

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Pós-Graduação em Biologia de Fungos

MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA

**OTOMICOSE: DIAGNÓSTICO E NOVAS ESTRATEGIAS PARA O CONTROLE,
PREVENÇÃO E TRATAMENTO**

Recife
2018

MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA

**OTOMICOSE: DIAGNÓSTICO E NOVAS ESTRATEGIAS PARA O CONTROLE,
PREVENÇÃO E TRATAMENTO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves

Co-orientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Recife
2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Buonafina, Maria Daniela Silva

Otomucose : diagnóstico e novas estratégias para o controle, prevenção e tratamento / Maria Daniela Silva Buonafina. – 2018.

125 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves.

Coorientador: Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Micologia médica. 2. Micose. 3. Diagnostico micológico. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). II. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de (Coorientador) III. Título.

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 419

MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA

**OTOMICOSE: DIAGNÓSTICO E NOVAS ESTRATEGIAS PARA O CONTROLE,
PREVENÇÃO E TRATAMENTO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 08/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Rejane Pereira Neves – UFPE (Orientadora)

Dra. Melissa Fontes Landell – UFAL (Membro externo)

Dra. Teresinha Gonçalves da Silva – UFPE (Membro externo)

Dra. Carolina Maria da Silva – UFPE (Membro externo)

Dr. Henrique John Pereira Neves – UFPE (Membro externo)

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais, Ronaldo e Fátima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco por proporcionar atividades durante a pós-graduação que me fizeram amadurecer profissionalmente e ao CNPq, pela bolsa de estudos.

Ao Departamento de Micologia pela estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

A Orientadora Prof^a. Rejane Pereira Neves e ao co-orientador Prof. Reginaldo Gonçalves Lima-Neto, pelo incentivo e orientação durante esses quatro anos.

A Prof^a. Oliane Magalhães, Prof. Armando Marsden e Rubem Moraes (*in memoriam*) pelos ensinamentos, atenção durante esses anos de convivência.

Ao Prof. Silvio Caldas e a Profa. Dinalva Barros, aos residentes Dr^a Rebeqa Marques, Dr. Leopoldo, Dr. Pietro Tenório, Dra Daniele, Dra Larissa, Dra Mariana, Dra Salyne Martins do setor de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas/ UFPE, que colaboraram coleta das amostras clínicas.

Aos professores, profissionais e colegas da Micoteca URM: Prof^a. Cristina Souza-Motta, Prof^a. Maria José Fernandes, Prof^a. Débora Lima, Eliane Barbosa, Ana Reges que contribuíram com a identificação morfológica dos isolados fúngicos desta pesquisa.

Aos amigos Dr. Luiz Araújo Neto (Departamento de Antibióticos), Edson Rubem, Dra. Mayara Nunes e a Profa. Márcia Vanusa, pela parceria no trabalho com os derivados de tiossemicarbazonas e os extratos.

Aos amigos e companheiros do Departamento de Micologia: Dra. Pamella de Britto Ximenes Vilela, Ma. Melyna Leite, Me. Franz Assis, Ma. Ana Paula Rocha, Me. Michellângelo Nunes, Me. Cícero Pinheiro, Dra. Ildnay Brandão, Dra. Fabíola Couto, Dra. Heloiza Moraes, Ma. Aline Julião, Dra. Marília Gomes, Dr. Rafael Vilela, Dr. Jadson Bezerra, Dra. Suanni Lemos, Ma. Ana Emília Medeiros, Ma. Ertênia Paiva, Me. Carlos Tiburcio, Dra. Carolina Silva, Dr. André Ferraz, Dra. Ana Maria Parahym, Profa. Danielle Macêdo, Dr. Henrique John que contribuíram com esta pesquisa.

Desde já, agradeço a banca pelas considerações.

A Deus pela saúde, disposição, equilíbrio e sabedoria para produção deste trabalho.

A minha família.

RESUMO

A otomicose é infecção fúngica oportunista do conduto auditivo externo cujos principais agentes etiológicos são espécies de *Aspergillus* e *Candida*. Essa micose é caracterizada por prurido, otorreia e otalgia, e um importante fator de virulência de alguns desses patógenos é a capacidade de formar biofilmes. Tais estruturas aderem-se a superfícies as quais podem ocasionar maior dano ao paciente devido a recorrências mais frequentes dessa micose além de resistência a tratamento com antifúngicos. Desta forma, esta pesquisa objetivou detectar, isolar e identificar fungos em amostras clínicas de pacientes com otite fúngica que fazem ou não uso de aparelho auditivo, e buscar novas estratégias para a prevenção, controle e tratamento da otomicose. Fungos foram isolados do conduto auditivo de pacientes com otomicose e identificados por meio da taxonomia clássica e molecular. Foram sequenciadas as regiões ITS e o domínio D1/D2 da região LSU, e os genes da calmodulina e β -tubulina, e no caso de otomicose bilateral foi analisada a região GTG5 dos isolados. Após crescimento em meio de cultura, uma suspensão foi ajustada para uma concentração desejada de células. Produziram-se biofilmes em placas de microdiluição, nas quais células foram incubadas nos tempos de 24, 48 e 72h e o biofilme quantificado através da solução cristal violeta e de MTT. A atividade antifúngica *in vitro* das células planctônicas, do biofilme e da determinação do sinergismo, foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* utilizando o anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, ciclopirox olamina, octopirox olamina, derivados tiossemicarbazônicos e D-limoneno. A otomicose foi diagnosticada em 15 pacientes, com idade média de 28 anos; 60% era do sexo masculino. O fator de risco prevalente foi a presença da perfuração timpânica com inflamação exsudativa. Foram isolados e identificados 19 espécimes entre *Aspergillus awamori*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. pseudonomius*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *Candida parapsilosis*, *Millerozyma farinosa* e *Talaromyces funiculosus*. Todos isolados formaram biofilme e tiveram maior atividade metabólica após 24h. As concentrações inibitórias mínimas obtidas de anfotericina B foram 0,125 a 4 μ g/mL; fluconazol, 16 a 64 μ g/mL, cetoconazol, 0,03 a 8 μ g/mL; itraconazol, 0,03 a 0,5 μ g/mL; ciclopirox olamina, 0,5 a 16 μ g/mL, e octopirox olamina, 0,5 a 4 μ g/mL. Derivados de tiossemicarbazonas, L3, L8 e L9, e o limoneno também tiveram atividade contra os isolados. L3, variou de 4 a 1024 μ g/mL; L8, 2 a 256 μ g/mL; L9, 2 a 512 μ g/mL, e o

limoneno, 32 a 1024 μ g/mL. Além disso, constatamos sinergismo entre octopiroxolamina e o limoneno. Também se verificou a atividade antifúngica no tratamento dos biofilmes de 18 isolados em pelo menos um dos tratamentos. Espécies de *Aspergillus* continuam sendo os agentes etiológicos mais frequentes em casos de otomicoses. É cada vez mais claro que uma grande maioria destes fungos tem a capacidade de formar biofilmes e devido a este fato, são refratários ao tratamento desta micose, o que representa um grande problema para os pacientes, uma vez que a dose necessária para erradicar os agentes etiológicos, pode exceder o máximo atingível terapêuticamente as concentrações de antifúngicos.

Palavras-chave: Otite externa fúngica. Biofilme. Terapia antifúngica.

ABSTRACT

Otomycosis is an opportunistic fungal infection of the auditory input conduit in the municipality of *Aspergillus* and *Candida*. This mycosis is characterized by pruritus, otorrhea and otalgia, and an important virulence factor of some of these pathogens is the ability to form biofilms. Such structures adhere to surfaces which may cause greater damage to the patient due to more frequent recurrences of this mycosis besides resistance to treatment with antifungals. In this way, this research aimed to detect, isolate and identify fungi in clinical samples of patients with fungal otitis who do or do not use hearing aids, and to seek new strategies for the prevention, control and treatment of otomycosis. Fungi were isolated from the auditory canal of patients with otomycosis and identified through classical and molecular taxonomy. The ITS regions and the D1/D2 domain of the LSU region, and the calmodulin and β -tubulin genes were sequenced, and in the case of bilateral otomycosis, the GTG5 region of the isolates was analyzed. After growth in culture medium, a suspension was adjusted to a desired concentration of cells. Biofilms were produced in microdilution plates, in which cells were incubated at 24, 48 and 72h times and the biofilm quantified through the crystal violet solution and MTT. The in vitro antifungal activity of planktonic cells, biofilm and synergism was evaluated by the broth microdilution method, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute using amphotericin B, fluconazole, ketoconazole, cyclopirox olamine, octopirox olamine, thiosemicarbazonic derivatives and D-limonene. Otomycosis was diagnosed in 15 patients, with a mean age of 28 years; 60% were male. The prevalent risk factor was the presence of tympanic perforation with exudative inflammation. Twenty nine specimens were identified and identified as *Aspergillus awamori*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. pseudonomius*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *Candida parapsilosis*, *Millerozyma farinosa* and *Talaromyces funiculosus*. All the isolates formed biofilm in the three times and had greater metabolic activity after 24h. The minimum inhibitory concentrations obtained from amphotericin B were 0,125 to 4 μ g/mL; fluconazole, 16 to 64 μ g/mL, ketoconazole, 0,03 to 8 μ g/mL; itraconazole, 0,03 to 0,5 μ g/mL; cyclopirox olamine, 0,5 to 16 μ g/mL, and octopirox olamine, 0,5 to 4 μ g/mL. The thiosemicarbazones, L3, L8 and L9 derivatives, and limonene also had activity against the isolates. L3, ranged from 4 to 1024 μ g/mL; L8, 2 to 256 μ g/mL; L9, 2 to 512 μ g/mL, and limonene, 32 to 1024 μ g/mL. In addition, we found synergism between octopirox olamine and limonene. Antifungal

activity was also observed in the treatment of biofilms of 18 isolates in at least one of the treatments. *Aspergillus* species continue to be the most frequent etiological agents in cases of otomycosis. It is increasingly clear that a large majority of these fungi have the ability to form biofilms and because of this, they are refractory to the treatment of this fungus, which is a major problem for patients, since the dose required to eradicate the fungi etiological, may exceed the maximum therapeutically achievable antifungal concentrations.

Key words: Fungal external otitis. Biofilm. Antifungal therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Estrutura química do 2- (5-nitro-tiofeno) – tiossemicarbazona e dos radicais (R) constituintes das moléculas derivados de tiossemicarbazonas..... 53
- Figura 2-** Frenquência de doenças e procedimentos realizados em pacientes com otomicose atendidos no setor de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco..... 56
- Figura 3-** Frequência dos sintomas e manifestações clínicas relatadas pelos pacientes com otomicose atendidos no Hospital das Clínicas de Pernambuco..... 57
- Figura 4-** Exame direto da amostra clínica do paciente com otomicose, evidenciando hifas hialinas, septadas (A), e o micélio imerso na amostra clínica (B e C) 60
- Figura 5-** Exame direto evidenciando hifa dicotômica (seta), característico do fungo quando em parasitismo..... 60
- Figura 6-** Exame direto de amostras clínicas de pacientes com otomicose, evidenciando estruturas reprodutivas (conidióforos) de *Aspergillus fumigatus* (A e B) e *A. niger* (C e D) 61
- Figura 7-** Exame direto de amostra clínica evidenciando numerosas células de leveduras ovais, hialinas, característico de levedurose..... 61
- Figura 8-** Isolamento de cultura primária de *Aspergillus* sp. com crescimento nas temperaturas de 28°C e 37°C, obtido de amostra clínica de paciente com otomicose..... 68
- Figura 9-** Características macroscópicas, verso e reverso, e microscópicos de *Aspergillus awamori* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), evidenciando os conidióforos (G), com sete dias de crescimento a 25°C..... 63
- Figura 10-** Características macroscópicas, verso e reverso, de *Aspergillus flavus* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e Ágar malte (E e F), e microscópicos em MEA, mostrando conidióforo (G) e conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C..... 64
- Figura 11-** Características macroscópicas, verso e reverso, de *Aspergillus fumigatus* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar

	malte (E e F), e microscópicos, mostrando os conidióforos (G e H), com sete dias de crescimento a 25°C.....	65
Figura 12-	Características macroscópicas, verso e reverso, de <i>Aspergillus niger</i> nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, evidenciando o conidióforo (G), com sete dias de crescimento a 25°C.....	66
Figura 13-	Caracteres macroscópicos, verso e reverso, de <i>Aspergillus parasiticus</i> nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e Ágar malte (E e F), e microscópicos, evidenciando o conidióforo (G) e os conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.....	67
Figura 14-	Características macroscópicas do verso e reverso de <i>Aspergillus pseudonomius</i> nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e Ágar malte (E e F), e microscópicos, mostrando conidióforo (G) e conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.....	68
Figura 15-	Caracteres macroscópicos, verso e reverso, de <i>Aspergillus sydowii</i> nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, os conidióforos (G), com sete dias de crescimento a 25°C.....	69
Figura 16-	Características macroscópicas, verso e reverso, de <i>Aspergillus tamaritii</i> nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, mostrando conidióforo (G) e conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.....	70
Figura 17-	Caracteres macroscópicos, verso e reverso de <i>Talaromyces funiculosus</i> nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, exibindo os conidióforos (G), com sete dias de crescimento a 25°C.....	71
Figura 18-	Caracteres macroscópicos, no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (A), e microscópicos, evidenciando células de leveduras, ovais, hialinas e pseudo-micélio (B), com 15 dias de crescimento a 25°C, identificando <i>Candida parapsilosis</i>	71
Figura 19-	Caracteres macroscópicos de <i>Millerozyma farinosa</i> no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (A), e microscópicos (B), evidenciando células de leveduras (a) e formação de pseudo-	

	micélio (b), ascos (c) e ascósporos. Cultura com 15 dias de crescimento a 25°C.....	72
Figura 20-	Imagem do resultado da amplificação da região de sequência repetida utilizando o iniciador (GTG) ₅ , de <i>Millerozyma farinosa</i> (864OD e 864OE) isolados de paciente com otomicose bilateral.....	74
Figura 21-	Teste de sensibilidade antifúngica utilizando o método tabuleiro de xadrez demonstrando interação entre octopirox olamina (0,06-8 µg/mL) e o limoneno (2-1024 µg/mL) indicando sinergismo FIC≤0,5 em <i>Aspergillus flavus</i> (MM661OE)	88
Gráfico 1-	Os dados representam a média e o desvio padrão (SD) da absorbância (OD ₅₇₀) do Cristal violeta durante a produção de biofilme por espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Millerozyma farinosa</i> , <i>Talaromyces funiculosus</i> e o controle de <i>Canidida albicans</i> ATCC90028 (<i>C. abicans</i>) com três repetições, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as medias obtidas com nível de significância de 5%.....	93
Gráfico 2-	Relação das médias da formação de biofilme nos tempos 24, 48 e 72 horas, quanto a quantidade de biomassa, evidenciando diferença significativa entre 24h/48h e 48h/72h ($P \leq 0.0001$) e 24h/72h ($P \leq 0.001$)	93
Gráfico 3-	Os dados representam a média e o desvio padrão (SD) da absorbância (OD ₅₇₀) do MTT durante a produção de biofilme por espécies de <i>Aspergillus</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Millerozyma farinosa</i> , <i>Talaromyces funiculosus</i> e o controle de <i>Canidida albicans</i> ATCC90028 (<i>C. abicans</i>) com três repetições, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as medias obtidas com nível de significância de 5%.....	94
Gráfico 4-	Relação das médias da formação de biofilme nos tempos 24, 48 e 72 horas, quanto a atividade metabólica, evidenciando diferença significativa entre 24h/48h e 48h/72h ($P \leq 0.001$) e 24h/72h ($P \leq 0.01$)	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Ocorrência dos agentes etiológicos da otomicose nos principais trabalhos no mundo, publicados entre 2000 e 2018.....	34
Tabela 2-	Descrição dos pacientes com otomicose em relação ao sexo, idade, doenças relacionadas e procedimentos, além dos sintomas.....	58
Tabela 3-	Identificação dos fungos isolados de pacientes com diagnóstico de otomicose, por meio de ferramenta molecular, após o sequenciamento das regiões ITS, LSU e os genes da calmodulina e da β -tubulina, e a comparação com isolados de banco de dados.	73
Tabela 4-	Concentração Inibitória Mínima de anfotericina B (ANFB) frente a fungos isolados de pacientes com otomicose.....	77
Tabela 5-	Concentração Inibitória Mínima de fluconazol, cetoconazol e itraconazol frente a fungos isolados de pacientes com otomicose.	79
Tabela 6-	Concentração Inibitória Mínima de ciclopirox olamina e octopirox olamina frente aos fungos isolados de pacientes com otomicose.	81
Tabela 7-	Menor concentração de derivados do tiossemicarbazonas capaz de inibir o crescimento de fungos isolados de paciente com otite externa fúngica.....	83
Tabela 8-	Menor concentração de D-limoneno capaz de inibir o crescimento de fungos isolados de paciente com otite externa fúngica.....	86
Tabela 9-	Comparação entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), <i>in vitro</i> , dos isolados frente ao cetoconazol e ao D-limoneno (OL7) sobre a redução da população de fungos isolados de pacientes com otomicose.....	89
Tabela 10-	Comparação entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), <i>in vitro</i> , dos isolados frente ao ciclopirox olamina e ao D-limoneno sobre a redução da população de fungos isolados de pacientes com otomicose.....	90
Tabela 11-	Comparação entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), <i>in vitro</i> , dos isolados	

	frente ao octopirox olamina e ao D-limoneno sobre a redução da população de fungos isolados de pacientes com otomicose.....	91
Tabela 12-	Concentração Fungicida Mínima (CFM) capaz inibir os biofilmes após 48h de incubação dos fungos isolados de pacientes com otomicose frente ao cetoconazol, octopirox olamina e ao limoneno.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA *Deoxyribonucleic Acid*

CTAB *Cetyl Trimethylammonium Bromide*

ITS *Internal Transcribed Spacer* do rDNA

LSU *Large Subunit* do rDNA

BLASTn *Basic Local Alignment Search Tool*

dNTP *Deoxynucleotide*

PCR *Polymerase Chain Reaction*

pH Potencial Hidrogeniônico

MOPS Ácido Morfolino Propano Sulfônico

PBS Tampão Fosfato Salino

CIM Concentração Inibitória Mínima

µl Microlitro

v/v Percentagem volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	PROBLEMATIZAÇÃO.....	20
1.2	OBJETIVOS.....	21
1.2.1	Objetivo Geral.....	21
1.2.2	Objetivos Específicos.....	21
1.3	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	21
1.3.1	Local de coleta e obtenção das amostras clínicas.....	21
1.3.2	Manipulação das amostras clínicas.....	22
1.3.3	Purificação e identificação dos fungos.....	22
1.3.4	Classificação taxonômica clássica.....	23
1.3.5	Classificação taxonômica molecular.....	23
1.3.6	ISSR-PCR para a tipagem dos espécimes re-isolados.....	24
1.3.7	Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	25
1.3.7.1	Método de coloração cristal violeta.....	25
1.3.7.2	Método de coloração MTT.....	26
1.3.7.3	Análise estatística.....	27
1.3.8	Teste de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> de células planctônicas .	27
1.3.9	Teste de sensibilidade antifúngica utilizando o método tabuleiro de xadrez – <i>chequerboard</i>.....	30
1.3.10	Sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> de biofilmes.....	30
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	31
2.1	MORFOLOGIA DA ORELHA	31
2.1.1	Orelha externa.....	31
2.1.2	Orelha média.....	32
2.1.3	Orelha interna.....	32
2.2	OTOMICOSE.....	33
2.3	OCORRÊNCIA E ETIOLOGIA DA OTOMICOSE.....	34
2.4	FATORES QUE PREDISPÕEM A OTOMICOSE.....	37
2.5	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA OTOMICOSE.....	40
2.5.1	Manifestações clínicas e sintomatologia.....	40
2.5.2	Coleta e manipulação das amostras clínicas.....	42
2.6	TRATAMENTO DA OTOMICOSE.....	44

2.6.1	Antifúngicos utilizados no tratamento da otomicose.....	45
2.6.2	Polienos.....	46
2.6.3	Azólicos.....	47
2.6.4	Hidroxi piridonas.....	47
2.6.5	Propostas de novos compostos bioativos no tratamento da otite externa fúngica.....	49
2.6.5.1	Limonoeno	49
2.6.5.2	Derivados de tiossemicarbazonas.....	51
2.7	BIOFILME E RESISTÊNCIA DO FUNGO AO TRATAMENTO.....	53
3	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	55
3.1	DIAGNÓSTICO DA OTOMICOSE E DOENÇAS RELACIONADAS.....	55
3.2	EXAME DIRETO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS E CULTURAS OBTIDAS	59
3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS.....	62
3.3.1	Identificação dos isolados por taxonomia clássica.....	62
3.3.2	Identificação dos isolados por taxonomia molucular.....	72
3.4	PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA OTOMICOSE.....	77
3.4.1	Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos frente ao polieno anfotericina B (ANFB).....	77
3.4.2	Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos frente aos azólicos, fluconazol (FLZ), cetoconazol (CTZ) e itraconazol (ITZ)	78
3.4.3	Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos frente as hidroxipiridonas: Ciclopirox olamina (CPO) e octopirox olamina (OPO).....	80
3.4.4	Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos da otomicose frente aos derivados de 5-nitrotiofenotiosemicarbazonas.....	82
3.4.5	Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos da otomicose frente ao D-limoneno.....	84
3.5	AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS COM O D-LIMONENO.....	87

3.6	CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR FUNGOS ISOLADOS DE PACIENTES COM OTITE FÚNGICA.....	92
3.6.1	Avaliação do tratamento do biofilme frente a cetoconazol, octopiroxolamina e D-limoneno.....	96
4	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101
	APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	122

1 INTRODUÇÃO

A otite externa fúngica ou otomicose é uma infecção do canal auditivo externo causada por fungos (NEMATÍ et al., 2013). A incidência varia em diferentes áreas geográficas e é determinada principalmente pelas diversas condições ambientais, atingindo percentagens elevadas em algumas regiões tropicais e subtropicais, podendo constituir até 25% das otites infecciosas (ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2010). Os agentes mais comuns desta micose incluem espécies de *Aspergillus* e *Candida*, entretanto, outros gêneros também são relatados como agentes de otomicose como *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon asahii*, *Scedosporium apiospermum*, *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus* sp., *Cephalosporium* sp. (VENNEWALD; SCHNLEBE; KLEMM, 2003; MOGADAM et al., 2009; PONTES et al., 2009; GARCIA-AGUDO et al., 2011; NOWROZI et al., 2014; PRASAD et al., 2014; SENTHIL KUMARAN; KAVITHA, 2017).

A sintomatologia apresentada pelos portadores de otomicose pode ser diversa e, em certos casos são poucos evidentes, sendo necessário um exame realizado por meio da visualização do canal auditivo externo, a otoscopia. Em outros casos, o paciente queixa-se de surdez, prurido, zumbido e a presença de secreção denominada otorreia aquosa (LACAZ et al., 2002). Fatores intrínsecos que predispõem esta micose oportunista podem ser neoplasias, diabetes, hemopatias, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e doenças ou tratamentos que alteram a imunidade celular (GUATIMOSIM, 2002). Além destas condições, outros fatores que predispõem à otite externa incluem ausência de cerume, alta umidade, aumento da temperatura e trauma local ocasionado normalmente a partir da utilização de objetos introduzidos no conduto auditivo, assim como uso de aparelhos de amplificação sonora individual ou prótese auditiva (JACKMAN et al., 2005; HO et al., 2006).

De acordo com Ahmad et al. (2007), o uso de aparelhos auditivos contribui para o aumento do número de casos desta micose. A utilização de aparelho auditivo tem sido apontada como um fator predisponente para o desenvolvimento de otite externa crônica (BANKAITIS, 2005; AHMAD et al., 2007). Estes dispositivos foram identificados como uma potencial fonte de transmissão de micro-organismos. Em longo prazo, o uso de prótese auditiva é um fator para a colonização de fungos, sendo que esta colonização pode resultar em níveis suficientemente altos para dar lugar a uma infecção (STURGULEWSKI et al., 2006). Tais micro-organismos podem se

agregar e formar biofilmes, um modo protegido de crescimento colonial que permite a sobrevivência em ambientes hostis, sendo sua fisiologia e comportamento significativamente diferente das células livres (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

A otite externa fúngica não pode ser diagnosticada com base apenas nos sintomas clínicos, sendo necessário também o histórico clínico do paciente, otoscopia, preparações das amostras para exame direto, cultura micológica, que são importantes e recomendáveis para o diagnóstico preciso (AFSHARI et al., 2005; VENNEWALD; KLEMM, 2010). O tratamento deve ser dirigido especificamente contra o agente da doença com a finalidade de evitar o desenvolvimento de resistência do patógeno (VENNEWALD; KLEMM, 2010). Desta forma, a busca de novas alternativas terapêuticas pode auxiliar na instituição de tratamento adequado e conduzir a uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Pelo fato da otomicose apresentar sintomas inespecíficos, muitas vezes, o tratamento é inadequado, gerando complicações para o paciente, como recidivas e resistência a fármacos comercialmente disponíveis, pelos micro-organismos. Essas complicações também estão associadas ao diagnóstico tardio, uma vez que o exame direto e a cultura micológica não são procedimentos na rotina da conduta clínica.

Adicionalmente, a capacidade de o fungo penetrar em áreas mais profundas da orelha externa, média e interna, associada a seu potencial de formar agregados celulares em diversos dispositivos, como aparelho auditivo, tornam estes instrumentos veículos desses agentes etiológicos e alvos de higienização adequada e constante com substâncias que removam estas estruturas celulares. Além disso, existe a necessidade no desenvolvimento de pesquisas que determinam correlação epidemiológica entre infecção no conduto auditivo externo e a formação de biofilmes em dispositivos auriculares, com finalidade de determinar o potencial antifúngico de novas substâncias e prover melhor qualidade de vida dos pacientes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Detectar, isolar e identificar fungos em amostras clínicas de pacientes com otite fúngica que fazem ou não uso de aparelho auditivo, e buscar novas estratégias para o controle, prevenção e tratamento da otomicose.

1.2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho correspondem às ações desenvolvidas para atingir o objetivo geral:

- a) diagnosticar a otite fúngica em pacientes que fazem uso ou não de aparelho auditivo;
- b) verificar a associação de otomicose com outras doenças da orelha média e externa;
- c) identificar os isolados fúngicos através de metodologias clássica e molecular;
- d) correlacionar, através de similaridade genética, os agentes etiológicos obtidos do dispositivo auricular com do conduto auditivo dos pacientes ou de casos de otomicose bilateral;
- e) avaliar quantitativamente a capacidade de formação de biofilme dos agentes da otomicose;
- f) determinar o padrão de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos de otomicose e do biofilme formado nos dispositivos auriculares, frente a antifúngicos comerciais e novas substâncias bioativas.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 Local de coleta e obtenção das amostras clínicas

As coletas foram realizadas em pacientes atendidos no setor de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas, Recife, Pernambuco.

O estudo obedeceu às diretrizes e normas regulamentares de pesquisa envolvendo seres humanos Resolução nº 466/2012, do Ministério da Saúde, enviado para Plataforma Brasil e, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas – CAAE 44747515.5.0000.5208 (ANEXO1), os pacientes assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido, antes de se submeter à coleta, que só foram realizadas após a liberação do referido comitê.

As coletas foram realizadas em pacientes que apresentaram suspeita clínica de otomicose. O procedimento para a obtenção das amostras foi realizado por um profissional, com o acompanhamento dos colaboradores do projeto. A coleta foi realizada com *swab* esterilizado e o material transportado em tubo de ensaio contendo 2 mL de água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L de cloranfenicol (PONTES et al., 2009).

Após a obtenção das amostras clínicas, as mesmas foram transportadas para o Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para a realização do diagnóstico micológico laboratorial.

1.3.2 Manipulação das amostras clínicas

As amostras clínicas foram manipuladas para realização do exame direto, a fresco (sem clarificante e corante), e foram semeadas em duplicata na superfície do meio cultura ágar Sabouraud dextrose ágar suplementado com 50 mg/L de cloranfenicol, contidos em placas de Petri, mantidas à temperatura de 28° C e 37° C por até 15 dias para o crescimento e obtenção do agente etiológico, o qual foi purificado para posterior identificação através das características macroscópicas, microscópicas e moleculares (BARNETT et al., 2000; RAPPER; FENNEL, 1977; De HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002).

1.3.3 Purificação e identificação dos fungos

Para purificação das amostras de fungos, os fragmentos das colônias foram semeados, em estria, em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose suplementado com 50 mg/L de cloranfenicol (LACAZ et al., 2002). Após confirmação

da pureza, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meios específicos, de acordo com o grupo do fungo a ser identificado.

1.3.4 Classificação taxonômica clássica

A caracterização convencional dos agentes etiológicos foi realizada através da observação dos aspectos morfológicos, macroscópicos e microscópicos e, quando necessário, fisiológicos e bioquímicos (BARNETT et al., 2000; HOOG et al., 2000; KLICH, 2002; LACAZ et al., 2002).

Foram analisadas diferentes características morfológicas como diâmetro, bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento (RAPPER; FENNEL, 1977; BARNETT et al., 2000; HOOG et al., 2000; RAPER; THOM; FENNEL, 1949).

A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada pela técnica de DALMAU (1929), através de microcultivos (cultivo sob lamínula), nas quais fragmentos das colônias foram semeados em dois pontos equidistantes da placa contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estes, colocadas lamínulas previamente esterilizadas. A preparação permaneceu a temperatura de 25°C por aproximadamente sete dias conforme espécie em estudo. Em seguida, a lamínula do cultivo foi retirada, invertida e colocada sobre uma lâmina de vidro, contendo uma 40 µL de Azul de Amann (CARRANZA, 1949), para posterior observação microscópica.

1.3.5 Classificação taxonômica molecular

A biomassa dos fungos foi obtida a partir de células cultivadas em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose contido em tubos de ensaio, mantidos a 28°C por até seis dias. Todo micélio foi retirado do tubo de ensaio com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5g de contas de vidro (*glass beads*) com dois diâmetros diferentes na proporção de 1:1 (acid-washed, 150-212µm and 425-600µm; Sigma, U.S. sieve). O material foi triturado por agitação em alta velocidade em um FastPrep®.

A extração do DNA genômico foi realizada com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al., (2005), que inclui uma lavagem com clorofórmio:

álcool isoamílico (24:1) e posterior homogeneização do material em tampão CTAB 2%, além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

Para amplificação da região ITS foram utilizados os iniciadores (*primers*) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990), calmodulina, cmd5 (5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3') e cmd6 (5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3') (HONG *et al.*, 2005), β tubulina, bT2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e bT2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995) e LSU rDNA (D1/D2), NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram os mesmos descritos por Kaliyaperumal & Kalaichelvan (2008). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações. Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR (5µL) foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed, e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Os produtos de amplificação foram purificados com o “ExoProStar™ 1-Step, Enzymatic PCR and Sequencing Clean-Up (illustra™)” seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de DNA no Departamento de Genética (Centro de Ciências da Saúde/ UFPE).

1.3.6 ISSR-PCR para a tipagem dos espécimes re-isolados

As reações de PCR para amplificação das regiões de sequência repetida (ISSR) foi realizada utilizando o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'). A preparação da mistura de cada reação de PCR consistiu em volume final de 25µL as seguintes condições: tampão 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25 mM, primer 0,25 mM, 0,2U Taq DNA polimerase e 25ng de DNA. Para a implementação da reação de PCR foi realizada uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos seguido de 35 ciclos, cada uma composta de 95°C por 30 segundos, um passo anelamento a 39°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com uma extensão final

a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram corados com solução de vermelho-Gel (0,5µg/mL) e separado por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão de corrida TAE 1X (pH 8,0), migrando por 50 minutos a 3V/cm distância entre os eletrodos, visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografado. Foram usados marcadores moleculares de 1kb plus (Fermentas®).

1.3.7 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

1.3.7.1 Método de coloração cristal violeta

- Leveduras

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método de Melo et al. (2011). As leveduras foram semeadas em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose por 24h a 35°C. Após o crescimento, o inóculo foi padronizado em 3 mL de salina, com a turbidez na escala 4 de Mac Farland (10^6 células). 20µL da suspensão foi aliqotado para cada poço da placa de poliestireno de 96 poços, em triplicata, contendo 180µL de caldo Sabouraud suplementado com 8% de glicose. Após 24h de incubação, o excesso de meio de cultura foi removido com pipeta Pasteur. O biofilme foi lavado duas vezes com 200µL de tampão fosfato salina (PBS) para remover as células planctônicas. Após a remoção, as placas foram secas por 20 min a 35°C. Depois, 110µL de cristal violeta a 0,4% foi adicionado aos poços por 45 min. As placas foram lavadas três vezes com 200µL de água ultrapura esterilizada.

Para descoloração foi utilizado 200µL de etanol (95%) por 45 min. Depois, 100µL da solução foi transferida para uma nova placa e o biofilme lido por absorbância em leitor de microplaca no comprimento de onda de 570nm. O controle negativo foi representado pela leitura do biofilme sem o uso do cristal violeta.

- Fungos filamentosos

Os isolados de fungos filamentosos foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SAB) a 37°C por 72 h. Os conídios foram coletados por lavagem da superfície das culturas utilizando 5mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 e

contendo *Tween* 20 na concentração de 0,025% (v/v). Subsequentemente foram submetidos a contagem em câmara de Neubauer e o inóculo ajustado para a concentração de 1×10^5 células em RPMI 1640 (Sigma) tamponado para pH 7,0 com MOPS 0,165M (MOWAT et al., 2007).

Biofilmes foram produzidos em placas de microtitulação de fundo chato (96 poços), pela adição de 200 μ L da suspensão celular padronizada em tampão MOPS-RPMI 1640 em cada orifício a cada período de tempo determinado (24, 48 e 72h), incubado a 37°C. Em cada intervalo de tempo, o meio de cultura foi removido dos poços e lavados três vezes com PBS pH 7,2 para total remoção de células não aderentes (MOWAT et al., 2007).

O biofilme foi quantificado usando um versão modificada por O'toole e Kolter (1998) e posteriormente por Mowat et al. (2007). As placas foram secas e coradas com 100 μ L de solução de cristal violeta 0,5% (p/v) por 5 minutos. A solução foi removida por lavagem cuidadosa sob água corrente para remoção do excesso. Os biofilmes foram descorados, adicionando 100 μ L de etanol 95% a cada poço por um minuto e, posteriormente, o etanol foi transferido para uma outra placa de microtitulação (96 poços) e a absorbância foi aferida com comprimento de onda 570nm (A570). Os valores obtidos foram proporcionais à quantidade de biomassa de biofilme, o qual compreende hifas e material polimérico extracelular (quanto maior a quantidade de material biológico, maior o nível de coloração e absorvância). O experimento foi realizado em triplicata.

1.3.7.2 Método de coloração MTT

- Leveduras e fungos filamentosos

Leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose por 24h a 37°C, em seguida foram suspensas em meio RPMI Medium 1640 tamponado com HEPES (Gibco®) e ajustada para concentração de 10^6 células/mL, e os fungos filamentosos foram semeados em ágar Batata dextrose (BDA) por cinco dias a 37°C, e suas suspensões em meio RPMI Medium 1640 tamponado com HEPES (Gibco®) foram ajustadas para concentração de 10^5 células/mL.

Posteriormente, 100 μ L foram adicionadas em poços das placas de poliestireno contendo 96 poços, sendo mantidas a 37°C por 24, 48 e 72 horas. Após cada tempo,

os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS) para remover as células planctônicas. O isolado de *Candida albicans* ATCC20098 foi utilizado como controle.

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de 1- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -3,5- diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical, St. Louis, MO), no qual 20 μ L, na proporção de 5 μ L para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22 μ m) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação. As placas foram incubadas na ausência de luz à temperatura de 37°C, por 18 horas. Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 200 μ L de isopropanol (FREMOSIER et al., 1999; BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM et al., 2006). As placas foram mantidas em repouso por 15 minutos e em seguida foram transferidos 100 μ L do conteúdo de cada poço para nova placa de microtitulação, afim de proceder à leitura em leitor de microplacas com 570 nm de comprimento de onda (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

1.3.7.3 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada isolado. A análise estatística foi calculada usando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os resultados dos ensaios colorimétricos, Cristal Violeta e MTT, foram avaliados estatisticamente por análise de variância com ANOVA e teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

1.3.8 Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro* de células planctônicas

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 (CLSI, 2008), M27-S4 (2012) e M38-A2 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol/L; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μ m (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

- Agentes antifúngicos

Os agentes antifúngicos padrões utilizados foram Anfotericina B (Sigma-Aldrich®) (ANFB), Cetoconazol (Sigma-Aldrich®) (CTZ), Itraconazol (Brainfarma®) (ITZ), Fluconazol (Sigma-Aldrich®) (FLZ), Ciclopirox olamina (Fluka®) (CPO), Octopirox olamina (Fluka®) (OPO). Concentrações diferentes de ambos antifúngicos foram preparados e usados nos intervalos de 0,03 a 16 µg/mL para os quatro primeiros fármacos, diluídos em DMSO; 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol, diluído em água, e 0,06 a 32 µg/mL para os dois últimos, também diluídos em DMSO. Também foram utilizados derivados de tiossemicarbazonas L3, L8 e L9, diluídas em DMSO obtidas do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, Departamento de Antibióticos (UFPE) e o limoneno (Sigma-Aldrich®), todos os compostos utilizados na concentração de 2 a 1024 µg/mL.

Breakpoints para fungos filamentosos não dermatófitos ainda não são bem estabelecidos. A inibição de 100% do fungo frente a anfotericina B é observada concentração inibitória mínima (CIM) da droga de 0,5 a 2 µg/mL. Fluconazol e cetoconazol variam com inibição de 50 a 80%, contudo tais fungos geralmente não são susceptíveis ao fluconazol apresentando CIM >64 µg/mL, e sensíveis ao cetoconazol nas concentrações de 0,03 a 16 µg/mL. Assim como com cetoconazol, o itraconazol também possui determinada a CIM de 0,03 a 16 µg/mL, no entanto, sua inibição é de 100%. Já para o ciclopirox olamina não há determinação de concentração inibitória para fungos filamentosos não dermatofíticos (CLSI, 2008). Octopirox olamina não possui referência no M38-A2 do CLSI (2008).

Em relação as leveduras, de acordo com M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012), frente a *Candida parapsilosis*, a anfotericina B, com 100% de inibição, possui a CIM de 0,25 a 1 µg/mL. Frente ao fluconazol é sensível quando apresenta CIM ≤2 µg/mL, dose-dependente, CIM=4 µg/mL, e resistentes, CIM>8 µg/mL. A CIM do cetoconazol frente a esta levedura pode variar de 0,03 a 16 µg/mL, e ao itraconazol, é sensível quando CIM≤0,125, dose-dependente, CIM entre 0,25 a 0,5 µg/mL e resistente, CIM≥1 µg/mL. A inibição dos três azólicos podem variar de 50 a 100%.

- Preparação do inóculo

As leveduras foram mantidas em meio ágar Sabouraud dextrose (SDA) e incubadas por 24h a 35°C. As células dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de Mac Farland em

90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2 a 5×10^3 céls/ mL.

Isolados de fungos filamentosos, foram repicados em meio de cultura ágar Batata dextrose (BDA) em tubos e incubados por até sete dias a 35°C. Sequencialmente, 3mL de solução salina a 0,85% esterilizada foi adicionado às colônias fúngicas, e a suspensão foi homogeneizada com uma pipeta. Posteriormente, a mistura resultante foi transferida para tubos de ensaio esterilizados, adicionando de *Tween* 20 (10µL de Tween/ 5mL de salina) para facilitar a dispersão dos esporos. Após cinco minutos de repouso, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio esterilizado e agitado por 15 segundos em vórtex. A densidade da suspensão foi ajustada por espectrofotômetro a 530nm para obter uma densidade óptica de 0,09 a 0,13. Em seguida, as suspensões foram diluídas (1:50) em RPMI 1640, obtendo-se uma concentração final aproximada de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL.

- Teste de sensibilidade antifúngica *in vitro*

Para os testes, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), nas quais foram dispostos 100 µL de cada uma das diluições das drogas a serem testadas nas colunas de 1 a 10. Em seguida, 100 µL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 µL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs para anfotericina B foram determinadas para 100%; cetoconazol, voriconazol, itraconazol e fluconazol, de 50 a 100%; e ciclopirox olamina de 80 a 100%, em relação aos poços controles. Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), o conteúdo dos poços que mostrarem 100% de inibição no crescimento foram cultivados para o meio SDA em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante três dias para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico. A CIM foi definida como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir o crescimento. Todo o teste foi realizado em triplicata.

1.3.9 Teste de sensibilidade antifúngica utilizando o método tabuleiro de xadrez – *chequerboard*

Combinações de cetoconazol e limoneno (OL7), ciclopirox olamina e OL7 e octopirox olamina e OL7 foram testados em duplicata utilizando o método anteriormente descrito. O inóculo inicial foi preparado como descrito para a teste de sensibilidade antifúngica. As leituras foram determinadas visualmente após 24 e 48 h. Para avaliar a interações dos antifúngicos, a concentração inibitória fraccionada (FIC) foi calculada para cada combinação.

O Índice de Concentração Inibitória Fracionária foi avaliado através da combinação de cetoconazol e octopirox olamina com o OL7 usando o método de diluição *chequerboard* (PFALLER et al, 1989; LEWIS et al., 2002). O FIC foi calculado para cada agente por dividindo a concentração de inibição de cada antifúngico quando utilizados em combinação pelo seu valor de CIM. Valores FIC foram em seguida, adicionado em conjunto para definir a interação da combinação. O sinergismo foi definido quando: $FIC \leq 0,5$; Aditivo: $1 > FIC > 0,5$; Indiferente: $4 > FIC \geq 1$; Antagônico: $FIC \geq 4$.

1.3.10 Sensibilidade antifúngica *in vitro* de biofilmes

Os testes de susceptibilidade antifúngica dos biofilmes foram realizados segundo Pierce *et al.* (2008) modificado. As concentrações antifúngicas avaliadas foram de 0,06 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para cetoconazol e octopirox olamina. A concentração utilizada do limoneno foi determinada pelo experimento anterior. Aos biofilmes formados (48h) foi adicionado 200 μL de cada concentração de cetoconazol, octopirox olamina e a substância avaliada para posterior incubação por 48h a 37°C. Os testes foram realizados em triplicata, sendo realizados concomitantemente controles de crescimento e esterilidade do meio.

As CIMs dos antifúngicos para os biofilmes foram definidas como as menores concentrações capazes de produzir reduções no crescimento do fungo igual a 50% (CIM50), 80% (CIM80) e 100%(CIM100), no retrocultivo em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose mantidas por 48h a 37°C, em comparação ao controle de crescimento (sem antifúngico).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MORFOLOGIA DA ORELHA

A orelha é um dos principais sistemas sensoriais do organismo. Ela comporta dois sistemas essenciais ao desenvolvimento do indivíduo: o aparelho auditivo, que confere a audição, e o vestibular, relacionado ao equilíbrio (MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005).

Este órgão, da região lateral para medial, se dispõe da seguinte forma: orelha externa, orelha média e orelha interna. A externa e a média constituem o chamado aparelho de transmissão, que capta e conduz o som por meio de vibrações mecânicas. A orelha interna transforma essas vibrações em impulsos elétricos e os encaminha ao sistema nervoso central para interpretação (MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005).

2.1.1 Orelha externa

A orelha externa abrange o pavilhão auricular, conduto auditivo externo e membrana timpânica. O pavilhão é formado por uma lâmina de cartilagem elástica revestida por pele. Um prolongamento medial dessa cartilagem se afunila em direção à porção anterior, que forma o meato acústico externo, onde se localiza o conduto auditivo externo (SNELL, 1999; MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005). O conduto é formado por um esqueleto cartilaginoso, revestido por uma camada de pele pobre em tecido celular subcutâneo e apresenta várias irregularidades anatômicas que têm importância no direcionamento do som para o meato acústico externo o qual exerce a função de guia de ondas, ligando o campo sonoro externo com a membrana timpânica (SNELL, 1999; DI DIO, 2002; COUTO; MOTA; CARVALLO, 2009). O canal auditivo apresenta um estreitamento no seu terço médio, o que dificulta a visão da membrana timpânica durante o exame clínico (otoscopia), devido à inclinação no sentido anterior (SNELL, 1999; DI DIO, 2002; SIH, 2005).

Tal estrutura pode ser dividida em um terço externo (porção lateral), cujo esqueleto é cartilaginoso, e dois terços internos (porção medial), de esqueleto ósseo. A pele é mais espessa no terço externo, sendo provida de glândulas ceruminosas e sudoríparas, além de folículos pilosos (DI DIO, 2002).

Na porção interna, a pele é extremamente fina, com tecido subcutâneo muito escasso, e repousa quase que diretamente sobre o periósteo. A membrana timpânica sela este conduto medialmente, separando-o da orelha média (DI DIO, 2002; MENEZES; CALDAS NETO; MOTTA, 2005).

O conduto auditivo externo é um tubo de paredes lisas, revestido internamente por pele rica em pelos, glândulas sebáceas e ceruminosas, sendo estas últimas, glândulas sudoríparas modificadas. Ao produto de secreção dos dois tipos glandulares do conduto dá-se o nome de cerúmen que é uma substância pastosa de cor marrom. Tanto o cerume quanto os pelos do conduto têm função protetora (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

2.1.2 Orelha média

A orelha média consiste em um espaço, a cavidade timpânica, contendo ar, localizado no osso temporal e é revestida pela túnica mucosa. O osso está localizado na região lateral do crânio e pode ser dividido em cinco partes: escamosa, petrosa, timpânica, estilóidea e mastoidea. Na porção mastoidea, encontram-se inúmeras cavidades aeradas chamadas células mastóideas que se apresentam como uma série de cavidades preenchidas por ar e revestidas com túnica mucosa. Essas cavidades se interconectam e emergem como um divertículo da cavidade timpânica a partir do antro mastóide (DI DIO, 2002; SETHI et al., 2006).

Na cavidade timpânica são encontrados os ossículos da audição cuja função é transmitir as vibrações da membrana do tímpano para a orelha interna. Essa cavidade tem comunicação com o antro mastoideo e com a parte nasal da faringe pela tuba auditiva, que tem a função de equilibrar as pressões do ar na cavidade timpânica e na parte nasal da faringe (SNELL, 1999).

2.1.3 Orelha interna

A orelha interna corresponde ao órgão vestibulo-coclear, situada na parte rígida do osso temporal. Consiste em espaços cheios de líquido e nos labirintos ósseo e membranoso. A orelha interna está envolvida na recepção das vibrações sonoras e na manutenção do equilíbrio (MOORE; AGUR, 1998; SNELL, 1999).

O labirinto ósseo é constituído por três partes: o vestíbulo, os canais semicirculares e a cóclea. Estas estruturas estão situadas na substância densa do osso e contêm um líquido claro, a perilinfa, na qual fica suspenso o labirinto membranoso (DI DIO, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

O labirinto membranoso é a parte essencial dos órgãos da orelha e do equilíbrio, estando instalado dentro do labirinto ósseo envolvido pela perilinfa. É uma vesícula fechada, contendo um conjunto de cavidades intercomunicantes e um líquido claro, a endolinfa. A parede do labirinto é revestida por epitélio e em determinadas áreas apresenta células sensitivas e expansões terminais do nervo vestíbulo-coclear. Esse labirinto está localizado no interior de escavações no osso temporal (DI DIO, 2002).

De um modo geral, a orelha, desde o pavilhão auricular a orelha interna, possui estruturas que as tornam susceptíveis a ação de micro-organismos causando infecções sendo denominadas de otomicose aquelas causadas por fungos que acometem principalmente o conduto auditivo externo (HAWKE et al., 1997; ROBERT SANDER et al., 2001).

2.2 OTOMICOSE

A otomicose ou otite externa fúngica tem sido tipicamente descrita como uma infecção micótica superficial que acomete o conduto auditivo externo (CAE), que pode atingir a orelha média, caso a membrana timpânica apresente-se perfurada e, em casos mais graves, a orelha interna (MUNGUIA; DANIEL, 2008; ABOULMAKARIM et al., 2010; PRASAD et al., 2014).

Essa micose tem distribuição mundial, mas é relatada com prevalência em áreas de clima tropical e subtropical com maior incidência no verão (quente e úmido) e baixa no inverno (SIH, 2005; GHARAGHANI; SEIFI; ZAREI MAHMOUDABADI, 2015). A otite fúngica pode ocorrer de forma isolada (primária), o que é pouco frequente, ou sobreposta à infecção bacteriana (secundária), fato que corresponde à grande maioria das ocorrências (SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003; SIH, 2005; ZAREI MAHMOUDABADI, 2006; GARCIA-AGUDO et al., 2011; NOWROZI et al., 2014). REPETIDO

Essa doença é causada principalmente por fungos oportunistas, como espécies de *Aspergillus* e *Candida*. Apesar de inespecíficos, os principais sintomas são prurido, otalgia, otorreia, perda de audição, sensação de plenitude auricular (orelha cheia) e zumbido (KUMAR KARN et al., 2014).

Embora raramente fatal, a otite externa fúngica é um desafio para os médicos otorrinolaringologistas, além de ser frustrante para os pacientes, uma vez que, requer tratamento a longo prazo podendo haver recorrência (PRASAD et al., 2014).

2.3 OCORRÊNCIA E ETIOLOGIA DA OTOMICOSE

A otite externa fúngica tem distribuição mundial e, estima-se que aproximadamente 10 a 25% do total dos casos de otite externa sejam devido aos fungos (KAZEMI; GHIAEI, 2005; ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2010). Nos Estados Unidos, essa infecção é responsável por 10% dos casos de otite externa sendo mais prevalente em países de clima quente e úmido (MARÍN et al., 2000; SIH, 2005; MAHMOUDABADI, 2006; ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2010). Os mais frequentes fungos causadores de otomicose são *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. Contudo, nas regiões tropicais e subtropicais, a otomicose é causada principalmente por espécies de *Aspergillus* (MUNGUIA; DANIEL, 2008) (Tabela1).

Tabela 1 - Ocorrência dos agentes etiológicos da otomicose nos principais trabalhos no mundo, publicados entre 2000 e 2018.

Autores	País	Número de casos	Agentes Etiológicos
Marín et al. (2000)	Espanha	256	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. candidus</i> <i>A. tamaritii</i>
Kurnatowski; Kilipiak (2001)	Polônia	30	<i>Candida</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.
Ozcan et al. (2003b)	Turquia	57	<i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. terreus</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. kefyr</i>
Vennewald, Schonlebe e Klemm (2003)	Alemanha	128	<i>A. niger</i> <i>A.fumigatus</i> <i>A.flavus</i> <i>A. alliaceus,</i> <i>A. candidus,</i> <i>A. hollandicus,</i>

			<i>A. janus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Mucor</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Rhodotorula rubra</i> .
Yavo et al. (2004)	Costa do Marfim	-	<i>A. flavus</i> <i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>A. niger</i>
Kaieda (2008)	Japão	-	<i>A. terreus</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i>
Araiza, Canseco e Bonifaz (2006)	México	97	<i>A. flavus</i> <i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>
Pontes et al. (2009)	Brasil	103	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Trichosporon asahii</i> <i>S. apiospermum</i>
Yenisehirli et al. (2009)	Turquia	92	<i>A. fumigatus</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> <i>C. albicans</i>
Aneja, Sharma e Joshi (2010)	Índia	118	<i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> , <i>A. luchuensis</i> <i>C. albicans</i>
García-Agudo et al. (2011)	Espanha	390	<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. candidus</i> <i>A. terreus</i> <i>Paecilomyces variotii</i>
Barati et al. (2011)	Irã	171	<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. nidulans</i> <i>Candida</i> sp.
Sarvan et al. (2012)	Índia	100	<i>A. niger</i> <i>A. flavus</i>

			<i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i>
Jia et al. (2012)	China	108	<i>A. niger</i> <i>C. albicans</i>
Adoubryn et al. (2013)	Costa do Marfim (àfrica)	110	<i>A. flavus</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. parapsilosis</i>
Kumar Karn et al. (2014)	Índia	246	<i>A. niger</i>
Nowrozi et al. (2014),	Índia	200	<i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>C. albicans</i> <i>Penicillium sp.</i>
Prasad et al. (2014)	Índia	100	<i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>C. albicans</i> <i>Rhizopus sp.</i>
Senthil Kumaran; Kavitha (2017)	Índia	50	<i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> <i>Candida sp</i> <i>Mucor sp</i> <i>Cephalosporium sp.</i>

A maioria destes fungos são saprofitos e podem se desenvolver sob condições ambientais especiais no conduto auditivo externo. No entanto, são encontrados mais frequentemente quando o canal está acometido por bactérias, corpos estranhos, tumores necrotizantes, ou quando há secreção proveniente da orelha média. Esses agentes adquirem características patogênicas também, após o uso prolongado de medicação imunossupressora ou após o uso tópico de corticosteroides e antibióticos, tomando um caráter oportunista (BENTO; MINITI; MARONE, 1998). Vandeputte, Ferrari e Coste (2012), afirmaram que agentes patogênicos oportunistas, entre eles micro-organismos comensais do corpo humano, são capazes de desenvolver colonização seguida por infecção quando há imunossupressão.

Além desse grupo de fungos, também observamos a presença de forma rara causando infecção no CAE patógenos dos gêneros *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cephalosporium sp.* (KUMARAN; KAVITHA, 2017), e das espécies, *Paecilomyces variotii*, *Scedosporium apiospermum*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon asahii*, além de dermatófitos (BUZINA; LANG-LOIDOLT; GINTER-HANSELMAYER, 2004).

De acordo com a tabela, pode-se observar que a otomicose é uma doença de ocorrência mundial, prevalente principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, de clima quente e úmido. Apesar da maioria dos trabalhos revelarem que os agentes etiológicos mais frequentes são do gênero *Aspergillus*, as espécies podem variar de acordo com a região.

2.4 FATORES QUE PREDISPÕEM A OTOMICOSE

Como já visto anteriormente, a otomicose é uma infecção no conduto auditivo externo, e que, em muitos casos, apresenta uma origem secundária. Fatores endógenos como anemia, hipovitaminoses, portadores de distúrbios endócrinos, principalmente *Diabetes mellitus*, linfoma, transplantados recebendo quimioterapia, radioterapia, pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e várias formas de dermatite, como seborreia, psoríase e eczema podem diminuir a resistência às infecções no conduto auditivo externo, aumentando o risco de desenvolver otite externa com complicações potenciais de otomicose (OLINA et al., 2002; OZCAN et al., 2003a; ZAREI MAHMOUDABADI, 2006; STERN; LUCENTE, 2008).

A falha dos mecanismos defensivos, alterações do epitélio de revestimento, mudanças de pH, modificações qualitativas e quantitativas do cerume, presença de infecção bacteriana, o uso de aparelhos de amplificação sonora individual ou prótese auditiva, trauma, natação, antibioticoterapia de amplo espectro, uso de corticóides e citostáticos, neoplasias, alterações imunitárias ou enfermidades debilitantes podem tornar o hospedeiro susceptível ao desenvolvimento desta micose (JACKMAN et al., 2005; SIH, 2005). Sih (2005) ainda cita como fatores calor, ambiente úmido e obstruções anatômicas do conduto auditivo externo.

A própria estrutura morfológica original do conduto auditivo externo, segundo Robert Sander et al. (2001), também contribui para o desenvolvimento de otite externa. O CAE é escuro, quente e propenso a tornar-se úmido, sendo assim um excelente ambiente para o crescimento de bactérias e fungos. A pele é muito fina e a cartilagem recobre um terço do canal, enquanto o resto tem uma base de osso. O canal é facilmente traumatizado e a eliminação de detritos, secreções e corpos estranhos é dificultada por uma curva no entroncamento da cartilagem e osso. Além disso, na orelha externa, a pele do conduto tem uma atividade migratória

característica, e não descamativa, que mantém a superfície constantemente renovada, tornando desnecessária a utilização de instrumentos para limpeza, pois impede a migração de pele e o cerume tende a acumular-se provocando otites externas (SAFFER; BELLIZIA NETO, 2006).

Contudo, a orelha é um local de infecção por espécies de *Aspergillus* também em indivíduos saudáveis. Quando o epitélio do canal auditivo externo é danificado, pode contribuir para ocorrer otite externa. Lesões descamativas do conduto auditivo facilitam a colonização secundária do fungo, pois rompem a integridade da pele e a manutenção das secreções protetoras e assim, representam portas de entrada para infecções (SAFFER, BELLIZIA NETO, 2006). Lesões, tanto na orelha externa quanto na média, bem como em cavidades pós-operatórias, podem criar condições favoráveis para o crescimento de fungos e posterior otomicose causada por *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* (KAUR et al., 2000; KURNATOWSKI; KILIPIAK, 2001; NWABUISI; OLOGE, 2001; VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003).

As otomicoses são muito frequentes nos casos de otorreia crônica e em orelhas submetidas a mastoidectomias amplas, com grandes cavidades (SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003). Ho et al. (2006) afirmam que a presença de uma cavidade mastóidea está associada com maiores taxas de recorrência residual da doença, além do fator umidade.

Esportes aquáticos são particularmente associadas, pois a exposição repetida à água resulta na remoção de cerume e secagem do canal auditivo externo (HO et al., 2006). Além disso, mergulhadores, surfistas e outros que têm experiência de compressão vigorosa da membrana timpânica são particularmente susceptíveis à perfuração timpânica e ocorrência de otomicose (NICHOLS, 1999). Estudo realizado na Costa do Marfim por Yavo et al. (2004), mostrou que nadar frequentemente em piscinas naturais ou artificiais, fazer limpeza diária da orelha e o uso excessivo de gotas otológicas contendo antibióticos e corticoides, são fatores de risco para otomicose. Portanto, pacientes com otite média crônica com drenagem ativa, devem evitar nadar. Os nadadores apresentam frequentemente otite bacteriana aguda externa e otomicose. Calor, umidade e água podem causar inchaço do estrato córneo da pele. A umidade do banho aumenta a maceração da pele do canal auditivo que leva à destruição da barreira protetora de cerume e cria condições adequadas para bactérias e fungos. Além disso, essas mudanças também podem causar coceira no

canal auditivo externo, assim acrescentando a possibilidade de arranhões e posterior infecção (WANG et al., 2005).

Outros fatores que facilitam a instalação desta micose, segundo Kumar (2005), além das condições de higiene são questões culturais. Estudo realizado na Índia, concluiu que ambiente úmido, falta de higiene, uso de turbante e véu, e condições climáticas são os principais fatores predisponentes para o desenvolvimento de otomicose.

A ausência de cerume no canal auditivo é outra causa para otite externa. O Cerume tem um pH de 4 a 5 e assim elimina tanto o crescimento de bactérias quanto de fungos e, deste modo provê uma barreira protetora química e mecânica contra infecções (WANG et al., 2005; HO et al., 2006). Além disso, o cerume é rico em lipídios (substância hidrofóbica) que impedem a penetração de água, evitando assim a maceração da pele (ROBERT SANDER, 2001).

Além destes fatores como umidade e cerume, de acordo com AHMAD et al. (2007), o uso de aparelhos auditivos também contribui ao aumento de otomicose. A utilização de aparelho auditivo tem sido apontada como um fator predisponente para o desenvolvimento de otite externa crônica (BANKAITIS, 2005; AHMAD et al., 2007). Estes dispositivos foram identificados como uma potencial fonte de transmissão de micro-organismos. Em longo prazo, o uso de prótese auditiva é um fator para a colonização de fungos, sendo que esta colonização pode resultar em níveis suficientemente altos para dar lugar a otomicose (STURGULEWSKI et al., 2006).

A infecção fúngica da orelha pode ocorrer em pacientes com otite média crônica com persistente perfuração da membrana timpânica e otorreia com ou sem colesteatoma (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003). Os colesteatomas são caracterizados pela proliferação anormal de células do epitélio escamoso, resultando em acúmulo de queratina, destruição do arcabouço ósseo adjacente, podendo invadir e comprometer estruturas nobres, como a orelha interna, nervo facial e sistema nervoso central (TESTA et al., 2003). A maioria desses pacientes não são neutropênicos ou imunocomprometidos mas têm otite média crônica por muitos anos. Estes pacientes têm, a longo prazo, reincidência de otorrêia, e sido tratados repetidamente com antibióticos, sem remissão de sintomas. Apresentam também colonização fúngica crônica do canal auditivo (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003). Os pacientes imunossuprimidos podem desenvolver infecção aguda invasiva fatal ou forma crônica invasiva (BELLINI et al., 2003).

Por fim, Araiza et al. (2006) e Pontes et al. (2009) afirmaram que antibioticoterapia de uso tópico, é um dos principais fatores predisponentes desta micose. Munguia e Daniel (2008), asseguram que houve um aumento na prevalência de otomicose, nos últimos anos, associada ao uso tópico extensivo de antibiótico. Ozcan et al. (2003a) alegaram que a infecção secundária bacteriana foi um dos mais comuns fatores predisponentes em pacientes com acompanhamento prévio de 1 a 4 meses de duração de antibioticoterapia.

2.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA OTOMICOSE

O diagnóstico de otomicose isolada não oferece maiores dificuldades, desde que se faça uma otoscopia cuidadosa, pois, muitas vezes, há filamentos ou secreção cobrindo as paredes do meato, com coloração variável de acordo com o agente fúngico. Contudo, na otite fúngica associada à infecção bacteriana, a otoscopia, mesmo que cuidadosa, pode não evidenciar estruturas fúngicas sugestivas, sendo necessário exame micológico para que seja confirmada a suspeita diagnóstica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003).

A otomicose não pode ser diagnosticada baseando-se apenas na sintomatologia, mas também, na história clínica do paciente, na otoscopia, no exame direto e cultura micológica, que são recomendáveis para o diagnóstico preciso desta micose (AFSHARI et al., 2005; VENNEWALD; KLEMM, 2010; GHARAGHANI; SEIFI; ZAREI MAHMOUDABADI, 2015).

Desta forma, no diagnóstico de otite fúngica é essencial que na suspeita clínica ocorra a solicitação de exame direto e de cultura para identificar os agentes fúngicos responsáveis (ABOULMAKARIM et al., 2010).

2.5.1 Manifestações clínicas e sintomatologia

A otite externa fúngica pode apresentar-se de forma aguda, subaguda ou crônica, e é caracterizada principalmente por inflamação exsudativa e prurido no CAE (BARATI et al., 2011).

Os agentes fúngicos crescem rapidamente no estrato córneo da pele, o que aumenta o quadro inflamatório do CAE (GARCIA-AGUDO et al., 2011). Em alguns

casos, os fungos acometem regiões mais profundas e se disseminam para áreas periauriculares e pescoço (BENTO; MINITI; MARONE, 1998).

Esta infecção, geralmente é sintomática, mas de maneira inespecífica, apresentando como principais sintomas prurido, otalgia, sensação de plenitude auricular (“orelha cheia”), perda auditiva, otorreia e zumbido, além da diminuição da audição (hipoacusia) quando fragmentos de fúngicos e restos epiteliais obstruem o canal auditivo, ocorre descamação do epitélio do conduto auditivo, inflamação, sensação de queimação, vertigem, hiperemia do canal auditivo; espessamento e eritema do canal (alergia ou dermatite de contato), bem como tecido de granulação no canal, causado por infecção crônica (SIDRIM; ROCHA, 2004; JACKMAN *et al.*, 2005; SIH, 2005; MAHMOUDABADI; MASOOMI; MOHAMMADI, 2010; GHARAGHANI; SEIFI; ZAREI MAHMOUDABADI, 2015).

A otomicose pode ocorrer de forma isolada, como única infecção (primária), ou superposta (secundária) à doença bacteriana da orelha externa. Segundo Sih (2005), nos dois casos a sintomatologia é diferente, uma vez que na primária a coceira é intensa, e na secundária, além do prurido, há dor. Desta forma, clinicamente, a otite fúngica, primária ou isolada, apresenta sintomatologia pobre, lenta e indolor no início, porém com prurido muitas vezes intenso. Já os sintomas no quadro de otomicose secundária ou associada à infecção bacteriana, de maneira geral, é mais exuberante, com prurido, otalgia intensa, secreção abundante e grande desconforto, com edema e hiperemia da pele do meato, em decorrência do processo inflamatório (SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003).

Em pacientes gravemente imunossuprimidos e com profunda neutropenia, pode ser observada, além dos sintomas citados, erosão extensa do conduto, com invasão fúngica e ocorrência de otite externa necrosante. A persistência de supuração com a maceração do epitélio do conduto pode fazer com que a colonização de fungos na orelha externa de pacientes acarrete em uma otite média (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A inflamação crônica da mucosa na orelha média resulta em uma contínua drenagem de flúidos da cavidade da orelha média para o canal auditivo externo, ocorrendo a perfuração da membrana timpânica e recidiva de otorreia. A persistência da perfuração do tímpano é uma porta de entrada para a orelha. Nesses casos, as recidivas fúngicas são bastante frequentes (LACAZ *et al.*, 2002).

Segundo Aneja, Sharma e Joshi (2010), os sintomas podem apresentar-se de forma isolada ou em conjunto. Estes pesquisadores observaram que, dentre os 118 casos de otite fúngica, em Haryana, na Índia, a queixa mais frequente pelos pacientes com otite fúngica foi prurido (72%), seguido por otalgia (62%), perda da audição (57%), sensação de plenitude auricular (54%), otorreia (31%) e zumbido (27%). Aboulmakarim et al. (2010), no Marrocos, de 232 pacientes com infecção na orelha, recrutou 70 pacientes com suspeita clínica de otite fúngica, no entanto, apenas 29 destes foram confirmados pelo exame direto. Os sintomas mais comuns nestes pacientes foram otorreia (70%), seguido por prurido (62%) e otalgia (62%). Já Zarei Mahmoudabadi et al. (2010), no Irã, investigaram o acometimento fúngico no conduto auditivo externo em 57 pacientes. Eles observaram que todos os pacientes apresentavam um ou mais sintomas dentre prurido, otalgia e perda auditiva.

2.5.2 Coleta e manipulação das amostras clínicas

Antes da obtenção da amostra biológica, é necessário coletar dados de cada paciente que devem ser registrados, como nome, idade, sexo, endereço, ocupação, sintomas, histórico, fatores predisponentes (JADHAV; PAL; MISHRA, 2003), além de tratamentos anteriores (ABOULMAKARIM et al., 2010).

A coleta do material clínico é a primeira etapa do diagnóstico laboratorial e deve ser realizada corretamente, podendo o profissional inutilizar todo o procedimento laboratorial, uma vez que amostras colhidas inadequadamente podem acarretar em resultados falsos (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Considerando que o ouvido externo contém microbiota comensal cutânea, e o interno e médio são estéreis, antes da coleta deve ser realizada uma limpeza do conduto auditivo com *swab* esterilizado umedecido com álcool a 70% (PONTES et al., 2009), evitando a contaminação do material biológico.

Para a visualização do conduto auditivo externo é necessária a utilização de um otoscópio com espéculo, esterilizado, que permite a visualização ao longo do conduto até a membrana timpânica no exame clínico para a coleta da amostra clínica, que é realizada por profissional especializado não implicando riscos aos pacientes (NOGUEIRA et al., 2008; PONTES et al., 2009).

A coleta deve ser realizada usando *swab*, sendo a secreção transferida para água destilada esterilizada adicionada de 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol contido em tubo

de ensaio. As escamas de pele devem ser coletadas com o auxílio de bisturis. As amostras clínicas são processadas por meio de microscopia direta e cultura. Após a obtenção das amostras clínicas, as mesmas deverão ser analisadas, para o exame direto e cultivo, até duas horas após a coleta (PONTES et al., 2009).

As amostras do canal auditivo (detritos e secreções) podem ser utilizados para o exame direto e cultura micológica. A partir do material biológico de pele e da membrana timpânica pode-se realizar biópsia, e amostras da cavidade ouvido médio pode ser utilizada para o exame histopatológico (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

- Exame direto

O exame laboratorial direto da amostra clínica pode ser realizado a fresco, sem clarificante nem corante, em caso de secreção, ou clarificado com solução aquosa de hidróxido de potássio a 20%, se o material coletado for cerume ou fragmentos de pele (TRABULSI et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; PONTES et al., 2009). Sarvan et al., (2012) afirmam que é possível clarificar o material biológico com hidróxido de potássio a 10%.

Sempre que estruturas fúngicas são detectadas em amostras clínicas do conduto auditivo externo, surge a questão se estas representam colonização ou infecção clinicamente relevante, sendo estas acompanhadas por inflamação (VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003).

Ao exame direto da otite externa fúngica podem ser observadas a presença de numerosos filamentos micelianos septados, hialinos, dicotômicas, podendo ser visíveis em infecções por espécies de *Aspergillus*, ou várias células de leveduras, ovais, hialinas isoladas, agrupadas ou com formação de pseudomicélio (JACKMAN et al., 2005; ENOZ; SEVINC; LAPEÑA, 2009).

- Obtenção de cultura, isolamento e identificação dos agentes etiológicos

Após a coleta, o material clínico obtido, concomitante ao exame direto, é semeado em duplicata, quando for secreção, ou inoculado em pontos, quando se tratar de fragmentos, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud dextrose, suplementado de 50 mg.L⁻¹ de cloranfenicol, incubadas a 25°C e a 37°C com observação semanal durante 30 dias (PONTES et al., 2009).

Desta forma, a obtenção da cultura é importante para o diagnóstico micológico da otite externa pois, além de confirmar a presença de estruturas do micro-organismo já observadas ao exame direto, torna possível a identificação do agente causador da otomicose (LACAZ et al., 2002; NEMATI et al., 2013).

Assim, a observação das características morfológicas como macroscopia e microscopia são fundamentais na identificação do micro-organismo. Diâmetro, bordos, textura, coloração do verso e reverso das colônias, a produção de pigmentos podem ser as características determinantes na identificação da espécie, bem como os aspectos microscópicos (micélio, células de leveduras e estruturas reprodutivas).

2.6 TRATAMENTO DA OTOMICOSE

A primeira etapa do tratamento do paciente com otite externa fúngica consiste no desbridamento intenso do conduto auditivo externo, para a remoção do fungo e detritos acumulados. Não havendo perfuração timpânica, a limpeza pode ser feita por meio de lavagem com água morna, seguida de secagem completa do CAE e aplicação de antifúngicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 2003; VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003; MUNGUIA; DANIEL, 2008).

O tratamento adequado para infecção fúngica deve incluir a formulação da droga, via de administração, dose, tempo de tratamento de acordo com o local e a severidade da doença. O tratamento deve ser dirigido especificamente contra o agente da doença com a finalidade de evitar o desenvolvimento de resistência do patógeno. A cura deve ser confirmada por repetidas culturas com ausência de crescimento fúngico (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

A infecção é raramente fatal e, geralmente, o uso de um antifúngico tópico é suficiente para tratamento (GHARAGHANI; SEIFI; ZAREI MAHMOUDABADI, 2015). Contudo, o tratamento sistêmico deve ser prescrito no caso de otite externa maligna invasiva (aguda ou crônica) com complicações devido a meningite ou mastoidite (VENNEWALD; KLEMM, 2010).

Os principais fármacos de uso tópico que estão disponíveis são Polienos (Anfotericina B), Imidazólicos (cetoconazol e miconazol), Piridonas (Ciclopirox alamina) (KURNATOWSKI; FILIPIAK, 2001; DEL PALACIO et al., 2002; VENNEWALD; SCHONLEBE; KLEMM, 2003; JACKMAN et al., 2005).

2.6.1 Antifúngicos utilizados no tratamento da otomicose

A disponibilidade de informações microbiológicas e epidemiológicas ajuda aos médicos a escolher o agente antifúngico mais apropriado para o tratamento das infecções. Os testes de susceptibilidade a antifúngicos avalia a capacidade de um agente microbiano inibir o crescimento de micro-organismos *in vitro*. Desta forma, os micro-organismos podem ser classificadas em categorias de acordo com a sensibilidade às drogas (MOLINA et al., 2005).

Vários agentes antifúngicos tópicos estão disponíveis no mercado para o tratamento da otite fúngica. No entanto, existe controvérsia entre os autores quanto à seleção de tratamento em otomicose. Alguns autores acreditam que o tratamento de otomicose depende da identificação de espécie e sua sensibilidade aos antifúngicos (BASSIOUNY et al., 1986; ARTHUR, DREW, PERFECT, 2004). Outros autores sugerem que o tratamento depende apenas da eficácia da droga, independentemente do agente causador (ARAIZA; CANSECO; BONIFAZ, 2006; BLYTH; PALASANTHIRAN; O'BRIEN, 2007)

NAVANEETHAN e YAADHAVAKRISHNAN (2015) avaliaram a eficácia de clotrimazol, miconazol e fluconazol no tratamento de otomicose em hospital na Índia. De 214 pacientes, 116 (54,2%) pacientes foram isolados *Aspergillus niger*, *Candida albicans* em 53 (24,7%), *Aspergillus flavus* em 9 (4,2%), *Aspergillus fumigatus* em 6 (2,8%). Eles os separaram em três grupos que correspondiam aos três tratamentos, por duas semanas. Foi relatado que, na primeira semana, clotrimazol teve uma resposta melhor do que miconazol e, na segunda semana, o fluconazol demonstrou-se ruim no tratamento dos pacientes, em comparação com aqueles que utilizaram miconazol e clotrimazol. No entanto, este resultado não mostrou diferença estatística na eficácia das três drogas, ou seja, mostraram-se quase a mesma eficácia terapêutica no tratamento da otomicose. Os pesquisadores concluíram que clotrimazol (solução), miconazol (creme) e fluconazol (solução) tiveram a mesma eficácia terapêutica, além de não serem ototóxicos.

Nemati et al. (2014) afirmaram que a classe dos azóis, incluindo o clotrimazol, fluconazol, cetoconazol, além da nistatina, não possuem qualquer ototoxicidade, são mais eficazes contra os agentes da otomicose. Além disso, eles demonstraram *A. niger*, *A. fumigatus*, *C. albicans* e *Penicillium* sp., foram sensíveis no intervalo de

0,625-32 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, no teste de sensibilidade. Ainda constataram que as três espécies de fungos filamentosos foram resistentes à nistatina.

Zarei Mahmoudabadi et al. (2015) revelaram que todos os fungos isolados de pacientes com otomicose foram altamente sensíveis, *in vitro*, à terbinafina. Da mesma forma, Szigeti et al. (2012) relataram que todos os isolados de *Aspergillus*, obtidos de pacientes com otomicose, foram altamente sensíveis a terbinafina. No entanto, foram pouco susceptíveis a anfotericina B, fluconazol e cetoconazol.

MUNGUIA e DANIEL (2008), SAGIT et al. (2013) e ALNAWAISEH et al. (2011), confirmaram em pesquisas que diversos antifúngicos tópicos, tais como clotrimazol, miconazol, bifonazol, nistatina, e terbinafina, são potencialmente ativos contra agentes de otomicose.

2.6.2 Polienos

A classe dos polienos possuem mais de 200 moléculas apresentam atividade antifúngica, sendo a maioria destas produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces*. No entanto, apenas a anfotericina B, nistatina e a natamicina se sobressaem no uso clínico. Contudo, por causa da alta toxicidade, principalmente devido à afinidade reduzida com o colesterol, apenas a anfotericina B é utilizada sistematicamente (VANDEPUTTE et al., 2012).

Os polienos exercem atividade fungicida, principalmente em fungos que estão na fase estacionária do crescimento, pois se unem por interações hidrofóbicas ao ergosterol, o esterol predominante encontrado na membrana citoplasmática dos fungos. O ergosterol é o principal componente da membrana plasmática dos fungos. A sua estrutura anfífilica permite que eles se liguem aos lipídeos da bicamada e formem poros, os quais promovem a desestabilização da membrana, modificando a permeabilidade e causando a morte celular por perda de nutrientes e íons essenciais (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005.)

A anfotericina B e a nistatina são os dois antifúngicos poliênicos mais amplamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (ZHANG; CAMP; ELEWSKI, 2007). Contudo, além da nistatina apresentar estrutura química e mecanismo de ação sobre o ergosterol das membranas celulares semelhantes a anfotericina B, a nistatina não é absorvida pelo trato intestinal, pele ou mucosas sendo sua ação terapêutica restrita a infecções mucocutâneas produzidas

por diferentes espécies de *Candida*, observadas na boca, esôfago, intestino, vagina ou áreas intertriginosas (MAFFEI, 2016). O aparecimento de cepas resistentes a esse grupo de antifúngicos é menor quando comparado aos azólicos (ZHANG; CAMP; ELEWSKI, 2007).

2.6.3 Azólicos

Os azóis são agentes sintéticos que reduzem a concentração de ergosterol, um esterol essencial na membrana citoplasmática fúngica (MUNGUIA e DANIEL, 2008). O mecanismo de ação das drogas azólicas baseia-se na inibição de um sistema de enzimas, o esterol-14-para-desmetilase, dependente do citocromo P450 microsomal, comprometendo a síntese do ergosterol na membrana plasmática e levando ao acúmulo de 14-a-metilesteróis. Estes, por não possuírem a mesma forma e propriedades que o ergosterol, levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não executa as funções básicas necessárias para o desenvolvimento do fungo (GOODMAN; GILMAN, 1996; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Os azóis podem causar menos reações adversas aos pacientes quando comparados a anfotericina B, porém são menos eficientes, uma vez que, possuem menor espectro de atividade antifúngica. Eles podem ter ação fungistática ou fungicida. Contudo, o uso excessivo de azóis levou ao surgimento de resistência nas espécies antes susceptíveis (GOODMAN; GILMAN, 1996; WILLIAMS; LEMKE, 2002; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). No entanto, Munguia e Daniel (2008), afirmaram que a classe dos azóis, tais como clotrimazol, fluconazol, cetoconazol e Miconazol, são antimicóticos mais eficazes no tratamento da otomicose.

2.6.4 Hidroxipiridonas

As hidroxipiridonas são compostos quimicamente diferentes de outros agentes anti-fúngicos, como os derivados azólicos, pois não interferem na biossíntese de esteróis. O mecanismo de ação desta classe de antifúngicos envolve a ação quelante dos íons de ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}), ou seja, tem a capacidade de penetrar na membrana celular e formar complexos com íons de ferro inibindo o metabolismo energético nas mitocôndrias de fungos patogênicos, inibindo as enzimas responsáveis pela

degradação dos peróxidos tóxicos na célula fúngica (GUPTA; FLECKMAN; BARAN, 2000; DUBINI et al., 2005; KIM et al., 2011).

Esta classe de antifúngicos tem um amplo espectro antifúngico e é fungicida diante, principalmente, de dermatófitos. *In vitro*, é igualmente eficaz contra espécies de *Candida* e fungos filamentosos não dermatófitos, por exemplo, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* sp. e *Scytilidium hyalinum* (GUPTA; FLECKMAN; BARAN, 2000).

Ciclopirox olamina é um derivado de hidroxipiridona, formado a partir de um sal de etanolamina de 6-cicloexil-1-hidroxi-4-metil-2-piridona (GUPTA; PLOTT, 2004), tem sido recentemente objeto de várias investigações que têm elucidado seu mecanismo de ação e eficácia em várias doenças causadas por infecções fúngicas superficiais (SUBISSI et al., 2010). Esta droga pertence ao grupo das hidroxipiridonas que tem um amplo espectro de atividade, podendo inibir até o crescimento de espécies frequentemente resistentes a azólicos. Além disso, atua contra uma ampla gama de bactérias, incluindo as patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (NIEWERTH et al., 2003); exibe leves efeitos anti-inflamatórios (WEIR et al., 2011) e possui baixa toxicidade, observada em testes experimentais, o que tornou possível a aplicação tópica (SOARES; CURY, 2001; NIEWERTH et al., 2003). Para VENNEWALD e KLEMM (2010), o antifúngico tópico ciclopirox olamina é uma escolha segura para o tratamento de otomicoses, especialmente em pacientes com perfuração da membrana timpânica.

Assim como ciclopirox olamina, a octopirox olamina (piroctone olamina) também pertence ao grupo das hidroxipiridonas e é formado por um sal etanolamino (1-hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetil)-2-(1H) piridinona), derivado de ácido hidroxâmico piroctona (KIM et al., 2011). Este antimicrobiano, em adição a atividade fungicida, também exibe uma atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e negativas (UNILEVER; UNILEVER, 1998). Esta hidroxipiridona está presente em muitos produtos cosméticos para o tratamento da caspa como xampus de grande atividade fungicida contra dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não-dermatófitos, devido à sua penetração na parede celular do fungo. Contudo, não há relatos sobre seu uso contra patógenos no tratamento de casos de otomicose.

2.6.5 Propostas de novos compostos bioativos no tratamento da otite externa fúngica

As infecções por fungos permanecem muito difíceis de se tratar e o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos tem custos bastante altos. As abordagens recentes, portanto, procuram aumentar o número de antifúngicos existentes com agentes sinérgicos que podem diminuir a dose terapêutica, aumentar a eficácia e evitar o desenvolvimento de resistência (LAI et al., 2016).

Devido a este fato, pesquisadores investigam novos compostos ou seus derivados semi-sintéticos, a fim de propor um novo composto ou novas combinações de antifúngicos dotados de toxicidade reduzida (CARRADORI et al., 2016).

Assim, a busca por novas substâncias naturais, como D-limoneno, e sintéticas, como derivados tiossemicarbazônicos, que possuam efeitos sinérgicos a antifúngicos são imprescindíveis, pois, além da toxicidade das drogas padrões, cada vez mais é constatado uma diminuição da susceptibilidade dos fungos no tratamento da otomicose.

2.6.5.1 D-Limoneno

O crescente número de doenças infecciosas, somado ao aumento contínuo da resistência antimicrobiana de determinados micro-organismos justificam a busca constante por novos fármacos. Diante dessa situação, os vegetais representam uma fonte rica de recursos bioativos de interesse farmacológico (COSTA et al., 2017). Os polímeros provenientes dessas fontes naturais são materiais de grande interesse, uma vez que apresentam baixa toxicidade, menor quantidade de formação de resíduos durante a fase de síntese e baixo custo de produção e processamento (BONON, 2016).

Os óleos essenciais, extraídos dos vegetais, constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (SIQUI et al., 2000).

Os principais constituintes desses óleos essenciais são os terpenos, sendo o limoneno (4-isopropenil-1-metilciclo-hexeno), um hidrocarboneto cíclico insaturado que pertence à família dos terpenos, o composto identificado em maior quantidade.

Esse composto é um líquido incolor, volátil e oleoso naturalmente encontrado nas cascas de, principalmente, frutas cítricas, e é responsável pelo forte odor característico destas frutas (FISCHER; PHILLIPS, 2008; ESPINA, et al., 2011; ÓLEOS ESSENCIAIS, 2017).

O limoneno apresenta dois isômeros configuracionais, o D-limoneno (R), óleo essencial da laranja e o L-limoneno (S), óleo essencial do limão. A principal aplicação do D-limoneno é como um precursor para a carvona, uma cetona terpênica com propriedades odoríferas e sápidas muito utilizada pela indústria alimentícia e na fabricação de dentifrícios. No entanto, está crescendo o seu uso como solvente, pois além de ser biodegradável, decompondo-se naturalmente pelos micro-organismos existentes no meio ambiente, possui baixa toxicidade. O princípio do D-limoneno tem chamado a atenção dos profissionais da saúde, pois, alguns estudos, têm mostrado a eficácia deste composto ativo contra vários tipos de câncer, como câncer gástrico (ALMEIDA et al., 2015).

Além de ser ativo contra diversos tipos de câncer, o limoneno tem se mostrado um excelente redutor de população de micro-organismos, sobretudo, os fungos. Segundo Romero et al. (2012) a inibição de micro-organismos por óleos essenciais pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação. Os efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular têm sido utilizados para explicar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus componentes isolados. Esses efeitos estão associados ao caráter lipofílico dos constituintes dos óleos essenciais, que sofrem partição da fase aquosa para dentro da membrana celular. Isto conduz à expansão da membrana, aumento da fluidez e da permeabilidade da célula, permitindo a liberação dos componentes intracelulares vitais à sobrevivência do micro-organismo.

Contudo, alguns estudos sugerem que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser consequência da inativação de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e na síntese de componentes estruturais do micro-organismo, além da destruição ou inativação de material genético (ROMERO et al., 2012).

Dessa forma, torna-se necessário mais estudos tanto sobre os mecanismos de ação do D-limoneno, quanto de testes de susceptibilidade antifúngica para o conhecimento e uso desse óleo essencial no tratamento de micoses.

2.6.5.2 Derivados de tiossemicarbazonas

Outra alternativa é a utilização de derivados de novas formulações sintéticas para o tratamento de micoses, como derivados de tiossemicarbazonas.

Estes compostos são geralmente obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos e/ou cetonas, e recebem a denominação da classe tiossemicarbazona após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado (CASAS; TASENDE; SORDO, 2000; HANG; BERTOZZI, 2001).

As tiossemicarbazonas são uma classe de compostos sintéticos, conhecidas por possuírem propriedades químicas bastante versáteis, e promissora nas aplicações biológicas, tais como antitumoral (FEUN et al., 2002), antibacteriana (KASUGA et al., 2003), antiviral (TEITZ et al., 1994), antiprotozoária (BHARTI et al., 2002), antifúngica (ARAÚJO NETO, et al., 2017), dentre outras. Sua capacidade de formar quelatos com metais tem grande importância em suas atividades biológicas. São bastante conhecidas por suas aplicações importantes na pesquisa de novos fármacos, pois são empregadas como intermediários na síntese orgânica de diversos núcleos importantes em função de seu largo espectro de ação. Sua vasta aplicação, deve-se, a sua já versatilidade de obtenção e manipulação (SILVA; ALVES; NASCIMENTO, 1998; TENÓRIO; GÓES, 2005).

Contudo, a reação de condensação entre um aldeído ou uma cetona com tiossemicarbazidas, que formam diretamente a tiossemicarbazonas, normalmente produz altos rendimentos de produto, mas o produto não tem solubilidade em água, tornando uma das principais desvantagens destes sistemas moleculares (GLISONI, et al., 2012; BACHER et al., 2013). De fato, o equilíbrio adequado entre uma hidrofiliabilidade de fármacos, que favorece a solubilidade e a biodisponibilidade, e a lipofiliabilidade, que permite que essas moléculas se difundam através da bicamada lipídica da membrana celular, é um pré-requisito fundamental para uma absorção celular eficiente destes compostos (AKAM; TOMAT, 2016; PALMA et al., 2017).

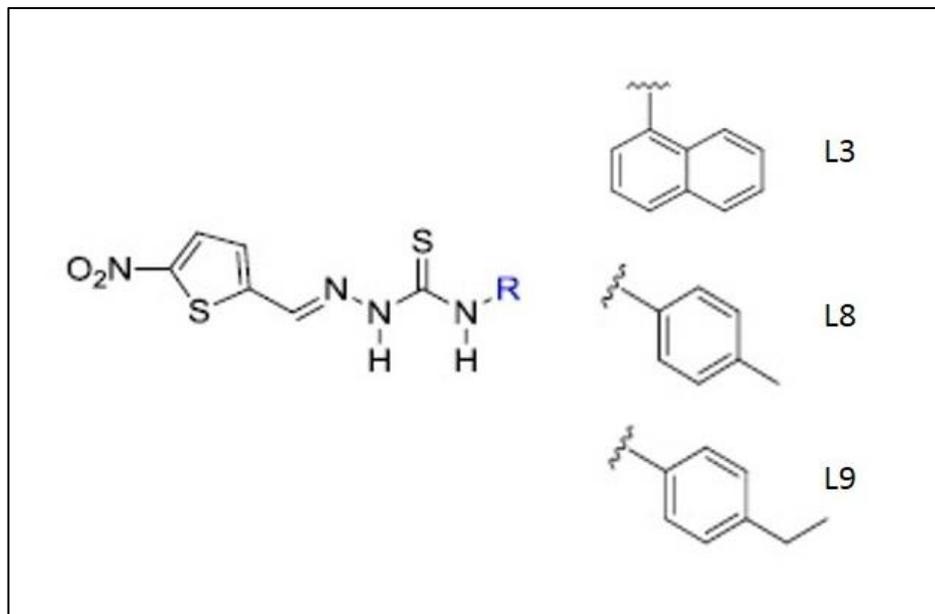
Bisceglie et al. (2018), analisando formulações de derivados tiossemicarbazonas, afirmaram que novas tiossemicarbazonas foram sintetizadas com o objetivo de estudar como os grupos substituintes influenciam na sua atividade biológica. Eles concluíram que os ligantes livres não apresentam qualquer atividade biológica significativa, e que os complexos metálicos é que a define.

As semicarbazonas e seus análogos de enxofre, as tiosemicarbazonas formam uma importante classe de nitrogênio, átomos de oxigênio ou de enxofre que mostram coordenação para uma variedade de íons metálicos (RODRIGUEZ-ARGÜELLES et al., 1997; PATEL; SHAH, 2010). O avanço da química bioinorgânica aumentou o interesse das pesquisas por esses complexos, e se reconhece que as propriedades biológicas das semi e tiosemicarbazonas eram muitas vezes relacionadas à sua capacidade de complexação de metais (Beraldo e Gambino, 2004; Prathima et al., 2010; Suvarapu *et al.*, 2012). Entre os complexos de metais de transição, os complexos de Cu (II) receberam muita atenção devido às suas atividades biológicas aprimoradas, principalmente em antimicrobianos (BACCHI *et al.*, 1999; RODRÍGUEZ-ARGÜELLES et al., 2009). Chan et al., 2017, analisando a atividade de Complexos de Cu (II) de derivados de 2- (difenilmetileno) hidrazinecarboxamida como antifúngico, testaram em *Fusarium oxysporum*, concluíram que tais complexos de Cu (II) ligados, apresentaram atividade fúngica promissora.

Em outro estudo, Araújo Neto, et al. (2017), após sintetizarem 12 N-substituído 2- (5-nitro-tiofeno) – tiosemicarbazonas (Figura 1), todas com um anel de tiofeno aromático, com um grupamento nitro na sua estrutura química, avaliaram a atividade antifúngica e o mecanismo de ação da molécula com melhor atividade antifúngica. Os pesquisadores concluíram, em ensaios *in vitro*, que todos os compostos exibiram atividade antifúngica sobre espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. Além disso, avaliaram o mecanismo de ação da molécula, a qual não se ligou ao ergosterol na membrana (ensaio de ergosterol), e não atuaram na inibição da síntese de parede celular fúngica (ensaio de sorbitol), o que levou os autores a supor que há possibilidade de diferentes mecanismos de ação daqueles descritos para as classes de polienos e equinocandinas.

Três (L3, L8 e L9) destas moléculas sintetizadas por estes pesquisadores foram utilizadas em nossa pesquisa para investigar a atividade antifúngica diante de fungos isolados de pacientes com otomicose. Todos os três radicais constituintes possuem anéis aromáticos. A L3 é constituída por dois anéis aromáticos (nafitil) fundidos na molécula de 2- (5-nitro-tiofeno) – tiosemicarbazonas; L8, p-Mefenil e L9, p-Et-fenil (Figura1).

Figura 1 – Estrutura química do 2- (5-nitro-tiofeno) – tiossemicarbazona e dos radicais (R) constituintes das moléculas derivados de tiossemicarbazonas.



2.7 BIOFILME E RESISTÊNCIA DO FUNGO AO TRATAMENTO

Na investigação micológica observou-se uma mudança de paradigma nos últimos anos, com uma valorização de desenvolvimento dos fungos de importância clínica, em relação a capacidade de formar e sobreviver em comunidades de biofilme (JABRA-RIZK et al., 2004; RAMAGE et al., 2009; MARTINEZ; FRIES, 2010).

Biofilmes são comunidades complexas e interdependentes de micro-organismos associados à uma superfície. Os organismos estão encerrados em uma matriz de exopolissacarídeos. Estes micro-organismos formam agregados celulares, que é um modo protegido de crescimento, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis, sendo sua fisiologia e comportamento significativamente diferente das células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Tais estruturas são estabelecidas em uma superfície após as seguintes fases de desenvolvimento: chegada a um adequado substrato, a adesão, a colonização, a produção de polissacarídeo, a maturação de biofilme e de dispersão (CHANDRA et al., 2001; DONLAN, 2002; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

A adesão e colonização de populações fúngicas complexas em superfícies biológicas e inatas, tais como prótese de acrílico, é comum para fungos clinicamente relevantes (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 1998).

Devido a isso, as infecções relacionadas com biofilme de fungos filamentosos também têm sido cada vez mais descritas (RAMAGE et al., 2009), inclusive por espécies do gênero *Aspergillus* (MOWAT et al., 2009). É cada vez mais claro que uma grande diversidade destes micro-organismos tem a capacidade de formar estes agregados que, clinicamente são importantes, pois, são refratários ao tratamento antifúngico, o que representa um grande problema já que a dose de fármaco necessária para erradicar o biofilme pode exceder o máximo recomendado (RASMUSSEN; GIVSKOV, 2006).

Uma das características do biofilme produzido por estes micro-organismos é o aumento da resistência aos agentes antifúngicos. Tré-Hardy et al., (2008), Di Bonaventura et al. (2006) e Ramage et al. (2001), relataram que biofilmes são até 1000 vezes mais resistentes à antifúngicos do que as células planctônicas.

Além da formação de biofilmes poder trazer consequências muito relevantes, pois conduz à maioria dos agentes antifúngicos clinicamente utilizados a altos níveis de resistência, também proporciona um ambiente seguro para células fúngicas, que serve de reservatório para fontes recorrentes de infecções (KOJIC; DAROUICHE, 2004; RAMAGE; MARTINEZ; LOPEZ-RIBOT, 2006).

Desta forma, a formação de biofilme representa um dos principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese tanto de espécies de *Candida* (PIERCE et al., 2015), quanto de fungos filamentosos. E ainda, a eficácia dos agentes antifúngicos por ser limitada devido a problemas de toxicidade e, mais recentemente, ao surgimento de resistência (SANGLARD; ODDS, 2002; PIERCE et al., 2013), assim, torna-se uma necessidade urgente, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, particularmente aqueles com novos mecanismos de ação (PIERCE et al., 2015).

3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.1 DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM OTOMICOSE E DOENÇAS ASSOCIADAS

Um total de 130 pacientes compreendendo crianças, jovens e adultos, foram atendidos no setor de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (UFPE). Destes pacientes, 15 (11%) foram diagnosticados com otite externa fúngica, sendo nove (60%) do sexo masculino e seis (40%) do sexo feminino. Em nossa pesquisa, nenhum dos pacientes diagnosticados com otite externa fúngica fazia uso de aparelho auditivo.

Sarvan et al. (2012), na Índia, trabalharam com amostras de 100 pacientes e relataram que houve prevalência da otomicose em pacientes do sexo masculino (65%), assim como Nandyal, Choudhari e Sajjan (2015), na Índia avaliando 185 pacientes, observaram que 54,72% dos pacientes eram do sexo masculino, da mesma forma que constatamos em nosso estudo. Contudo, a prevalência da otomicose no sexo feminino foi observada por Barati et al. (2011), no Irã, que partir de 171 pacientes com otomicose, 86 (50,3%) eram do sexo feminino e 85 (49,7%) do sexo masculino; Jia et al. (2012) quando avaliaram 108 pacientes, na China; Kumar Karn et al. (2014), na Índia, avaliaram 246 pacientes, 143 eram do sexo feminino e 103 do sexo masculino; assim como por Nowrozi et al. (2014), de 114, 67 do sexo feminino e 47 do sexo masculino apresentaram otomicoses. Gharaghani, Seifi e Zarei Mahmoudabadi (2015), em trabalho realizado no Irã, também concordam com a maior prevalência da otite externa fúngica em mulheres.

A idade dos pacientes com a micose variou entre quatro e 48 anos, com média de 30 a 40 anos de idade, da mesma forma observado por Kumar Karn et al. (2014), na Índia, em seus estudos perceberam que a idade dos pacientes com otomicose que eles avaliaram foi entre 31-40 anos. Gharaghani, Seifi e Zarei Mahmoudabadi (2015), Irã, também constataram esta média.

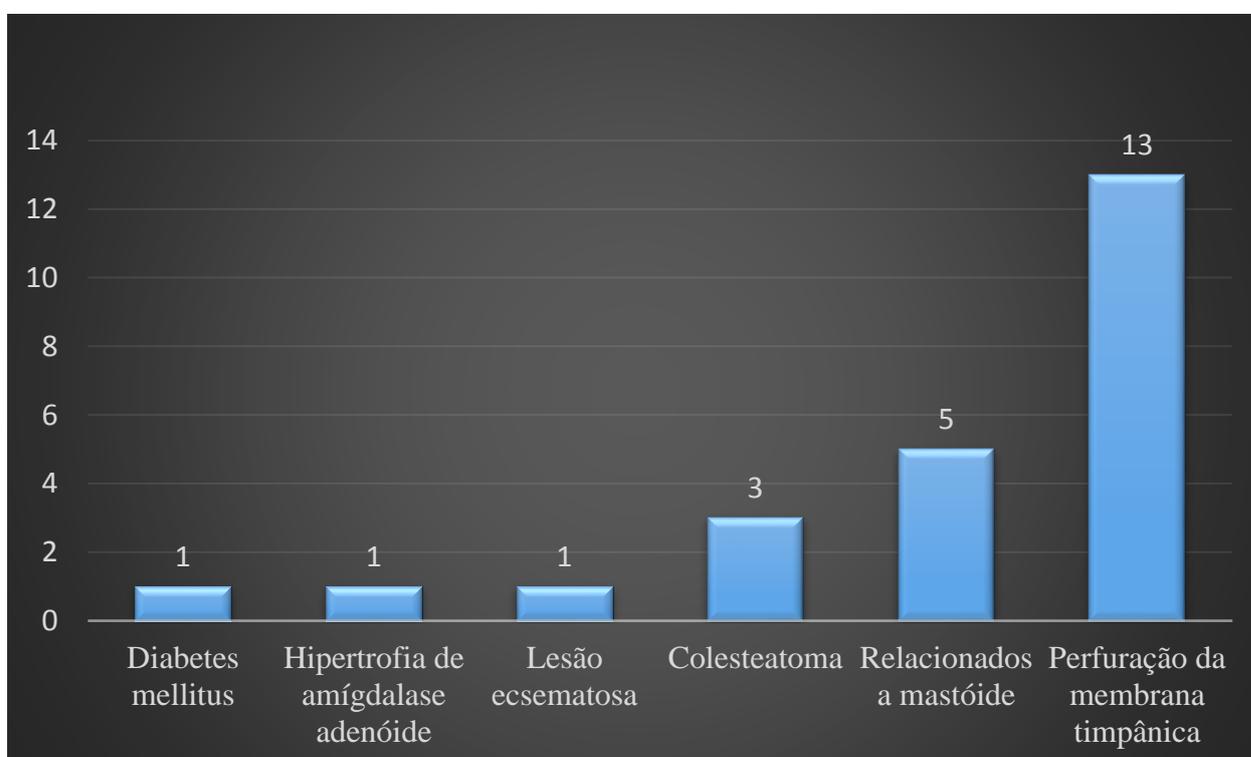
O exame micológico foi realizado juntamente com o exame clínico, uma vez que um dá subsídio ao outro. O exame clínico foi realizado por meio da otoscopia, a qual consiste na visualização do conduto auditivo externo, assim tornando possível um diagnóstico mais preciso.

Dos 15 pacientes diagnosticados com a micose, 12 (80%) dos casos estavam associados a perfuração da membrana timpânica, dois estavam acometidos por

colesteatoma, um tinha hipertrofia das amígdalas (nível 4) e adenóide, e três com patologia relacionada a mastoide (Figura 2).

Vennewald, Schonlebe e Klemm (2003) examinando 128 pacientes na Alemanha com suspeita de otomicose observaram que 115 (90%) pacientes estavam acometidos por otite média crônica persistindo a perfuração timpânica. Kurnatowski e Kilipiak (2001), na Polônia, analisaram 295 indivíduos que apresentavam sintomas de otite, os autores observaram que culturas positivas foram predominantemente de pacientes com supuração pós operatória (52, 8%).

Figura 2 – Frenquência de doenças e procedimentos realizados em pacientes com otomicose atendidos no setor de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco.



Dentre os 15 pacientes diagnosticados com otite externa fúngica, foram obtidos 19 isolados fúngicos devido a ocorrência de um caso de otomicose bilateral, um caso de infecção mista, por levedura e fungo filamentosos, e um caso de recidiva. No trabalho realizado por Araiza, Canseco e Bonifaz (2006), no México, eles relataram que 90,7% dos casos de otite fúngica foi unilateral. García-Agudo et al. (2011), na Espanha, identificaram 228 leveduras e 184 fungos filamentosos como agentes da otomicose, e ainda observaram infecções mistas em 22 casos (5,6%). Da mesma forma, Vennewald, Schonlebe e Klemm (2003), relataram que culturas mistas de

fungos filamentosos e leveduras foram observados em 4% dos casos de otite externa fúngica. Em relação a recorrência, no estudo de Jia et al. (2012), na China, eles observaram que a doença residual ocorreu em 9,26% com recorrência em 8,89% dos pacientes.

Os sintomas mais frequentes detectados na nossa pesquisa foram: otorreia, 12 (80%), otalgia, sete (47%), prurido, seis (40%), hipoacusia, um (7%) (Figura 3). Aneja, Sharma e Joshi (2010), afirmaram que as principais queixas foram prurido (72%), otalgia (62%), hipoacusia (57%), plenitude auricular (54%), otorreia (31%) e zumbido (27%). Jia et al. (2012), na China, também concordam que o sintoma mais frequente foi o prurido (79,63 %), o que diverge dos nossos estudos. Provavelmente o sintoma mais comum entre nossos pacientes foi a otorreia devido a maioria dos pacientes terem perfuração da membrana timpânica, o que é caracterizada por inflamação exsudativa. Todos estes dados estão descritos na tabela 2.

Figura 3 – Frequência dos sintomas e manifestações clínicas relatadas pelos pacientes com otomicose atendidos no Hospital das Clínicas de Pernambuco.

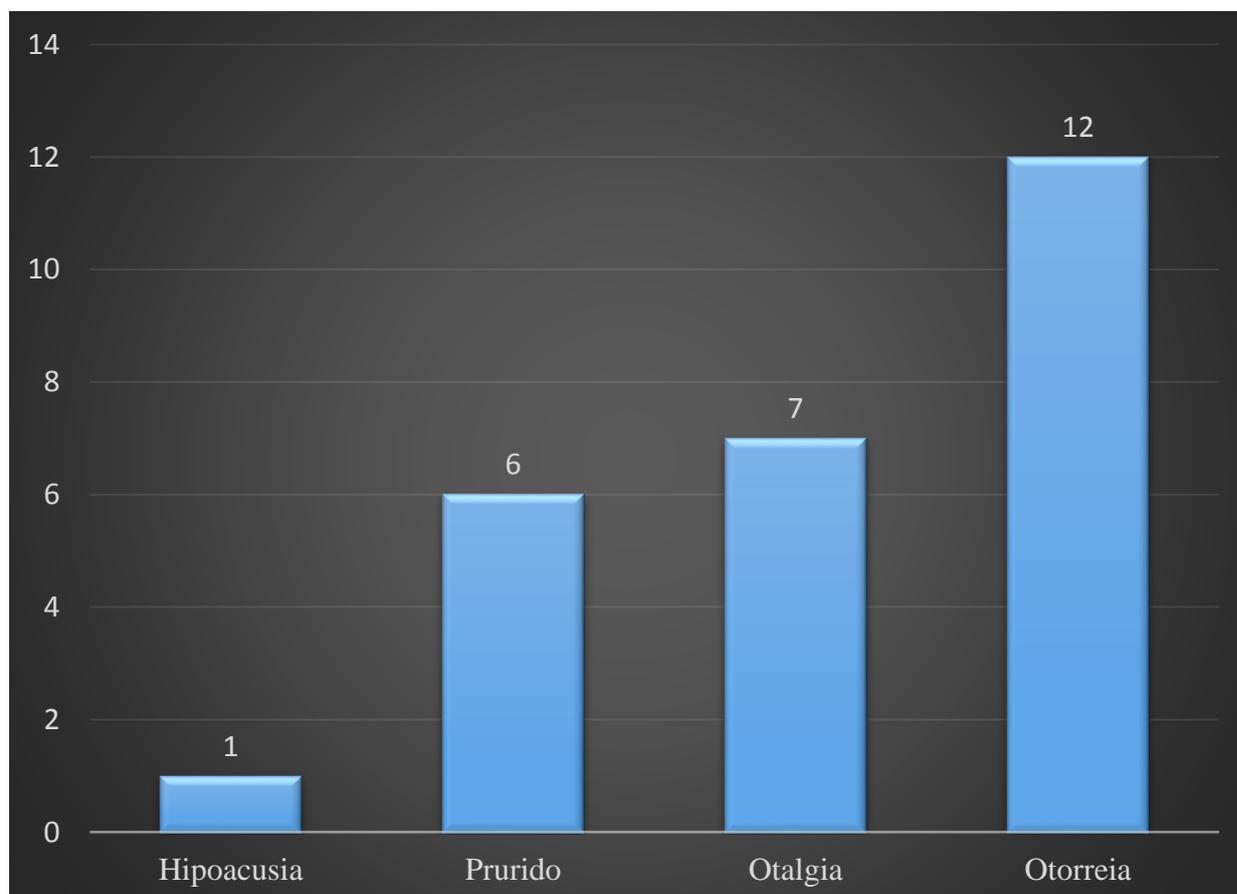


Tabela 2 – Descrição dos pacientes com otomicose em relação ao sexo, idade, doenças relacionadas e procedimentos, além dos sintomas.

Pacientes	Registro (MM)	Sexo	Idade (anos)	Ocupação	Doenças/ Procedimentos	Sintomas/ manifestações clínicas
P1	628	M	22	-	Diabetes; Colesteatoma; Perfuração da membrana timpânica.	Prurido.
P2	649	M	31	Servente de obras	Timpanomastoidectomia; mastoide aberta.	Prurido, otalgia e otorreia.
P3	661	M	04	-	Hipertrofia das amígdalas (nível 4) e adenoide; otite média crônica secretora.	Otalgia e otorreia.
P4	674	M	30	Almoxarifado	Perfuração da membrana timpânica.	Otorreia.
P5	699	F	22	Do lar	Perfuração da membrana timpânica; colesteatoma.	Prurido; otorreia.
P6	735	F	21	Estudante	Perfuração da membrana timpânica	Otalgia; otorreia.
P7	736	F	37	Balconista	Perfuração da membrana timpânica	Otalgia.
P8	817	F	38	Do lar	Perfuração da membrana timpânica; Mastoidectomia.	Otorreia.
P9	841	M	19	Aviaria	Mastoidectomia;	Prurido.
P10	864	F	48	-	Perfuração bilateral da membrana timpânica; lesão eczematosa;	Otalgia, otorreia e prurido.
P11	103	M	29	Agricultor	Timpanoplastia; Perfuração da	Otorreia.

					membrana timpânica		
P12	153	M	40	-	Perfuração da membrana timpânica.	Otorreia.	
P13	293	M	15	Estudante	Perfuração da membrana timpânica.	Otorreia.	
P14	294	F	40	Confeiteira	Mastoide aberta; Perfuração da membrana timpânica.	Otalgia, otorreia, prurido e hipoacusia.	
P15	417	M	28	Assistente de suporte de TI	Mastóide aberta; Colesteatoma; Timpanomastoide ctomia; Perfuração da membrana timpânica.	Otalgia e otorreia.	

P=paciente; M=masculino; F=feminino;

3.2 EXAME DIRETO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS E CULTURAS OBTIDAS

- **Exame direto**

Ao exame direto das amostras biológicas de pacientes com otomicose, foram observados numerosos filamentos micelianos hialinos, septados (Figura 4). Nas amostras também foram observadas hifas com dicotomia (Figura 5), e ainda estruturas reprodutivas (conídios e conidióforos) (Figura 6), quando o paciente era acometido por um fungo filamentoso. No entanto, também obtivemos casos de levedurose nos quais observamos células leveduriformes, ovais, hialinas (Figura 7), da mesma forma que observado por Jackman et al. (2005) e Enoz; Sevinc; Lapeña (2009).

Figura 4 – Exame direto da amostra clínica do paciente com otomicose, evidenciando hifas hialinas, septadas (A), e o micélio imerso na amostra clínica (B e C).

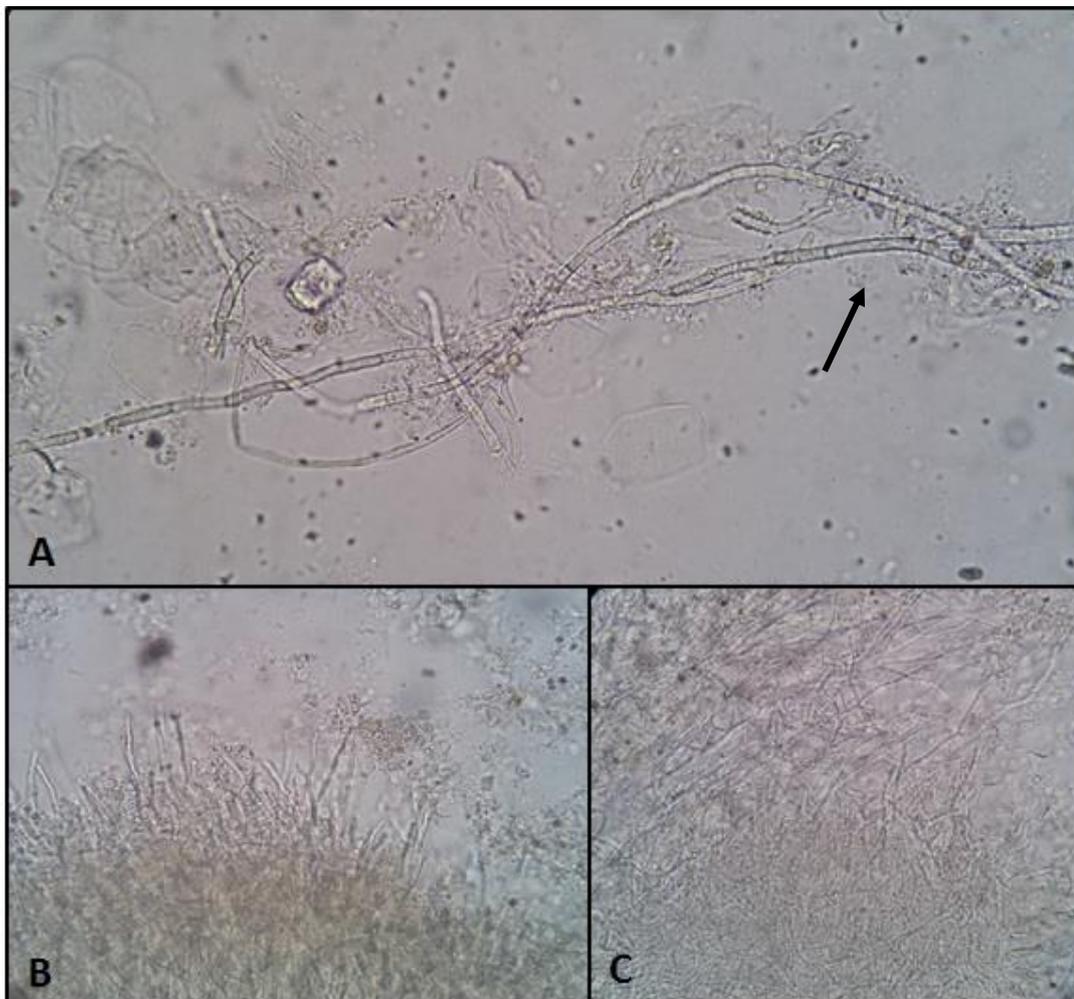


Figura 5 – Exame direto evidenciando hifa dicotômica (seta), característico do fungo quando em parasitismo.



Figura 6 – Exame direto de amostras clínicas de pacientes com otomicose, evidenciando estruturas reprodutivas (conidióforos) de *Aspergillus fumigatus* (A e B) e *A. niger* (C e D).

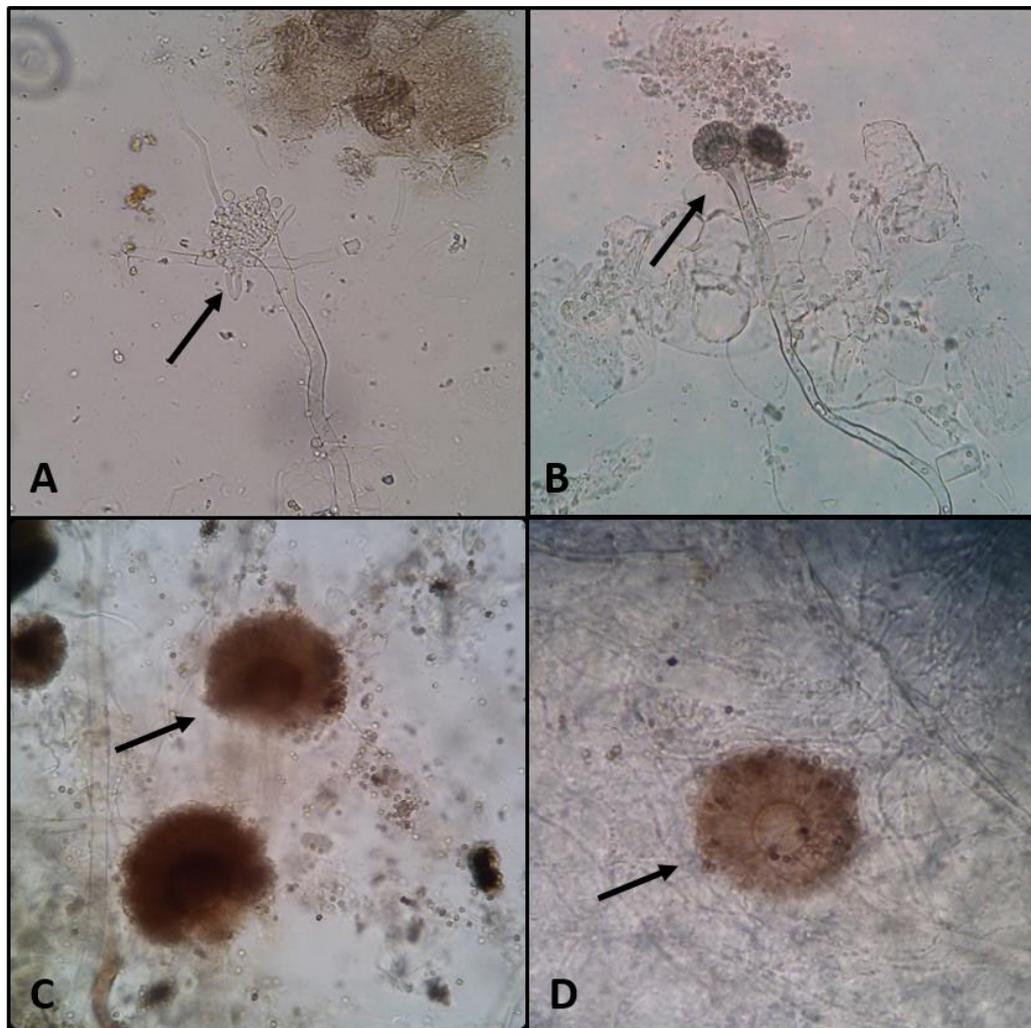
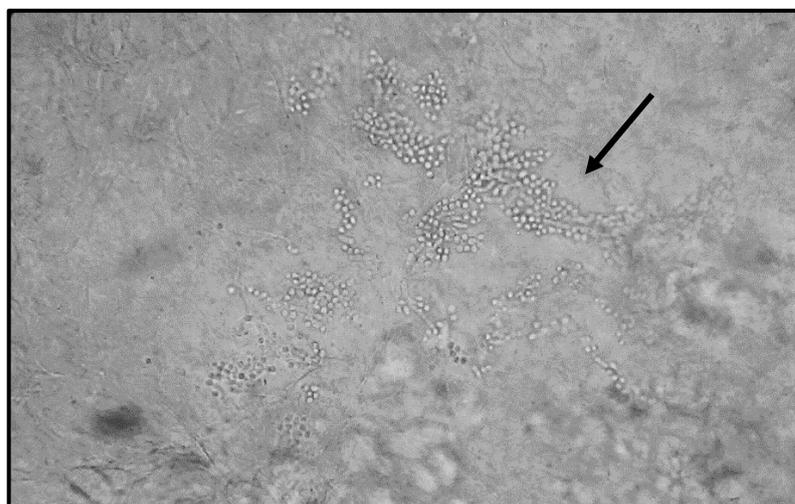


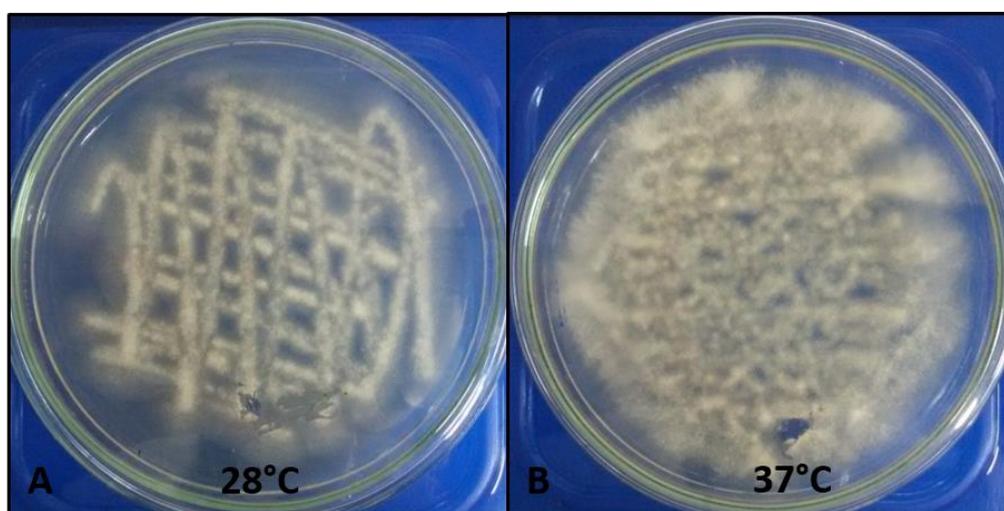
Figura 7 – Exame direto de amostra clínica evidenciando numerosas células de leveduras ovais, hialinas, característico de levedurose.



- **Obtenção da cultura primária**

Após o semeio da amostra em meio de cultura em placas de Petri, o material biológico foi mantido nas temperaturas de 28°C e 37°C por até 15 dias (Figura 8). Segundo Yenisehirli et al., 2009, tal procedimento é imprescindível devido à natureza dos agentes causadores da otomicose, uma vez que a maioria destes são considerados contaminantes, e esta conduta eliminaria os riscos de contaminação da amostra.

Figura 8 – Isolamento de cultura primária de *Aspergillus* sp. com crescimento nas temperaturas de 28°C e 37°C, obtido de amostra clínica de paciente com otomicose.



3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

3.3.1 Identificação dos isolados por taxonomia clássica

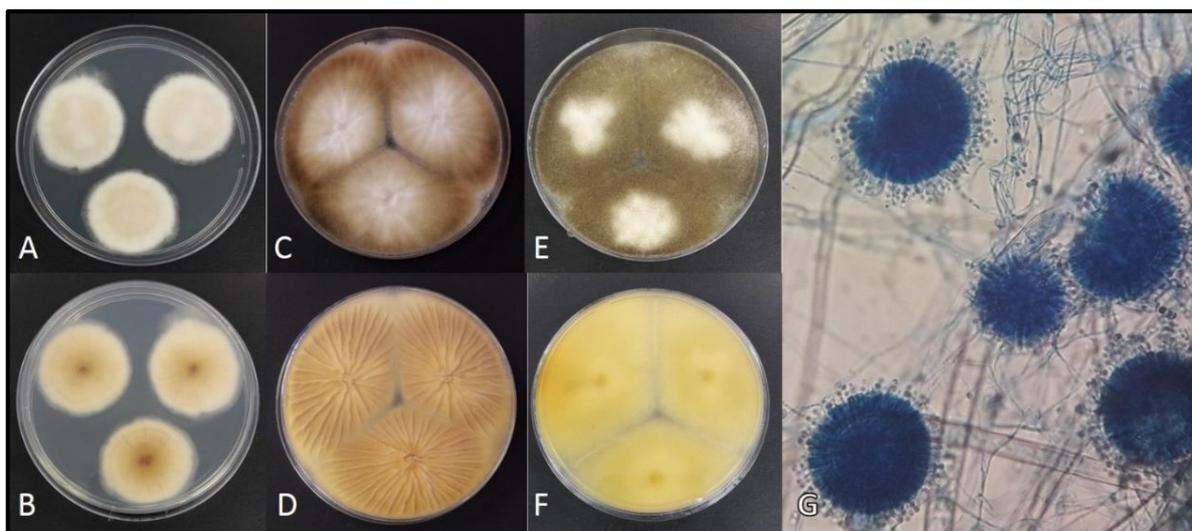
Os agentes etiológicos fúngicos isolados dos pacientes com otomicose identificados por meio de caracteres morfológicos, macro e microscópicos foram: *Aspergillus awamori* (1), *Aspergillus flavus* (6), *Aspergillus fumigatus* (1), *Aspergillus niger* (1), *Aspergillus parasiticus* (1), *Aspergillus pseudonomius* (1), *Aspergillus sydowii* (2), *Aspergillus tamarisii* (2), *Candida parapsilosis* (1), *Millerozyma farinosa* (2) e *Talaromyces funiculosus* (1), os quais *A. sydowii*, *A. pseudonomius*, *Millerozyma farinosa* e *T. funiculosus*, relatados pela primeira vez causando infecção no conduto auditivo externo de paciente com otomicose.

As espécies de *Aspergillus* foram identificadas a partir dos caracteres apresentados por Klich, 2002, com exceção de *A. pseudonomius*, *T. funiculosus* e as leveduras, que foram identificados, principalmente por taxonomia molecular.

- *Aspergillus awamori* Nacz

Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 30-60; CYA (58) 60-70 e MEA (55) 60-70. **Cor e textura da colônia:** Os conídios em CYA25 e CZ apresentam-se marrons escuros quase pretos; micélio branco, inconspícuo e com micélio flocoso sobreposto. A coloração do reverso foi do amarelo ao marrom. A colônia é baixa, aveludada a granular, e radialmente sulcada. Em MEA, os conídios são marrons escuros a preto, micélio inconspícuo, colônia plana e as cabeças conidiais bem separadas (Figura 9). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais radiadas, dividindo em colunas na maturidade. Estipes com paredes lisas, incolor e levemente pigmentada no ápice; vesículas globosas; predominantemente bisseriados, e a métula cobrindo ao menos até a metade superior da vesícula. Conídios esféricos, suavemente enrugados **Características que os diferenciam de outras espécies:** Possuem colônias marrons escuras a preta, com cabeças conidiais bisseriadas e conídios suavemente enrugados.

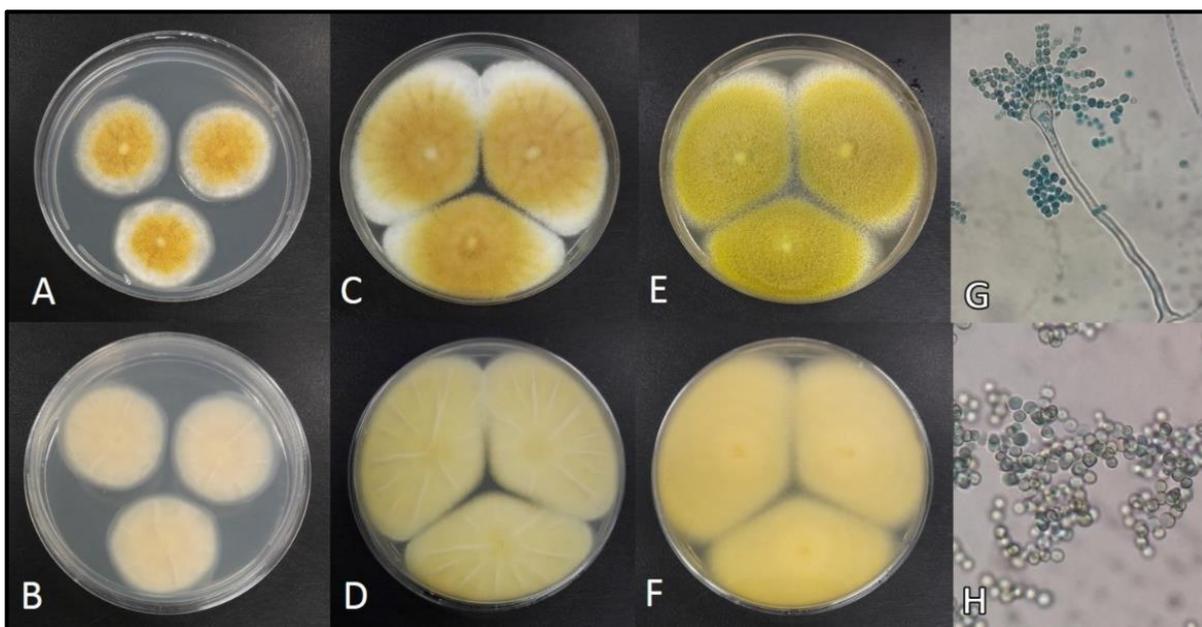
Figura 9 – Características macroscópicas, verso e reverso, e microscópicas de *Aspergillus awamori* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), evidenciando os conidióforos (G), com sete dias de crescimento a 25°C.



- *Aspergillus flavus* Link

Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 55-65; CYA25 (45) 65-70 e MEA (50) 65-70. **Cor e textura da colônia:** Os conídios em CYA25 e CZ são verde escuros, micélio branco, reverso incolor a marrom claro, colônia é rasteira. Em MEA, os conídios são verde oliva micélio branco inconspícuo, reverso incolor a amarelo, colônia flocosa, especialmente no centro (Figura 10). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais radiadas a colunares; estipes com parede geralmente dura, incolor; vesícula esférica a alongada; em CYA25 pelo menos 20% é bisseriado; em MEA são quase que totalmente unisseriados. O conídio é globoso e parede bastante enrugada.

Figura 10 – Características macroscópicas, verso e reverso, de *Aspergillus flavus* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e Ágar malte (E e F), e microscópicas em MEA, mostrando conidióforo (G) e conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.

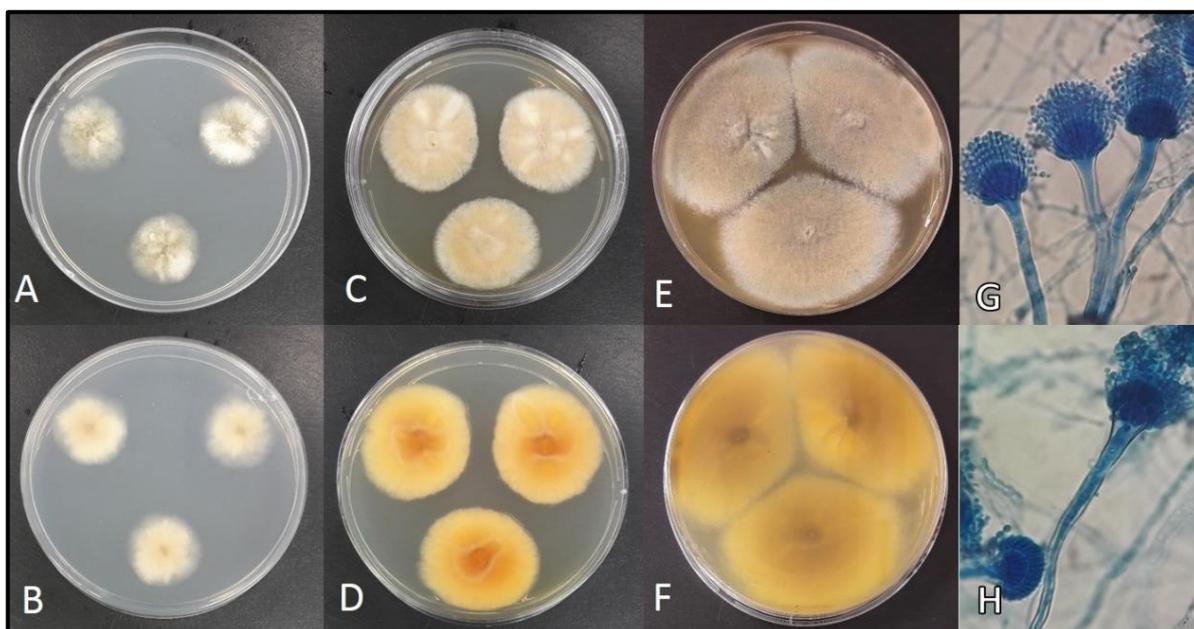


- *Aspergillus fumigatus* Fresen.

Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 45-60; CYA (35) 40-70 e MEA (30) 45-70. **Cor e textura da colônia:** Os conídios em CYA25 e CZ são acinzentados a turquesa mais escuro, micélio branco, reverso incolor a amarelado. Textura aveludada a flocosa plana. Em MEA a coloração dos conídios é semelhante quando em CZ e CYA; micélio branco inconspícuo, reverso incolor a amarelado; textura aveludada a

flocosa plana (Figura 11). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais predominantemente colunares; estipes incolores, e acinzentados próximos ao ápice, parede celular lisa, e vesículas com formato piriforme. São uniserriados e ao longo da metade superior dos dois terços da vesícula, normalmente curvando-se de tal forma que todas as fiáldes ficam paralelas entre si. Os conídios são globosos a elipsoidais, levemente enrugados. **Características que os diferenciam:** Esta espécie se distingue pela coloração acinzentada da colônia, o formato da vesícula piriforme e o tamanho dos conídios.

Figura 11 – Características macroscópicas, verso e reverso, de *Aspergillus fumigatus* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicas, mostrando os conidióforos (G e H), com sete dias de crescimento a 25°C.



- *Aspergillus niger* Tiegh

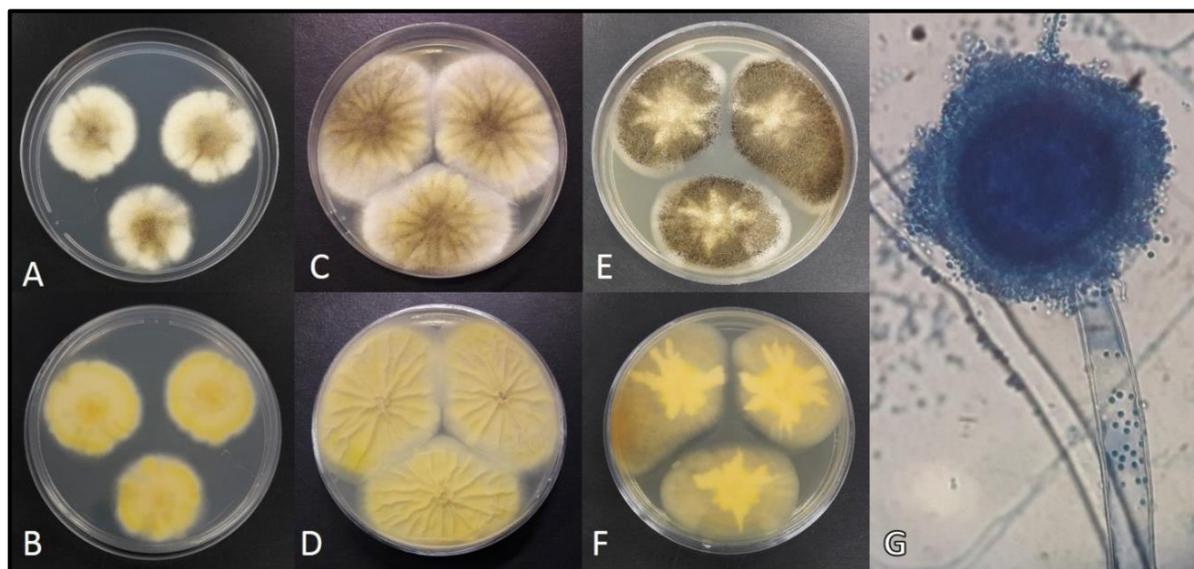
Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 40-62, CYA 55-70, MEA (30) 50-70.

Cor e textura da colônia: Os conídios em CYA25 e CZ são pretos a marrons escuros organizados de forma densa. Micélio inconspícuo, branco. Reverso amarelo; colônia granular a flocosa, radialmente sulcadas. Em MEA, os conídios são pretos, micélio branco e inconspícuo, reverso incolor, colônias granular a flocosa (Figura 12).

Características microscópicas: Cabeças conidiais radiadas; estipes com paredes grossas, lisas, hialinas, mas escuras próximo ao ápice; Vesículas largas quase esférica; bisseriados. Conídios globosos bastante enrugados. **Características que os**

diferenciam: São características comuns destas espécies colônias marrons escuras a pretas, cabeças conidiais bisseriadas com vesículas largas, métula bastante longa e conídios irregularmente enrugados.

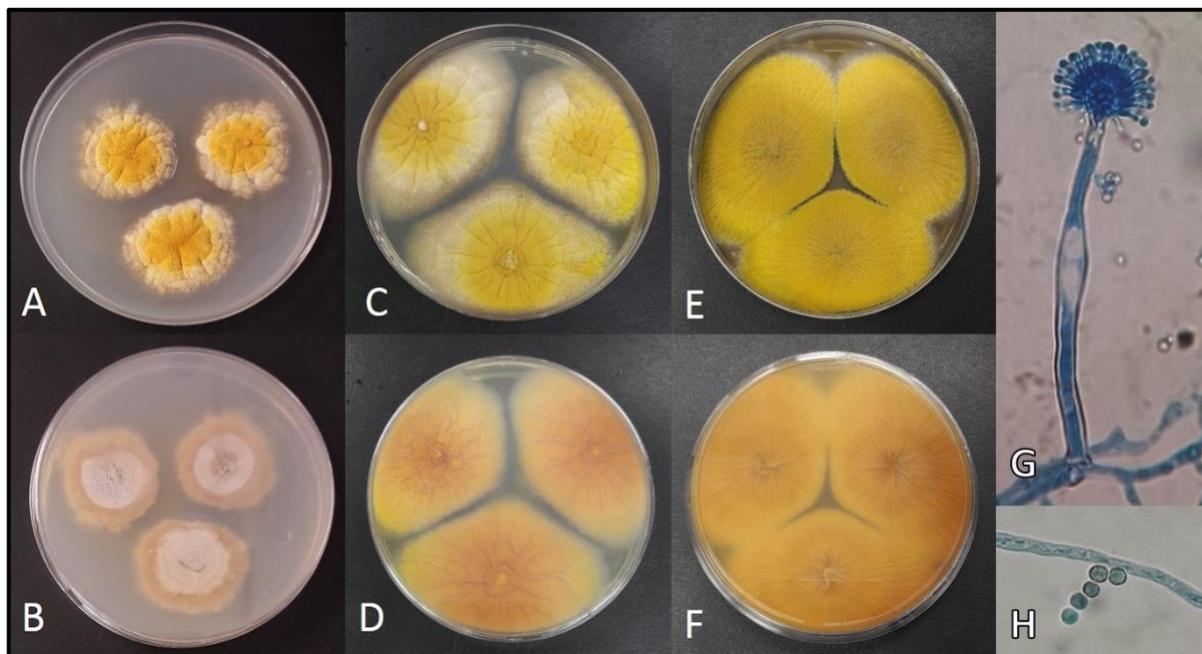
Figura 12 – Características macroscópicas, verso e reverso, de *Aspergillus niger* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, evidenciando o conidióforo (G), com sete dias de crescimento a 25°C.



- *Aspergillus parasiticus* Speare

Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 45-65, CYA (50) 60-70, MEA (45) 60-70. **Cor e textura da colônia:** Em CZ e CYA, os conídios são verde oliva, micélio branco, inconspícuo, reverso amarelo. Colônias bastante baixas e textura aveludada. Em MEA, os conídios são verde escuros, micélio inconspícuo, com tufos flocosos. Reverso incolor a um amarelo forte. As colônias em CZ são mais aveludadas do que em CYA (Figura 13). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais geralmente radiadas; Stipes com paredes enrugadas. Vesículas larga, esférica ou suavemente alongada; predominantemente unisseriado, sendo observado 20% bisseriados. As fiálides cobrem até a metade da vesícula. Os conídios são globosos e possuem a parede suavemente enrugadas. **Características que os diferenciam:** *A. parasiticus* se diferencia de *A. flavus* pela formação de conídios com paredes muito enrugadas.

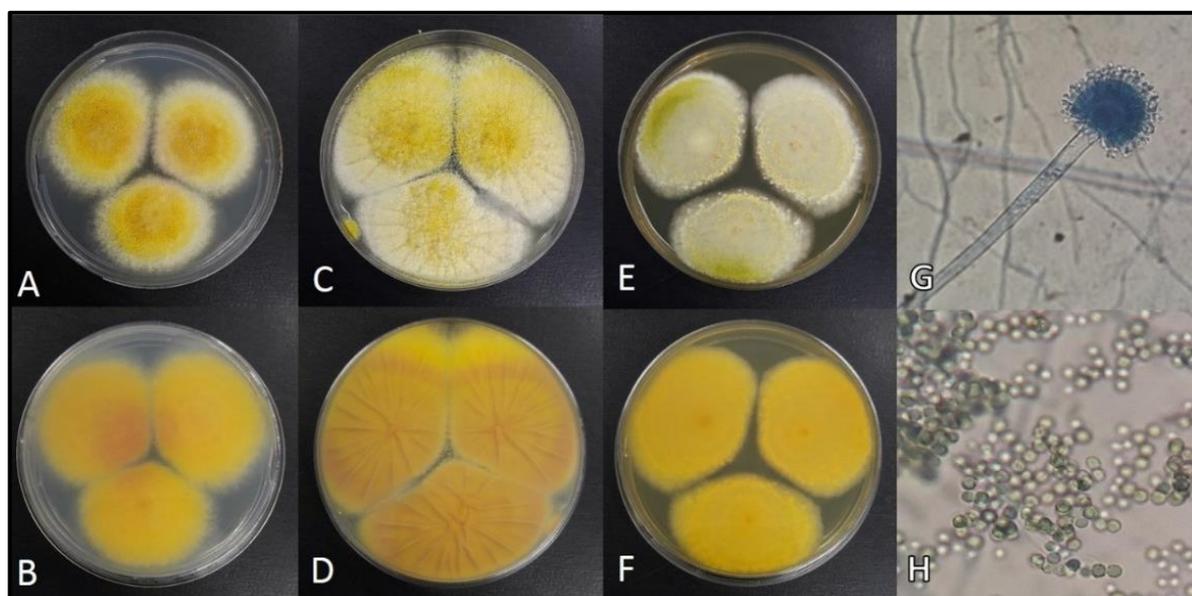
Figura 13 - Caracteres macroscópicos, verso e reverso, de *Aspergillus parasiticus* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e Ágar malte (E e F), e microscópicos, evidenciando o conidióforo (G) e os conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.



- *Aspergillus pseudonomius* Varga, Frisvad & Samson

Cor e textura da colônia: Em CZ e CYA, os conídios são verde oliva, micélio branco, inconspícuo, reverso amarelo. Colônias bastante baixas e textura aveludada no centro. Em MEA, os conídios são verde escuros, micélio inconspícuo, com tufo flocosos. Reverso amarelo forte. As colônias em CZ são mais aveludadas do que em CYA (Figura 14). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais geralmente radiadas; vesícula esférica a alongada; redominantemente unisseriado, sendo observado 20% bisseriados. As fiálides cobrem até a metade da vesícula. Os conídios são globosos e possuem a parede bastante enrugada. **Características que os diferenciam:** *A. pseudonomius* de diferencia de *A. nomius* por análise molecular.

Figura 14 – Características macroscópicas do verso e reverso de *Aspergillus pseudonomius* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e Ágar malte (E e F), e microscópicos, mostrando conidióforo (G) e conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.

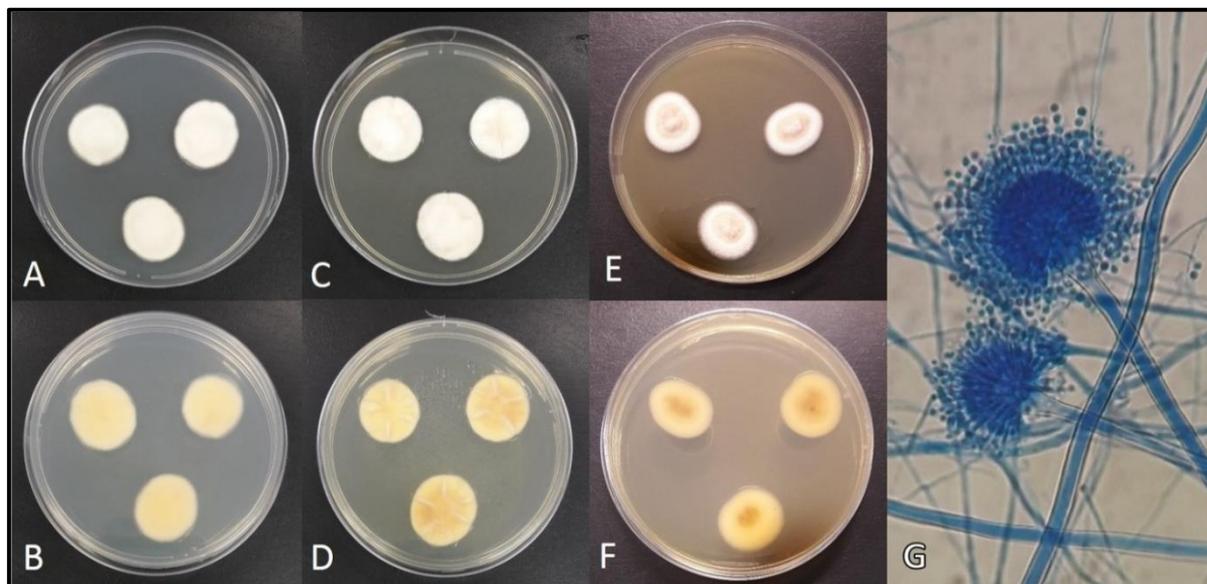


- *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church

Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 20-27, CYA 20-30, MEA (16) 22-30.

Cor e textura da colônia: Em CZ e CYA, as colônias esporulam fortemente acinzentadas. Possuem o micélio branco, reverso alaranjado; colônias densas, aveludadas a lanosas, radialmente sulcadas. Em MEA, os conídios são acinzentados a escuros, micélio branco inconspícuo; reverso amarronzados; colônia com textura aveludada plana (Figura 15). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais radiadas; estipes lisas com paredes grossas quase incolor. As vesículas se expandem de forma piriforme, quase de forma clavata. Geralmente bisseriados e com métulas. Algumas estruturas menores do que conídios são produzidas por muitos isolados. Os conídios são esféricos, muito enrugados. **Características que os diferenciam:** Possuem colônias pequenas, conídios esféricos com a parede extremamente enrugada e cabeças conidiais bisseriadas.

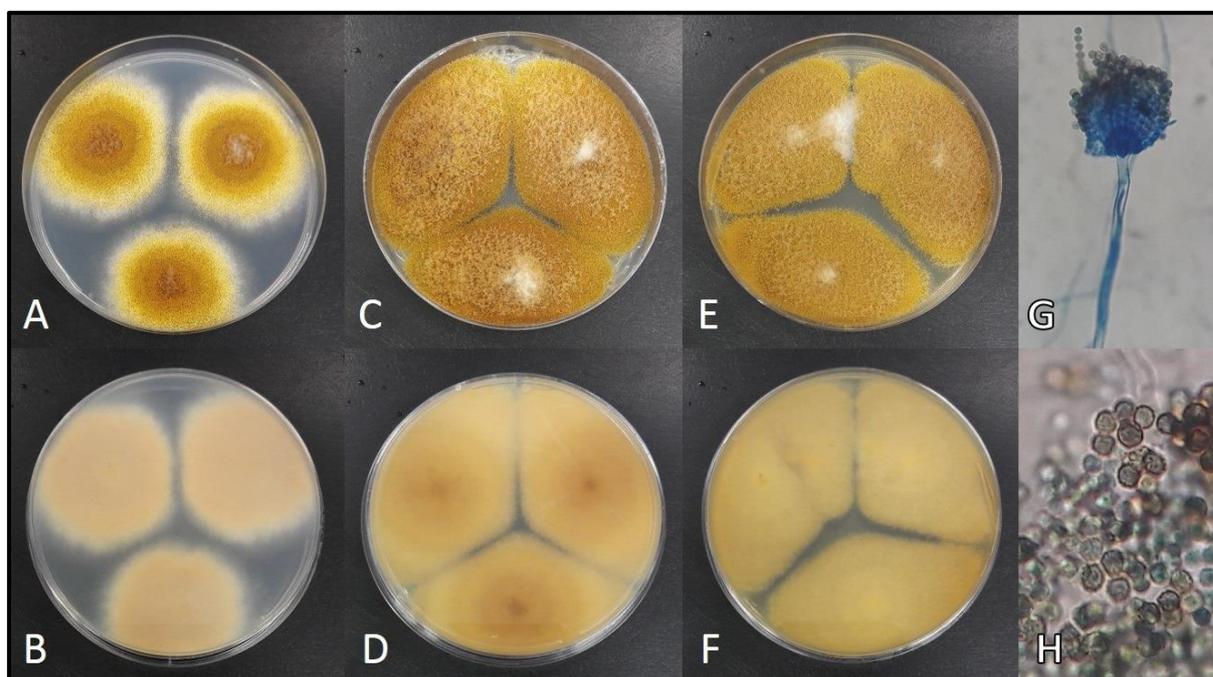
Figura 15 – Caracteres macroscópicos, verso e reverso, de *Aspergillus sydowii* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, os conidióforos (G), com sete dias de crescimento a 25°C.



- *Aspergillus tamaris* Kita

Diâmetro (mm) da colônia até 7 dias: CZ 54-70, CYA (45) 55-70, MEA (55) 65-70. **Cor e textura da colônia:** Os conídios em CYA25 e CZ são marrons oliva, micélio branco, reverso incolor a amarelado. Colônias baixas, planas a flocosas. Em MEA, conídios marrons oliva, micélio branco, inconspícuo, reverso levemente amarelo; cabeças conidiais bem separadas; estipes desiguais no comprimento, dando a colônia uma textura grosseira. Em CZ, o reverso é incolor, que diferencia do fungo em CYA (Figura 16). **Características microscópicas:** Cabeças conidiais radiadas; estipes possui a parede enrugada e incolor; Vesículas globosas a piriformes, largas; Cabeças conidiais unisseriadas e bisseriadas são encontradas na maioria dos isolados. Métula e fiálides geralmente crescem cobrindo toda a superfície da vesícula. Os conídios são globosos, grosseiramente enrugados com paredes bastante grossas. **Características que os diferenciam:** A coloração verde amarronzada das colônias e os conídios grandes com paredes bastante grossas e enrugadas são características bastantes peculiares desta espécie.

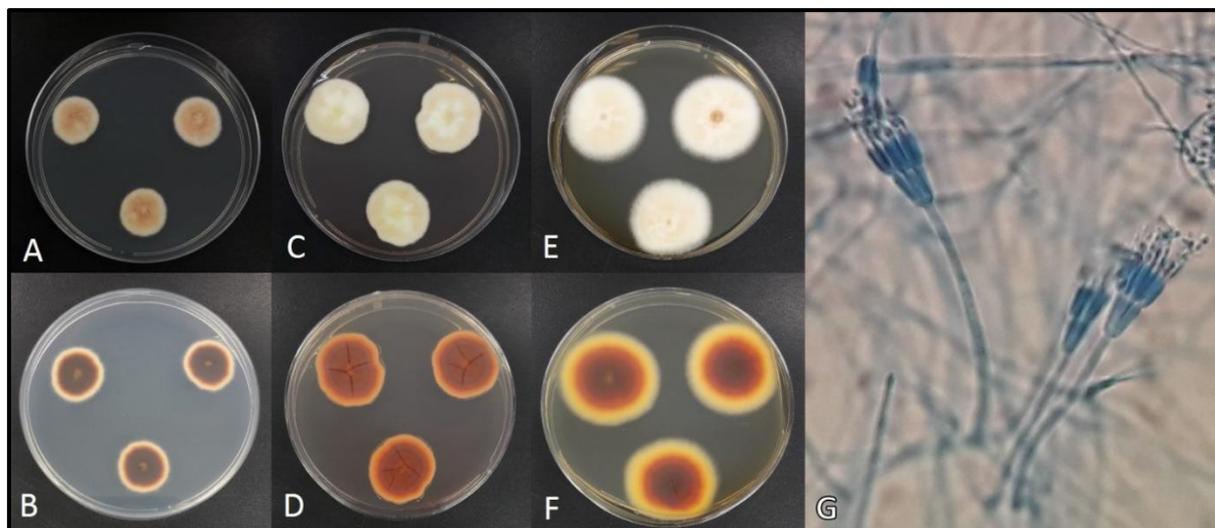
Figura 16 – Características macroscópicas, verso e reverso, de *Aspergillus tamarii* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicas, mostrando conidióforo (G) e conídios (H), com sete dias de crescimento a 25°C.



- *Talaromyces funiculosus*

Cor e textura da colônia: colônias aparência superficial, floccose-funiculos; geralmente espalhando-se, mas ocasionalmente mais restrita; de cores variadas, com áreas de conídios geralmente em tons amarelo-verde e com micelium vegetativo aéreo, amarelo-laranja, buff a carne, a rosa a tons avermelhados; o verso geralmente em tons vermelhos, laranja-castanhos ou avermelhados (Figura 17). **Características microscópicas:** Conidióforos geralmente decorrentes de cordas ou mechas de hifas aéreas, menos comumente do substrato ou do feltro basal; com paredes lisas ou ligeiramente ásperas, coloridas em algumas espécies e cepas. Esterigma lanceolada ou acuminada, de longa, característica da simetria Biverticillata. Conídios geralmente elíptico, variando de subgloboso a globoso; com paredes variáveis, de liso a conspicuosamente áspero.

Figura 17 – Caracteres macroscópicos, verso e reverso de *Talaromyces funiculosus* nos meios de cultura Czapek (A e B), CYA (C e D) e ágar malte (E e F), e microscópicos, exibindo os conidióforos (G), com sete dias de crescimento a 25°C.

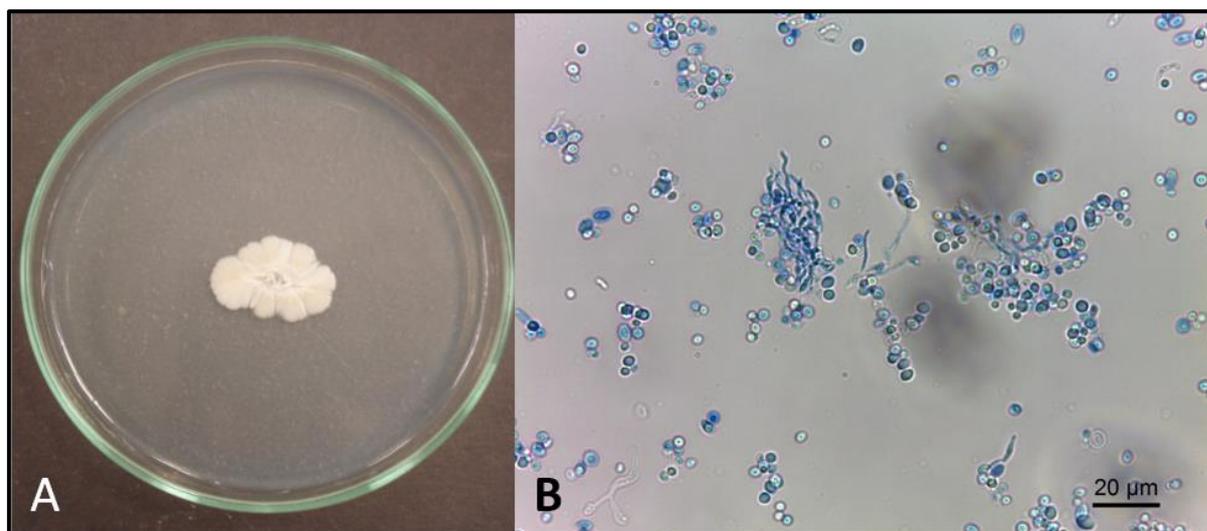


- *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice

Cor da colônia: Possuem colônias branca a creme e textura cremosa.

Características microscópicas: reprodução vegetativa por brotamento; formação de pseudo-micélio simples a ramificado, e sem reprodução sexuada (Figura 18).

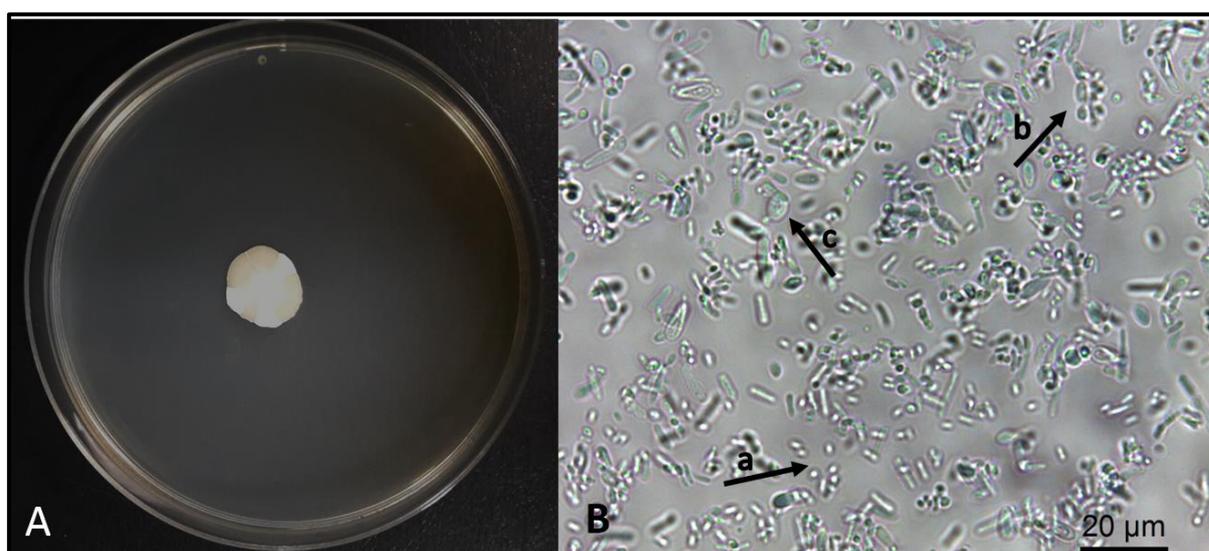
Figura 18 – Caracteres macroscópicos, no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (A), e microscópicos, evidenciando células de leveduras, ovais, hialinas e pseudo-micélio (B), com 15 dias de crescimento a 25°C, identificando *Candida parapsilosis*.



- *Millerozyma farinosa* (Lindner) Kurtzman & M. Suzuki

Cor da colônia: Possuem colônias branca a creme. **Características microscópicas:** reprodução vegetativa por brotamento; formação de pseudo-micélio (Figura 19); ascos contendo 1 a 4 ascósporos lisos, ovais ou arredondados em agar V8, em agar de malte Difco de 5% e também em ágar YM a 25°C.

Figura 19 – Caracteres macroscópicos de *Millerozyma farinosa* no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (A), e microscópicos (B), evidenciando células de leveduras (a) e formação de pseudo-micélio (b), ascos (c) e ascósporos. Cultura com 15 dias de crescimento a 25°C.



3.3.2 Identificação dos isolados por taxonomia molucular

Após o isolamento dos agentes etiológicos e a identificação por meio da taxonomia clássica, foi realizada a identificação através de ferramentas moleculares pela amplificação e sequenciamento das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*), utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4; para o gene da calmodulina, Cmd5 e Cmd6; o gene da β -tubulina, bT2a e bT2b, além do LSU (*Large Subunit do rDNA*), NL1 e NL4, este último, além do ITS, também foi utilizado para identificação das leveduras (Tabela 3).

As ferramentas moleculares, especialmente o reconhecimento de espécies filogenéticas, são cada vez mais utilizadas com os espaçadores transcritos internos do nrDNA (ITS) que são aceitos como código de barras de DNA oficial para fungos (SCHOCH; SEIFERT; HUHDORF, 2012). As regiões ITS possuem alta variação

interespecífica, desse modo, são apropriadas para discriminar espécies proximamente relacionadas (CHEN et al., 2001; ROULAND-LEFEVRE et al., 2002; NILSSON et al., 2009). No entanto, este *locus* é insuficiente para identificar corretamente todas as espécies de *Aspergillus* e, portanto, foi necessário um marcador de identificação secundário, com o uso do gene da calmodulina (SAMSON et al., 2014), além da β -tubulina, distingue espécies de *Aspergillus* seção Flavi (MASSI et al., 2014), como *A. flavus*, *A. tamaraii* e *A. nomius*.

A porção 28S ou LSU (*Large Subunit*), em eucariotos, está presente em múltiplas cópias e evolui rapidamente, ou seja, é mais variável, por esse motivo, é utilizada para discriminar espécies consideradas táxons complexos do ponto de vista morfológico (FUNGARO, 2000; CHEN et al., 2001), como é o caso das leveduras.

Portanto, é inquestionável a importância da análise dos caracteres morfológicos e bioquímicos nos diversos grupos fúngicos. No entanto, a utilização de apenas dados morfológicos é um fator limitante, principalmente entre táxons evolutivamente próximos (GÓES-NETO, 2007).

Tabela 3 – Identificação dos fungos isolados de pacientes com diagnóstico de otomicose, por meio de ferramenta molecular, após o sequenciamento das regiões ITS, LSU e os genes da calmodulina e da β -tubulina, e a comparação com isolados do banco de dados.

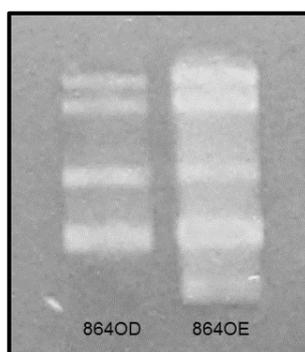
Pacientes	Registro	Isolados	Regiões/ Genes
P1	MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	ITS/ Calmodulina
P2	MM649	<i>A. flavus</i>	ITS/ Calmodulina
P3	MM661OD	<i>A. flavus</i>	ITS/ Calmodulina
	MM661OE	<i>A. flavus</i>	ITS/ Calmodulina
P4	MM674	<i>A. sydowii</i>	ITS/ Calmodulina
P5	MM699(1)	<i>A. tamaraii</i>	ITS/ Calmodulina
	MM699(2)	<i>A. tamaraii</i>	ITS/ Calmodulina
P6	MM735	<i>A. awamori</i>	ITS/ Calmodulina
P7	MM736	<i>A. niger</i>	ITS/ Calmodulina

P8	MM817F	<i>A. flavus</i>	ITS/ Calmodulina
	MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS/ LSU
P9	MM841	<i>A. sydowii</i>	ITS/ Calmodulina
P10	MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	ITS/ LSU
	MM864OE	<i>M. farinosa</i>	ITS/ LSU
P11	MM103	<i>A. fumigatus</i>	ITS/ Calmodulina
P12	MM153	<i>A. parasiticus</i>	ITS/ Calmodulina
P13	MM293	<i>A. flavus</i>	ITS/ Calmodulina/ β - tubulina
P14	MM294	<i>A. flavus</i>	ITS/ Calmodulina/ β - tubulina
P15	MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	ITS/ Calmodulina

P=pacientes;

No que diz respeito ao caso da otomicose bilateral, após a identificação dos agentes etiológicos, o teste de similaridade genética, utilizando o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), revelou que provavelmente o mesmo isolado causou infecção nos condutos auditivos direito e esquerdo (Figura 20).

Figura 20 – Imagem do resultado da amplificação da região de sequência repetida utilizando o iniciador (GTG)₅, de *Millerozyma farinosa* (864OD e 864OE) isolados de paciente com otomicose bilateral.



Aproximadamente 61 espécies de fungos diferentes, entre fungos filamentosos, leveduras, dermatófitos e *Malassezia* sp. foram identificados como agentes etiológicos da otomicose (PAKSHIR et al., 2008). Em nosso estudo, podemos observar que mesmo isolado apenas 19 espécimes, obtivemos uma diversidade grande de espécies, inclusive três espécies nunca relatadas antes causando otomicose.

Na literatura muitos autores afirmam que a espécie mais frequente que causam infecção nos condutos auditivos externos é *Aspergillus niger* (ANEJA; SHARMA; JOSHI, 2010; DESHMUKH; SURPAM; BAND, 2014; KUMAR KARN et al., 2014; NOWROZI et al., 2014; PRASAD et al., 2014). No entanto, as espécies de *Aspergillus* seção Nigri são difíceis de identificação por meio apenas da taxonomia clássica. Desta forma, não podem ser confiavelmente identificadas com base apenas em critérios morfológicos. O sequenciamento da calmodulina ou β -tubulina são imprescindíveis para identificação das espécies dentro da seção Nigri (SAMSON et al., 2007).

Além de *A. niger*, Vennewald, Schonlebe e Klemm (2003) observaram uma grande frequência em *A. fumigatus* e *A. flavus*. Outros isolados obtidos por eles foram *A. alliaceus*, *A. candidus*, *A. hollandicus*, *A. janus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. e *Rhodotorula rubra*.

Por outro lado, Adoubryn et al. (2013), na Costa de Marfim, Barati et al. (2011) no Irã, García-Agudo et al. (2011), na Espanha, relataram em seus trabalhos que o agente etiológico predominante é *A. flavus*. Assim como foi constatado em nossa pesquisa.

Na Turquia, Yenisehirli et al. (2009), afirma que o patógeno mais frequente *A. fumigatus* (40,6%), seguido de *A. niger* (35,4%), *A. flavus* (12,5%) e *C. albicans* (11,5%).

Diferente do nosso trabalho, no Brasil, Pontes et al. (2009), descrevem que a otomicose foi confirmada pela presença de *C. albicans* (30%) na maioria dos pacientes, seguido de *C. parapsilosis*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *C. tropicalis*, *Trichosporon asahii* e *S. apiospermum*. Além desses, organismos endógenos como *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Malassezia* sp. são agentes patogênicos em alguns casos de infecção (PAKSHIR et al., 2008; RAJABNIA et al., 2010).

Pesquisadores afirmam que os patógenos mais comuns desta micose são espécies de *Aspergillus* e *Candida* (GARCIA-AGUDO et al., 2011). Contudo, em nosso trabalho obtivemos o primeiro caso de infecção no conduto auditivo externo humana causada por *Millerozyma farinosa*. Uma reavaliação da filogenia das espécies produtoras de enzimas Q9 mudou o nome de *Pichia farinosa* para *Millerozyma farinosa* (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

Millerozyma farinosa foi descrita poucas vezes causando infecções. Foi observado um aumento do número de casos com *M. Farinosa* em pacientes submetidos a radioterapia para câncer de boca (PAULA et al., 1990) e uma cepa de *M. Farinosa* foi encontrada como um colonizador de cavidade oral (GARCIA-MARTOS, 1996), além disso dois outros casos de infecções humanas associadas a *M. Farinosa* foram descritos também associados ao câncer (ANAISSIE et al., 1989; ADLER, 2007).

Barnett et al. (2000), afirmam que estas leveduras já foram encontradas na cerveja, e em alimentos de arroz, na Polônia; fezes de girafa, no Japão; farinha de milho, na América do Sul; em vacas com mastite, na Suíça; no meio para cultura para vírus da febre aftosa no Reino Unido; em escarro, na Noruega; em molho de soja, na China e sendo utilizada para fermentar cacau em Trinidad, dentre outros. Entretanto, relatamos pela primeira vez *M. farinosa* obtida de amostra clínica de paciente com otomicose.

Outras duas espécies nunca relatadas causando otomicose foram *Aspergillus pseudonomius* e *A. sydowii*. Massi et al. (2014), relatando sobre a importância da exploração e comercialização da castanha no Brasil, inferiu que tal comercialização era prejudicada devido a produção de aflatoxinas por fungos *Aspergillus* da seção Flavi. Eles investigaram cepas de *Aspergillus nomius*, isolados da castanha, e utilizaram abordagens diferentes, sobretudo sequências de nucleotídeos parciais de β -tubulina e calmodulina. Os resultados mostraram que a maioria dos isolados pertencem a espécies de *A. nomius*, mas alguns foram re-identificados como *Aspergillus pseudonomius*, uma espécie recentemente descrita por Varga, Frisvad e Samson (2011).

3.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA OTOMICOSE

3.4.1 Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos frente ao polieno anfotericina B (ANFB)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos isolados frente a anfotericina B (ANFB) variaram entre 0,125 e 4 µg/ mL (Tabela 4). Dois isolados de *A. flavus* (MM661OD e MM817F) e um de *A. parasiticus* (MM153), apresentaram CIM acima de 2 µg/ mL.

Szigeti et al. (2012), constataram em seu trabalho sobre otomicose que todos isolados de *A. awamorii* e *A. tubingensis* apresentaram valores baixos da CIM *in vitro* para anfotericina B (0,5 e 1 µg/ mL), da mesma forma observados por Kaya e Kiraz (2007), assim como também foi demonstrado em nosso trabalho, no qual isolados *Aspergillus* seção Nigri obtiveram CIM=0,5 µg/ mL.

Segundo o CLSI (2008), geralmente a concentração inibitória mínima acima de 2µg/ mL de ANFB, pode estar relacionada a tratamentos sem sucesso anteriormente realizados.

Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima de anfotericina B (ANFB) frente a fungos isolados de pacientes com otomicose.

Registro	Espécies	Anfotericina B (µg/mL)
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	2
MM649	<i>A. flavus</i>	0,5
MM661OD	<i>A. flavus</i>	4
MM661OE	<i>A. flavus</i>	1
MM674	<i>A. sydowii</i>	1
MM699(1)	<i>A. tamarii</i>	0,25
MM699(2)	<i>A. tamarii</i>	0,5
MM735	<i>A.awamori</i>	0,5
MM736	<i>A.niger</i>	0,5
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	0,25
MM817F	<i>A. flavus</i>	4

MM841	<i>A. sydowii</i>	1
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	0,125
MM864OE	<i>M. farinosa</i>	0,125
MM103	<i>A. fumigatus</i>	1
MM153	<i>A. parasiticus</i>	4
MM293	<i>A. flavus</i>	1
MM294	<i>A. flavus</i>	0,5
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	1
ATCC90028	<i>C. albicans</i>	0,06

3.4.2 Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos frente aos azólicos, fluconazol (FLZ), cetoconazol (CTZ) e itraconazol (ITZ)

No teste de susceptibilidade antifúngica com FLZ, foi observado que a CIM foi de 16 a >64 µg/ mL entre os fungos filamentosos, CIM=1 µg/ mL, para *C. parapsilosis* e 8 µg/ mL, para *M. farinosa*.

Szigeti et al. (2012) relataram que todos as espécies de *Aspergillus* isolados de otomicose tiveram susceptibilidade moderada frente à FLZ e ao CTZ. No entanto, Nemati et al. (2014), afirmaram que a classe de azólicos, incluindo fluconazol e cetoconazol, é mais eficaz contra os agentes de otomicose com CIM entre 0,0625 - 32 µg/mL sem qualquer ototoxicidade. Da mesma forma, Navaneethan e YaadhavaKrishnan (2015), afirmaram a eficácia do FLZ frente aos patógenos da otite fúngica. Contudo, em nosso trabalho, constatamos que a maioria dos isolados, principalmente as espécies de *Aspergillus*, foram pouco sensíveis a resistentes ao FLZ, o que corrobora com o CLSI (2008), que afirmam que geralmente espécies de *Aspergillus* são resistentes ao FLZ e possuem CIM >64 µg/ mL.

Em nossa pesquisa, ainda podemos observar que a CIM dos isolados, frente ao CTZ variou de 0,03 a 8 µg/ mL. *Aspergillus awamori* (MM735) e *A. niger* (MM736) foram os isolados menos susceptíveis a este fármaco, apresentando CIM 8 µg/ mL. Szigeti et al. (2012), também observaram esses valores altos da CIM de 8 a 16 µg/ mL, *in vitro*, da no trabalho realizado com fungos *Aspergillus* seção Nigri.

Diferente dos outros azólicos, o ITZ demonstrou bastante eficácia quando testado nos patógenos. As CIMs variaram de 0,03 a 0,5 µg/ mL dentre os fungos filamentosos e leveduras. Rath (1998), relatou sobre *A. niger* com CIM de ITZ na faixa de 0,03-0,5 µg/ mL. No entanto, Kaya e Kiraz (2007) relataram resistência ao ITZ *in vitro* de *A. niger* causando otomicose. Dentro de outro estudo, Yenisehirli et al. (2009), reportaram que os isolados de *A. niger* exibiram CIM *in vitro* valores de ≤ 1 µg/ mL para este antifúngico. O que corrobora com nossos resultados sobre o ITZ, tanto em relação a *A. niger*, quanto aos demais isolados fúngicos. Os resultados dos nossos testes estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima de fluconazol, cetoconazol e itraconazol frente a fungos isolados de pacientes com otomicose.

Registro	Espécies	Concentração Inibitória Mínima		
		Fluconazol (µg/mL)	Cetoconazol (µg/mL)	Itraconazol (µg/mL)
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	16	4	0,25
MM649	<i>A.flavus</i>	16	1	0,06
MM661OD	<i>A.flavus</i>	16	2	0,06
MM661OE	<i>A. flavus</i>	16	1	0,06
MM674	<i>A.sydowii</i>	16	0,5	0,125
MM699(1)	<i>A.tamarii</i>	16	1	0,03
MM699(2)	<i>A.tamarii</i>	16	1	0,06
MM735	<i>A.awamori</i>	>64	8	0,06
MM736	<i>A.niger</i>	>64	8	0,25
MM817 L	<i>Candida parapsilosis</i>	1	0,03	0,03
MM817 F	<i>A.flavus</i>	>64	2	0,125
MM841	<i>A. sydowii</i>	16	2	0,5
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	8	0,03	0,03
MM864OE	<i>M.farinosa</i>	8	0,03	0,03
MM103	<i>A. fumigatus</i>	>64	4	0,125
MM153	<i>A. parasiticus</i>	>64	4	0,125

MM293	<i>A.flavus</i>	16	2	0,06
MM294	<i>A.flavus</i>	16	2	0,125
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	>64	0,5	0,125
ATCC90028	<i>C.albicans</i>	4	0,03	0,03

3.4.3 Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos frente as hidroxipiridonas: Ciclopirox olamina (CPO) e octopirox olamina (OPO)

Nos testes realizados com ciclopirox olamina, observamos que dentre os isolados de fungos filamentosos, a concentração inibitória mínima (CIM) variou entre 0,5 a 16 µg/ mL. Apenas isolado de *A. pseudonomius* apresentou CIM 16 µg/ mL, *A. tamarii* (MM699(1) e MM699(2), e *A. flavus* (MM817F) tiveram CIM 8 µg/ mL. Entre as leveduras a CIM foi de 0,03 a 0,25 µg/ mL.

A Concentração Inibitória Mínima de ciclopirox olamina utilizados contra dermatófitos e leveduras patogênicas encontradas por Dittmar et al. (1981), mostraram grande uniformidade nas concentrações mínimas de inibição, variando de 0,98 a 3,9 µg/ mL.

Em 2002, Del Palacio et al. já relatavam sobre a eficiência da CPO no tratamento da otomicose. No entanto, ainda hoje, o CLSI reporta CIM apenas para fungos dermatófitos. Contudo, em outros estudos exibem a eficácia deste fármaco em relação a fungos filamentosos não-dermatófitos e leveduras (SUBISSI et al. 2010). Oliveira et al. (2010), em trabalho sobre tratamento *in vivo* de cryptococose utilizaram CPO como alternativa e obtiveram a CIM 0,25 a 1 µg/mL dentre os isolados de *Cryptococcus* sp.

Ali Esfandiary et al. (2015), isolaram espécies de *Candida* (44) de pacientes com candidíase vulvovaginal, e na avaliação da susceptibilidade antifúngica utilizando Ciclopirox olamina (CPO) obtiveram que em em 42 dos 44 isolados a CIM foi de 8 µg/ml, que incluem *C. glabrata* (29), *C. kefyr* (8 isolados), *C. krusei* (3) e *C. parapsilosis* (2); e para os 2 isolados de *C. Kefyr*, a CIM de CPO foi 4 µg / mL. Eles afirmaram que a CPO poderia ser uma alternativa terapêutica no tratamento da micose, apesar de os valores no presente estudo serem consideravelmente altas (8µg/ mL), da mesma forma que obtivemos em nossa pesquisa.

Assim, diante dos nossos dados, podemos verificar uma diminuição da sensibilidade do CPO frente a alguns isolados de pacientes com otite fúngica, como observado em *Aspergillus pseudonomius* (MM628), *A. tamaritii* (MM699(1) e MM699(2) e *A. flavus* (MM817F e MM293). Esta constatação é de grande relevância, uma vez que a maioria dos isolados menos sensíveis ao CPO, é pertencente a *Aspergillus* seção Flavi, grupo a que foi pertencente a maioria dos nossos isolados de casos de otite fúngica.

Outra hidroxipiridona é o octopirox olamina (OPO). Os isolados de fungos filamentosos foram mais sensíveis ao OCO do que a CPO, na qual a CIM variou de 0,5 a 4 µg/ mL. Já entre as leveduras, 0,03 a 0,25 µg/ mL, semelhante ao que apresentou as leveduras frente ao ciclopirox olamina. Portanto, os fungos filamentosos foram mais susceptíveis ao OPO, como mostra na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima de ciclopirox olamina e octopirox olamina frente aos fungos isolados de pacientes com otomicose.

Registro	Espécies	Concentração Inibitória Mínima	
		Ciclopirox olamina (µg/mL)	Octopirox olamina (µg/mL)
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	16	4
MM649	<i>A. flavus</i>	2	0,5
MM661OD	<i>A. flavus</i>	4	2
MM661OE	<i>A. flavus</i>	4	2
MM674	<i>A. sydowii</i>	1	0,5
MM699(1)	<i>A. tamaritii</i>	8	4
MM699(2)	<i>A. tamaritii</i>	8	2
MM735	<i>A. awamori</i>	2	2
MM736	<i>A. niger</i>	1	1
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	0,25	0,25
MM817F	<i>A. flavus</i>	8	2
MM841	<i>A. sydowii</i>	1	0,5

MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	0,03	0,03
MM864OE	<i>M. farinosa</i>	0,125	0,125
MM103	<i>A. fumigatus</i>	1	2
MM153	<i>A. parasiticus</i>	4	4
MM293	<i>A. flavus</i>	8	4
MM294	<i>A. flavus</i>	4	2
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	0,5	1
ATCC90028	<i>C. albicans</i>	0,5	0,25

3.4.4 Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos da otomicose frente a derivados de 2 (5-nitro-tiofeno) – tiossemicarbazonas

Em nossa pesquisa as concentrações de L-3 inibiram o crescimento fúngico nas concentrações de 4 a 1024 µg/ mL, sendo as menores concentrações observadas em *A.s sydowii* (MM674) (4 µg/ mL e 16 µg/ mL), *C. parapsilosis* (MM817L) (32 µg/ mL), *M. farinosa* (MM864OD) (16 µg/ mL).

As inibições em L-8, ocorreram entre 2 a 256 µg/ mL, sendo as menores concentrações obtidas em *M. farinosa* (MM864OE e MM864OD) (2 µg/ mL e 4 µg/ mL), *A. sydowii* (MM674 e MM841) (2 µg/ mL e 8 µg/ mL), *C. parapsilosis* (MM817L) (16 µg/ mL), *A. niger* (MM736) (32 µg/ mL).

As inibições demonstradas por L-9, foram de 2 a 512 µg/ mL. *A. sydowii* (MM674 e MM841) (2 µg/ mL e 16 µg/ mL), *C. parapsilosis* (MM817L) (8 µg/ mL) e *M. farinosa* (MM864OE e MM864OD) (2 µg/ mL e 4 µg/ mL), foram os isolados mais sensíveis a este composto. Nossos resultados estão descritos na tabela 7.

Carradori et al. (2016), analisando dois compostos bioativos de estigmas *Crocus sativus* L., Crocin 1 e safranal (2), e sete derivados semi-sintéticos de Safranal (3,4,5,6,7,8 e 9). Os nove compostos foram testados frente a cepas de *C. albicans*. Apenas safranal (2) e 5 (derivado de tiossemicarbazona de safranal) foram ativos contra *C. albicans* com valores de CIM de 1 mg/mL, enquanto que os outros compostos (crocin 1, 3, 4, 6, 7, 8 e 9) mostraram valores de CIM > 8 mg/mL. Valores semelhantes a CIM para atividade fungicida (MFC) foi reportado (CIM safranal = 4 mg/mL e CIM composto 5 = 1 mg/mL). Também foi observado um efeito sinérgico

quando usado em combinação do safranal com o derivado 5, e concluíram que algumas modificações químicas renderam compostos mais potentes e promissores.

Sun et al. (2017), identificaram uma tiossemicarbazona (NSC319726) a qual possuía uma piridina (anel aromático com nitrogênio) que apresentou ampla atividade antifúngica contra fungos patogênicos, incluindo espécies de *Candida*, *A.fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* na faixa de 0,1 a 2,0µg/ml. A molécula também inibiu isolados *Candida* sp. resistentes ao fluconazol. A sinergia entre a molécula e o fluconazol também foi observada, bem como com caspofungina

Araújo Neto et al. (2017), constataram nas suas pesquisas que a presença de dois anéis aromáticos fundidos na molécula L-3 (naftil) reduziu a atividade fungicida deste composto contra *C. parapsilosis* URM 7048 (16,0 µg /mL), quando comparado a atividade de outro composto sintetizado por eles que possui um anel aromático com nitrogênio. Os compostos L9 e L8, os quais apresentavam um anel aromático e diferenciavam apenas na posição de um carbono, apresentaram excelentes atividades antifúngicas indicadas pelos valores de CFM de 4,0 µg/ mL a L-9 e 8,0 µg/ mL a L-8 para *C. parapsilosis* URM 7048. A concentração inibitória mínima por esta espécie foi menor do que a encontrada em nossos estudos utilizando as mesmas moléculas. No entanto, obtivemos em nossa pesquisa que em outras espécies, não testadas por eles, a concentração que inibiu o crescimento foi bem menor do que as concentrações encontradas por eles como, *A. sydowii* MM674 e *M. farinosa* MM864OE, inibiram o crescimento com concentração de 2 µg/ mL, em L-8 e L-9, o que torna necessário mais avaliações de mais espécies fúngicas com estas moléculas.

Tabela 7 – Menor concentração de derivados do tiossemicarbazonas capaz de inibir o crescimento de fungos isolados de paciente com otite externa fúngica.

Registro	Espécies	Concentração Inibitória Mínima		
		L-3 (µg/mL)	L-8 (µg/mL)	L-9 (µg/mL)
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	256	128	256
MM649	<i>A. flavus</i>	256	128	256
MM661OD	<i>A. flavus</i>	256	256	256
MM661OE	<i>A. flavus</i>	256	256	512
MM674	<i>A. sydowii</i>	4	2	2

MM699(1)	<i>A. tamarii</i>	256	128	256
MM699(2)	<i>A. tamarii</i>	256	256	512
MM735	<i>A. awamori</i>	128	64	64
MM736	<i>A. niger</i>	128	32	64
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	32	16	8
MM817F	<i>A. flavus</i>	256	64	256
MM841	<i>A. sydowii</i>	16	8	16
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	16	4	4
MM864OE	<i>M. farinosa</i>	64	2	2
MM103	<i>A. fumigatus</i>	512	128	128
MM153	<i>A. parasiticus</i>	256	128	128
MM293	<i>A. flavus</i>	256	128	512
MM294	<i>A. flavus</i>	256	64	512
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	1024	128	256
ATCC90028	<i>C. albicans</i>	64	32	16

3.4.5 Perfil de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos da otomicose frente ao D-limoneno

As menores concentrações do D-limoneno sobre os fungos isolados de pacientes com otomicose, variaram de 32 a 1024 µg/ mL. Apenas os isolados *A. flavus* (MM649, MM293 e MM294) e *A. sydowii* (MM674), tiveram a concentração de inibição superior a concentração do óleo que utilizamos em nossa pesquisa (Tabela 8).

Segundo Formolo (2009), óleos com alta concentração de carvona/ cariofileno e limoneno foram particularmente eficientes sobre leveduras. Contudo, no nosso estudo o D-limoneno teve atividade tanto sobre leveduras quando sobre fungos filamentosos. Outros autores observaram a atividade antifúngica do limoneno em diversos grupos de fungos.

Tampieri et al., (2005), analisando a composição do óleo essencial de *Citrus limon* (limão), verificaram que o óleo possui atividade antifúngica, e ainda descreveram que existem mais de 40 constituintes neste óleo, sendo o mais comum

o limoneno (62,9%). Eles concordaram que estes numerosos componentes podem atuar de maneira isolada ou em associação, sendo responsáveis por sua maior ou menor atividade biológica (FERHAT et al., 2007; Iota et al., 2002). Contudo, esta complexa composição do óleo essencial mascara as ricas propriedades de cada um dos seus fitocomponentes (SOUZA et al., 2005; TAMPIERI, et al., 2005). Sua ação antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida*, foi comprovada em estudo com pacientes HIV positivo (WRIGHT et al., 2009).

Almeida et al. (2015) observaram que o óleo essencial da casca da laranja inibiu 16,7% do crescimento fúngico, quando analisavam, *in vitro*, agentes causadores de diversas doenças em plantas como a ferrugem do café (*Hemileia Vastatrix*), requeima da batata (*Phytophthora infestans*), pinta preta dos citros (*Guignardia Citricarpa*), além de serem responsáveis por várias doenças humanas como as micoses na pele e mucosas, diversos problemas respiratórios. Da mesma forma, Nunez et al. (2016), trabalhando com óleos essenciais, observaram que o óleo essencial que tinha predominância de limoneno (42,27%), possuía alta atividade antibacteriana contra *Corynebacterium glutamicum*.

Viriato (2012) avaliou a atividade antifúngica de 15 terpenóides frente a espécies de *Candida* causadoras de infecções hospitalares. O autor constatou que os resultados mais promissores foram obtidos com o terpenoide D-Limoneno com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Para *C. albicans* e *C. parapsilosis* relatou CIM 375 µg/mL.

Freire et al. (2017), analisaram a atividade antifúngica de citral, selecionada pela triagem de produtos naturais contra isolados de *Candida albicans* de indivíduos que utilizam próteses dentárias. Semelhante aos nossos estudos, estes pesquisadores obtiveram a CIM 256 µg/mL do fitoconstituente limoneno para *C. albicans*. Ainda encontramos este mesmo valor para *A. fumigatus* (MM103) e *A. awamori* (MM735) e valores menores para *A. flavus* (MM817F), *Milleromyza farinosa* (MM864OD e 864OE) e *T. funiculosus* (MM417).

Padhan, Pattnaik e Behera (2017), em outra pesquisa, analisando a atividade de do óleo essencial de *Acmella* e seu componente isolado D-Limoneno contra *Trichophyton rubrum*. Os compostos exibiram ação fungistática e fungicida. Os valores da CIM da *Acmella* e do limoneno contra este dermatófito foi de 1 µ/mL (V/V) e 2 µg/mL (V/V), respectivamente. No entanto, os valores mais elevados de CIM (4 e 6 µg/mL) foram determinados como concentrações fungicidas.

O limoneno, presente em 57,5% da composição do óleo essencial de *Thapsia villosa* (Apiaceae) isolada por hidrodestilação das partes aéreas da planta, segundo Pinto et al (2017). Além da atividade antifúngica do óleo essencial, eles avaliaram os seus principais componentes, dentre eles, o limoneno. Leveduras clinicamente relevantes (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia furfur*) e fungos filamentosos (*Aspergillus* spp. e dermatófitos). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram medidas de acordo com os protocolos de macrodiluição de caldo pelo Instituto de Normas Clínicas e de Laboratório (CLSI). Tanto o óleo essencial, como o limoneno apresentaram valores baixos de CIM e CFM (concentração fungicida mínima) contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus* spp. Os autores concluem afirmando que as atividades fungistáticas e fungicidas reveladas pelo óleo essencial de *T. villosa* e seus principais compostos, associados à sua baixa atividade hemolítica, confirmam seu potencial interesse antimicrobiano contra espécies de fungos frequentemente associadas a micoses humanas.

Tabela 8 – Menor concentração de D-limoneno (OL7) capaz de inibir o crescimento de fungos isolados de paciente com otite externa fúngica.

Registro	Espécies	Limoneno (µg/mL)
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	1024
MM649	<i>A. flavus</i>	>1024
MM661OD	<i>A. flavus</i>	1024
MM661OE	<i>A. flavus</i>	512
MM674	<i>A. sydowii</i>	>1024
MM699(1)	<i>A. tamarii</i>	1024
MM699(2)	<i>A. tamarii</i>	1024
MM735	<i>A. awamori</i>	256
MM736	<i>A. niger</i>	512
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	1024
MM817F	<i>A. flavus</i>	128
MM841	<i>A. sydowii</i>	1024

MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	32
MM864OE	<i>M. farinosa</i>	64
MM103	<i>A.fumigatus</i>	256
MM153	<i>A.parasiticus</i>	512
MM293	<i>A. flavus</i>	>1024
MM294	<i>A.flavus</i>	>1024
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	128
ATCC90028	<i>C. albicans</i>	256

3.5 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO DOS AGENTES ANTIFÚNGICOS COM O D-LIMONENO

Para investigar o sinergismo *in vitro* de cetoconazol (CTZ), ciclopirox olamina (CPO), octopirox olamina com o D-limoneno (OL7), aplicamos a técnica do tabuleiro de xadrez para o ensaio para obter a Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), segundo Odds (2003).

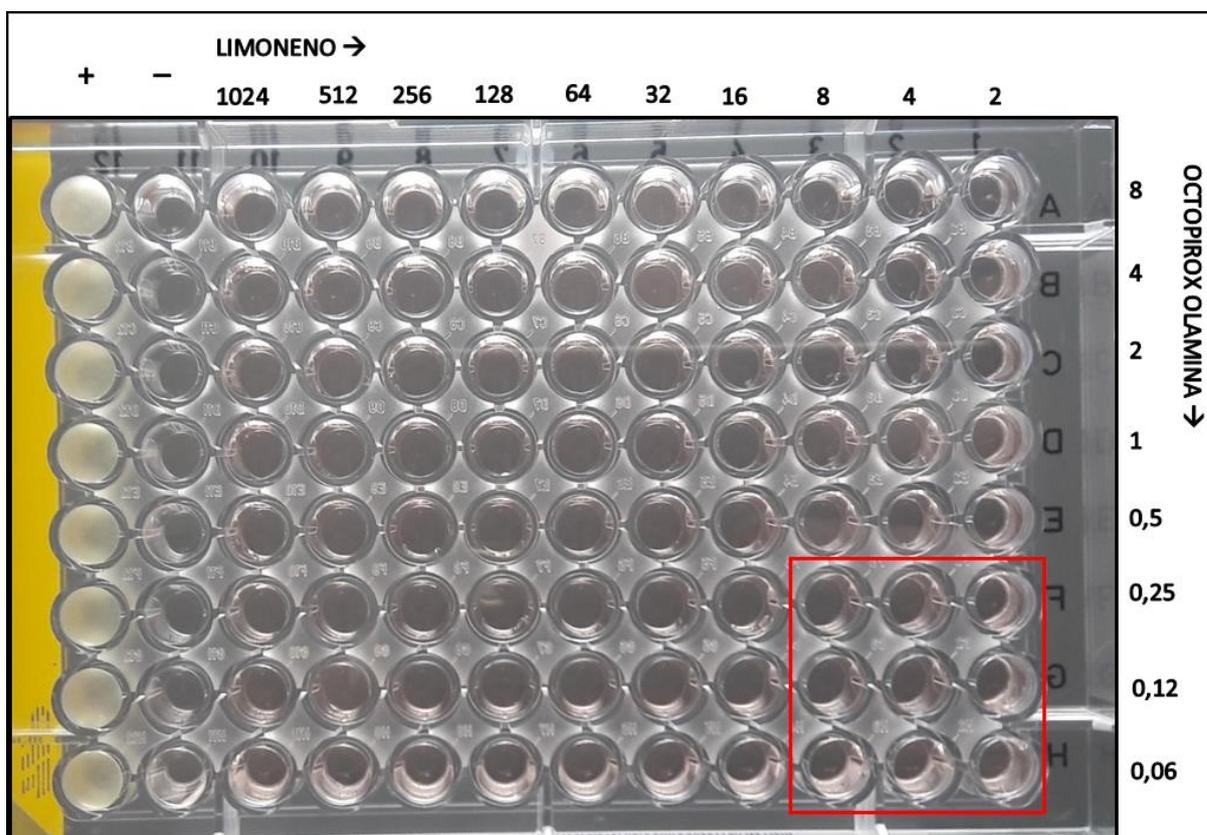
O cetoconazol juntamente com o D-limoneno não apresentou ação sinérgica sobre os fungos isolados de pacientes com otite externa fúngica. Entretanto demonstraram atividade aditiva em quatro (20%) isolados, *A.niger* (MM736), *C. parapsilosis* (MM817L) e *M. farinosa* (MM864OD e MM864OE); 14 (70%) reações indiferentes e duas (10%), antagônicas em *T. funiculosus* (MM841) e *C. albicans* ATCC90028 (Tabela 9).

Já a associação do D-limoneno com ciclopirox olamina não exibiu efeito sinérgico e nem ação aditiva. Apresentaram 19 (95%) interações indiferentes e uma (5%) antagônica (Tabela 10).

No entanto, quando testamos o octopirox olamina (OPO) com o D-limoneno, verificamos quatro (20%) casos de interações sinérgicas, envolvendo as espécies *A. awamori* (MM735), *A. flavus* (MM661OE) (Figura 21), *A. fumigatus* (MM103) e um isolado de *M. farinosa* (MM864OD). O efeito sinérgico entre o octopirox olamina e D-limoneno, o qual demonstrou que a CIM de OCO sozinho contra *A. awamori* (MM735), *A. flavus* (MM661OE), *A. fumigatus* (MM103) foi reduzida de 2 µg/mL para 0,06 µg/mL, quando o óleo essencial foi adicionado na concentração de 256 µg/mL; enquanto que

em *M. farinosa* (MM864OD), a concentração foi reduzida de 0,25 µg/mL para 0,015 µg/mL, quando adicionado 32 µg/mL e limoneno. Além disso, também foram verificados dois casos (10%) de ação aditiva, envolvendo os isolados *A. niger* (MM736) e *A. sydowii* (MM841); 14 (70%), isolados indiferentes. Não houve ação antagônica (Tabela 11).

Figura 21 – Teste de sensibilidade antifúngica utilizando o método tabuleiro de xadrez demonstrando interação entre octopirox olamina (0,06-8 µg/ mL) e o limoneno (2-1024 µg/ mL) indicando sinergismo $FIC \leq 0,5$ em *Aspergillus flavus* (MM661OE).



(+) controle positivo/ crescimento fúngico; (-) controle negativo/ sem crescimento fúngico.

Em 2010, por Mahboubi e Ghazian Bidgoli, avaliando a atividade antifúngica do óleo essencial de *Myrtus communis*, no qual o principal fitoconstituente é o limoneno, demonstraram que houve atividade antifúngica contra oito isolados clínicos de *C. albicans*, *C. albicans* ATCC10231), *A. niger* ATCC 16404, *A. parasiticus* ATCC 15517, *A. flavus* (6) utilizando ensaio de micro diluição de caldo. Os isolados fúngicos exibiram valores CIM da anfotericina B foram 1 a 2 µg/mL para *C. albicans* e 4-8 µg/mL para *Aspergillus* sp. A CIM exibida pelo óleo de mirtilo sobre os isolados variaram em 8 e 16 µg/mL Os pesquisadores concluíram que o óleo era bastante ativo contra

fungos nessas concentrações. Além disso, eles avaliaram o efeito sinérgico entre o óleo essencial e a anfotericina B, o qual demonstrou que a CIM de anfotericina B sozinha contra *C. albicans* foi reduzida de dois a 0,06 µg/mL quando o óleo essencial foi adicionado em concentração de 4 µg/mL. O FIC do óleo de mirtilo em combinação com a anfotericina B contra *C. albicans* 10231 foi de 0,25 µg/mL e 0,03 µg/mL para anfotericina B. O FIC do óleo de mirto em combinação com anfotericina B contra *A. niger* foi de 0,25 µg/mL e 0,015 µg/mL para anfotericina B. O índice FIC mostrou sinergia marcada da combinação de óleo e anfotericina B contra *C. albicans* e *A. niger*.

Pinto et al (2017), avaliando o óleo essencial de *Thapsia villosa* (Apiaceae) e o limoneno presente na composição, afirmam que o ambos possuem atividade antifúngica. Ainda avaliam a associação de fluconazol juntamente com óleo de *T. villosa*, que não mostra antagonismo, mas a combinação de limoneno/ fluconazol exibe sinergismo frente às leveduras clinicamente relevantes (*Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia furfur*) e fungos filamentosos (*Aspergillus* spp. e dermatófitos). Como azóis são conhecidos por selecionar resistência entre isolados e espécies, compostos que sinergizam com estes antifúngicos podem ser úteis ao prolongar a sua vida útil.

Há alguns estudos sobre a ação sinérgica do D-limoneno. No entanto, é a primeira vez que são avaliados efeitos sinérgicos utilizando cetoconazol, ciclopirox olamina e octopirox olamina com o D-limoneno sobre fungos isolados de pacientes com otomicose. Portanto, estes resultados sugerem que a atividade do octopirox olamina juntamente com o D-limoneno seja uma alternativa terapêutica para o tratamento de pacientes com otite externa fúngica.

Tabela 9 – Comparação entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), *in vitro*, dos isolados frente ao cetoconazol e ao D-limoneno (OL7) sobre a redução da população de fungos isolados de pacientes com otomicose.

Registro	Cepas	*CTZ (µg/ mL)	*OL7 (µg/ mL)	**CTZ (µg/ mL)	**OL7 (µg/ mL)	FIC	R
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	8	1024	8	1024	2	In
MM649	<i>A. flavus</i>	2	>1024	0.5	1024	1,25	In
MM661OD	<i>A.flavus</i>	4	1024	0.25	>1024	1,06	In
MM661OE	<i>A.flavus</i>	2	512	0.5	1024	2,25	In

MM674	<i>A.sydowii</i>	1	>1024	0.5	>1024	1,5	In
MM699(1)	<i>A.tamarii</i>	2	1024	0.25	1024	1,125	In
MM699(2)	<i>A.tamarii</i>	2	1024	0.5	1024	1,25	In
MM735	<i>A.awamori</i>	16	256	4	256	1,25	In
MM736	<i>A.niger</i>	16	512	4	256	0,75	Ad
MM817F	<i>A.flavus</i>	4	1024	0.5	>1024	1,125	In
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	0.03	128	0.015	2	0,51	Ad
MM841	<i>A. sydowii</i>	4	1024	1	1024	1,25	In
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	0.03	32	0.015	2	0,56	Ad
MM864OE	<i>M.farinosa</i>	0.03	64	0.015	2	0,53	Ad
MM103	<i>A.fumigatus</i>	4	256	2	512	2,5	In
MM153	<i>A.parasiticus</i>	8	512	1	512	1,125	In
MM293	<i>A.flavus</i>	4	>1024	1	>1024	1,25	In
MM294	<i>A.flavus</i>	4	>1024	0.5	>1024	1,125	In
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	1	128	0.25	1024	8,25	An
ATCC90028	<i>C.albicans</i>	0,03	256	2	256	68	An

CTZ = cetoconazol; OL7 = D-limoneno; (*) Substâncias testadas separadas; (**) Substâncias testadas juntas; FIC≤0,5= sinérgico; 1>FIC>0,5= aditivo; 4>FIC≥1= indiferente; FIC≥4= antagônico. Ad=Aditivo; In= Indiferente; An=Antagônico; R=interpretação.

Tabela 10 - Comparação entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), *in vitro*, dos isolados frente ao ciclopirox olamina e ao D-limoneno sobre a redução da população de fungos isolados de pacientes com otomicose.

Registro	Cepas	*CPO (µg/ mL)	*OL7 (µg/ mL)	**CPO (µg/ mL)	**OL7 (µg/ mL)	FIC	R
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	16	1024	16	>1024	2	In
MM649	<i>A.flavus</i>	2	>1024	4	>1024	3	In
MM661OD	<i>A.flavus</i>	4	1024	2	>1024	1,5	In
MM661OE	<i>A.flavus</i>	4	512	2	1024	2,5	In
MM674	<i>A.sydowii</i>	1	>1024	2	1024	3	In

MM699(1)	<i>A.tamarii</i>	8	1024	8	>1024	2	In
MM699(2)	<i>A.tamarii</i>	8	1024	8	>1024	2	In
MM735	<i>A.Awamori</i>	2	256	0.5	256	1,25	In
MM736	<i>A.niger</i>	1	512	0.5	256	1	In
MM817F	<i>A.flavus</i>	8	1024	8	>1024	2	In
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	0.25	128	0.25	256	2,5	In
MM841	<i>A.sydowii</i>	1	1024	2	512	2,5	In
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	0.03	32	0.125	64	6,16	An
MM864OE	<i>M.farinosa</i>	0.125	64	0.125	64	3	In
MM103	<i>A.fumigatus</i>	1	256	0.125	512	2,125	In
MM153	<i>A.parasiticus</i>	4	512	8	1024	4	An
MM293	<i>A.flavus</i>	8	>1024	4	>1024	1,5	In
MM294	<i>A.flavus</i>	4	>1024	4	1024	2	In
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	0.5	128	1	256	4	An
ATCC90028	<i>C. albicans</i>	0,5	256	0,25	512	2,5	In

CPO = ciclopirox olamina; OL7 = D-limoneno; (*) Substâncias testadas separadas; (**) Substâncias testadas juntas; FIC≤0,5= sinérgico; 1>FIC>0,5= aditivo; 4>FIC≥1= indiferente; FIC≥4= antagônico. In= Indiferente; An=Antagônico; R=interpretação.

Tabela 11 - Comparação entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fraccionada (FIC), *in vitro*, dos isolados frente ao octopirox olamina e ao D-limoneno sobre a redução da população de fungos isolados de pacientes com otomicose.

Registro	Cepas	*OPO (µg/ mL)	*OL7 (µg/ mL)	**OPO (µg/ mL)	**OL7 (µg/ mL)	FIC	R
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	4	1024	2	>1024	1,5	In
MM649	<i>A.flavus</i>	0.5	>1024	0.25	1024	1,5	In
MM661OD	<i>A.flavus</i>	2	1024	0.25	1024	1,125	In
MM661OE	<i>A.flavus</i>	2	512	<0.06	<2	0,033	Sn
MM674	<i>A.sydowii</i>	0.5	>1024	0.25	1024	1,5	In
MM699(1)	<i>A.tamarii</i>	4	1024	0.5	1024	1,125	In

MM699(2)	<i>A.tamaritii</i>	2	1024	0.5	>1024	1,25	In
MM735	<i>A.awamori</i>	2	256	0.06	2	0,037	Sn
MM736	<i>A.niger</i>	1	512	0.25	256	0,75	Ad
MM817F	<i>A.flavus</i>	2	1024	1	1024	1,5	In
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	0.25	128	0.06	256	2,24	In
MM841	<i>A.sydwowii</i>	0.5	1024	0.25	256	0,75	Ad
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	0.25	32	0.015	2	0,122	Sn
MM864OE	<i>M.farinosa</i>	0.125	64	0.03	64	1,24	In
MM103	<i>A.fumigatus</i>	2	256	0.06	2	0,037	Sn
MM153	<i>A.parasiticus</i>	4	512	1	1024	2,25	In
MM293	<i>A. flavus</i>	4	>1024	1	>1024	1,25	In
MM294	<i>A.flavus</i>	2	>1024	0.25	1024	1,125	In
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	1	128	0.25	256	2,25	In
ATCC90028	<i>C.albicans</i>	0,25	256	0,06	512	2,24	In

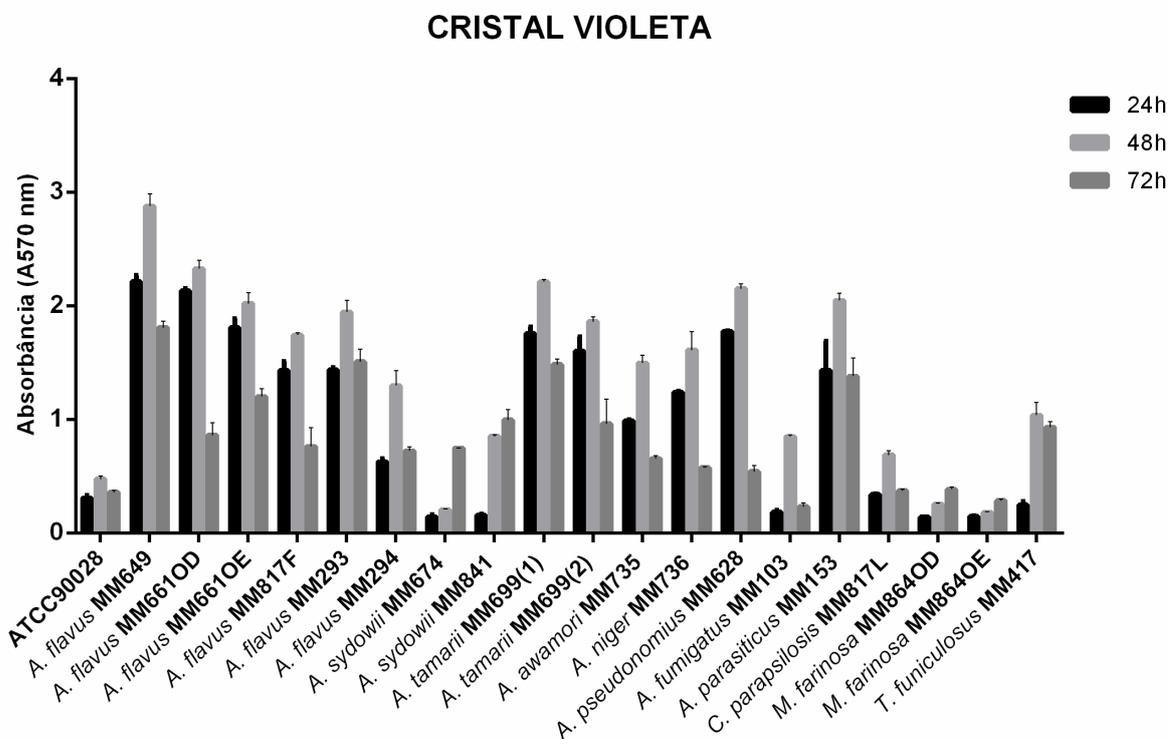
OPO = octopirox olamina; OL7 = D-limoneno; (*) Substâncias testadas separadas; (**) Substâncias testadas juntas; FIC \leq 0,5= sinérgico; 1>FIC>0,5= aditivo; 4>FIC \geq 1= indiferente; FIC \geq 4= antagônico. Sn= Sinérgico; Ad=Aditivo; In=Indiferente; R=interpretação.

3.6 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR FUNGOS ISOLADOS DE PACIENTES COM OTITE FÚNGICA

Os biofilmes dos isolados foram quantificados nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com duas metodologias diferentes: o ensaio com Cristal Violeta, que mede a quantidade de biomassa total do biofilme e o ensaio MTT, que mede a atividade metabólica do biofilme.

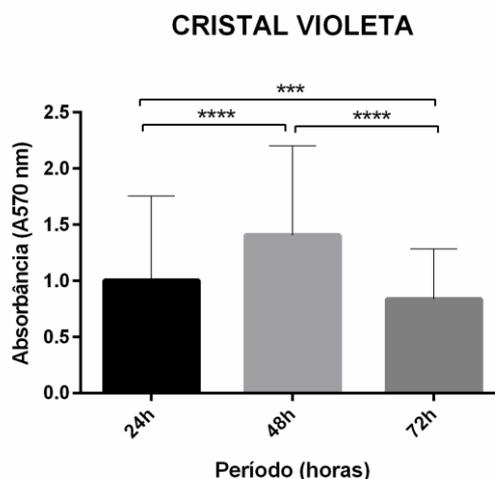
Todos os isolados testados foram capazes de produzir biofilmes nos três tempos com diferenças significativas entre os tempos de crescimento. Em relação a obtenção do biofilme pelo método colorimétrico com cristal violeta (CV), todos os isolados produziram maior quantidade de biomassa com 48 horas de crescimento, exceto *A. sydowii* (MM674 e MM841) e *M. farinosa* (864OD e 864OE), que obtiveram maior quantidade de biomassa com 72h (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Os dados representam a média e o desvio padrão (SD) da absorvância (OD570) do Cristal violeta durante a produção de biofilme por espécies de *Aspergillus*, *Candida parapsilosis*, *Millerozyma farinosa*, *Talaromyces funiculosus* e o controle de *Canidida albicans* ATCC90028 (*C. abicans*) com três repetições, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as medias obtidas com nível de significância de 5%.



Da mesma forma, foi observado na comparação das médias entre os três tempos, nos quais houve diferença significativa (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Relação das médias da formação de biofilme nos tempos 24, 48 e 72 horas, quanto a quantidade de biomassa, evidenciando diferença significativa entre 24h/48h e 48h/72h ($P \leq 0.0001$) e 24h/72h ($P \leq 0.001$).

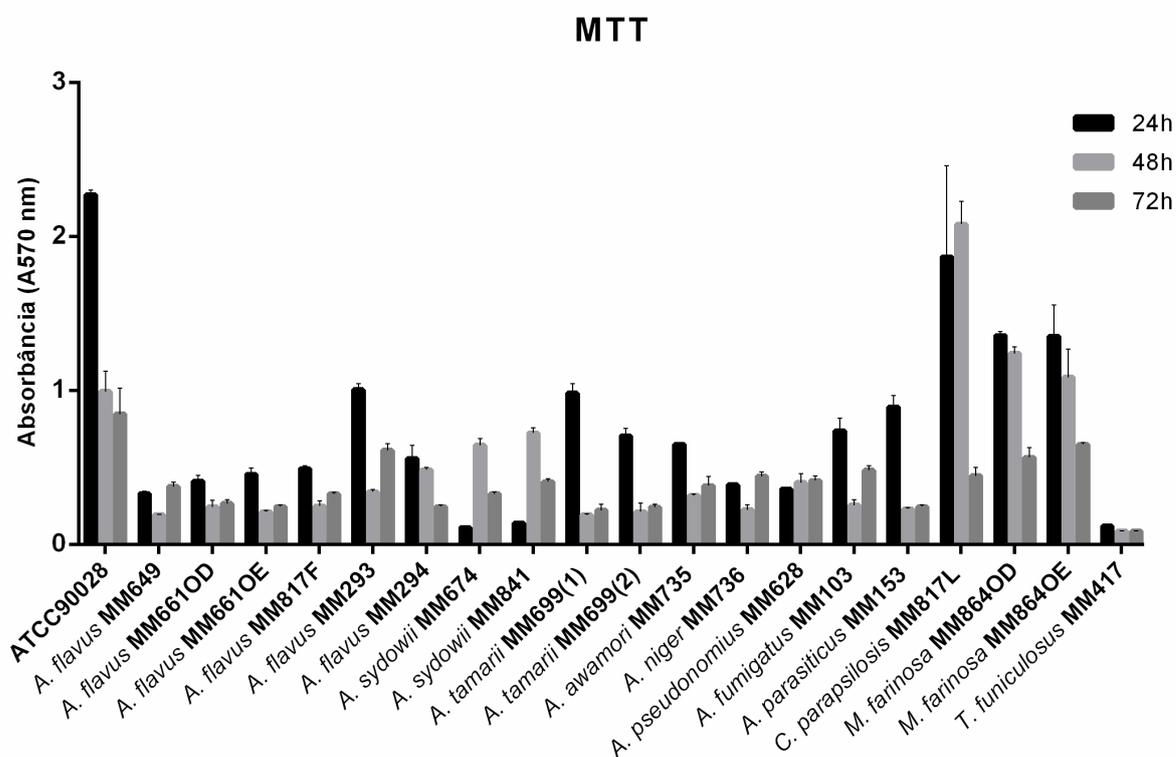


(***) $P \leq 0.001$; (****) $P \leq 0.0001$;

Devido ao fato que ensaio de formação de biofilme utilizando o CV quantificar apenas a biomassa, foram realizadas as análises de quantificação da atividade metabólica pelo ensaio colorimétrico de redução de sais de tetrazólio, por 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl) -2,5- Diphenyl-2HTetrazolium bromide (MTT). O teste do MTT é usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

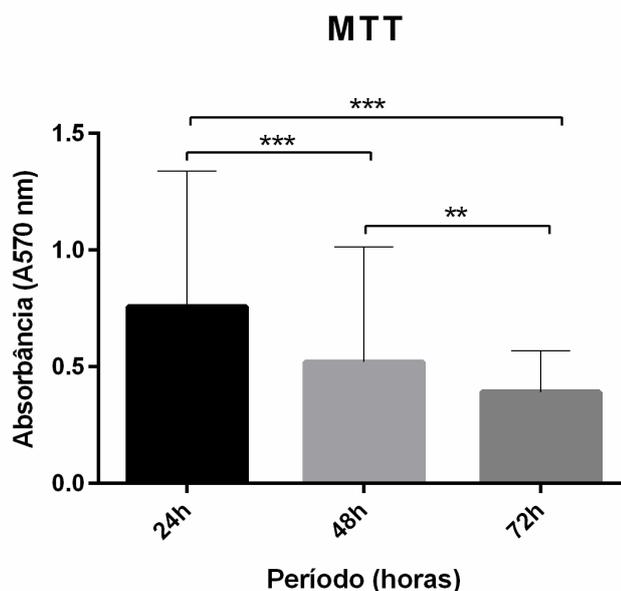
Quando nos referimos ao método colorimétrico MTT, nossos resultados demonstraram que a atividade metabólica dos isolados foi maior com 24h de crescimento em quase todos os isolados, exceto com *A. sydowii* (MM674 e MM841), que a maior atividade metabólica foi observada com 48 horas de crescimento (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Os dados representam a média e o desvio padrão (SD) da absorbância (OD570) do MTT durante a produção de biofilme por espécies de *Aspergillus*, *Candida parapsilosis*, *Millerozyma farinosa*, *Talaromyces funiculosus* e o controle de *Canidida albicans* ATCC90028 (*C. abicans*) com três repetições, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as medias obtidas com nível de significância de 5%.



No gráfico 4, observamos que houve diferença significativa entre os três tempos em relação ao metabolismo do biofilme detectado pelo método MTT, de acordo com o teste estatístico.

Gráfico 4 – Relação das médias da formação de biofilme nos tempos 24, 48 e 72 horas, quanto a atividade metabólica, evidenciando diferença significativa entre 24h/48h e 48h/72h ($P \leq 0.001$) e 24h/72h ($P \leq 0.01$).



(**) $P \leq 0.01$; (***) $P \leq 0.001$

Segundo Mowat et al. (2007), *A. fumigatus* tem a capacidade de formar estruturas multicelulares de biofilme em uma maior quantidade em 48 horas. O mesmo foi achado em nossa pesquisa, tanto para *A. fumigatus*, quanto para os outros isolados obtidos por nós. Ele ainda afirma que após esse tempo, a quantidade de biomassa estabilizou. O que diferiu dos nossos resultados, uma vez houve uma diminuição na quantidade de biofilme no tempo de 72 horas.

Da mesma forma, Kirchhoff et al. (2017), em outro trabalho, analisando biofilmes de *Exophiala dermatitidis*, demonstraram, baseado em violeta de cristal (CV), que todos os isolados conseguiram formar biofilme. Os pesquisadores, assim como na nossa pesquisa, e na de Mowat et al. (2007), também observaram que a quantidade de biomassa no biofilme de 48 horas maior do que com 24 horas ($P = 0,0098$). Estes pesquisadores também fizeram uma comparação da atividade metabólica, detectada pelo ensaio XTT e da biomassa, detectada por coloração CV, e provaram que a atividade metabólica do biofilme de *E. dermatitidis* não está

associada linearmente à biomassa envolvida no biofilme. Eles concluíram que o ensaio com XTT e a coloração com CV são complementares, pois a coloração CV detecta biomassa no biofilme e o ensaio XTT, assim como o MTT, detecta a atividade metabólica (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014).

Silva-Dias et al. (2015), analisando a formação de biofilme de espécies de *Candida*, por meio de ensaio com cristal violeta, relataram que a quantidade de biomassa obtida por *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram maiores com 48h, semelhante a nossos achados. Contudo, para eles a atividade metabólica destes isolados são maiores também com 48h, enquanto, em nossos resultados, *C. albicans* teve maior atividade metabólica com 24h, decaindo bastante em 48h. Eles também afirmaram que *C. parapsilosis* foi quem teve menor atividade metabólica, o que também difere de nosso trabalho. Eles ainda complementam que espécies que são formadores de biofilme mais rapidamente, indicam que o biofilme se torna completamente estabelecido nas primeiras 24 h.

3.6.1 Avaliação do tratamento do biofilme frente a cetoconazol, octopirox olamina e D-limoneno

Em nossas pesquisas também avaliamos a atividade de cetoconazol, octopirox olamina e D-limoneno contra biofilmes maduros ao longo de 48 h a 35 °C. Os fármacos e o D-limoneno foram adicionados após dois dias de formação de biofilme. O cetoconazol e octopirox olamina apresentaram atividade sobre o biofilme nas concentrações de 8 a 32 µg/ mL, e o limoneno, 256 a 2048 µg/ mL (Tabela 12).

Frente ao cetoconazol, octopirox olamina e ao D-limoneno, todos biofilmes dos isolados apresentaram inibição de crescimento em um valor superior a CIM das células planctônicas correlacionadas.

Sherry et al. (2017), analisando cepas de *Candida auris*, um patógeno emergente de levedura multirresistente, constataram que esta levedura, altamente virulenta, tem capacidade para formar biofilmes resistentes a antifúngicos como fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina, anfotericina B lipossomal, anfotericina B. Os agentes antifúngicos foram testados nas concentrações de 0,06-32,0 mg/L para células planctônicas e sésseis. O fluconazol foi ineficaz com CIM > 32 mg/L contra as comunidades planctônicas e sésseis, enquanto o voriconazol

apresentou atividade mínima contra as células planctônicas. Segundo os pesquisadores, embora a anfotericina B lipossomal tenha sido ativa contra *C. auris* planctônico a 0,25-1,0 mg/L, foi necessária até 16 mg/L para reduzir a viabilidade metabólica do biofilme em 90%. A anfotericina B foi mais eficaz, exigindo 4 mg/L para matar biofilmes. A micafungina foi a equinocandina mais ativa. Contudo, exigindo <0,5 mg/L para inibir as células planctônicas, em comparação com 2-32 mg/L para a caspofungina. No entanto, estes dois agentes antifúngicos foram ineficazes contra biofilmes, exigindo CIM > 32 mg/L para inibir células sésseis.

A formação de biofilme pode causar a persistência de infecções que devido a exposição a antibióticos, ou seja, predispõe ao desenvolvimento de resistência a antibióticos aos micro-organismos (CIOFU et al., 2017). Além disso, com a falta de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, a resistência a drogas nesses pacientes ainda tem um problema que é difícil de resolver. Este aumento elevado da resistência vem em associação com a descoberta de que os fungos patogênicos são capazes de produzir um complexo multicelular conhecido como biofilme (TSEUNG; ZHAO, 2016).

Tabela 12 – Concentração Fungicida Mínima (CFM) capaz inibir os biofilmes após 48h de incubação dos fungos isolados de pacientes com otomicose frente ao cetoconazol, octopirox olamina e ao limoneno.

Biofilme dos Isolados/ Fármacos		Cetoconazol (µg/ mL)	Octopirox olamina (µg/ mL)	Limoneno (µg/ mL)
MM628	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	16	16	1024
MM649	<i>A. flavus</i>	>32	>32	2048
MM661OD	<i>A. flavus</i>	32	16	1024
MM661OE	<i>A. flavus</i>	>32	8	1024
MM674	<i>A. sydowii</i>	8	8	1024
MM699(1)	<i>A. tamarii</i>	32	>32	2048
MM699(2)	<i>A. tamarii</i>	32	16	1024
MM735	<i>A. awamori</i>	>32	16	1024
MM736	<i>A. niger</i>	>32	>32	2048

MM817F	<i>A. flavus</i>	>32	>32	>2048
MM817L	<i>Candida parapsilosis</i>	>32	>32	1024
MM841	<i>A.sydowii</i>	8	16	1024
MM864OD	<i>Millerozyma farinosa</i>	16	16	256
MM864OE	<i>M.farinosa</i>	16	8	128
MM103	<i>A.fumigatus</i>	>32	>32	1024
MM153	<i>A. parasiticus</i>	16	32	2048
MM293	<i>A. flavus</i>	16	16	2048
MM294	<i>A.flavus</i>	16	16	>2048
MM417	<i>Talaromyces funiculosus</i>	8	16	256
ATCC90028	<i>C. albicans</i>	>32	>32	>2048

4 CONCLUSÕES

De acordo com o que podemos observar nos resultados, concluímos que:

- Pacientes com perfuração da membrana timpânica, acometidos por colesteatoma, hipertrofia das amígdalas e adenoide, e com patologia relacionada a mastoide são susceptíveis a micose no conduto auditivo externo;
- Espécies de *Aspergillus* continuam sendo os agentes etiológicos mais frequentes em casos de otite externa fúngica, sobretudo, *A.flavus*;
- *Aspergillus pseudonomius*, *Talaromyces funiculosus*, *A. sydowii*, e *Millerozyna farinosa* estão sendo relatados pela primeira vez causando otomicose;
- O uso da ferramenta da similaridade genética pode ser eficiente para detectar infecção em casos de otomicose bilateral por mesma cepa;
- Os agentes etiológicos da otomicose são potencialmente produtores de biofilmes com 48 horas e possuem maior atividade metabólica em 24 horas, exceto *A. sydowii* e *M. farinosa*;
- Cepas de *A. flavus*, isolados do conduto auditivo externo podem apresentar resistência, *in vitro*, ao tratamento com a anfotericina B;
- Cepas de *A. awamorii*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Talaromyces funiculosus*, obtidos de pacientes com otomicose, podem demonstrar resistência ao tratamento, *in vitro*, ao fluconazol, diferente do que ocorre com estas espécies de fungos frente a outros azólicos como cetoconazol e itraconazol;
- Isolados fúngicos de pacientes com otite externa são mais susceptíveis ao octopirox olamina do que ao ciclopirox olamina, sendo o primeiro uma nova possibilidade de alternativa para o tratamento da otomicose;

- Derivados de tiossemicarbazonas L3, L8 e L9, assim como o D-limoneno, provocam inibição no crescimento de fungos isolados de pacientes com otite externa fúngica;
- Octopirox olamina e o D-limoneno apresentam sinergismo frente a espécies de *Aspergillus flavus*, *A. awamori*, *A. fumigatus* e *M. farinosa* isolados de pacientes com otite fúngica;
- Biofilmes de *A. pseudonomius*, *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. sydowii*, *A. parasiticus*, *T. funiculosus* e *M. farinosa* são susceptíveis ao tratamento com cetoconazol;
- Biofilmes de *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *A. awamorii*, *A. parasiticus*, *M. farinosa* são sensíveis a octopirox olamina;
- O D-limoneno causa inibição no crescimento de biofilmes produzidos por fungos causadores da otomicose, podendo ser alvo de mais estudos para o uso no tratamento de casos de otomicose.

REFERÊNCIAS

- ABOULMAKARIM, S., TLIGUI, H., EL MRINI, M., ZAKARIA, I., HANDOUR, N., AGOUMI, A. Otomycoses: étude clinique et mycologique de 70 cas. **Journal de Mycologie Médicale**, v.20, p.48-52, 2010.
- ADAMS, David J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, Reading, v.150, n.7, p.2029-2035, 2004.
- ADOUBRYN, K.D., N'GATTIA, V.K., KOUADIO-YAPO, G.C., NIGUÉ, L., ZIKA, D.K., OUHON, J. Épidémiologie des otomycoses au centre hospitalier et universitaire de Yopougon (Abidjan-Côte d'Ivoire). **Journal de Mycologie Médicale**, 2013.
- AFSHARI, M.A., KACHOOEI, R., AJALLOEIAN, M. Assessment of prevalence of otomycosis in ENT clinic in Baqiyatallah (AS) hospital. **Journal of Military Medicine**, cidade, v.2, p.121-4, mes. 2005.
- AHMAD, N., ETHERIDGE, C., FARRINGTON, M., BAGULEY, D.M. Prospective study of the microbiological flora of hearing aid moulds and the efficacy of current cleaning techniques. **The Journal of Laryngology and Otology**, v.121, p.110-113, 2007.
- AKAM, E.A., TOMAT, E. **Bioconjug. Chem.**, v.27, p.1807-1812, 2016.
- AKTAS, E., YIGIT, N. Determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. responsible for otomycosis by E-test method. **Journal de Mycologie Médicale**, v.19, p.122-5, 2009.
- ALBIIN, N., HELLSTRÖM, S., SALÉN, B., STENFORS, L-E., SÖDERBERG, O. The anatomy of the Eustachian tube in the rat: a macroand microscopical study. **Anat Rec.**, v.207, p.513, 1983.
- ALBUQUERQUE, A.A.S.; ROSSATO, R.; OLIVEIRA, J.A.O.; HYPPOLITO, M.A. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v.75, n.1, p.43-9, 2009.
- ALI ESFANDIARY, M. et al. In vitro antifungal activity of Zataria multiflora essential oil, fluconazole and ciclopirox olamine against nonalbicans Candida species isolated from recurrent vulvovaginal candidiasis. **Journal of Mycology Research**. v.2, N.1, p.3-8, 2015.
- ALMEIDA, M.P., ROMERO, R.B., ROMERO, A.L., CRESPIAN, E. R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**. V.2, p.22059, 2015.
- ALNAWASEH, S., ALMOMANI, O., ALASSAF, S., ELESSIS, A., SHAWAKFEH, N., ALTUBESHI, K., et al. Treatment of otomycosis: a comparative study using

miconazole cream with clotrimazole otic drops. **J Roy Med Serv.** v.18, n.3, p.34–7. 2011;

ALVINO, D.S., RODRIGUES, M.L., ALMEIDA, C.A. Differential expression of sialylglycoconjugates and sialidase activity in distinct morphological stages of *Fonsecaea pedrosoi*. **Arch Microbiol**, v.181, p.278–86, 2004

ANEJA, K.R., SHARMA, C., JOSHI, R. Fungal infection of the ear: A common problem in the northeastern part of Haryana. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.74, p.604–607, 2010.

ARAIZA, J., CANSECO, P., BONIFAZ, A. Otomycosis: clinical and mycological study of 97 cases. **Rev Laryngology Otology Rhinology (Bord)**, v.127; n.4; p.251-4, 2006.

ARAÚJO NETO, L.N., *et al.* Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophenethiosemicarbazones derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v.272, p.172-181, 2017.

ARTHUR, R.R., DREW, R.H., PERFECT, J.R. Novel modes of antifungal drug administration. *Expert Opin Investig. Drugs*, cidade, v.13, p.903–32, mes.2004.

BACCHI, A., CARCELLI, M., PELAGATTI, P., PELIZZI, C., PELIZZI, G., ZANI F. Antimicrobial and mutagenic activity of some carbon- and thiocarbonohydrazone ligands and their copper (II), iron (II) and zinc (II) complexes *J. Inorg. Biochem.* V.75, p. 123-133, 1999.

BACHER, F., ENYEDY, É., NAGY, N.V., ROCKENBAUER, A., BOGNÁR, G.M., TRONDL, R., NOVAK, M.S., KLAPPROTH, E., KISS, T., ARION INORG, V.B. **Chem.**, v.52, p.8895-8908, 2013.

BALAJEE, S.A., HOUBRAKEN. J., VERWEIJ, P.E., HONG, S.B., YAGHUCHI, T., VARGA, J., SAMSON, R.A. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Stud Mycol**, cidade, v.59, p.39-46, mes.2007.

BANKAITIS, A.U. Hearing aids: lick 'EM and stick 'EM? **Audiology Today**, cidade, v.17, p. 2-3, mes.2005.

BARATI, B., OKHOVVAT, S.D.R., GOLJANIAN, A., OMRANI, M.R. Otomycosis in central Iran: a clinical and mycological study. **Iranian Red Crescent medical journal**, cidade, v.13, n.12, p.873-6, mes.2011.

BARNETT, J.A., PAINE, R.W., YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification.** 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge. 2000. Xp.

BASSIOUNY, A., KAMEL, T., MOAWAD, M.K., HINDAWY, D.S. (1986) Broad spectrum antifungal agents in otomycosis. **J Laryngol Otol** 100:867–873

BASMA, R., BARADA, G., OJAIMI, N., KHALAF R.A. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating

type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. **Mycoses**, v.52, p.141–148, 2009.

BEAUVAIS, A., SCHMIDT, C., GUADAGNINI, S., ROUX, P., PERRET, E., HENRY, C., PARIS, S., MALLET, A., PRÉVOST, M.C., LATGÉ, J.P. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. **Cell. Microbiol.**, v.9, p.1588 –1600, 2007.

BELLINI, C., ANTONINI, P., ERMANNI, S., *et al.* Malignant otitis externa due to *Aspergillus niger*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, cidade, v.35, p.284-8, mes.2003.

BENTO, Ricardo Ferreira; MINITI, Aroldo; MARONE, Silvio Antônio Monteiro. **Tratado de Otologia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Fundação Otorrinolaringologia: FAPESP, 1998.

BERALDO, H., GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes, *Mini-Rev. Med. Chem.* V.4, p. 31-39, 2004.

BERGOLD, A.M., GEORGIADIS, S. New antifúngic drugs: A review. Curitiba-PR, **Visão Acadêmica** v.5, n.2, p. 159-172, 2004.

BETH, D.S., ROBERT, G.T. **Basic and Clinical Biostatistics**, 2nd edition. New York: Appleton & Lange. 1990. Xp.

BHALLY, H.S., SHIELDS, C., LIN, S.Y., MERZ, W.G. Otitis caused by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent child. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.68, cap.7, p.975-978, 2004.

BHARTI, N *et al.* Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of 5-nitrothiofene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v.12, p.3475, 2002.

BISCEGLIE, F. *et al.* Effects of polar substituents on the biological activity of thiosemicarbazone metal complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.179, p.60-70, 2018.

BLANKENSHIP, J.R., MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v.9, p.588–594, 2006.

BLUESTONE, C.D., CASSELBRANT, M.L., DOHAR, J.E., SIH, T. Complexo Otite Média. In: **III Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO**. São Paulo: Eskenazi Indústria Gráfica. p.202-223, 302p. 2003.

BLYTH, C.C., PALASANTHIRAN, P., O'BRIEN, T.A. (2007) Antifungal therapy in children with invasive fungal infections: a systematic review. **Pediatrics** 119:772–784

BONON, ANDERSON DE JESUS, Synthesis of polymers derived from limonene epoxides for medical applications. FEQ - Tese e Dissertação, 2016.

BORKOWSKI, G., GURR, A., STARK, T., *et al.* Funktionelle und morphologische Störungen des mukoziliären Systems bei der sekretorischen Otitis media.

Laryngorhinootologie, v.79, p.135-8, 2000.

BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. **Microbiologia Médica**. 21ª edición. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.142-145, p.485, 611p. 2000.

BUZINA, W., LANG-LOIDOLT, D., GINTER-HANSELMAYER, G. *Trichophyton rubrum* in the external auditory meatus. **Mycoses**, v.47, p.85–86, 2004.

CALDERONE, R.A. Recognition between *Candida albicans* and host cells. **Trends Microbiol**, v.1, p.55–58, 1993.

CARFRAE, M.J., KESSER, B.W. Malignant otitis externa. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.41, p.537-49, 2008.

CARNEY, A.S. Otitis externa and otomycosis. In: Gleeson MJ, Jones NS, Clarke R, et al (eds). Scott-Brown's Otolaryngology, **Head and Neck Surgery**, v.3. 7 th ed. London: Hodder Arnold Publishers; 2008. p. 3351-7.

CARRADORI, S., CHIMENTI, P., FAZZARI, M., GRANESE, A., ANGIOLELLA, L. Antimicrobial activity, synergism and inhibition of germ tube formation by *Crocus sativus*-derived compounds against *Candida* spp. **J Enzyme Inhib Med Chem**, Early Online: 1–5, 2016.

CARRANZA, J.M. **Técnicas e métodos elementares para el estudio de hongos sitopásitos**. 2ª edición, Universidad Nacional de La Plata, Bolivia. 1949.

CASAS, J. S.; TASENDE, M. S. G.; SORDO, J.; Coord. **Chem. Rev.** 209, 197, 2000.

CHAN, Y.C., et al. Cu(II) complexes of 2-(diphenylmethylene)hydrazinecarboxamide derivatives: Synthesis, characterization and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **Arabian Journal of Chemistry**. V.10, Suppl. 2, p. S3493-S3500, 2017.

CHANDRA, J., KUHN, D.M., MUKHERJEE, P.K., HOYER, L.L., MCCORMICK, T., GHANNOUM, M.A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v.183, p.5385–5394, 2001.

CHEN, Y.C., EISNER, J.D., KATTAR, M.M.; RASSOULIAN-BARRET, S.L., LAFE, K., BUI, U.; LIMAYE, A.P., COOKSON, B.T. Polymorphic internal transcribes spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **Journal of clinical microbiology**. 39: 4042-4051, 2001.

CIOFU, O, ROJO-MOLINERO, E., MACIÀ, M.D., OLIVER, A. Antibiotic treatment of biofilm infections. **APMIS**. 125(4):304-319, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved

Standard-Second Edition. CLSI document M27-A3 [ISBN 1-56238-666-2]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; *Approved Standard*. CLSI document M38-A2 [ISBN 1-56238-668-9]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012 (Document M27-S4)

COSTA, P.S., SOUZA, E.B., BRITO, E.H.S., FONTENELLE, R.O.S. Antimicrobial activity and therapeutic potential of the genus *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**, v.44, n.2, 2017.

COSTA, S.S., SOUSA, L.C.A. Otite média crônica não-colesteatomatosa. In: Campos CAH, Costa HOO. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca. 2002. p.72-92.

COUTO, Christiane Marques Do; MOTA, Renata; CARVALLO, Mamede. O efeito das orelhas externa e média nas emissões otoacústicas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 2009;75(1):15-23.

DALMAU, L.M. **Annual Parasitology Human Compendium**, cidade, v.7, p.536. mês.1929.

DE HOOG, G.S., GUARRO, J., GENE, J., FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2 rd edition. The Netherlands. Central bureau voor Schimmelculture. 2000.

DEL PALACIO, A., CUÉTARA, M.S., LÓPEZ-SUSO, M.J., *et al.* 2002. Randomized prospective comparative study: short-term treatment with ciclopiroxolamine (cream and solution) versus boric acid in the treatment of otomycosis. **Mycoses** v. 45, p. 317-28.

DAGENAIS, T.R., KELLER, N.P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clin. Microbiol. Ver**, cidade, v.22, p.447– 465, mês.2009.

DESHMUKH, J., SURPAM, R., BAND, A. Mycological Study of *Aspergillus* Infections in Otomycosis in Eastern Part of Maharashtra. **International Journal of Health Sciences & Research**. 77 Vol.4; Issue: 10; 2014

DI BONAVENTURA, G., POMPILIO, A., PICCIANI, C., IEZZI, M., D'ANTONIO, D., PICCOLOMINI, R. "Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, cidade, v.50, n.10, pp.3269–3276, 2006.

DI DIO, L.J.A. **Tratado de Anatomia Sistemica Aplicada**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu. v.2, cap.19, p.902-24, 948p. 2002.

DITTMAR, W., GRAU, W., RAETHER, W., SCHRINNER, E., WAGNER, W.H. Microbiological laboratory studies with ciclopiroxolamine. *Drug Res.* v.31, p.1317–1322, 1981)

DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. San Francisco, IHW Verlag. 1993.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v.8, p. 881–890, 2002.

DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* v.15, p.167–93, 2002.

DUBINI, F., BELLOTTI, M.G., FRANGI, A., MONTI, D., SACCOMANI, L. In vitro antimycotic activity and nail permeation models of a piroctone olamine (octopirox) containing transungual water soluble technology. **Arzneimittelforschung** 55:478–483, 2005.

DURAN, A., NOMBELA, C. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, Reading, v.150, n.10, p.3099–3103, 2004.

ELLEPOLA, A.N.B., SAMARANAYAKE, L.P. “Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents,” **Archives of Oral Biology**, v.43, n.12, p.999–1007, 1998.

ELLIS, M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Commonwealth Mycological Institute. 1971

EMGARD, P., HELLSTRÖM, S. An animal model for external otitis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.254, p.115-119, 1997.

EMGÅRD, P., HELLSTRÖM, S. A topical steroid without an antibiotic cures external otitis efficiently: a study in an animal model. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.258, p.287–291, 2001.

EMGARD, P. External otitis and its treatment. is a group iii steroid without antibiotics sufficient therapy? – experimental and clinical studies. Hansson och Kotte i Ystad Tryckeri AB, Ystad, Sweden. 2005.

ENOZ, M., SEVINC, I., LAPEÑA, J.F. Organismos bacterianos e fúngicos em pacientes com otite externa sem fatores de risco para infecção fúngica em Erzurum, Turquia. **Brazilian Journal Otorhinolaryngology**, cidade, v.75, cap.5, p.721-725, mes.2009.

ERJAVE, Č.Z., VERWEIJ, P.E. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v.5, n.1, p.3-10, 2002.

ESPINA, L., et al. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, volume 22. pp. 896 – 902, 2011.

FEUN, L. et al. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother. Pharmacol.* v.50, p.223, 2002.

FISHER, K. PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. **Trends in Food Science & Technology**, volume 19. pp. 156 – 164, 2008.

FORMOLO, F. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de distintos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown. Universidade de Caxias do Sul. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Mestrado e Doutorado. Dissertação, 2009.

Fungaro, M.H.P. *PCR na Micologia*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 14: 12-16, 2000.

FREIRE, M.G. Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talísia esculenta* (ST. HILL) RALDLAK. 2003. 189p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2001.

FREIRE, J.C.P., JÚNIOR, J.K.O., SILVA, D.F., DE SOUSA, J.P., GUERRA, F.Q.S., DE OLIVEIRA LIMA, E. Antifungal Activity of Essential Oils against *Candida albicans* Strains Isolated from Users of Dental Prostheses. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017.

GARCÍA-AGUDO, L., AZNAR-MARÍN, P., GALÁN-SÁNCHEZ, F., GARCÍA-MARTOS, P. MARÍN-CASANOVA, P., RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M. Otomycosis due to filamentous fungi. **Mycopathologia**, v.172, p.307–310, 2011.

GHANNOUM, M.A., RADWAN, S.S. ***Candida* Adherence to epithelial cells**. New York: CRC Press, 1990.

GHARAGHANI, MARAL; SEIFI, ZAHRA; ZAREI MAHMOUDABADI, ALI. Otomycosis in Iran: A Review. **Mycopathologia**, v.179, p.415–424, 2015.

GHIACEI, S. Survey of Otomycosis in northwestern area of Iran. **Medical Journal of Masshad University of Medical Sciences**, v.43, p.85-87, 2001.

GIOLO, M.P., SVIDZINSKI, T.I.E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, n.3, p. 225-234, 2010

GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61, p.1323–1330. 1995.

GLISONI, R.J., CHIAPPETTA, D.A., MOGLIONI, A.G., SOSNIK, A. **Pharm. Res.**, v.29, p. 739-755, 2012.

GÓES-NETO, A. Amostragem de fungos para estudos de filogenia molecular e código de barras de DNA. In: L.C., Maia; E, Malosso; A.M., Yano-Melo (orgs). **Micologia: avanços no conhecimento**. Livros de Resumos do V Congresso Brasileiro de Micologia. Ed. Universitária da UFPE, Recife. 197-201, 2007.

GÓES-NETO, A., LOGUERCIO-LEITE, C., GUERRERO, R.T. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. **Biotemas**, v.18, p.19-32. 2005.

GOLDMAN, G.H., FERREIRA, M.E.S., MARQUES E.R., SAVOLDI, M., PERLIN, D., PARK, S., MARTINEZ, P.C.G., GOLDMAN, M.H., COLOMBO, A.L. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.50, n.1, p.25-32, 2004.

GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OZAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, cidade, v.285, p.66, mes.1980.

GUATIMOSIM, M.H.E. "Doenças da Orelha". In: Sociedade Brasil. ORL. **Tratado de Otorrinolaringologia**. 1 ed., São Paulo: Editora Roca. v.2, cap.1, p.3-20. 2002.

GUPTA, A.K., FLECKMAN, P., BARAN, R. Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis. **J Am Acad Dermatol**.43(4 Suppl):S70-80, 2000.

GUPTA, A.K., PLOTT, T. Ciclopirox: a broad-spectrum antifungal with antibacterial and anti-inflammatory properties. **International Journal of Dermatology**, v.43, Suppl.1, p.3-8, 2004.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R.; Acc. **Chem. Res.** 34, 727, 2001.

HAWKE, M., BINGHAM, B., STAMMBERGER, H., BENJAMIN, B. **Manual de diagnóstico de otorrinolaringologia**. Argentina: Aula Médica. v.2, p.40-41. 1997.

HO, T., VRABEC, J.T., YOO, D., *ET al.* Otomycosis: clinical features and treatment implications. **Otolaryngology Head Neck Surgery**, v.135, n.5, p.787-791, 2006.

HONG, S.B., GO, S.J., SHIN, H.D., FRISVAD, J.C., SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, v.97, p.1316–1329, 2005.

JABRA-RIZK, M.A., FALKLER, W.A., MEILLER, T.F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg Infect Dis**, v.10, p.14–19, 2004.

JACKMAN, A., WARD, R., APRIL, M., *et al.* Topical antibiotic induced otomycosis. **The International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.69, n.6, p.857-60, 2005.

JADHAV, V.J., PAL, M., MISHRA, G.S. Etiological significance of *Candida albicans* in otitis externa. **Mycopathologia**, v.156, cap.4, p.313-5, 2003.

JIA, X., LIANG, Q., CHI, F., CAO, W. Otomycosis in Shanghai: aetiology, clinical features and therapy. **Mycoses**, v.55, p.404–409, 2012.

JONES, E.D. Onychomycosis: Current Treatment Options. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v.15, p.165–169, 2003.

JUE, S.G., DAUSON, G.W., BROGDEN, R.N. Ciclopirox olamine 1% cream. A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use. **Drugs**, v.29, p.330-341, 1985.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.23, p.466-471, 488p. 2004.

KAIEDA, S. Fungal infection in the otorinolaryngologic area. *Nippon Rinsho*. **Japanese Journal of clinical medicine**, v.66, n.12, p.2290-2293, 2008.

KASUGA, N.C. *et al.* Shyntesis, structural characterization and antimicrobial activities os 12 zine (II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. **J. Inorg. Biochem.** v.96, p.298, 2003).

KAUR, R., MITTAL, N., KAKKAR, M., *et al.* Otomycosis: a clinicomycologic study. **Ear, Nose and Throat Journal**, v.79, cap.8, p.606-609, 2000.

KAYA, A., KIRAZ, N. In vitro susceptibilities of *Aspergillus* spp. causing otomycosis to amphotericin B, voriconazole and itraconazole. **Mycoses**. v.50, p. 447–50, 2007.

KAZEMI, A.H., GHIAEI, S. Survey of Otomycosis in northwestern area of Iran, 1997-2004. **Journal Mazandaran University of Medical Science**, v.48, p.112-9, 2005.

KIM, Y., ALPMANN, P., BLAUM-FEDER, S., KRÄMER, S., ENDO, T., LU, D., CARSON, D., SCHMIDT-WOLF, I.G.H. Increased in vivo efficacy of lenalidomide by addition of piroctone olamine. **In vivo** 25:99–104, 2011.

KIRCHHOFF, L., OLSOWSKI, M., ZILMANS, K., DITTMER, S., HAASE, G., SEDLACEK, L., STEINMANN, E., BUER, J., RATH, P.M., STEINMANN, J. Biofilm formation of the black yeast-like fungus *Exophiala dermatitidis* and its susceptibility to antiinfective agentes. **Scientific Reports** volume7, Article number: 42886, 2017.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht, Centraal bureau vöör Schimmelcultures. 2002.

KLIS, F.M., BOORSMA, A., DE GROOT, P.W. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.23, n.3, p.185-202, 2006.

KLUTTS, J.S., YONEDA, A., REILLY, M.C., BOSE, I., DOERING, T.L. Glycosyltransferases and their products: cryptococcal variations on fungal themes. **FEMS Yeast Research**, v.6, n.4, p.499-512, 2006.

KOJIC, E.M., DAROUICHE, R.O. *Candida* infections of medical devices. **Clin Microbiol Rev**; 17: 255–267, 2004.

KROM, B. P.; COHEN, J. B.; FESER, G. E. M.; CIHLAR, R. L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. **J. Microbiol. Methods**, 68: 421-423, 2007.

KUMAR, A. Fungal Spectrum in Otomycosis Patients. **JK Science**, v.7, n.3, p.152-155, 2005.

KUMARAN, S.S., KAVITHA, M. A prospective non-randomised observational case study- the study of otomycosis. **J. Evolution Med. Dent. Sci** v.6, Issue 12, 2017.
KUMAR KARN, PRAVEEN; LAKSHMANAN, ANANDHI; HEMAMALINI, M; MADHAVAN, RADHA. Otomycosis: A study from a tertiary care center. **Journal of Pharmacy Research**, v.8, n.3, p.266-268, 2014.

KURNATOWSKI, P., KILIPIAK, A. Otomycosis: prevalence, clinical symptoms, therapeutic procedure. **Mycoses**, v.44, n.11, p.472-479, 2001.

KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 73(4):331-71, 1998.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., VACCARI, E.M.H., MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ªed. São Paulo: Sarvier. Cap.10, p.296-297; cap.13, p.364-384, 1104p. 2002.

LAI, Y.W. et al. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.48, p.388–394, 2016.

LEAL, A. et al. *Novo método para marcação com lectinas em fungo filamentoso*. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Programação e resumos, Recife. 2007.

LEAL, A. F. G., LOPES, N. E. P., CLARK, A. T. R., PONTES FILHO, N. T., BELTRÃO, E. I. C., NEVES, R. P. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical Mycology. Early Online**, 1–4. 2011a.

LEAL, A.F.G., LIMA NETO, R.G., MACÊDO, D.P.C., BELTRÃO, E.I.C., NEVES, R.J. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Trichophyton tonsurans* and other keratinophilic filamentous fungi using lectins. **Mycoses**, v.54, p.789–794, 2011b.

LEE, D.H., JUN, B.C., KIM, D.G., JUNG, M.K., YEO, S.W. Volume variation of mastoid pneumatization in different age groups: a study by three-dimensional reconstruction based on computed tomography images. **Surg Radiol Anat** (Seoul), v.27, p.37-42, mes.2005.

LEMKE, A., KIDERLEN, A. F., KAYSER, O. "Amphotericin B," **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, pp.151–162, 2005.

LESLIE, J.F., SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Blackwell Publishing, USA. 2006.

LEWIS, R.E., DIEKEMA, D.J., MESSER, S.A., PFALLER, M.A., KLEPSE, M.E. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.49, p.345-351, 2002.

LIMA-NETO, R.G., BELTRÃO, E.I., OLIVEIRA, P.C., NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v.54, p.23–29, 2009.

LIS, H., SHARON, N. *Lectins in higher plants*. In: MARCUS, A. The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise. Proteins and nucleic acids. v.6, New York: Academic Press, p.371-447, 1981.

LÓPEZ-RIBOT, J.L., CASANOVA, M., MURGUI, A., MARTÍNEZ, J.P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.41, n.3, p.187-196, 2004.

MACCALLUM, D.M., COSTE A., ISCHER F., JACOBSEN M.D., ODDS F.C., SANGLARD, D. Genetic Dissection of Azole Resistance Mechanisms in *Candida albicans* and Their Validation in a Mouse Model of Disseminated Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1476 – 1483, 2010.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Shizoccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, New York, v.336, n.2, p.202-212, 2005.

MAHBOUBI, M., GHAZIAN BIDGOLI, F. In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v.17, p.771–774, 2010.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J., ESCRIBANO, P., BOUZA, E. & GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* ssp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int. J. Med. Microbiol.** v.304, p.1192–1198, 2014.

MARÍN, P., GARCÍA-MARTOS, P., PUERTO, J. L., MIRA, J. Otomycosis by *Aspergillus* in Cádiz (Spain). **Revista Iberoamericana de Micología**. Hospital Puerta del Mar. Cádiz. Spain. v.17, p.151, mês.2000.

MARKUS A. Hydroxy-pyridones. Outstanding biological properties. In: Shuster S, ed. Hydroxy-pyridones as Antifungal Agents with Special Emphasis on Onychomycosis. Berlin: Springer-Verlag, 1±10. 1999.

MARTINEZ, L.R., FRIES, B.C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v.4, p.266–275, 2010

MASSI, F.P., VIEIRA, M.L.C., SARTORI, D., PENHA, R.E.S., MUNHOZ, C.F., FERREIRA, J.M., IAMANAKA, B.T., TANIWAKI, M.H., FRISVAD, J.C., FUNGARO, M.H.P. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **Int J Food Microbiol**.186:14–21, 2014.

MELO, A.S., BIZERRA, F.C., FREYMÜLLER, E., ARTHINGTON-SKAGGS, B.A., COLOMBO, A.L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the ***Candida parapsilosis* complex**. **Med Mycol**. v.49, n.3, p.253–62. 2011.

MENEZES, P.L., CALDAS NETO, S., MOTTA, M.A. Anatomofisiologia da Orelha. Em:_____ **Biofísica da Audição**. São Paulo: Lovise, cap. 5, p. 87-90, 188 p. 2005.

MGBE, R.B., UMANA, A., ADEKANYE, A.G., OFFIONG, M.E. Otomycosis - A Management Challenge in Calabar, South-South Nigeria. **The Internet Journal of Third World Medicine**. v.9, n.2, 2011.

MIERTUSOVA, S., SIMALJAKOVA, M. Yeasts and fungi isolated at the mycology laboratory of the First Dermatovenerology Clinic of the Medical Faculty Hospital of Comenius University in Bratislava (1995-2000). **Epidemiology Microbiology e Imunology**, cidade, v.52, n.2, p.76-80, mes.2003.

MISHRA, G.S., MEHTA, N., PAL, M. Chronic bilateral otomycosis caused by *Aspergillus niger*. **Mycoses**, v.47, cap.1-2, p.82-4, 2004.

MOORE, K.L., AGUR, A.M.R. **Fundamentos de Anatomia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8, p. 351-357, 436p. 1998.

MOGADAM, A.Y., ASADI, M.A., DEHGHANI, R., HOOSHYAR, H. The prevalence of otomycosis in Kashan, Iran, during 2001-2003. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.2, n.1, p.18-21, 2009.

MOLINA, P., PUCHADES, M.J., APARICIO, M., GARCÍA RAMÓN, R., MIGUEL, A. Experience in fungal peritonitis in a dialysis unit for 10 years. **Nefrologia**. v.25, p.393-8, 2005

MOWAT, E., WILLIAMS, C., JONES, B., MCCHLERY, S., RAMAGE, G. "The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm?" **Medical Mycology**, v.47, supplement 1, pp.S120–S126, 2009.

MOWAT, E., BUTCHER, J., LANG, S., WILLIAMS, C., RAMAGE, G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1205–1212, 2007.

MUNGUIA, R., DANIEL, S.J. Otological antifungals and otomycosis: a review. **The International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.72; cap.4, p.453-9, 2008.

NANDYAL, C.B., CHOUDHARI, A.S., SAJJAN, N.B. A cross sectional study for clinico mycological profile of Otomycosis in North Karnataka. **International Journal of Medical and Health Sciences**. vol.4, n.1, pp.64-69 ref.23, 2015.

NAVANEETHAN, Nagendran; YAADHAVAKRISHNAN, Raj Prakash Dharmapuri. Type of Antifungals: Does it Matter in Empirical Treatment of Otomycosis? **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg** 67(1):64–67, 2015

NEMATI, S., HASSANZADEH, R., JAHROMI, S.K., ABADI, A.D.N. Otomycosis in the north of Iran: common pathogens and resistance to antifungal agents. **European archives of otorhinolaryngology**, v.271, n.5, p. 953–7, 2014.

NICHOLS, A.W. Nonorthopaedic problems in the aquatic athlete. **Clinics in sports medicine**, v.18, n.2, p.395-411, 1999.

NIWERTH, M., D. KUNZE, M. SEIBOLD, M. SCHALLER, H.C. KORTING, HUBE, B. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1805-1817, 2003.

NILSSON, R.H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K.H. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary Bioinformatics** 4: 193-201, 2008.

NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M. L., RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and Infection**, Paris, v.7, n.4, p.789– 798, 2005.

NOGUEIRA, J.C.R., DINIZ, M.F.F.M, LIMA, E.O., LIMA, Z.N. Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de micro-organismos obtidos de otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.74, n.4, p.526-30, 2008.

NOWROZI, Hossein, ARABI, Fatemeh Doustdar, MEHRABAN, Hamid Ghaffarnejad, TAVAKOLI, Ahmad, GHOOSHCHI, **Ghoolsh**. Mycological and clinical study of otomycosis in Tehran Iran. **Bull Environ Pharmacol Life Sci**. v.3, n.2, p.29–31, 2014.

NUNEZ, C.V., SILVA, J.I.M., SOUZA, M.C.S., SOARES, M.L.C., COSTA, R.C. Óleos essenciais das raízes das espécies de *Philodendron maximum*, *P. solimoesense* e *P. goeldii* (Araceae). **Fitos**. v. 10, n. 1, 2016.

NWABUISI, C., OLOGE, F.E. The fungal profile of otomycosis patients in Ilorin, Nigeria. **Nigerian Journal of Medicine**, v.10, n.3, p.124-126, 2001.

ODDS, F.C., MESSER, S.A., WOESTENBORGH, F. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.39, 2051, 1995.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother** **52**, 1, 2003.

O'DONNELL, K (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds DR & Taylor JW (Eds) *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (pp 225–233). CAB International, Wallingford, UK.

ÓLEOS ESSENCIAIS. <http://www.oleos essenciais.org/limoneno/>, 2017.

OLINA, M., CAMETTI, M., GUGLIELMETTI, C., GATTONI, M., LEIGHEB, G., PIA, F. External otitis. **Recenti Progressi in Medicina**, v.93, n.2, p.104-107, 2002.

OLIVEIRA, P.C., MEDEIROS, C.S., MACÊDO, D.P., ANDRADE, S.L., CORREIA, M.T., MESQUITA, S.D., LIMA-NETO, R.G., NEVES, R.P. Ciclopirox olamine: an antifungal alternative against cryptococcosis. **Lett Appl Microbiol**. 51(5):485-9, 2010.

O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol Microbiol**, v.28, p.449–461, 1998.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol.**, v.54, p.49-79, 2000.

OZCAN, K.M., OZCAN, M., KARAARSLAN, A., KARAARSLAN, F. Otomycosis in Turkey: predisposing factors, etiology and therapy. **The Journal of Laryngology and Otology**, v.117, n.1, p.39-42, 2003a.

OZCAN, M., OZCAN, K.M., KARAASLAN, A., *et al.* Concomitant otomycosis and dermatomycoses: a clinical and microbiological study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v.260, n.1, p.24-7, 2003b.

OZER, E. Effects of prenatal exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. **Clin. Neuropathol**, v.19, n.1, p.21-25, 2000.

PADHAN, D., PATTNAIK, S., BEHERA, A.K. Growth-arresting Activity of *Acmella* Essential Oil and its Isolated Component D-Limonene (1, 8 P-Mentha Diene) against *Trichophyton rubrum* (Microbial Type Culture Collection 296). **Pharmacogn Mag**. 13(Suppl 3):S555-S560, 2017.

PAKSHIR, K., SABAYAN, B., JAVAN, H., KARAMIFAR, K. Mycoflora of human external auditory canal in Shiraz, southern Iran. **Iran Red Crescent Med J**. 10(1):27–9, 2008.

PALMA, E., MENDES, F., MORAIS, G.R., RODRIGUES, I., SANTOS, I.C., CAMPELLO, M.P., RAPOSINHO, P., CORREIA, I., GAMA, S., BELO, D., ALVES, V.,

ABRUNHOSA, A.J., SANTOS, I., PAULO, A. **J. Inorg. Biochem.** 167 , pp. 68-79, 2017.

PATEL, J.D. SHAH. P.J. Synthesis, characterization and chelating properties of 4-butyrylsemicarbazone-1-phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-one. **Eur. J. Chem.** V.7, p. 357-362, 2010.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell wall analysis. **Methods**, Amsterdam, v.33, n.3, p.245-251, 2004.

PFALLER, M., GORDEE, R., GERARDEN, T., YU, M., WENZEL, R. Fungicidal activity of cilofungin (LY121019) alone and in combination with anticapsin or other antifungal agents. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** v.8, p.564-7, 1989.

PINTO, M.R, BARRETO-BERGTER, E., TABORDA, C.P. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. **Braz J Microbiol**, v.39, p.195–208, 2008.

PIERCE, C.G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A.R.; WORMLEY, J.R.F.L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature protocols** 3(9):1494-1500, 2008.

PIERCE, C.G., SRINIVASAN, A., UPPULURI, P., RAMASUBRAMANIAN, A.K., LOPEZ-RIBOT, J.L. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Curr Opin Pharmacol** 13: 726–730, 2013.

PIERCE, C.G., CHATURVEDI, A.K., LAZZELL, A.L., POWELL, A.T., SAVILLE, S.P., MCHARDY, S.F., LOPEZ-RIBOT, J. L. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **npj Biofilms and Microbiomes** volume 1, 15012, 2015.

PINTO, E., GONÇALVES, M.J., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L. Antifungal Activity of *Thapsia villosa* Essential Oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and Dermatophyte species. **Molecules** 22(10), 2017.

PITT, J.I. *A laboratory guide to common Penicillium species*. North Ryde, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1988.

PONTES, Z.B.V.S., SILVA, A.D.F., LIMA, E.O., GUERRA, M.H., OLIVEIRA, N.M.C., CARVALHO, M.F.F.P., GUERRA, F.S.Q. Otomicoses: um estudo retrospectivo. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.75, cap.3, p.367-70, 2009.

PRASAD, Sampath Chandra, KOTIGADDE, Subbannayya, SHEKHAR, Manisha, THADA, Nikhil Dinaker, PRABHU, Prashanth, D' SOUZA, Tina, PRASAD, Kishore Chandra. Primary Otomycosis in the Indian Subcontinent: Predisposing Factors, Microbiology, and Classification. **International Journal of Microbiology** Volume, 2014.

- PRATHIMA, B. et al. Copper(II) and nickel(II) complexes of benzyloxybenzaldehyde-4-phenyl-3-thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and biological activity *Spectrochim. Acta, Part A*, v.77, p.248-252, 2010.
- RAJABNIA, R., MAHDAVI OMRAN, S., MAJIDIAN, A., AGHAJANPOUR, S., KIAKOJORI, K. Comparison of fungal flora in patients with acute otitis externa and healthy subjects. **J Babol Univ Med Sci.** 12(3):32–7, 2010.
- RAMAGE, G.; BACHMANN, S.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; LOPEZ RIBOT, J. L. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to flucoazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother**, v.4, p.973–980, 2002.
- RAMAGE, G., MARTINEZ, J.P., LOPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS Yeast Res** 6: 979–986, 2006.
- RAMAGE, G., VANDE WALLE, K., WICKES, B.L., L'ÓPEZ- RIBOT, J.L. "Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albican* biofilms," **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, pp.2475–2479, 2001.
- RAMAGE, G., MOWAT, E., JONES, B., WILLIAMS, C., LOPEZ- RIBOT, J. "Our current understanding of fungal biofilms fungal biofilms," **Critical Reviews in Microbiology**, v.35, n.4, pp.340–355, 2009.
- RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; JONES, B.; WILLIAMS, C. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.324, p.89 –97, 2011.
- RAPER, K.B., FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore, Willians and Wilkins. 1965.
- RAPER, K.B, THOM, C., FENNEL, D.I. A manual of the Penicillia. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1949.
- RASMUSSEN, T.B., GIVSKOV, M. "Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects," **Microbiology**, v.152, part 4, pp.895–904, 2006.
- RATH, P. Susceptibility of *Aspergillus* strains from culture collections to amphotericin B and itraconazole. **J Antimicrob Chemother.**41:567–70, 1998.
- REX, J.H., PFALLER, M.A., WALSH, T.J., CHATURVEDI, V., ESPINEL-INGROFF, A., GHANNOUM, M.A., GOSEY, L.L., ODDS, F.C., RINALDI, M., SHEEHAN, D.J., WARNOCK, D.W. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, p.643, 2001.
- ROBERT SANDER, M.D. Otitis Externa: A Practical Guide to Treatment and Prevention. **American Family Physician**, v.63, n.5, p.927-936, 2001.
- RODRIGUEZ-ARGÜELLES, M.C. et al. Acenaphthenequinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes: synthesis, structure, and biological activity. *J. Inorg. Biochem.* V.66, p. 7-17, 1997.

RODRÍGUEZ-ARGÜELLES, M.C. et al. Complexes of 2-acetyl- γ -butyrolactone and 2-furancarbaldehyde thiosemicarbazones: antibacterial and antifungal activity. *J. Inorg. Biochem.* V.103, p. 35-42, 2009.

RODRÍGUES-TUDELA, J.L., MARTINEZ-SUÁREZ, J.V. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.35, p.739, 1995.

ROHLF, F.J. 1988. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Applied Biostatistics, Inc.* New York, Exeter Publishing.

ROMERO, A. L., ROMERO, R. B., SILVA, E. L., DINIZ, S. P. S. S., OLIVEIRA, R. R., VIDA, J.B. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. *Unopar Científica - Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(4), 231-235, 2012.

ROULAND-LEFEVRE, C., DIOUF, M.N., BRAUNAN, A., NEYRA, M. Phylogenetic relationships in *Termitomyces* (Family *Agaricaceae*) based on the nucleotide sequence of ITS: A first approach to elucidate the evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing termites and their fungi. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 22(3): 423-429, 2002.

RUIZ, L.S., KHOURI, S., HAHN, R.C., SILVA, E.G., OLIVEIRA, V.K.P., GANDRA, R.F., PAULA, C.R. Candidemia by species of the *Candida parapsilosis* complex in children's hospital: prevalence, biofilm production and antifungal susceptibility. **Mycopathologia**, cidade, v.175, p.231–239, mes.2013.

RUTT, A.L., SATALOFF, R.T. *Aspergillus* otomycosis in an immunocompromised patient. **Ear Nose Throat Journal**, cidade, v.87, n.11, p.622-623, mes.2008.

SAFFER, M., BELLIZIA NETO, L. Otite Externa. In: _____ **IV Manual de Otorrinolaringologia Pediátrica da IAPO**. São Paulo: Lis Gráfica e Editora. p.187-190, 291p, 2006.

SAGIT, M., SOMDAS, M.A., KORKMAZ, F., AKCADAG, A. The ototoxic effect of intratympanic terbinafine applied in the middle ear of rats. **J Otolaryngol Head Neck Surg**, v.42, n.1, p.13, 2013.

SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extralites. **Studies in Mycology**, v.49, p.1-260. 2004.

SAMSON, R.A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J.C., VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Stud Mycol.** 59:129–45, 2007.

SAMSON, R.A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**. Jun; 78: 141–173, 2014.

SANGLARD, D., ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis** 2: 73–85, 2002.

SANTOS, P.F. et al. Achados otomicroscópicos e histológicos da miringoesclerose induzida em ratos: estudo crítico de um modelo experimental. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.71, n.5, p.668-74, 2005.

SARVAN, R.R., KIKANI, K.M., MEHTA, S.J., JOSHI, P.J. Clinico-mycological study of otomycosis. **International Journal of Biological & Medical Research**, v.3, n.4, p.2469-2470, 2012.

SCHOCH, C.L., SEIFERT, K.A., HUHNDORF, S. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V.109, p.6241–6246, 2012.

SENTHIL KUMARAN, S., KAVITHA, M. A Prospective non-randomised observational case study-The Study of Otomycosis. *J. Evolution Med. Dent. Sci./ eISSN- 2278-4802, pISSN- 2278-4748/ Vol. 6/ Issue 12/ Feb. 09, 2017.*

SEPHIDGAR, A., KYAKAJOURI, K., MEYRZAEI, M., SHARIFI, F. Fungal infection of external ear in otomycosis. **J Babol Med Sci**, v.13, p.25-9, 2001.

SETHI, A., SINGH, I., AGARWAL, A.K., SAREEN, D. Pneumatization of Mastoid Air Cells: Role of Acquired Factors. **International Journal of Morphology**, v.24, n.1, p.35-38, 2006.

SHERRY, L., RAMAGE, G., KEAN, R., BORMAN, A., JOHNSON, E.A., MALCOLM, D. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. **Emerg Infect Dis**. v.23, n.2, p. 328–331, 2017.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.4 e 26, p.37 e 276, 408p. 2004.

SIH, T. Otite externa. *Passages de Paris*. p. 2166-71. 2005.

SILVA-DIAS, A., MIRANDA, I.M., BRANCO, J., MONTEIRO-SOARES, M., PINA-VAZ, C., RODRIGUES, A.G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Front Microbiol**. 6: 205, 2015

SILVA, M. J.; ALVES, A. J.; NASCIMENTO, S. C.; **Il farmaco**, 53, 241, 1998.

SIMÕES, M., SIMÕES, L.C., VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.573–583, 2010.

SIQUI, A.C., SAMPAIO, A.L.F., SOUSA, M.C., HENRIQUES, M.G.M.O., RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* **16: 38-43, 2000.**

SUBISSI, A., MONTI, M., TOGNI, G., MAILLAND, F. Ciclopirox Recent Nonclinical and Clinical Data Relevant to its Use as a Topical Antimycotic Agent. *Drugs*, v.70, n.16, 2010.

SUVARAPU, L.N., SOMALA, A.R. KODURU, J.R. BAEK, S.O.K. AMMIREDDY V.R. A critical review on analytical and biological applications of thio- and phenylthiosemicarbazones *Asian J. Chem.* V.24, p. 1889-1898, 2012.

SZIGETI, G., KOCSUBE, S., DOCZI, I., BEREZKI, L., VAGVÖLGYI, C., VARGA, J. Molecular Identification and Antifungal Susceptibilities of Black *Aspergillus* Isolates from Otomycosis Cases in Hungary. *Mycopathologia*, v.174, p.143–147, 2012.

SNELL, R.S. **Anatomia Clínica para Estudantes de Medicina.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.11, p.692-698, 857p.1999.

SOARES, M.M.S.R., CURY, A.E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.2, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA. **Tratado de Otorrinolaringologia.** 1ª ed. São Paulo: Roca. v.5, cap.2, p.38-49, 3984p. 2003.

SREEPADA, G.S., KWARTLER, J.A. Skull base osteomyelitis secondary to malignant otitis externa. **Current Opinion Otolaryngology Head Neck Surgery**, v.11, p.316-23, 2003.

STERN, J.C., LUCENTE, F.E. Otomycosis. **Ear, Nose and Throat Journal**, v.87, p.804-10, 2008.

STURGULEWSKI, S.K., BANKAITIS, A.U., KLODD, D.A., HABERKAMP, T. What's still growing on your patient's hearing aids? **The Hearing Journal**, v.159, p.8-48, 2006.

SUN, N., LI, D., ZHANG, Y., KILLEEN, K., GROUTAS, W., CALDERONE, R. Repurposing an inhibitor of ribosomal biogenesis with broad anti-fungal activity. **Scientific REPOrTS**, 7: 17014, 2017.

TEITZ, Y et al. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-beta-4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-beta-4':4'-diallylthiosemicarbazone. **Antiviral Res.** v.24, p.305, 1994.

TENÓRIO, R.P., GÓES, A.J.S. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 6, 1030-1037, 2005.

TESTA, J.R.G., VICENTE, A.O., ABREU, C.E.C.; BENBASSAT, S.F., ANTUNES, M.L., BARROS, F.A. Colesteatoma causando paralisia facial. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.69, n.5, p.657-62, 2003.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ªed. São Paulo: Atheneu. cap.57, p.418-419, 586p.2002.

TRÉ-HARDY, M., VANDERBIST, F. TRAORE, H., DEVLEESCHOUWER, M.J. "In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures," **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, n.4, pp.329–336, 2008.

TSEUNG, K.S.Y.N.H., ZHAO, J. Update on the Fungal Biofilm Drug Resistance and Its Alternative Treatment. **Journal of Biosciences and Medicines**, 4, 37-47, 2016.

UMAMAHESHWARI, R.B., JAIN, N.K. Receptor mediated targeting of lectin conjugated gliadin nanoparticles in the treatment of Helicobacter pylori. **J Drug Target**, v.11, p.415–24, 2003.

UNILEVER, PLC, UNILEVER N.V. Antimicrobial Personal Care Compositions. Patent WO 1998023258 A1. Issued date June 04, 1998.
<https://www.google.com/patents/WO1998023258 A1?cl=en&hl=ru>

VALDÉS, B. S.G. Estructura y actividad de los antifúngicos. **Rev Cubana Farm**, v.39, n.2, 2005.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology** 71:3687.

VARGA, J., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. **Studies in Mycology**. 69(1): 57–80, 2011.

VENNEWALD, I., SCHONLEBE, J., KLEMM, E. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. **Mycoses**, v.46, p.12–18, 2003.

VENNEWALD, I., KLEMM, E. Otomycosis: Diagnosis and treatment. **Clinics in Dermatology**, v.28, p.202–211, 2010.

VIRIATO, A. Prospecção de terpenoides com atividade antifúngica para espécies do gênero *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. Franca (SP): Universidade de Franca; 2012.

VISWANATHA, B., SUMATHA, D., VIJAYASHREE, M.S. Otomycosis in immunocompetent and immunocompromised patients: comparative study and literature review. **Ear Nose Throat J.**, v.91, n.3, p.114-21, 2012.

WILLIAMS, D.A., LEMKE, T.L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5.ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2002.

YAVO, W., KASSI, R.R., KIKI-BARRO, P.C., BAMBA, A., KPLÉ, T., MENAN, E.I., EHOOU, F., KONÉ, M. Prevalence and risk factors for otomycosis treated in the hospital setting in Abidjan (Ivory Coast). **Med Trop (Mars)**, v.64, cap.1, p.39-44, 2004.

YENISEHIRLI, G., BULUT, Y., GÜVEN, M., GÜNDAY, E. In vitro activities of fluconazole, itraconazole and voriconazole against otomycotic fungal pathogens. **The Journal of Laryngology & Otology**, v.123, n.9, p.978-81, 2009.

YOUNG, R.C.; BENNETT, J.E.; VOGEL, C.L.; CARBONE, P.P.; DEVITA, V.T. "Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients," **Medicine**, v.49, n.2, pp.147–173, 1970.

WANG, M.C., LIU, C.Y., SHIAO, A.S., WANG, T. Ear problems in swimmers. **Journal of the Chinese Medical Association**, cidade, v.68, n.8, p.347-352, mes.2005.

WEIR, S.J., PATTON, L., CASTLE, K., RAJEWSKI, L., KASPER, J., SCHIMMER, A.D. The repositioning of the anti-fungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.36, n.2, p.128-34, 2011

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, L. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. Eds). **Academic Press**, San Diego 315–322, 1990.

ZABEL, R. A., MORRELL, J. J. **Wood microbiology: decay and its prevention**. Academic Press. 1^a ed. 1992.

ZHANG A.Y., CAMP, W.L., ELEWSKI B.E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics**, v.25, n.2, p.165-183, 2007.

ZAREI MAHMOUDABADI, A. Mycological studies in 15 cases of otomycosis. **Pak J Med Sci** 22:486-8, 2006.

ZAREI MAHMOUDABADI, A., MASOOMI, S.A., MOHAMMADI, H. Clinical and mycological studies of otomycosis. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v.26, n.1, p.187-190, 2010.

APÊNDICE A

PARECER CONSUBSTANCIADOS DO COMITÊ DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "OTOMICOSE: DIAGNÓSTICO E NOVAS ESTRATEGIAS PARA O CONTROLE, PREVENÇÃO E TRATAMENTO"

Pesquisador: Rejane Pereira

Neves Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44747515.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.117.208

Data da Relatoria: 30/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado, apresentado ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

DE FUNGOS, pela aluna MARIA DANIELA SILVA BUONAFINA, sob a orientação da Profª Dra REJANE

PEREIRA NEVES e co-orientação do Prof DR REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar, isolar e identificar fungos em amostras clínicas de pacientes com otite fúngica que fazem ou não uso de aparelho auditivo, e buscar novas estratégias para o controle, prevenção e tratamento da otomicose.

Objetivo Secundário:

Diagnosticar a otite fúngica em pacientes que fazem uso ou não de aparelho auditivo;
Verificar a associação de otomicose com outras doenças da orelha média e externa;
Identificar os isolados fúngicos através de metodologias clássica e molecular;
Correlacionar, através de similaridade genética, os agentes etiológicos obtidos do dispositivo auricular com do conduto auditivo dos pacientes;

Avaliar a capacidade de formação de biofilme, quantitativamente, dos agentes da otomicose.

Determinar o padrão de sensibilidade antifúngica dos agentes etiológicos de otomicose e do biofilme formado nos dispositivos auriculares, frente a antifúngicos comerciais e novas substâncias bioativas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: 1 - Constrangimento no momento da coleta, entretanto serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de secreção de pacientes que terão solicitação médica para diagnóstico microbiológico, independente de execução do projeto.

2 - Possível perda de alguma das amostras, entretanto a pesquisadora se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura.

3 - Possível quebra de sigilo ou extravio de algum dado do prontuário do paciente. Como forma de minimizar esses riscos, a pesquisadora se compromete com a manipulação adequada do prontuário e a confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma Brasil.

Benefícios: 1- os pacientes atendidos no setor de otorrinolaringologia, com suspeita de otite fúngica, terão acesso a um diagnóstico laboratorial micológico rápido e fidedigno, que será realizado no Laboratório de Micologia Médica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. 2- A identificação de todos os agentes etiológicos da otomicose norteará um tratamento mais preciso, visto que, já existe resistência por parte destes organismos aos antifúngicos comercialmente disponíveis.

3- Adicionalmente, acredita-se que a avaliação do potencial antimicótico de substâncias bioativas recentes, que está sendo proposto e nunca foi utilizado para o referido sítio anatômico, poderá compor o arsenal terapêutico e contribuir na terapia desse quadro infeccioso.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e trará uma grande contribuição para a melhoria de vida dos pacientes, uma vez que o diagnóstico da otomicose ainda não é rotina do setor de otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto devidamente assinada e carimbada;
Cartas de anuência do Dep de Micologia da UFPE, do Serviço de Otorrinolaringologia do HC/UFPE e do Serviço de Arquivos Médicos e estatística do HC/UFPE (esta última assinada pela chefia do SAME e também pela gerente de Ensino e Pesquisa do HC/UFPE);

Constam 3 TCLEs (maiores de 18 anos, analfabetos e juridicamente incapazes e responsáveis para menores de 18 anos e 1 TALE (menores de 12 a 18 anos);
Currículo Lattes devidamente anexados;

Termo de confidencialidade devidamente datado e assinado; Projetos adequados em ambos os formatos.

Recomendações:

Deixamos como recomendação, apenas a correção da data de início da pesquisa, no texto, ao final da segunda página do projeto da plataforma, onde se inicia a metodologia. (Salientamos que esta data foi devidamente corrigida no cronograma do projeto da plataforma, bem como no texto projeto do word).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3, da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5. da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 22 de Junho de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)