, 20, 6–21.

ZORZO, R. A. Impacto do microbioma intestinal no Eixo Cérebro-Intestino. **International Journal of Nutrology**, a.10, n.1, p. 298 S - 305 S, Março 2017.

5 CONCLUSÃO

É preocupante a realidade descrita neste estudo, pois além de todos os efeitos maléficos de agrotóxicos já comprovados, em relação à saúde humana, evidencia-se mais um: os prejuízos causados à microbiota humana pela ingestão de resíduos de agrotóxicos.

É gritante o fato de que as IDAs dos respectivos agrotóxicos são superiores às concentrações microbicidas evidenciadas no presente estudo. Sugere-se que haja complementação dos estudos acerca dos efeitos deletérios de agrotóxicos à microbiota humana, pois as consequências são robustas e, muitas vezes, as causas não são percebidas.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê Abrasco**, Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015. Disponível em: <http://abrasco.org.br/dossieagrotoxicos>. Acesso em: 25 jan. 2017.
- ALMEIDA, M. D. et al. A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei no 3.200/2015. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 33, n. 7, e00181016, 2017.
- BANDARA, H. M. H. N., PANDUWAWALA, C. P., SAMARANAYAKE L. P. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. **Oral Diseases**. Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 363–371, 2019.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **J Bras Doenças Sexualm Transm.**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 22, 2010.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre câncer de cólon. **Revista Alimentos e Nutrição**. Lisboa, v. 16, n. 1, p. 19-28, 2009.
- BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de jul. 1989.
- BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 jan. 2002.
- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de Candida albicans e Candida dubliniensis**. 2004. Dissertação - (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos) - Universidade do Minho, Braga.
- CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras - M27-A2**. 2. ed. CLSI, Wayne: USA, 2002.
- COKER, O.O. et al. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. **Gut**. London, v. 68, p.654–662, 2019.
- DUQUE, A. L. R. F. **Influência Do Suco De Laranja Na Microbiota Intestinal Humana**. 2016. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- INCA. **Instituto Nacional do Câncer**, Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 01/03/2018.
- _____. **Posicionamento do INCA Acerca dos Agrotóxicos**. Rio de Janeiro: INCA. Acesso em: 20 de abr. de 2018.
- GALINDO, F.; PORTILHO, F. “O Peixe Morre pela Boca”: Como os Consumidores Entendem os Riscos dos Agrotóxicos e dos Transgênicos na Alimentação. **Sustentabilidade em Debate** - Brasília, v. 6, n. 2, p. 73-87, mai/ago 2015.

- GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G.T.; DE VOS, W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, London, v. 6, p. 209-240, 2011.
- KURIMORI, H.Y., LIMA, S.M.R.R., TAMURA, K.Y., YAMADA, S.S., NAVARINI, A., UEDA, S.M.Y. Microbiota vaginal de mulheres após a menopausa, assintomáticas, portadoras e não portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa ,São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 59-63, 2013.
- MACHADO A. dos S. **Importância da microbiota intestinal para a saúde humana, enfocando nutrição, probióticos e disbiose**. TCC – (Especialização em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- MAIA, P. L.; FIORIO, B. C.; SILVA, F. R. da. A influência da microbiota intestinal na prevenção do câncer de cólon. **Arq. Catarin Med.** Florianópolis, v. 47, n. 1, p. 182-197, 2018.
- NAVARRO-ARIAS, M. J. et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**. Auckland, v. 12, p. 783–794, 2019.
- RIBEIRO, E. L.; GUIMARAES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. **News Lab**. São Paulo, v. 34, n. 64, p. 15:20, 2004.
- ROSSI, T.; LOZOVOY, M. A. B.; SILVA, R.V.; et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 10, p. 15-28, 2011.
- RAMIREZ, A. V. G. A importância da microbiota no organismo humano e sua relação com a obesidade. **International Journal of Nutrology**, Catanduva-SP, v.10, n.4, p. 153-160, Set / Dez 2017.
- SANTOS, L. A. A microbiota intestinal e sua relação com o sistema imunológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Betim-MG, v. 16, n. 2, p. 2, ago./dez. 2018.
- SANTOS, J. C. **O Uso do Agrotóxico: O Caso do Cultivo de Abacaxi no Município de Sapé – PB**. 2013. Monografia (Graduação em Bacharelado e Licenciatura em Geografia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro, Atheneu. 1991, p.386
- VASCONCELOS, Y. Alternativas na mesa. **Revista Pesquisa Fapesp**. São Paulo, n. 271, 2018. Disponível na Internet. <revistapesquisa.fapesp.br/2018/09/18/alternativas-na-mesa/>. Set 2018.
- WALLACE, K. L.; ZHENG, L.; KANAZAWA, Y.; SHIH, D.Q. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol**. Pleasanton- CA, v. 20, n. 1, p. 6–21, 2014.

ZORZO, R. A. Impacto do microbioma intestinal no Eixo Cérebro-Intestino.
International Journal of Nutrology, Catanduva-SP, v. 10, n.1, p. 298 S - 305 S,
Março 2017.

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA.

Physis - Instruções aos autores
www.scielo.br/revistas/physis/pinstruc.htm 1/5
ISSN 0103-7331 versão impressa

Forma e preparação de manuscritos

A Revista *Physis* publica artigos nas seguintes categorias:

Artigos originais por demanda livre (até 7.000 palavras, incluindo notas e referências): textos inéditos provenientes de pesquisa ou análise bibliográfica. A publicação é decidida pelo Conselho Editorial, com base em pareceres - respeitando-se o anonimato tanto do autor quanto do parecerista (*double-blind peer review*) - e conforme disponibilidade de espaço.

Artigos originais por convite (até 8.000 palavras, incluindo notas e referências): textos inéditos provenientes de pesquisa ou análise bibliográfica. O Conselho Editorial e o editor convidado podem tanto solicitar a autores de reconhecida experiência que encaminhem artigos originais relativos a temáticas previamente decididas, conforme o planejamento da revista, quanto deliberar, ao receber os artigos, com base em pareceres (*double-blind peer review*), sobre a publicação. Revisões e atualizações são em geral provenientes de convite. Artigos que, devido a seu caráter autoral, não podem ser submetidos anonimamente a um parecerista, são analisados, com ciência do autor, com base em pareceres em que só o parecerista é anônimo (*singleblind peer review*). O número de autores será limitado ao máximo de dois por manuscrito, sendo que cada autor só poderá figurar em um único artigo por número.

Resenhas (até 4.000 palavras, incluindo notas e referências): podem ser provenientes de demanda livre ou convite. O Conselho Editorial decide quanto à publicação, levando em conta temática, qualidade, boa redação e disponibilidade de espaço. Só serão aceitas resenhas com um único autor.

Seção de Entrevistas (até 4.000 palavras): publica depoimentos de pessoas cujas histórias de vida ou realizações profissionais sejam relevantes para as áreas de abrangência da revista.

Seção de Cartas (até 1.500 palavras): publica comentários sobre publicações da revista e notas ou opiniões sobre assuntos de interesse dos leitores.

Seção de Comentários (até 1.500 palavras): publica ensaios curtos e notas ou opiniões sobre temas relevantes para a Saúde Coletiva.

Instruções para encaminhamento de textos:

1. O processo de submissão é feito apenas online, no sistema *ScholarOne Manuscripts*, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/physis-scielo>. Para submeter originais, é necessário se cadastrar no sistema, fazer o *login*, acessar o "Author Center" e dar início ao processo de submissão. Todos os autores dos artigos aprovados para publicação a partir de 2018 (inclusive) deverão, obrigatoriamente, associar seu número de registro no ORCID (*Open Researcher and Contributor ID*, <https://orcid.org/>) ao seu perfil no ScholarOne e informa-lo na declaração de autoria (ver modelo adiante).
2. Os artigos devem ser digitados em *Word* ou RTF, fonte Arial ou Times New Roman 12, respeitando-se o número máximo de palavras definido por cada seção, que compreende o corpo do texto, as notas e as referências. Resumos são considerados separadamente. **O texto não deve incluir qualquer informação que permita a identificação de autoria;** os dados dos autores deverão ser informados apenas nos campos específicos do formulário de submissão.
3. Os estudos que envolvam a participação de seres humanos deverão incluir a **informação referente à aprovação por comitê de ética** na pesquisa com seres humanos, conforme a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. Os autores devem indicar se **a pesquisa é financiada**, se é **resultado de dissertação de mestrado ou tese de doutorado** e se há **conflitos de interesse** envolvidos na mesma. Informações sobre financiamento devem constar no item **Agradecimentos**, ao final do artigo ou em nota de fim.
4. Os artigos devem ser escritos em português (preferencialmente), inglês ou espanhol. A Editoria reserva-se o direito de efetuar alterações e/ou cortes nos originais recebidos para adequá-los às normas da revista, preservando, no entanto, estilo e conteúdo. Eventualmente, serão aceitos artigos traduzidos, já publicados em outro idioma, que, pela sua relevância, possam merecer maior divulgação em língua portuguesa. **Os textos são de responsabilidade dos autores**, não coincidindo,

necessariamente, com o ponto de vista dos editores e do Conselho Editorial da revista.

5. O resumo do artigo e as palavras-chave em português devem ser incluídos **nas etapas indicadas do processo de submissão** (primeira e segunda, respectivamente). Resumo e palavras-chave em inglês devem ser incluídos no corpo do artigo, **após as referências** (somente nas seções de artigos originais por demanda livre e temáticos). Contendo, cada um **até 200 palavras**, devem destacar o objetivo principal, os métodos básicos adotados, os resultados mais relevantes e as principais conclusões do artigo. Devem ser incluídas de **3 a 5 palavras-chave em português e inglês**. O título completo do artigo também deverá ser traduzido. A revista poderá rever ou refazer as traduções.

6. Imagens, figuras ou desenhos devem estar em formato tiff ou jpeg, com resolução mínima de 200 dpi, tamanho máximo 12x15 cm, em tons de cinza, com legenda e fonte Arial ou Times New Roman 10. Tabelas e gráficos-torre podem ser produzidos em *Word* ou similar. Outros tipos de gráficos devem ser produzidos em *Photoshop* ou *Corel Draw* ou similar. **Todas as ilustrações devem estar em arquivos separados** e serão inseridas no sistema no sexto passo do processo de submissão, indicadas como "*image*", "*figure*" ou "*table*", com respectivas legendas e numeração. No texto deve haver indicação do local de inserção de cada uma delas.

7. As notas, numeradas sequencialmente em algarismos arábicos, devem ser colocadas no final do texto, após as referências, com fonte tamanho 10. **As notas devem ser exclusivamente explicativas, escritas da forma mais sucinta possível**. Não há restrições quanto ao número de notas.

8. As **referências devem seguir a NBR 6023 da ABNT (de agosto de 2002)**. No corpo do texto, citar apenas o sobrenome do autor e o ano de publicação, seguidos do número da página no caso de citações. Todas as referências citadas no texto deverão constar nas referências, ao final do artigo, em ordem alfabética. **Os autores são responsáveis pela exatidão das referências**, assim como por sua correta citação no texto.

9. Os trabalhos publicados em *Physis* estão registrados sob a licença **Creative Commons Attribution CC-BY**. A submissão do trabalho e a aceitação em publicá-lo implicam cessão dos direitos de publicação para a Revista *Physis*. Quando da reprodução dos textos publicados em *Physis*, mesmo que parcial e para uso não comercial, **deverá ser feita referência à primeira publicação na revista**. A **declaração de autoria deverá ser assinada por todos os autores**, digitalizada e inserida no sexto passo do processo de submissão, e indicada como "*supplemental file not for review*", de modo que os avaliadores não tenham como identificar o(s) autor(es) do artigo. Quaisquer **outros comentários ou observações encaminhados aos editores** deverão ser inseridos no campo "*Cover letter*".

10. Tendo em vista o crescimento no número de coautores em muitos artigos encaminhados a *Physis*, **o número máximo de autores está limitado a quatro**, e só com justificativas excepcionais será aceito número maior. Além disso, será avaliada com bastante rigor a contribuição efetiva de cada autor. A Editoria se reserva o direito de recusar artigos cujos autores não prestem esclarecimentos satisfatórios sobre este item, e/ou solicitar a remoção de participantes sem contribuição substancial. As responsabilidades individuais de todos os autores na preparação do artigo deverão ser indicadas na "Declaração de responsabilidade" (vide modelo a seguir), conforme o *International Committee of Medical Journal Editors*. Essa declaração também deverá ser assinada pelos autores, digitalizada e encaminhada como documento suplementar no sexto passo do processo de submissão. Poderá ser incluído no final do corpo do artigo ou como nota de fim um item de "Agradecimentos", caso seja necessário citar instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo mas não preenchem os critérios de coautoria.

11. Em atendimento às normas da SciELO, a identificação da afiliação de cada autor deverá restringir-se a nomes de entidades institucionais, cidade, estado e país. O endereço eletrônico poderá ser informado.

12. Não serão aceitos trabalhos que não atendam às normas fixadas, mesmo que eles tenham sido aprovados no mérito (pelos pareceristas). Os editores se reservam o direito de solicitar que os autores adêquem o artigo às normas da revista, ou

mesmo descartar o manuscrito, sem nenhuma outra avaliação. Quaisquer outros comentários ou observações poderão ser encaminhados no campo "*Cover letter*".

13. A Revista *Physis* não cobra taxa de submissão e avaliação de artigos.

14. Em caso de artigo já aceito para publicação, será possível publicá-lo em inglês também, se for de interesse do autor. No entanto, a tradução deverá ser feita por empresa qualificada (ou recomendada pela Editoria de *Physis*), e os custos de tradução correrão por conta do autor.

15. A revista adota sistema de detecção de plágio.

16. Todo conteúdo publicado nos artigos e resenhas é de inteira responsabilidade dos autores.

17. Os casos omissos serão decididos pelo Conselho Editorial.