

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS
CAMPUS FERNANDÓPOLIS/SP**

VANESSA BARBOSA GIMENEZ

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE OLEOS VEGETAIS *in natura* E
OZONIZADOS NO CONTROLE DE *Candida spp***

**EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF IN NATURA AND
OZONIZED VEGETABLE OILS IN THE CONTROL OF *Candida spp***

Fernandópolis – SP

2022

VANESSA BARBOSA GIMENEZ

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE OLEOS VEGETAIS *in natura* E
OZONIZADOS NO CONTROLE DE *Candida spp***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Prof(a). Dr(a). Dora Inés Kozusny-Andreani
Orientador(a)

Fernandópolis – SP
2022

Gimenez, Vanessa Barbosa.

G399a Avaliação da eficácia de óleos vegetais in natura e ozonizados no controle de
cândida spp. / Vanessa Barbosa Gimenez – Fernandópolis: Universidade Brasil, 2022.

81f.: il.; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof(a). Dr(a). Dora Inés Kozusny-Andreani.

1. Cândida spp. 2. Antifúngicos. 3. Plantas Medicinais.
2. 4. Ozônio 5. Sinergismo.

I.Título.

CDD 644.39



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de aprovação

TERMO DE APROVAÇÃO

VANESSA BARBOSA GIMENEZ

**“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE OLEOS VEGETAIS in natura E OZONIZADOS NO
CONTROLE DE Candida spp”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr.(a) Dora Inés Kozusny-Andreani (Presidente - Orientadora)

Prof(a). Dr.(a) Luciana Estevam Simonato de Oliveira (Universidade Brasil)

Prof(a). Dr.(a) Osmar Caon Filho (Fundação Educacional de Fernandópolis)

Fernandópolis, 14 de dezembro de 2022
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Dora Inés Kozusny-Andreani

Campus Fernandópolis

Estrada Projetada F1, s/n, Fazenda Santa Rita - Fernandópolis/SP | 15600-000

Central de Relacionamento com o Aluno - 08007807070

www.ub.edu.br



Termo de Autorização

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página
WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da
CAPES**


Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE OLEOS VEGETAIS in natura E OZONIZADOS NO CONTROLE DE *Candida spp*"

Autor(es):

Discente: Vanessa Barbosa Gimenez

Assinatura: 

Orientadora: Dora Inés Kozusny-Andreani

Assinatura: 

Data: 14/12/2022

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a DEUS, pela infinita bondade, por sustentar a minha fé, e me mostrar que ter paciência é fundamental em todas as conquistas. Por me guiar e dar forças em momentos que as cargas – da vida e acadêmicas – pareciam ser maiores do que eu podia suportar. A ele agradeço também por colocar vários anjos na minha vida, os quais chamo de amigos.

À minha família, por todo apoio, incentivo e principalmente por compreender os momentos em que eu não pude estar presente.

Aos funcionários do Laboratório da Universidade Brasil, campus Fernandópolis, pela preciosa ajuda durante a realização do experimento.

Aos professores, que ao longo do curso, abriram os horizontes e serviram de inspiração e àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este momento.

Aos meus colegas de mestrado, por dividirem suas experiências, dúvidas e risadas. Juntos compartilhamos momentos alegres e divertidos, dividimos experiências e conquistas.

À minha querida orientadora Prof. Dra. Dora, primeiramente por ter aceitado me orientar, pela paciência que teve comigo, por sempre ser atenciosa e gentil, pela sua contribuição para o meu crescimento científico e intelectual. Você é muito especial.

À coordenadora do Laboratório Geral da Universidade Brasil e amiga, Profa. Dra. Gisele Herbst Vazquez pela oportunidade, por sua amizade, apoio e incentivo. Admiro-te.

Ao coordenador do curso de Mestrado em Ciências Ambientais, Prof. Dr. Luiz Sérgio Vanzela, pelo seu comprometimento com o curso. Você fez, faz e sempre fará parte da minha história.

“Há para todas as coisas um tempo determinado por Deus...”

(ECLESIASTE-3)

RESUMO

Candida spp., é um patógeno associado à saúde, causa infecções superficiais ou invasivas com alta taxa de mortalidade. A patogenicidade é atribuída aos fatores de virulência como adesão, proteinases, fosfolipases e hemolisinas. O surgimento de cepas resistentes aos tratamentos convencionais evidencia a necessidade da obtenção de fármacos de alta eficácia e que não gerem resistência microbiana, entre os quais, os óleos vegetais ozonizados têm ganhado destaque por sua ampla gama de efeito antimicrobiano, são eficazes nas terapêuticas antifúngicas, antibacterianas e antivirais. Neste contexto, objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia de óleos vegetais ozonizados e *in natura* na inativação *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 25923 e *Candida tropicalis* ATCC 4563. Para analisar a atividade antifúngica foram utilizados óleos vegetais de coco, de dendê, girassol, de oliva e de pequi, todos na forma *in natura* e ozonizados em concentrações que variaram de 0,32% a 100%. Foi determinada a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em placa. Posteriormente, verificou-se a concentração fungicida mínima e a cinética fungicida dos óleos. Os resultados evidenciaram que os óleos vegetais de girassol, coco, dendê, pequi e oliva *in natura* e ozonizados inativaram *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, no entanto, os óleos *in natura* de dendê, girassol e coco apresentaram concentrações inibitórias e fungicidas mínimas superiores aos óleos ozonizados, enquanto os de oliva e de pequi não apresentaram diferenças. Em relação a capacidade de redução das unidades formadoras de colônias em função do tempo verificou-se que os óleos de oliva e de pequi ozonizados e *in natura* foram mais eficazes. Pelos resultados os óleos vegetais apontaram a possibilidade de utilização na terapêutica de espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Candida spp.*, antifúngicos, plantas medicinais, ozônio, sinergismo.

Abstract

Candida spp., is a pathogen associated with health, causes superficial or invasive infections with a high mortality rate. The pathogenicity is attributed to virulence factors such as adhesion, proteinases, phospholipases, and hemolysins. The emergence of strains resistant to conventional treatments, highlights the need to obtain highly effective drugs that do not generate microbial resistance, among which, ozonized vegetable oils have gained prominence for their wide range of antimicrobial effect, are effective in antifungal therapies, antibacterial and antiviral. In this context, the objective of this research was to evaluate the effectiveness of ozonated and *in natura* vegetable oils in the *in vitro* inactivation of *Candida albicans* ATCC 25923 and *Candida tropicalis* ATCC 4563. To analyze the antifungal activity, vegetable oils of coconut, palm oil, sunflower, olive and pequi, all fresh and ozonized in concentrations ranging from 0.32% to 100%. The minimum inhibitory concentration was determined by the plate microdilution method, and then the minimum fungicidal concentration and the fungicidal kinetics of the oils were verified. The results showed that the vegetable oils of sunflower, coconut, palm oil, pequi and olive, *in natura* and ozonized, inactivated *Candida tropicalis* and *C. albicans*, however the *in natura* oils of palm, sunflower and coconut presented minimum inhibitory and fungicidal concentrations higher than those of ozonized oils, while those of olive and pequi did not show differences. Regarding the ability to reduce colony-forming units as a function of time, it was found that olive and pequi oils, ozonated and *in natura*, were more effective. Based on the results, the vegetable oils indicate the possibility of using them in the therapy of *Candida spp.*

Keywords: *Candida spp.*, antifungals, medicinal plants, ozone, synergism

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Principais morfologias de patógenos fúngicos humanos A, B e C - Imagens de células de *Candida albicans* visualizada por microscopia de contraste de fase e esquema representativo de cada morfologia.....24
- Figura 2** - Esquema representativo dos estágios de formação de biofilme de *Candida albicans*.....28
- Figura 3** - Reação de esterificação entre uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos, onde o produto principal é uma molécula de triglicerídeo.....31
- Figura 4** - Estrutura molecular dos ácidos graxos de maior ocorrência na natureza.....32
- Figura 5** - (A) Coqueiro Gigante; (B) Coqueiro Anão; (C) Coqueiro Híbrido33
- Figura 6** - (A) corte longitudinal do coco verde e suas partes constituintes; (B) corte longitudinal do coco maduro, castanha ou Copra do coco.....34
- Figura 7** - (A) Planta de Dendzeiro (*Elaeis guineensis Jaquim*); (B) frutos verdes e maduros organizados em cachos.....35
- Figura 8** - (A) Cacho de dendê (A). Polpa e semente do fruto do dendzeiro (B). (*Elaeis guineensis Jaquim*)36
- Figura 9** - (A) Flor de Girassol (*Helianthus annuus L.*); (B) Semente e Óleo de Girassol (*Helianthus annuus L.*)38
- Figura 10** - (A) Oliveira (*Olea europaea*); (B) azeitonas verdes; (C) Azeite de oliva.....39
- Figura 11** - (A) *Caryocar brasiliense* ou pequizeiro; (B) Flor do pequizeiro. (C) Folha do *Caryocar brasiliense* ou pequizeiro.....40
- Figura 12** - (A) Os frutos do pequizeiro ainda verde. (B) o fruto do pequizeiro maduro e pronto para o consumo.....41
- Figura 13** - Partes do fruto do pequizeiro. Epicarpo Coriáceo de cor verde (EC), Mesocarpo Externo (ME), Mesocarpo Interno (MI), Endocarpo Espinhoso (EE) e amêndoa ou semente (A).....42
- Figura 14** - Esquema representativo da reação química do ozônio com triglicerídeos.....45
- Figura 15** - (A) Cepas de *Candida albicans*; (B) Cepas de *Candida tropicalis*...46

Figura 16 - Ozonização dos óleos vegetais.....	47
Figura 17 - Esquema representativo da susceptibilidade <i>in vitro</i> utilizando o teste de microdiluição em caldo.....	49
Figura 18 - Esquema representativo da metodologia de microdiluição.....	50
Figura 19 - Intervalos de confiança (95%) para cada um dos óleos essenciais avaliados de acordo com os tratamentos estudados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente....	54
Figura 20 - Contagem microbiana de <i>Candida albicans</i> para o óleo de coco <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	54
Figura 21 - Contagem microbiana de <i>Candida albicans</i> para o óleo de dendê <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	55
Figura 22 - Contagem microbiana de <i>Candida albicans</i> para o óleo de girassol <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	55
Figura 23 - Contagem microbiana de <i>Candida albicans</i> para o óleo de oliva <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	56
Figura 24 - Contagem microbiana de <i>Candida albicans</i> para o óleo de pequi <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	56
Figura 25 - Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos essenciais <i>in natura</i> . Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.....	58
Figura 26 - Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais ozonizados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.....	59
Figura 27 - Intervalos de confiança (95%) para cada um dos óleos essenciais avaliados de acordo com os tratamentos estudados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente....	60
Figura 28 - Contagem microbiana de <i>Candida tropicalis</i> para o óleo de coco <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	61
Figura 29 - Contagem microbiana de <i>Candida tropicalis</i> para o óleo de dendê <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	61

Figura 30 - Contagem microbiana de <i>Candida tropicalis</i> para o óleo de girassol <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	62
Figura 31 - Contagem microbiana de <i>Candida tropicalis</i> para o óleo de oliva <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	62
Figura 32 - Contagem microbiana de <i>Candida tropicalis</i> para o óleo de pequi <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	63
Figura 33 - Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais <i>in natura</i> . Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.....	65
Figura 34 - Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos essenciais ozonizados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos vegetais ozonizados e <i>in natura</i> frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 25923 e <i>Candida tropicalis</i> ATCC 4563.....	52
Tabela 2. Média±desvio padrão (Mediana) de <i>Candida albicans</i> submetida aos óleos vegetais ozonizados e <i>in natura</i>	53
Tabela 3. Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados.....	57
Tabela 4. Média±desvio padrão (Mediana) do microrganismo <i>Candida tropicalis</i> submetido aos óleos essenciais <i>in natura</i> e ozonizados.....	60
Tabela 5. Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos extratos avaliados.....	64
Tabela 6. Média±desvio padrão (Mediana) da carga microbiana para os óleos essenciais <i>in natura</i> e ozonizados de acordo com os microrganismos analisados.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABOZ	Associação Brasileira de Ozonioterapia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
AcGs	Ácidos Graxos
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
<i>Candida sp</i>	Especie de <i>Candida</i>
<i>Candida spp</i>	Especies de <i>Candida</i>
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
<i>EPS</i>	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
IFS	Infecção Fúngica Sistêmica
IMD	Dispositivo Médico Interno
NACs	Espécies de <i>Candida</i> não <i>albicans</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogênico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
rpm	Rotações por minuto
QS	<i>Quorum Sensing</i>
SAPs	Enzimas Aspartil Proteinases
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1 <i>CANDIDA</i> SPP. E CANDIDÍASE.....	21
3.1.1 Epidemiologia.....	21
3.1.2 Morfogênese.....	23
3.1.3 Fisiopatogenia.....	24
3.1.4 Fatores de virulência.....	25
3.1.5 Capacidade de adesão.....	25
3.1.6 Enzimas Hidrolíticas.....	26
3.1.7 Biofilme.....	27
3.1.8 Resistência aos antifúngicos.....	29
3.2 PRODUTOS NATURAIS.....	30
3.2.1 Óleos vegetais.....	31
3.2.2 Óleo de Coco (<i>Cocos nucifera</i> L.).....	33
3.2.3 Óleo de Dendê (<i>Elaeis guineensis</i> Jaquim).....	35
3.2.4 Óleo de Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	37
3.2.5 Óleo de Oliva (<i>olea europea</i> Linné.)	38
3.2.6 Óleo de Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>)	40
3.3 OZÔNIO (O ₃).....	42
3.3.1 Óleo Ozonizado.....	44
4. METODOLOGIA.....	46
4.1 LOCAL DA PESQUISA.....	46

4.1.1 Meios de cultivo	46
4.1.2 Micro-organismos.....	46
4.1.3 Inóculo.....	47
4.1.4 Óleos vegetais ozonizados.....	47
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	48
4.3 CINÉTICA FUNGICIDA DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	50
4.4 AVALIAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5 RESULTADOS	52
5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E <i>IN NATURA</i>	52
5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E <i>IN NATURA</i> FRENTE A <i>CANDIDA ALBICANS</i>	53
5.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E <i>IN NATURA</i> FRENTE A <i>CANDIDA TROPICALIS</i>	59
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas por espécies de *Candida* (*Candida spp*), tem sido descritas como uma ameaça à saúde global. O gênero *Candida* é tipicamente um patógeno associado à saúde. Causa infecções superficiais ou invasivas com alta taxa de morbidade e mortalidade, especialmente nos indivíduos com doenças crônicas de base ou imunossupressão (JEFFERY-SMITH, 2018).

O gênero *Candida* é constituído de aproximadamente 200 espécies de leveduras, no entanto as de interesse clínico são; *Candida albicans*, *guilliermondii*, *kefyr*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *viswanathii* e *glabrata*. Sendo a espécie *albicans* responsável pela maioria das infecções (ALVARES;SVIDZINSKI;CONSOLARO, 2007; SARDI et al. 2013).

Em condições normais as leveduras são comensais, predominantemente nos tratos gastrintestinal, geniturinário, pele e mucosa de indivíduos saudáveis. Todavia o desequilíbrio da flora normal, ruptura das barreiras do epitélio ou disfunção do sistema imunológico favorecem a transição de *Candida spp* de um comensal a um patógeno (ALVARES;SVIDZINSKI;CONSOLARO, 2007; SARDI et al. 2013).

Embora a maioria das infecções sejam prevalentes por *Candida albicans*, espécies de *Candida* não *albicans* (NACs), resistentes tem sido isolada de infecções em vários países nas últimas décadas. Dentre as quais *Candida tropicalis* é descrita como a segunda espécie mais virulenta. Além disso Isolados de *Candida tropicalis* em infecções graves apresentaram resistência aos medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis, como os derivados azoles, anfotericina B e equinocacandinas, o que é um grave problema na terapêutica, já que vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento da resistência antifúngica, incluindo o uso indiscriminado de antifúngicos no tratamento de infecções nosocomiais (CHOI et al. 2016; SENEVIRATNE et al. 2016).

Os fatores de risco para infecções por *Candida tropicalis* são semelhantes aos de outras espécies de *Candida*. Isso não é surpreendente, visto que muitas espécies de *Candida* são patógenos oportunistas e estão principalmente associadas a pacientes em estado crítico e imunocomprometidos, tais como, idade avançada, diabetes mellitus, cirurgia recente, a presença de um dispositivo médico permanente

(por exemplo, cateter venoso central), o uso de hemodiálise, um estado neutropênico, doença renal crônica ou o uso de antibióticos e / ou antifúngicos de amplo espectro (RUIZ-GAITAN et al. 2018; TIAN et al. 2018, WANG et al. 2018).

A patogenicidade de *Candida spp* é atribuída as características de virulência, como capacidade de aderência, morfogênese, produção de biofilme e enzimas hidrolíticas (AHMAD, MOLEPO, PATEL, 2016). A compreensão desses fatores e atividades que contribuem para a virulência em diferentes espécies de *Candida* é crucial para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (LARKIN et al. 2017; WANG et al. 2018).

Uma vez que o desenvolvimento de novos antifúngicos é restrito pelo número limitado de alvos seletivos em fungos (LARKIN et al. 2017; HILLIER et al. 2021). Portanto, o conhecimento desses fatores de virulência em *Candida spp* que foi relatado como resistente a drogas antifúngicas, ajudará a encontrar novos alvos de drogas antifúngicas e a desenvolver agentes antifúngicos mais eficazes para melhores regimes terapêuticos.

Nesse contexto destacam-se os produtos de origem natural, como o gás ozônio e as plantas medicinais, utilizadas nas formas de tinturas, extratos, chás, infusões e óleos vegetais (MARTÍNEZ-SANCHEZ, 2021; BRASIL, 2006).

O gás ozônio (O_3), tem sido alvo de estudos em diversos países, sua adição em produtos como, óleos extraídos de plantas oleaginosas tem se mostrado alternativa promissora para uso dermatológico, já que os óleos vegetais possuem capacidade de armazenamento do princípio ativo por mais tempo, possui atividade biocida, contra bactérias, vírus e fungos, além de propriedades cicatrizantes (BELTRAN et al. 2021; CARSOSO et al. 2021).

No Brasil o uso do O_3 nos tratamentos de saúde é descrito como prática segura, associado a resultados positivos, de baixo custo e baixa complexidade (BRASIL, 2018). Além disso, a busca por alternativas terapêuticas a partir de fontes naturais, têm se tornado uma prioridade médica indispensável para manter o controle de patógenos resistentes.

2 OBJETIVOS

Avaliar a eficácia de óleos vegetais ozonizados e *in natura* na inativação *in vitro* de *Candida albicans* ATCC 25923 e *Candida tropicalis* ATCC 4563.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade antifúngica dos seguintes óleos vegetais *in natura* e ozonizados: Óleo de Coco; Óleo de Dendê; Óleo de Girassol; Óleo de Oliva; Óleo de Pequi, sobre isolados de *Candida albicans* ATCC 25923 e *Candida tropicalis* ATCC 4563;
- ✓ Definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- ✓ Definir o tempo de sobrevivência das espécies de *Candida* quando expostas aos diferentes óleos;
- ✓ Verificar presença de sinergismo do gás ozônio com os óleos vegetais *in natura*;
- ✓ Avaliar possíveis diferenças de acurácia nos resultados encontrados através das metodologias de microdiluição em placa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *CANDIDA* SPP, E CANDIDÍASE

O gênero *Candida* é classificado taxonomicamente no Reino Fungi, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Sacchamycetaceae* (HOOG et al. 2011). Pode ser encontrada no solo, água, na microbiota de homens e animais, em ambientes hospitalares e nas superfícies de objetos e alimentos (EGGIMAN et al. 2003; PASQUALOTTO, 2004).

É composto por aproximadamente 200 espécies, entre elas as de interesse clínico são: *Candida albicans*, *guilliermondii*, *kefyr*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *viswanathii* e *glabrata*. (KHAN et al. 2010; WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Entre as quais *Candida albicans* é prevalente na maioria das infecções, no entanto infecções por NACs, estão emergindo significativamente nas últimas décadas, o que representa grandes desafios para os serviços de saúde (DE ALBUQUERQUE MARANHÃO et al. 2019).

Candida spp é comensal na microbiota da maioria dos indivíduos saudáveis, pode ser encontrada em vários sítios anatômicos, como, nos tratos gastrintestinal, trato geniturinário, na pele e mucosas. Todavia um desequilíbrio no sistema imunológico pode favorecer o surgimento de infecções, denominadas candidíase ou candidose (D'EÇA JÚNIOR, 2010; HUANG, 2012;).

Infecções leves apresentam lesões de pele ou mucosas e atinge frequentemente espaços interdigitais, mamas, virilhas, unhas e mucosas oral ou vaginal (LOPEZ et al. 2005; LOCKHART et al. 2017). Nos casos graves atinge a corrente sanguínea e órgãos internos como pulmão, rim, baço fígado e coração, podendo evoluir para sepse e meningites (PEIXOTO et al, 2014; MACALUPÚ, 2018).

3.1.1 Epidemiologia

Infecções fúngicas por *Candida spp* são descritas como um grave problema de saúde pública nas regiões subdesenvolvidas e países desenvolvidos, uma vez que representam 80% dos registros de infecções em hospitais, sobretudo nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). O que não é surpreendente visto que o progresso e

avanços nos tratamentos médicos para doenças graves, aumentam a sobrevivência dos pacientes, porém, resultam em nichos ecológicos de microrganismos produtores de biofilmes e as complicações infecciosas (RUIZ-GAITAN et al. 2018; TIAN et al. 2018, WANG et al. 2018).

A ocorrência dessas infecções acarretam maior tempo de internação e aumento dos custos hospitalares, além de elevados índices de morbidade e mortalidade (MENEZES et al. 2011; ALVES, 2017).

Embora a espécie *albicans*, seja prevalente, as infecções por NACs tem se tornado frequente. Nesse contexto *Candida tropicalis* é amplamente considerada a segunda ou terceira espécies mais virulenta de *Candida spp*, com forte produtor de biofilme, produz vários fatores de virulência, incluindo adesão a células epiteliais e endoteliais, secreção de enzimas líticas, como proteinases, fosfolipases e hemolisinas, transição de botão para hifas e o fenômeno comutação fenotípica (NUCCI, COLOMBO, 2007; ALVARES, 2007; CORNELLY et al.; WANG et al. 2015).

Rodrigues (2020) realizou um estudo no Brasil com 22 hospitais públicos, no Estado de São Paulo, onde foram obtidas 144 cepas de candidemia, dentre as quais *Candida albicans*, esteve presente em todos os hospitais, representando a segunda espécie mais frequente com 42 (29,1%), enquanto *Candida tropicalis* em terceiro lugar foi isolado em 21 (14,6%) dos casos totais durante os anos de 2017 e 2018 evidenciando a prevalência de *Candida spp* dentre as infecções fúngicas.

Nos Estados Unidos, Hillier et al. (2021) realizaram uma pesquisa com 303 mulheres de idade entre 18 e 45 anos, diagnosticadas com vaginite, em 8 clínicas de atendimento comunitário, e pelos resultados obtidos verificaram que o nível de concordância entre exame laboratorial de cultura e NAAT (*Nucleic Acid Amplification Test*) foi de 90% para o grupo de *Candida spp*, as espécies identificadas foram *albicans*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *dublinskiensis*.

De Albuquerque Maranhão et al. (2019), em sua pesquisa aponta *Candida spp*, como a causa mais comum de infecção ginecológica em mulheres, *Candida albicans* representa 60%, enquanto as infecções por NACs apontam 25% dos casos. Crastechini, et al. (2018), em estudo *in vivo* com 493 pacientes, portadores de estomatite proteica, identificaram *Candida albicans* em 96% dos isolados clínicos.

3.1.2 Morfogênese

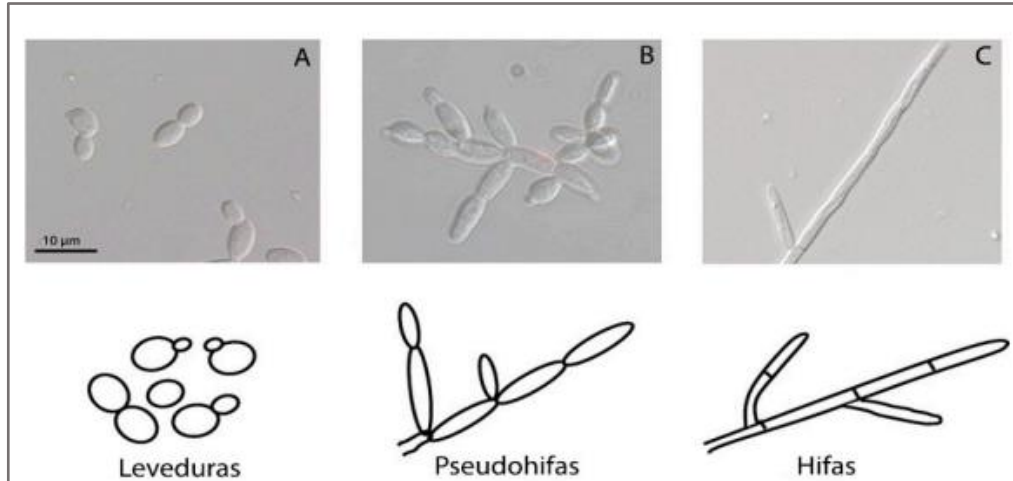
As espécies do gênero *Candida* apresentam variações e divergências genômicas e fenotípicas entre si, tais como, morfologia, tamanho celular, requisitos de crescimento, composição da parede celular e distribuição dos fatores de virulência. São predominantemente leveduriformes, a maioria das espécies deste gênero são dimórficas, ou seja, crescem na forma de leveduras e pseudo-hifas. No entanto *Candida albicans* e *Candida tropicalis* são considerados fungos polimórficos visto que possuem a capacidade de formar leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (D'EÇA, 2010; BALLAL et al. 2008).

A transição morfológica entre leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras é regulada por fatores considerados externos e internos. Os fatores externos referem-se às condições enfrentadas pelo fungo durante os ciclos de vida no organismo do hospedeiro, tais como, a elevação da temperatura corpórea (37°C), alterações do pH, soro humano, baixos níveis de oxigênio, altos níveis CO₂, deficiência nutricional, entre outros. Os fatores internos são relacionados às alterações genéticas e epigenéticas, como a via de transdução de sinais e fatores de transcrição, que desempenham importante papel na regulação da morfogênese de *Candida spp* (CORNELLY et al. 2015; MENEZES; CUNHA; CUNHA, 2011).

As formas leveduriformes possuem tamanhos variáveis, entre 2 e 11µm de diâmetro e consistem em células simples, de formato redondo ou ovais (Blastoconídios). Em cultivo apresentam colônias de coloração branca a creme de aspecto pastoso, com superfície lisa ou rugosa. Replicam-se tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose, normalmente de forma assexuada e por brotamento (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

As pseudo-hifas crescem a partir do brotamento, na fase de transição entre a levedura e o micélio, onde os brotos formados permanecem ligados uns aos outros, dando origem ao tubo germinativo, ou processo de filamentação, nesta fase não ocorre a formação de septos. As hifas verdadeiras crescem a partir dos filamentos denominados tubos germinativos, que forma estruturas alongadas, interligadas, com lados paralelos, larguras uniformes e septos, apresentadas na figura 1 (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011; TIRABOSCHI et al. 2017).

Figura 1 - Principais morfologias de patógenos fúngicos humanos A, B e C - Imagens de células de *Candida albicans* visualizada por microscopia de contraste de fase e esquema representativo de cada morfologia.



Fonte: Thompson; Carlisle; Kadosh (2011).

As alterações fenotípicas e morfológicas de *Candida spp* contempla os principais mecanismo de agressão e invasão tecidual, visto que facilita a aderência ao substrato e favorece a formação do biofilme (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCHA; CHAVES, 2017).

3.1.3 Fisiopatogenia

As leveduras de *Candida spp* habitam na microbiota humana, em diversos sítios anatômicos sem causar nenhum efeito prejudicial à saúde. Todavia alguns fatores podem facilitar a transição do fungo de comensal a um patógeno, como, o desequilíbrio da microbiota normal, ruptura das barreiras do epitélio de pele ou mucosas, aumento da população fúngica por uso de antimicrobiano ou disfunção do sistema imunológico (ALVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007; HUANG, 2012).

As infecções por *Candida spp* podem ocorrer pelas vias endógena ou exógena. A via endógena é considerada o principal mecanismo de transmissão, sendo a mucosa gastrointestinal, provavelmente, a via mais comum deste tipo de infecção. O risco de infecção por esta via é excepcionalmente elevado em pacientes submetidos à cirurgia abdominal recente ou com outros eventos gastrointestinais como perfuração

gastroduodenal, fístula, ou pancreatite aguda necrosante (COLOMBO, 2007; D'EÇA JÚNIOR et al. 2011; MENEZES et al. 2013).

A infecção pela via exógena ocorre principalmente por infecção cruzada, ou seja, quando é transmitida por meio das mãos de profissionais da saúde durante o cuidado, e/ou formação de biofilme em dispositivos médicos internos. Visto que as leveduras podem estar presentes em superfícies inanimadas úmidas ou secas, além de dispositivos e materiais médico-hospitalares, como os diferentes tipos cateter ou soluções intravenosas que estejam contaminadas (COLOMBO, 2007; MENEZES et al. 2013; D'EÇA JÚNIOR).

3.1.4 Fatores de virulência

Os fatores de virulência em *Candida*, envolve a capacidade de aderência a células e tecidos, morfogênese, variabilidade fenotípica, produção de biofilme sobre células e superfícies inanimadas, pleomorfismo, capacidade de expressão de enzimas extracelulares, fosfolipases e proteinases, que invadem e degradam os tecidos do hospedeiro levando à candidíase (AHMAD, MOLEPO, PATEL, 2016).

Na patogenicidade, acredita-se que haja uma ação sinérgica entre os fatores de virulência de *Candida spp* e os fatores de risco do hospedeiro, onde, os vários mecanismos de agressão do patógeno, associados à debilidade na resposta imunológica do hospedeiro atuam no desenvolvimento de candidíase (TAMURA et al. 2007; SARDI et al. 2013; SARIGUZEL et al. 2015).

3.1.5 Capacidade de adesão

A capacidade de adesão é o primeiro fator de virulência no processo de infecção por *Candida spp*. Esse processo consiste na fixação e penetração do fungo na célula do hospedeiro, ou em superfícies inanimadas. A adesão é condicionada por fatores biológicos e não biológicos (SILVA et al. 2012; SARDI et al. 2013).

Os fatores não biológicos compreendem as interações químicas que ocorrem entre as macromoléculas, como, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de

hidrogênio. Nos fatores biológicos, a adesão é mediada por proteínas chamadas de adesinas, presentes na parede celular fúngica que se ligam especificamente a moléculas que estão na superfície das células epiteliais do hospedeiro tais como lipídeos, polissacarídeos, glicoproteínas ou à componentes da matriz extracelular como fibrina, fibronectina, laminina e colágeno (SARDI et al. 2013; DA ROCHA et al. 2021).

Após a levedura aderir à superfície, ocorre a proliferação de novos micro-organismos que resulta na formação de comunidades ou colônias caracterizando, assim, a estrutura conhecida como biofilme (KHAN et al. 2010; NOBILE et al. 2008).

3.1. 6 Enzimas Hidrolíticas

As leveduras são capazes de secretar enzimas hidrolíticas, que destroem as membranas celulares dos tecidos e facilita a colonização e o processo da infecção. As enzimas são, aspartil proteinases (Saps), fosfolipases, lipases e hemolisinas. Em *Candida albicans* e *Candida tropicalis* as enzimas de maior relevância são as proteinases, fosfolipases e hemolisinas (KUMAR, KUMAR, MENON, 2006; OMBRELA, RACCA, RAMOS, 2008).

As Saps, hidrolisam ligações peptídicas das proteínas, como o colágeno, queratina e mucina presentes na superfície das mucosas, bem como componentes do sistema imunológico (citocinas, anticorpos e complemento), o que facilita a invasão dos tecidos do hospedeiro (MENEZES et al. 2013; SANTOS, 2018).

A atividade proteolítica em *Candida albicans* é atribuída a uma família de genes SAP de pelo menos dez membros, oito dos quais codificam proteinases que são secretadas ligadas ao espaço extracelular Sap1-8, enquanto Sap9 e Sap10 são proteínas de membrana. Essas enzimas são ativas em pH ácido, sendo evidentes as diferenças entre as faixas de pH e atividade ideal para cada enzima (KUMAR, KUMAR, MENON, 2006).

As enzimas fosfolipases degradam os fosfolipídeos presentes na membrana plasmática das células do hospedeiro e facilitam a penetração na fase hifa. De acordo com a literatura a principal atividade fosfolipase é devido à expressão do gene PLB1,

regulada por fatores nutricionais, ambiental como temperatura e pH, e fase de crescimento da levedura (OMBRELA, RACCA, RAMOS, 2008).

O gênero *Candida* tem a capacidade de secretar substâncias hemolíticas denominadas hemolisinas, que promovem a destruição das hemácias, após a destruição dos eritrócitos ocorre a liberação do ferro (essencial ao seu desenvolvimento) e captação pelas leveduras (MAUBON et al. 2014; PASTOR GARCIA, 2020).

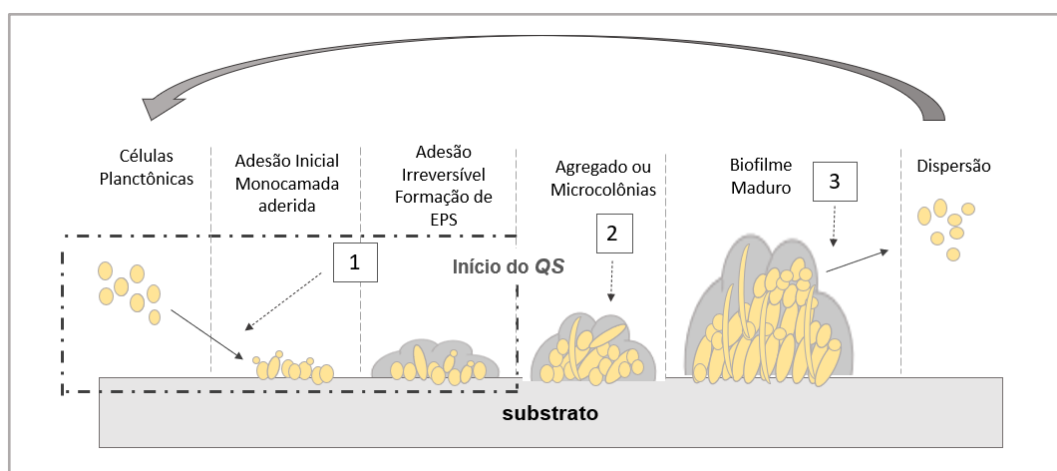
3.1.7 Biofilme

O biofilme é caracterizado pela integração e formação de comunidades, mono ou multiespécies de microrganismo aderidas a um substrato e células planctônicas que se movimentam no interior do biofilme (figura 2), onde existem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (RUTHERFORD; BASSLER, 2012; SARDI, 2013; SHIESARI JUNIOR, et al. 2015).

Dessa forma o biofilme caracteriza uma comunidade altamente diferenciada. Essa estrutura multicelular e complexa é envolvida por uma matriz de polímeros extracelulares o (*Extracellular Polymeric Substances – EPS*), produzida pelo próprio biofilme, essa membrana age como barreira física protegendo o biofilme da ação do sistema imunológico do hospedeiro e impedindo que antimicrobianos ou desinfetantes cheguem a seus sítios de ação (SARDI, 2013; SHIESARI JUNIOR, et al. 2015).

Assim a vida no biofilme garante inúmeras vantagens no processo patológico. Já que permitem a coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios, interligados por meio de microcanais internos (*quorum sensing-QS*), que fazem a comunicação entre as células, além da distribuição de água, nutrientes e metabólitos e aquisição de novas características genéticas pelos microrganismos integrantes (figura 2). Portanto a ocorrência de biofilmes em superfícies vivas ou inanimadas é um fator importante para o desenvolvimento de infecções clínicas (RUTHERFORD; BASSLER, 2012; DA SILVA TRENTIN, 2013).

Figura 2 - Esquema representativo dos estágios de formação de biofilme de *Candida albicans*.



Fonte: Autor

Chandra et al. (2001) e Mukherjee et al. (2005), descreveram a formação do biofilme de *Candida albicans*, em três etapas; adesão inicial (1 a 11 h), fase intermediária (12 a 30 h) e fase de maturação (38 a 72 h):

- ✓ Fase Inicial/Primária (1-11 h): as células de *Candida albicans* apresentam-se como blastoporos (forma de leveduras), aderidas ao substrato, brotamento de novas leveduras, seguido de agregação e formação de microcolônias. Os microrganismos passam de seu estilo vida planctônico ao sésil. Nessa fase o biofilme pode ser reversível;
- ✓ Fase Intermediária (12-30 h): O biofilme se torna irreversível, observa-se o desenvolvimento da *EPS* cobrindo as microcolônias, formação de microcanais de comunicação no interior da matriz, a proliferação de células e microcolônias, os mecanismos de comunicação intracelulares promovem uma mudança de crescimento do tipo leveduriforme para hifas e/ou pseudo-hifas, na arquitetura do biofilme envolvidos pela matriz de polissacarídeo;
- ✓ Fase de Maturação (38-72 h): presença da *EPS*, e crescimento tridimensional do biofilme. Nesta fase o biofilme é composto por células diferenciadas em pseudo-hifas, hifas verdadeiras e leveduras, o rompimento da *EPS* e deslocamento de células principalmente na forma de leveduras pode então formar um novo biofilme em outro sítio (MUKHERJEE et al, 2005; CHANDRA et al. 2001).

A formação de biofilme em materiais biológicos e não biológicos, constituem fontes de infecção, principalmente nos ambientes hospitalares. Essas infecções estão relacionadas à instalação ou manipulação de dispositivos médicos internos (IMD), em procedimentos invasivos. Ocorrem frequentemente nos tratos urinário, respiratório e infecção da corrente sanguínea (MUKHERJEE et al. 2005; RUTHERFORD; BASSLER, 2012; DA SILVA TERNTIN, 2013).

3.1.8 Resistência aos antifúngicos

Com o aumento na incidência das infecções fúngicas novas drogas têm sido introduzidas na terapêutica, em contrapartida, o uso indevido e a frequente exposição têm contribuído para o surgimento de novas cepas resistentes, principalmente nos ambientes hospitalares (MOREIRA et al. 2017; MACALUPÚ, 2018).

Resistência aos antifúngicos é quando um microrganismo não é susceptível a uma determinada droga, ou seja, quando a realização de testes de susceptibilidade *in vitro* indicam que as doses da (MIC ou CIM) de uma droga, ultrapassa o limite estabelecido para o tratamento da espécie (PEREIRA, 2017; TIRABOSCHI et al. 2017).

A resistência microbiana pode ser *intrínseca* (primária), quando o microrganismo apresenta resistência sem nunca ter entrado em contato com droga ou resistência *adquirida* (secundária) quando a resistência ocorre após a exposição do microrganismo a droga (PEREIRA, 2017; TIRABOSCHI, et al. 2017).

Assim a resistência aos antifúngicos intrínseca ou adquirida, constitui grande desafio no combate de fungos patógenos resistentes, uma vez que tem aumentado sua incidência na prática clínica, sobretudo nos pacientes imunodeficientes e imunossuprimidos (MOREIRA et al. 2017; MACALUPÚ, 2018). O que torna essencial o desenvolvimento de drogas com base em fontes naturais, que não ocasionem resistência microbiana e que sejam mais eficazes para melhores regimes terapêuticos (LÓPEZ-ÁVILA, 2016; RIZZATI, 2022).

3.2 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados no tratamento de doenças desde a antiguidade por diferentes povos, nas formas de tinturas, extratos, chás, infusões, óleos vegetais (VIEIRA; MARTINS, 2000; SILVA, 2017).

A utilização de plantas para tratar doenças, denominado fitoterapia, tem ganhado ênfase nas últimas décadas, uma vez que constituem as bases farmacológicas de origem vegetal para o tratamento de diversas doenças. A fitoterapia tem sido associada a inúmeros benefícios, como, combate a resistência microbiana, diminuição dos efeitos colaterais e toxicidade. Diminui a dependência a medicina e tratamento convencional. Tal abordagem incentiva ainda o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (MATTOS et al. 2018).

No Brasil a portaria nº 971/2006 aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), no Sistema Único de Saúde (SUS). A utilização dessa prática está em expansão no mundo todo, sobretudo no Brasil já existe vários programas implantados ou em fase de implantação em todas as regiões (IBIAPING et al. 2014). Uma vez que o Brasil possui *“a maior diversidade vegetal do mundo, ampla sociodiversidade, uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente esse conhecimento”* (BRASIL, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002), destaca que 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais, contudo muitas ainda não possuem eficácia comprovada (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; SILVA, 2017).

Nesse sentido vários estudos têm sido realizados na tentativa de verificar a eficácia dessas plantas no controle de microrganismos, e possibilidades de uso na terapêutica, observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso (BRASIL, 2006).

3.2.1 Óleos vegetais

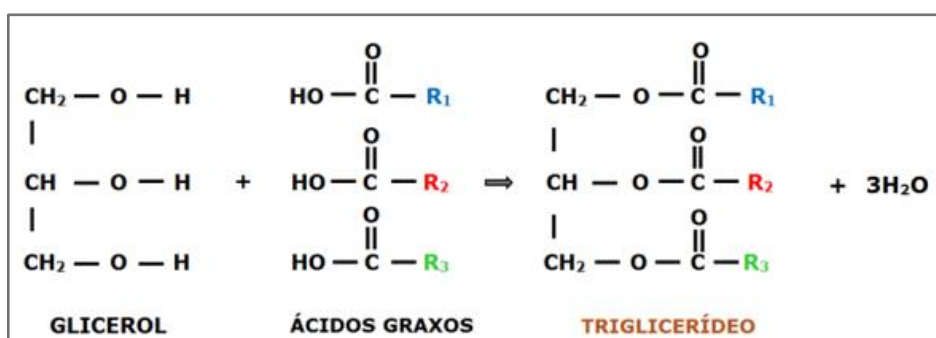
Óleos vegetais são substâncias obtidas de plantas oleaginosas. Geralmente extraído por técnica de prensagem a frio de sementes ou polpa do fruto, raramente outras partes da planta podem ser usadas na extração. É descrito pela química como ácidos graxos (AcGs), pertencem à classe dos lipídios (BENASSI et al. 2013; CARDOSO, 2021).

Possuem alta solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água. Assim como as proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, os lipídeos são componentes essenciais das estruturas biológicas e estão presentes em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e células de gordura (JORGE, 2009).

Os AcGs podem apresentar diferentes composições química, como, triacilgliceróis, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, fosfolipídios, cerebrosídeos, esteróis, terpenos e outras substâncias. No entanto os óleos vegetais são constituídos predominantemente de 98 a 99% de triacilglicerol, triacilglicerídeos e aproximadamente 1 a 2% de outras substâncias como fosfolipídios, cerídeos, clorofila, pigmentos e nutrientes da alimentação entre outros (ANVISA, 2005; JORGE, 2009).

Os óleos vegetais se diferem das gorduras pelo fato de que em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) apresentam-se na forma líquida, enquanto as gorduras vegetais em temperatura ambiente se mantêm na forma sólida ou pastosa (ANVISA, 2005).

Figura 3 - Reação de esterificação entre uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos, onde o produto principal é uma molécula de triglicerídeo.

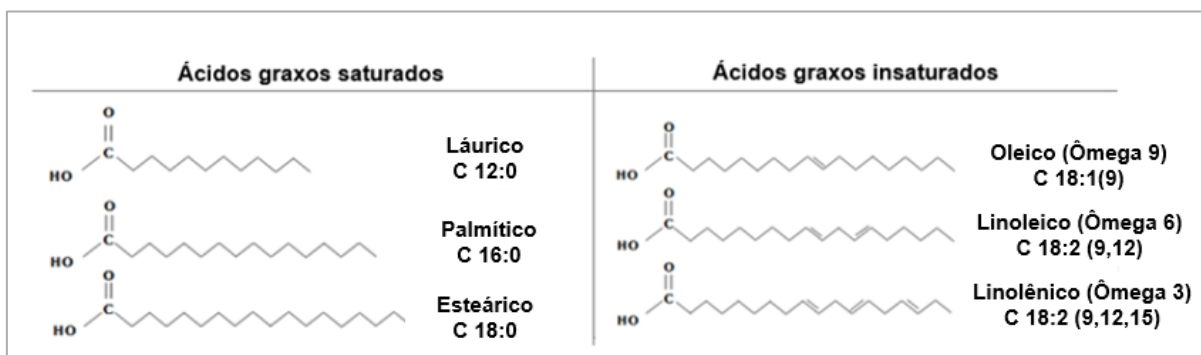


Fonte: Autor

A representação química dos AcGs é formada por um glicerol e três ácidos graxos iguais ou diferentes, formando um tipo particular de éster, conhecido cientificamente como triacilgliceróis (TAGS) (figura 3) também conhecido como triglicérides, triacilglicerídeo ou triacilglicérido (ANVISA, 2005; NARAYANANKUTTY et al. 2018).

Os AcGs podem ser classificados como saturados ou insaturados, de acordo com ausência ou não de ligações duplas na cadeia (figura 4). Entre os ácidos graxos saturados de maior ocorrência estão os ácidos láuricos, palmítico e esteárico, enquanto entre os ácidos graxos insaturados estão os ácidos oleicos, linoleico e linolênico (JORGE, 2009).

Figura 04 - Estrutura molecular dos ácidos graxos de maior ocorrência na natureza.



Fonte: Autor.

Os AcGs são utilizados na alimentação, desempenham funções energéticas, estruturais e hormonais no organismo. Têm sido relacionados com diversos benefícios à saúde, tais como, atividades antioxidantes, prevenção de doenças cardíacas, antidiabéticas, antiartríticas, melhora do sistema imunológico e cicatrizante, por sua ação contra bactérias e fungos (LIMA et al. 2015).

Além disso a produção e comercialização de óleos vegetais e seus produtos representam importância socioeconômica no mundo todo gerando emprego e renda para comunidades locais, produtores agrícolas, indústria e comércio (JORGE, 2009; APPAIAH et al. 2014;).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autoriza a comercialização de diversos óleos vegetais como óleo de algodão, amendoim, arroz,

canola, milho girassol, soja, oliva, coco, palma e gergelim entre outros (ANVISA, 1999). A RESOLUÇÃO RDC Nº 481, DE 15 DE MARÇO DE 2021, dispõe sobre os requisitos sanitários para comercialização de óleos e gorduras vegetais no território nacional (ANVISA, 2021).

3.2.2 Óleo de Coco (*Cocos nucifera* L)

O *Cocos nucifera*, conhecido como coqueiro é uma planta originária do sudeste asiático. Apresenta distribuição mundial, principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical, favorável ao seu desenvolvimento. No Brasil a região nordeste destaca-se com a maior produção de coco do país. A altura do tronco varia de acordo com a espécie, produz em média de 60 a 80 cocos ao ano, com expectativa de vida de aproximadamente 100 anos (BENASSI et al. 2013; LIMA et al. 2015).

No Brasil a produção de coco se dá entre as variedades de coqueiro Gigante, destinado para o consumo do coco seco, da espécie Anão para o consumo da água de coco e o Híbrido (obtido do cruzamento do coqueiro Anão com o Gigante), possui dupla finalidade tanto para o consumo *in natura* do coco seco ou para agroindustrial (figura 5). A produção do coqueiro Gigante representa 70 % da área plantada, a espécie Anão representa 20%, já o coqueiro Híbrido aponta apenas 10% da área de produção. No entanto, novos plantios vêm ocorrendo com variedades do grupo Anão e/ou Híbridos com produtividade superior ao Gigante (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2010).

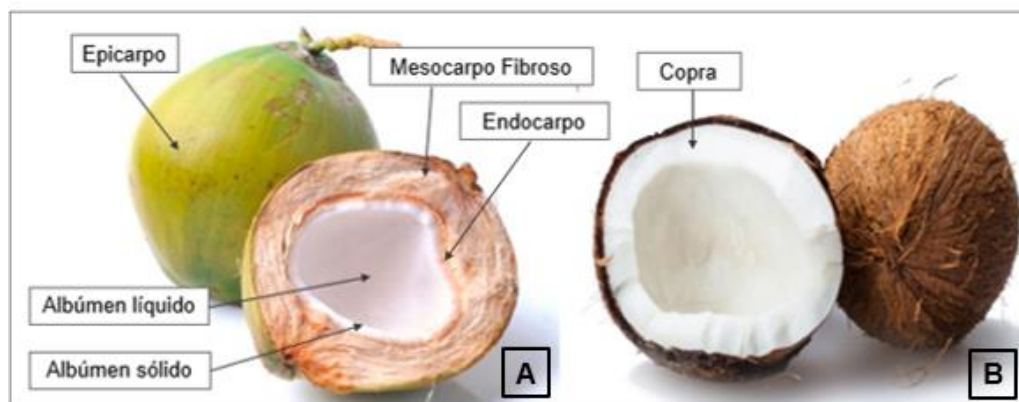
Figura 5 - (A) Coqueiro Gigante; (B) Coqueiro Anão; (C) Coqueiro Híbrido.



Fonte: Martins; Jesus Junior (2010).

O coco é formado pelo epicarpo, película lisa que envolve o fruto, em uma coloração que varia do verde ao marrom, seguida do mesocarpo, camada grossa e fibrosa utilizada de maneira variada na indústria e para pesquisas, e do endocarpo, bastante duro e de coloração escura, que envolve o albúmen gelatinoso, a polpa (figura 6), e o aquoso, a água de coco (LIMA et al. 2005; BENASSI et al. 2013; CABRAL, 2015).

Figura 6 - (A) corte longitudinal do coco verde e suas partes constituintes; (B) corte longitudinal do coco maduro, castanha ou copra do coco.



Fonte: Modificado de Cabral (2015).

O óleo de coco (*Coconut oil*) é composto em sua maioria de ácido láurico que representa aproximadamente 45 a 53% dos ácidos graxos, seguido de outros componentes como, ácido caprílico, cáprico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico e linoleico. Em menores concentrações pode conter outras substâncias como, monoglicerídeos, diglicerídeos, fosfatídeos, ceras, pigmentos (carotenoides e clorofila) e esteróis (matéria insaponificável) como os tocoferóis, que inibem a oxidação das cadeias de ácidos graxos insaturados do óleo de coco (MORETTO, FETT, 1998; APPAIAH et al. 2014; NARAYANANKUTTY et al. 2018).

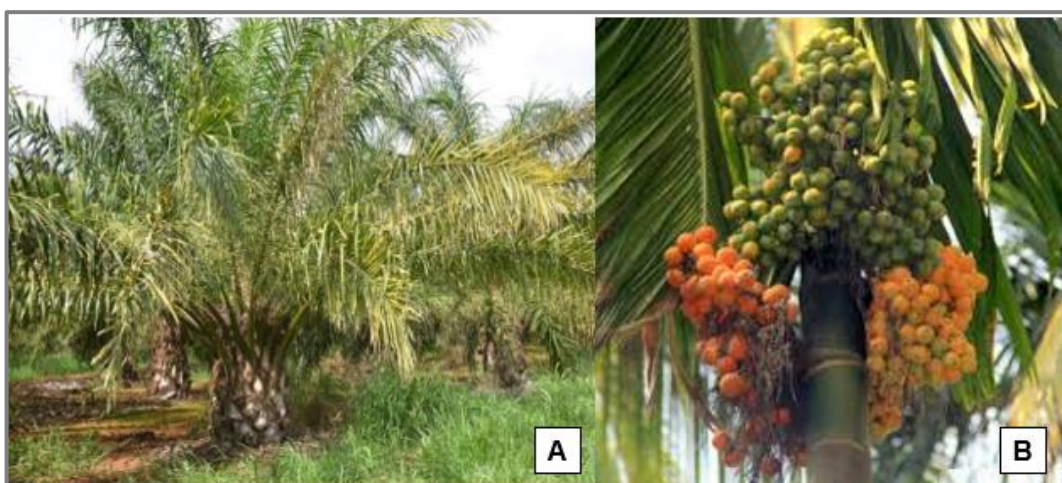
Diversos estudos têm comprovado as ações terapêuticas do coco *in natura* e do óleo de coco, tais como, diurético, no tratamento de infecções da pele, trato urinário e disenterias entre outros (APPAIAH et al. 2014; LIMA et al. 2015; NARAYANANKUTTY et al. 2018).

3.2.3 Óleo de Dendê (*Elaeis guineensis* Jaquim)

O dendezeiro (*Elaeis guineensis jaquim*), conhecida também como, Palmeira-de-dendê, Palma-de-guiné, entre outros é uma planta oleaginosa pertencente à família das *Arecaceae*. Originária da África, atualmente é cultivada em vários países da Ásia, Europa e América do Sul. Introduzida no Brasil no século XVI, durante o período de escravidão, devido as condições de clima e solo semelhantes às de seu habitat original adaptou-se no solo baiano. Assim o azeite de dendê constitui herança africana na cultura da culinária baiana (CURVELO, 2010; FEROLDI; CREMONEZ; ESTEVEAM, 2014; REIS, 2017).

Os frutos da palmeira *Elaeis guineensis* tem formato ovoide, de cor amarelo ou laranja, possui tamanho médio de 5 cm de comprimento, seu peso é de 3 a 30g. Possui três variedades, classificadas de acordo com a espessura do endocarpo, sendo; *Psífera*, *Dura* e *Tenera* (resultante do cruzamento das variedades *Psífera* e *Dura*). A variedade *Psífera* é conhecida pela ausência de casca protetora da amêndoa. A variedade *Dura* apresenta casca com espessura mínima de 2 mm. Já a variedade *Tenera* apresenta casca com espessura inferior a 2mm (CURVELO, 2010; REIS, 2017; RAUL, 2019).

Figura 7 – (A) Planta de Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jaquim); (B) frutos verdes e maduros organizados em cachos.



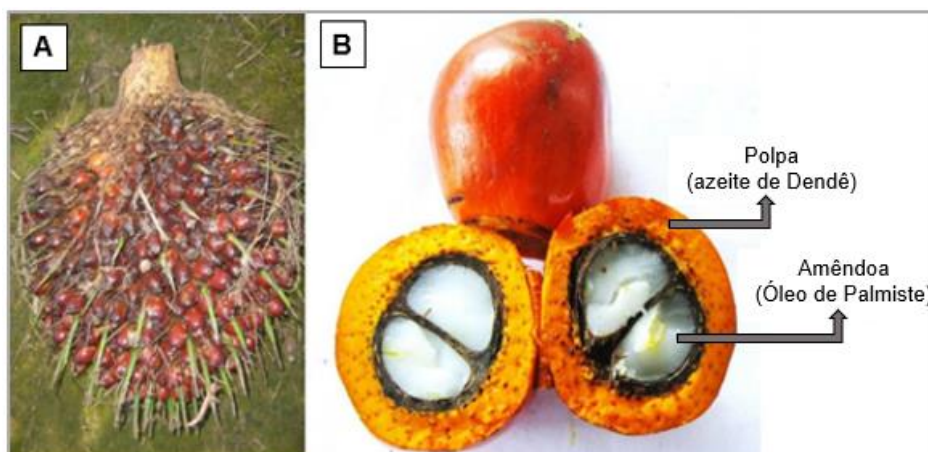
Fonte: Adaptado de Reis (2017).

O óleo de dendê pode ser extraído por diferentes procedimentos, os métodos mais utilizados são a prensagem mecânica e a extração com solventes. A partir do fruto dendê pode ser extraído dois tipos de óleo, sendo, o óleo de palma (*palm oil*), e óleo de palmiste (*Palm kernel*), com caracterização visual e composições químicas diferentes (CURVELO, 2010; FEROLDI; CREMONEZ; ESTEVEAM, 2014).

Óleo de Palma: extraído da polpa (mesocarpo) do fruto maduro, possui denominação internacional (*Crude Palm Oil – CPO*). O mesocarpo contém em média 20-22% de óleo. É composto pelos ácidos graxos palmítico (43,5%) e oléico (42%), e em menor quantidade os ácidos linoleicos (8,4%), esteárico (4,4%), entre outros, além de apresentar tocoferol e tocotrienol. Possui antioxidantes naturais, e ação bactericida, atuando na regeneração e cicatrização de tecidos (FEROLDI; CREMONEZ; ESTEVEAM, 2014; REIS, 2017).

Óleo de Palmiste: extraído da semente, possui denominação internacional (*Palm Kernen Oil – PKO*). A amêndoa ou semente de dendê contém aproximadamente 50 % de óleo. Possui composição de ácidos graxos láurico (46,3%), ácido oléico (16,7%), mirístico (15,7%), palmítico (9,4%), cáprico (3,2), caprílico (3,0%), linoléico (1,5%) entre outros. A grande quantidade de ácido láurico lhe confere propriedades antioxidantes naturais, anti-inflamatória, além de propriedades biocida contra bactérias, fungos e vírus (CURVELO, 2010; VIEIRA et al. 2018).

Figura 8 – (A) Cacho de dendê. (B) Polpa e semente do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jaquim).



Fonte: Modificado de Reis (2017).

O óleo de dendê pode ser consumido *in natura*, processado ou transformado na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica e biocombustível entre outros. Na medicina o azeite de dendê tem sido relacionado com a prevenção de doenças, como, cegueira, lepra e raquitismo, devido as fontes de gorduras da alimentação, além dos precursores de vitamina A (betacaroteno), vitamina D, vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis), e vitamina K (CoQ10, esqualeno, fitosteróis, flavonoides, ácidos fenólicos e glicolípídios), porém esses dados constituem observações que necessitam de respaldo científico (REIS, 2017; RAUL, 2019).

3.2.4 Óleo de Girassol (*Helianthus annuus L.*)

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma dicotiledônea anual, pertencente a ordem *Asterales* e família *Asteraceae*. O gênero deriva do grego hélios, que significa sol, e de anthus, que significa flor, ou "*flor do sol*", que gira seguindo o movimento do sol, é nativo da América do Norte. Atualmente, o girassol é cultivado em todos os continentes. No Brasil o cultivo teve início no século XIX, na região Sul, provavelmente trazida por colonizadores europeus, atualmente a produção de girassol tem aumentado significativamente em produção de grãos e área cultivada no país (GAZOLA et al. 2012).

O fruto do girassol é a semente, geralmente tem formato achatado, composto pelo pericarpo (casca) e pela polpa ou amêndoa, apresenta variedade no tamanho e cor da semente. Pode ser consumido *in natura* na alimentação humana, alimentação para aves, suínos e bovinos, além de outras utilidades como, forragem, silagem, entre outros. O óleo produzido industrialmente a partir das sementes, é o principal produto do girassol (GAZOLA et al. 2012; DALCHIAVON; MALACARNE; DE CARVALHO, 2016).

O óleo de girassol é essencialmente constituído por triacilgliceróis. Destaca-se por suas propriedades físico-químicas e nutricionais. É composto em sua maioria pelos ácidos graxos insaturados oleicos (49,02%), ácido linoleico (45,35%) em menores quantidades contém os ácidos graxos saturados, ácido láurico, mirístico, palmítico, e esteárico, além de outras substâncias como vitamina E, e polifenóis entre outros (CORREIA, et al. 2014; DALCHIAVON; MALACARNE; DE CARVALHO, 2016).

Figura 9 – (A) Flor de Girassol (*Helianthus annuus L.*); (B) Semente e Óleo de Girassol (*Helianthus annuus L.*).



Fonte: Magalhães (2020).

O óleo de girassol possui utilidades culinárias, indústrias de cosméticos e farmacêuticas. Além disso apresenta ações anticarcinogênicas, antitrombóticas, antimicrobianas, atua na regeneração de tecidos e cicatrização de feridas (TOPAN, 2012).

3.2.5 Óleo de Oliva (*olea europea Linné.*)

A oliveira (*Olea europea Linné*), pertence à família das oleáceas, tem sua origem ao Sul do Mar Cáspio, ao norte do Irã e região meridional do Mar Mediterrâneo. A oliveira foi difundida em vários outros continentes, como: Oceania (Austrália), Américas (Chile, Argentina, Uruguai, Brasil), Africano (África do Sul) e Ásia (China). A maior parte é produzida nos países europeus (BÖHMER, 2018; LORENÇATO, 2020).

A oliveira é conhecida por sua resistência, já que é capaz de sobreviver à escassez de água. Produz frutos em geral a partir do quinto anos do plantio e se mantém fértil por séculos. Classificada como árvore de porte médio, possui tronco contorcido, de casca grossa e ramos delgados. As folhas compridas e estreitas são verdes escuras na parte superior e verde acinzentada ou esbranquiçada na parte inferior. Suas flores organizadas em cachos, são brancas e aromáticas (REIS, 2017; BÖHMER, 2018; LORENÇATO, 2020).

O fruto ou azeitona é constituído por um caroço, contém uma única semente e uma camada externa, que pode ser consumido na alimentação ou destinado à

extração do óleo. Contém em média 50% de água, 22% de óleo, 19,1% de carboidratos, 5,8% de celulose, 1,6 % de proteínas, e 1,5 de minerais (GRABHER; HARRIS, 2016; REIS, 2017).

Figura 10 - (A) Oliveira (*Olea europaea*); (B) azeitonas verdes; (C) Azeite de oliva.



Fonte: Lorençato (2020); Rosa (2020).

O óleo ou azeite de oliva é extraído do mesocarpo ou polpa da azeitona. A extração é feita através de prensagem mecânica ou uso de solventes. O azeite extravirgem é obtido por prensa mecânica a frio. É composto majoritariamente (98% do peso total) por triacilgliceróis e ácidos graxos livres, sendo a maior parte por ácido oleico em média (85,4%), ácido palmítico (12,3%), e ácido linoleico (2,2%), além de outras substâncias como, hidrocarbonetos (esqualeno e o β -caroteno, e luteína), polifenóis, vitamina A, vitamina D, vitamina E, e vitamina K (REIS, 2017; BÖHMER, 2018).

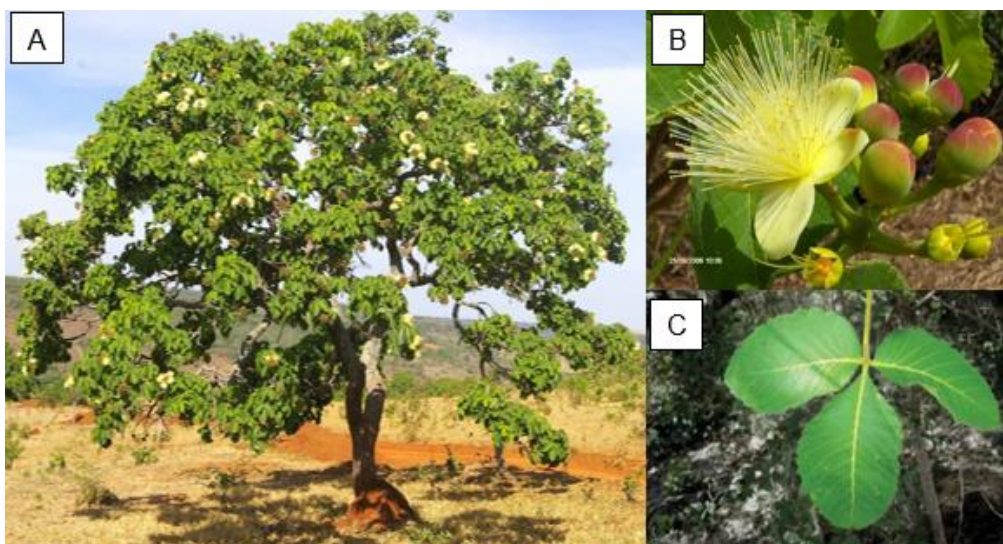
O azeite de oliva possui diversas utilidades na culinária, indústria cosmética e farmacêutica. É utilizado desde a antiguidade para tratar doenças, atualmente diversos estudos comprovam sua eficácia como, ação antioxidante, hidratante, calmante, fortalece o sistema imunológico, regula a função intestinal, regeneração de tecidos, atua na absorção do cálcio, previne sintomas de artrite, previne doenças cardiovasculares e câncer, ajuda nas funções cognitivas, possui atividade antiplaquetária, anti-inflamatória e antimicrobiana (GRABHER; HARRIS, 2016; TERAMOTO, 2017).

3.2.6 Óleo de Pequi (*Caryocar brasiliense*)

O pequi ou *Caryocar brasiliense*, é uma árvore nativa do cerrado brasileiro. Pertence ao gênero *Caryocar*, da família das *Caryocaraceae*. Da ordem Theales, é composta por 25 espécies agrupadas em dois gêneros *Caryocar* e *Anthodiscus*, o gênero *Caryocar* se divide em *caryocar brasiliense* e *caryocar* subespécies. O *Caryocar brasiliense* é mais frequentemente encontrado (LIMA et al. 2007; FALEIRO et al. 2008).

O pequi em geral possui porte arbóreo médio de 7 a 12 metros de altura, dependendo da região, área ambiental e espécie. As folhas do pequi contêm três “dedos” no final do ramo, são grandes e com pequenos pêlos, nos dois lados da folha, e possuem as bordas recortadas. As flores de cor branco-amarelada também são grandes e reunidas em cachos (OLIVEIRA, 2009; RODRIGUES et al. 2009), conforme ilustrado na figura 11.

Figura 11 – (A) *Caryocar brasiliense* ou pequi; (B) Flor do pequi. (C) Folha do *Caryocar brasiliense* ou pequi.



Fonte: Embrapa Cerrado (2017).

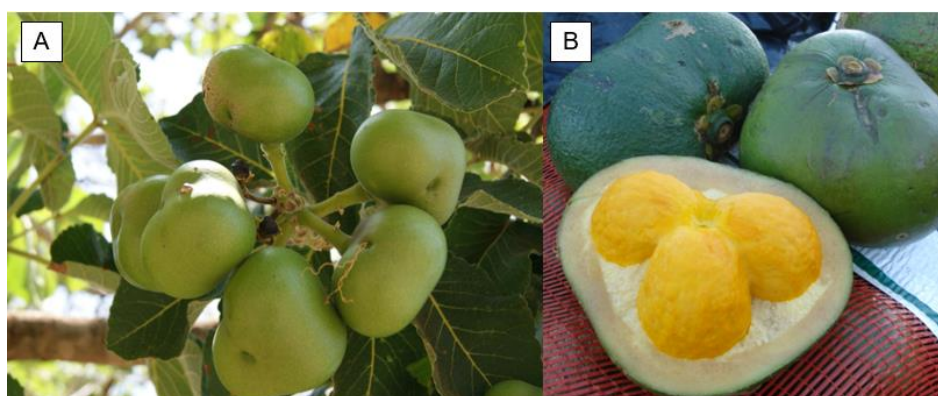
Sua distribuição ocorre em vários estados brasileiros de bioma cerrado. Assim a frutificação ou safra do pequi, que ocorre no período mais chuvoso, depende de

fatores ambientais, como, clima, temperatura e pluviosidade, podendo ocorrer entre os meses de dezembro até abril (BRANDÃO, 2002; AQUINO, 2007).

O fruto do pequizeiro recebe o nome de pequi, que vem da língua indígena tupi, onde “py” significa pele e “qui” espinhos, assim o nome faz referência aos pequenos espinhos no contidos no caroço. O nome *Caryocar* brasiliense, refere-se a caroço (“*caryon*” significa núcleo ou caroço), dentro do fruto grande e redondo (“*kara*” quer dizer cabeça), e que ocorre amplamente no Brasil (“brasiliense” significa originário do Brasil). Popularmente os frutos do pequizeiro é também conhecido como, pequi, piqui, piquiá, grão de cavalo, piquiá bravo e amêndoa de espinho (BRANDÃO, 2002; AQUINI, 2007).

Durante a safra cada planta produz em média de 110-420 frutos, podendo obter de 1 a 6 caroços por fruto. O fruto (figura 12) é formado por cinco partes; a mais externa o Exocarpo ou Epicarpo Coriáceo, de cor verde; o Mesocarpo Externo e o Mesocarpo Interno de coloração amarelada o qual constitui a parte comestível do fruto. O Endocarpo Espinhoso protege a Amêndoa ou semente, a qual é revestido por uma fina camada marrom (LIMA, 2006; FALEIRO et al. 2008).

Figura 12 - (A) Os frutos do pequizeiro ainda verde.(B) o fruto do pequizeiro maduro e pronto para o consumo.

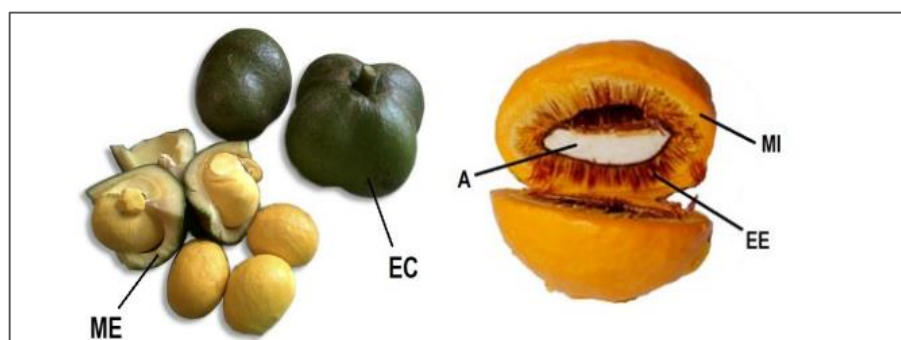


Fonte: Embrapa Cerrado (2017).

O óleo do pequi pode ser extraído do mesocarpo interno (polpa) e da amêndoa (MELO JUNIOR et al. 2004). A extração do óleo pode ocorrer de três formas: com o cozimento da polpa ou mesocarpo interno; através do uso de solventes adicionado à

farinha da polpa; e extrusão mecânica através da prensa da amêndoa (RODRIGUES et al. 2009; EMERENCIANDO, 2017).

Figura 13 - Partes do Fruto do Pequizeiro. Epicarpo Coriáceo de cor verde (EC), Mesocarpo Externo (ME), Mesocarpo Interno (MI), Endocarpo Espinhoso (EE) e amêndoa ou semente (A).



Fonte: Emerenciando (2017).

O óleo de pequi é composto pelos ácidos graxos palmítico (35,17%) e oleico (55,87%), sendo o total de saturados 37,97% e de insaturados 61,35%, apresentando ainda 0,68% não identificados (DE LIMA et al. 2007; RODRIGUES et al. 2009; EMERENCIANDO, 2017). Além disso, possui alto teor de carotenoides, é rico em lipídio, proteínas, vitamina C e outros micronutrientes (BRANDÃO, 2002; AQUINO, 2007).

Na medicina popular o valor terapêutico do pequi vem sendo pesquisado e sua eficácia têm sido amplamente comprovadas para diversas finalidades, tais como, doenças respiratórias, bronquite, gripes e resfriados, úlceras cutâneas, inflamações na pele e dores osteomusculares (VIEIRA; MARTINS, 2000; DE LACERDA NETO et al. 2018). Possui atividade antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória. Além de prevenir doenças associadas com a visão e outras relacionadas com a idade. O extrato de suas folhas possui atividade contra micoses (fungos) e moluscos (caracóis) (RODRIGUES et al. 2009; EMERENCIANDO, 2017).

3.3 OZÔNIO (O₃)

A substância O₃ foi descoberta no século XIX pelo químico alemão Christian Friedrich Schonbein, desde então tem sido utilizado no tratamento de efluentes,

higienizador de alimentos, e desodorizantes de ambientes, além de tratamentos médicos e odontológicos (MARTINS; KOZUSNY-ANDREANI; MENDES, 2015; UGAZIO et al. 2020).

O O_3 é um gás natural presente na atmosfera, útil por absorver as radiações ultravioletas. É formado por três moléculas de oxigênio (O_2), que se forma constantemente quando os raios solares são capazes de quebrar uma molécula de oxigênio (O_2), liberando o átomo de oxigênio (O), permitindo a união desse átomo isolado à outra molécula de O_2 formando a molécula de ozônio (O_3), (BOCCI, 2005).

Para uso na área da saúde precisa ser sintetizado através de geradores específicos. Na medicina o O_3 é produzido artificialmente através de um gerador elétrico do tipo corona, que forma o ozônio a partir da passagem de oxigênio puro por uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência. O O_3 é um produto 100% natural que utiliza o ar como matéria prima e não gera resíduo, já que a molécula de O_3 se decompõe espontaneamente no ambiente (BOCCI et al. 2009; SANGUANINI, 2019; ABOZ, 2022).

O O_3 tem ganhado destaque na medicina por sua eficácia comprovada no tratamento de diversas doenças, de origem inflamatória, infecciosa e isquêmica, apresenta potencial promissor no tratamento de lesões crônicas de pele ou mucosas (UGAZIO et al. 2020).

É reconhecido como agente bactericida, antivirais e antifúngicos, além de ação contra protozoários e parasitos de importância na saúde animal e humana. Seu poder oxidante promove destruição do material biológico bacteriano (UGAZIO et al. 2020). A ação do O_3 sobre os microrganismos tem início na destruição da membrana celular bacteriana, no interior da célula promove a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos, resultando em morte celular. No entanto, para obter bons resultados, na terapêutica alguns fatores devem ser observados, como a concentração do O_3 , tempo de exposição e a espécie microbiana (MARTINS; KOZUSNY-ANDREANI; MENDES, 2015).

Em diversos países o O_3 tem sido utilizado no tratamento de feridas contaminadas de difícil cicatrização, já que sua atividade antimicrobiana reduz a infecção, além disso é capaz de liberar substâncias, promove a regeneração tecidual,

diminui a resposta inflamatória, e ativa o sistema imunológico, acelerando o processo de cicatrização (UGAZIO et al. 2020).

No Brasil a Portaria nº 702, de 21 de março de 2018, inclui a ozonoterapia como prática integrativa complementar (PICS) na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), do Sistema Único de Saúde (SUS), para tratamentos de doenças, uma vez que pode ajudar a recuperar de forma natural a capacidade funcional do organismo humano e animal. Além disso a utilização de O₃ nos tratamentos de saúde consiste em uma prática segura, aliado a bons resultados, baixo custo e baixa complexidade (BRASIL, 2018).

3.3.1 Óleo Ozonizado

Os óleos vegetais são ricos em ácidos graxos insaturados como ácidos oleicos, linoleico e linolênico, contém também os ácidos graxos saturados como, palmítico, esteárico e láurico. Tem atividade antimicrobiana comprovada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de várias espécies de vírus, fungos, protozoários e parasitos. Todavia estudos comprovam que é possível potencializar as propriedades dos óleos através da adição de ozônio (UGAZIO et al. 2020; CARDOSO et al. 2021).

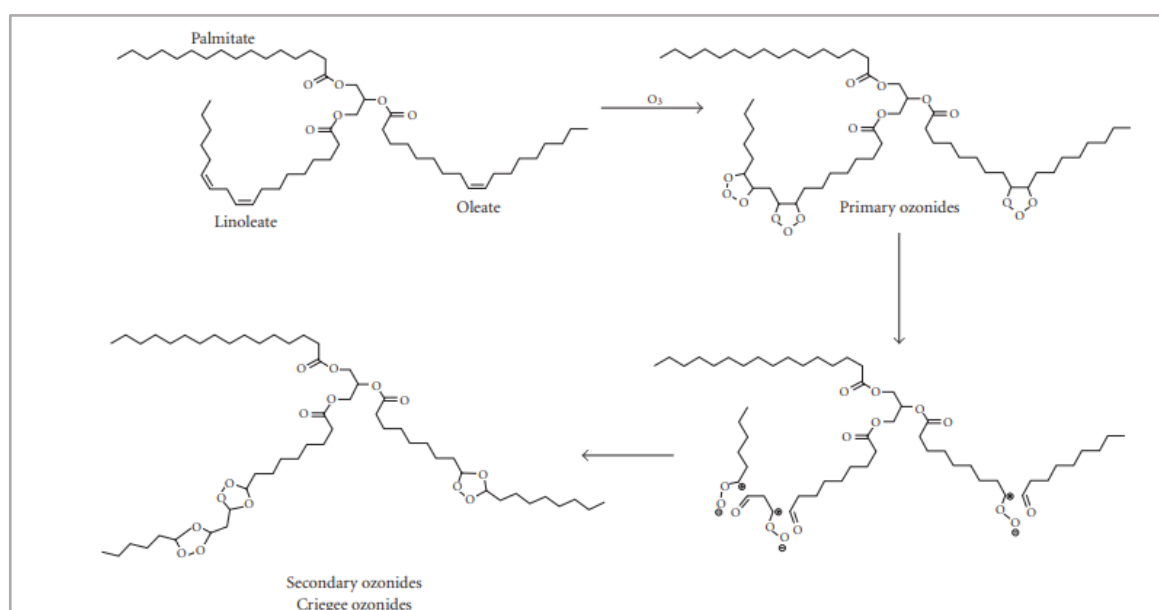
A terapia com O₃ deve seguir protocolos específicos para cada utilização. Assim o óleo ozonizado é obtido através do borbulhamento de uma mistura de ozono-oxigênio em óleo vegetal à temperatura ambiente. Após a ozonização quando armazenado em temperatura ambiente sua duração varia de 6 meses a 1 ano, enquanto refrigerado pode durar vários anos (TRAVAGLI et al. 2021; BOCCI, ZANARDI, TRAVAGLI, 2011).

Os óleos vegetais reagem facilmente com o O₃. As moléculas geradas após a ozonização possuem propriedades oxidativas que confere mecanismos microbicidas ao óleo ozonizado. A quantidade de O₃ que os óleos são capazes de incorporar depende do grau de insaturação de seus ácidos graxos, já que a reação acontece quando o O₃ é capaz de quebrar as duplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados, carbono-carbono, dando origem aos ozonídeos. Esta reação chamada de ozonólise gera compostos oxidativos como peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos,

aldeídos e ácidos carboxílicos que são as principais moléculas responsáveis pela ação antimicrobiana desses óleos (BELTRAN et al. 2021; CARSOSO et al. 2021).

Os veículos oleosos têm se mostrado promissor na aplicação de O_3 , visto que é capaz de manter o princípio ativo por mais tempo. Utilizados na dermatologia e cosmética, esses compostos inibem o crescimento microbiano, o efeito microbicida é induzido, uma vez que os microrganismos não possuem mecanismos para impedir a ação oxidativa do O_3 . Além disso, ainda em contato com a lesão, esses compostos também produzem reações capazes de ativar o sistema imunológico e produção de substâncias que aumentam a vascularização, influenciando a regeneração tecidual e o processo de cicatrização (BOCCI, ZANARDI, TRAVAGLI, 2011; DUARTE et al. 2014).

Figura 14 – Esquema representativo da reação química do O_3 com triglicerídeos.



Fonte: Travagli et al. 2010.

4. METODOLOGIA

4.1 LOCAL DA PESQUISA

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil (UB), na cidade de Fernandópolis-São Paulo.

A seleção dos óleos vegetais incluídos neste estudo foi baseada na produção e utilização pela população em diversas regiões do país, além do fato do óleo vegetal ser uma alternativa terapêutica menos agressiva ao tecido humano, sendo de difícil resistência microbiana e sobretudo de fácil obtenção.

Os óleos foram adquiridos no comércio local. Os produtos estavam contidos na embalagem do fabricante e não se teve acesso ao método de extração utilizado em sua obtenção e a origem dos frutos para sua produção.

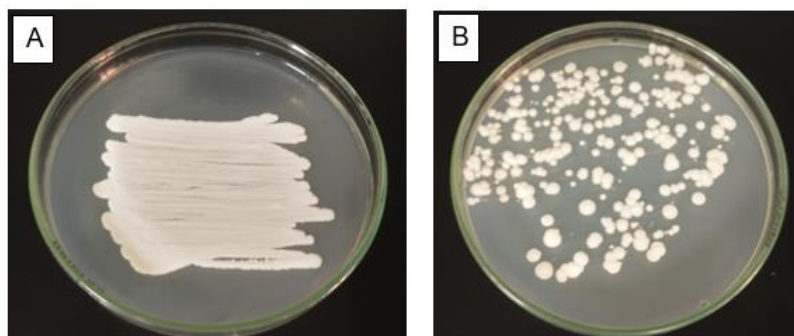
4.1.1 Meios de cultivo

Foram utilizados os meios de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD). Os quais foram preparados conforme a descrição do fabricante sob condições de esterilidade.

4.1.2 Micro-organismos

Foram utilizadas as cepas padrão: *Candida albicans* ATCC 25923 e *Candida tropicalis* ATCC 4563, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da UB. As cepas foram inoculadas nas placas de Petri estéril contendo meio de cultura ASD, em seguida encubados em temperatura de 35°C por 24 horas.

Figura 15 - Cepas de *Candida albicans* (A); Cepas de *Candida tropicalis* (B).



Fonte: Autor

4.1.3 Inóculo

Para preparação do inóculo, os microrganismos foram obtidos das colônias cultivadas em meio CSD (figura-15), submetido a agitação orbital constante (225 rpm) e temperatura controlada (28° C) por 24 horas. Foram preparadas suspensões em solução fisiológica estéril a (NaCl 0,5%), e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/ml (CLSI, 2015; FREIRE et al. 2014).

4.1.4 Óleos vegetais ozonizados

Foram utilizados cinco óleos vegetais, sendo eles, óleo de Coco Extra Virgem da marca Copra®, óleo de Dendê da marca Kidendê®, óleo e Girassol da marca Liza®, óleo de Oliva da marca Borges® e óleo de Pequi da marca Aroma D'MInas®. Todos na forma *in natura* e ozonizados.

O O_3 foi produzido por meio de um gerador que tem como princípio o efeito corona (Ozon & Life) e o oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O O_3 produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor, conforme ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Ozonização dos óleos vegetais



Fonte: Autor.

Todos os óleos foram expostos ao O_3 de forma direta por meio de um difusor, por um período de 2 horas. Ambos os óleos foram ozonizados em temperatura controlada de 25° C. Todo o procedimento de ozonização foi conduzido em uma

capela de exaustão da marca Quimis modelo 216.11, visando minimizar os riscos de inalação do gás O₃, seguindo as normas internacionais de segurança.

Após ozonizado cada óleo foi testado quanto a sua esterilidade, foi então retirado 0,1mL de cada óleo e inoculados em placas de Petri contendo ágar triptecaseína soja (TSA, Oxoid®), incubados a 37° C por 24/48 horas, quando foi verificada a ausência de crescimento microbiano. Foi considerado estéril o óleo que não apresentou nenhuma colônia. Os óleos ozonizados foram identificados e mantidos sob refrigeração (8°C).

4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Todas as avaliações foram realizadas em CSD suplementado com detergente Tween 20 (concentração final de 0,5% (v/v)). As linhagens dos microrganismos foram suspensas em CSD para dar uma densidade final de 10⁶ CFU ml⁻¹, e estas foram confirmadas por contagens de células viáveis. Os ensaios foram realizados conforme os protocolos estabelecidos pelo CLSI (2018). A determinação da CIM e CFM dos óleos vegetais *in natura* e ozonizados foi realizada através da técnica de microdiluição em placa de 96 poços.

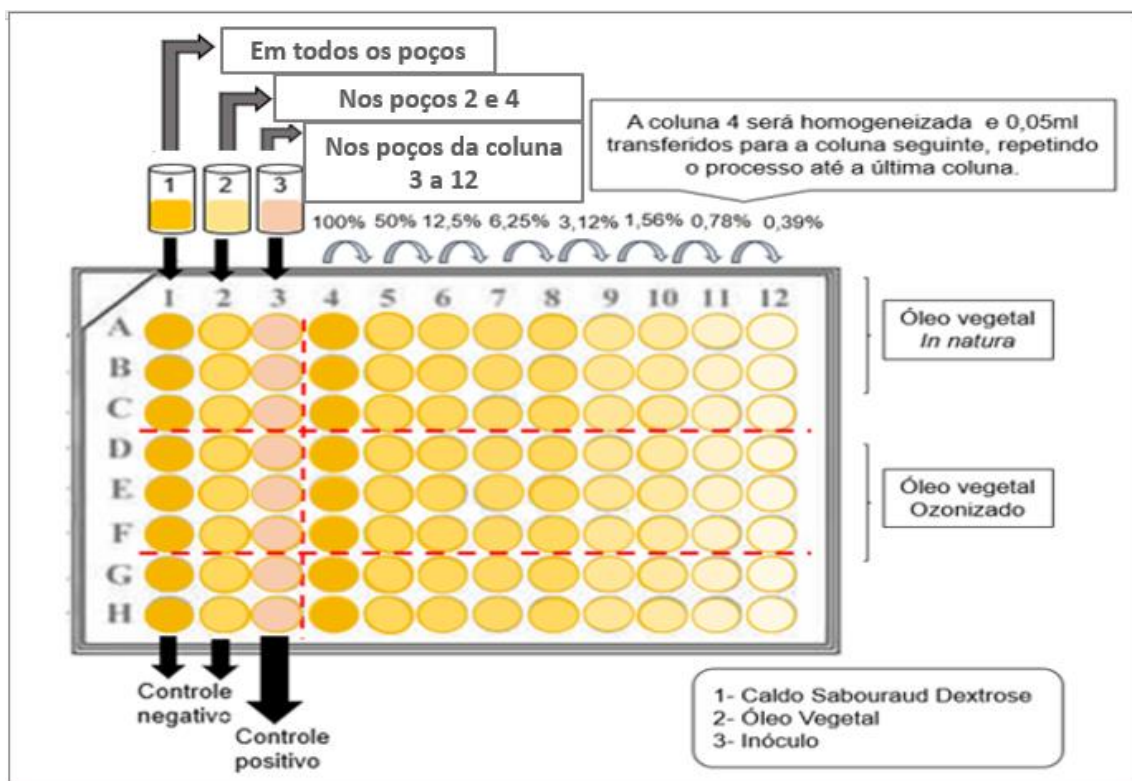
O experimento foi conduzido empregando-se concentrações que variaram de 0,00 a 100% e os controles negativo e positivo. Todos os poços, receberam 0,05 ml de CSD, cada poço da segunda e quarta coluna recebeu 0,05 ml do óleo vegetal. O conteúdo da quarta coluna, de forma a representar diluição 100%, foi homogeneizado e 0,05 ml foram transferidos para os poços da coluna seguinte, representando a diluição 50%. O procedimento foi repetido até a última coluna, representando as diluições 25%, 12,50%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78% e 0,39%.

Por último foram acrescentados 0,05mL do inóculo (10⁶ células viáveis mL⁻¹) de cada linhagem, com exceção dos controles negativo. A coluna 1 e 2 foram destinadas aos controles negativo e a coluna 3 para controle positivo.

Após incubação a 37°C por 24h, foi adicionado 50 µL em todos os poços do corante 2,3,5 -Triphenyltetrazolium Chloride, o que tornou possível visualizar as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantiveram a sua cor. A

concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração de óleo vegetal capaz de inibir o desenvolvimento microbiano (SYLVESTER, 2011).

Figura 17 - Esquema representativo da susceptibilidade *in vitro* utilizando o teste de microdiluição em caldo.

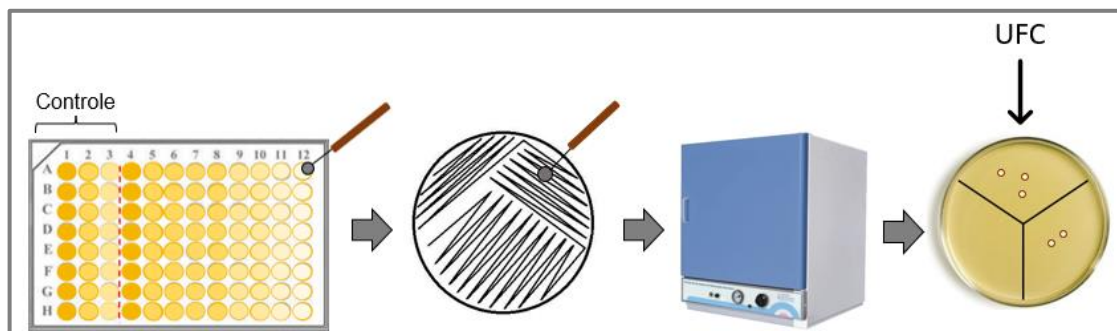


Fonte: Modificado de Kume, (2020).

Para determinar a CFM, após a leitura da CIM, alíquotas de 20 µl de amostras de todos os poços com inibição total do crescimento e do último poço com crescimento foram inoculados na superfície de placas de Petri com ASD.

As placas foram incubadas a 28 ° C por 24/48 horas ou até que o crescimento do fungo fosse observado nas amostras controle, conforme pode ser demonstrado na Figura 19. Os valores de CFM foram determinados como a concentração mais baixa de óleos vegetais, sem crescimento visível (AIEMSAARD e PUNAREEWATTANA, 2017).

Figura 18 - Esquema representativo da metodologia de microdiluição.



Fonte: Modificado de Kume (2020).

4.3 CINÉTICA FUNGICIDA DOS ÓLEOS VEGETAIS

Em tubos de 40 μL foram adicionados de cada óleo vegetal *in natura* e ozonizado e CSD na diluição determinada pela CFM representando 1000 μL , foi então acrescentado a suspensão fúngica μL de 10^6 UFC mL^{-1} , em seguida incubados a 37°C . Alíquotas de 0,05 ml, foram retiradas nos tempos: 0', 5', 10', 20', 60', 120', 240', 480' e 24 horas. As amostras foram espalhadas em cultura em, incubadas durante 24/48 horas a 37°C .

Todas as avaliações foram realizadas em triplicata. As colônias microbianas foram contadas após o período de incubação. Foi realizada uma avaliação sobre a variação da carga microbiana a fim de observar qual óleo vegetal apresentou a maior variação negativa (queda) na contagem microbiana.

Para a avaliação da eficácia do efeito antimicrobiano de cada um dos óleos essenciais, um estudo sobre a variação da carga microbiana foi realizado a fim de observar qual óleo essencial apresentou a maior variação negativa (queda) na contagem microbiana. Nesse contexto, a variação percentual da contagem microbiana consistiu na seguinte relação:

$$\text{Contagem microbiana}_{\text{óleo essencial}}(\%) = \frac{(\text{Contagem}_{10\text{min}} - \text{Contagem}_{0\text{min}})}{\text{Contagem}_{0\text{min}}} \times 100$$

Essa relação foi empregada para todos os óleos essenciais avaliados. De acordo com a expressão acima, variações negativas mostram diminuição na contagem microbiana e variações positivas mostram aumento da contagem

microbiana à medida que o tempo de exposição aumenta. A variação percentual da contagem microbiana foi determinada por meio de estatísticas descritivas (tabela 3) a fim de observar quais óleos essenciais obtiveram maior eficácia na redução da contagem microbiana.

4.4 AVALIAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram tabulados e foi realizada a análise descritiva das concentrações mínima inibitórias e fungicida de cada um dos óleos essenciais de acordo com os tratamentos (*in natura* e ozonizado).

O Teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a contagem microbiana referente aos óleos avaliados de acordo com o tipo de tratamento (*in natura* x ozonizado) e para comparar a variação da contagem microbiana referente aos óleos avaliados de acordo com o tipo de tratamento (*in natura* x ozonizado).

O Teste de Kruskal-Wallis foi para comparar a variação da contagem microbiana dos óleos avaliados restringindo o tipo de tratamento.

Foram realizados gráficos de linha para a visualização da evolução da contagem microbiana em relação ao tempo de exposição do microrganismo ao óleo essencial de acordo com o tratamento empregado.

Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Na realização das análises foi empregado o Software Minitab 17 (Minitab Inc.)

5 RESULTADOS

5.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E *IN NATURA*

Em um primeiro momento foi realizado um estudo com todos os óleos vegetais com o objetivo de avaliar a CIM e a CFM a fim de caracterizar o potencial de cada um dos óleos contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (tabela 1). Os resultados apontam que na grande maioria dos casos os óleos *in natura* apresentaram CIM e CFM superiores aos óleos ozonizados. Nos óleos de pequi e oliva, tais concentrações foram semelhantes para o óleo *in natura* e ozonizado para a ação contra *Candida tropicalis*. Para a ação contra *Candida albicans*, todos os óleos ozonizados apresentaram concentrações inibitórias e fungicidas mínimas inferiores aos óleos *in natura*, evidenciando que a ação do óleo ozonizado é superior, pois pequenas concentrações são suficientes para inibir o crescimento do microrganismo avaliado.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos vegetais ozonizados e *in natura* frente a *Candida albicans* ATCC 25923 e *Candida tropicalis* ATCC 4563.

Óleo essencial	Tratamento	<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
		CIM (%) ¹	CFM (%) ¹	CIM (%) ¹	CFM (%) ¹
Pequi	<i>In natura</i>	100	100	3,1	6,2
	Ozonizado	100	100	1,6	3,1
Girassol	<i>In natura</i>	100	100	12,5	25
	Ozonizado	50	50	3,1	6,2
Dendê	<i>In natura</i>	12,5	50	100	100
	Ozonizado	1,6	6,2	1,6	3,1
Coco	<i>In natura</i>	50	100	50	100
	Ozonizado	25	50	12,5	25
Oliva	<i>In natura</i>	50	100	100	100
	Ozonizado	50	100	1,6	3,1

¹ CIM: concentração inibitória mínima e CFM: concentração fungicida mínima.

5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E *IN NATURA* FRENTE A *CANDIDA ALBICANS*

A tabela 2 evidencia os resultados obtidos para a contagem de *Candida albicans* exposta aos óleos vegetais ozonizados e *in natura* nas suas respectivas CIM.

Tabela 2. Média±desvio padrão (Mediana) de *Candida albicans* submetida aos óleos vegetais ozonizados e *in natura*.

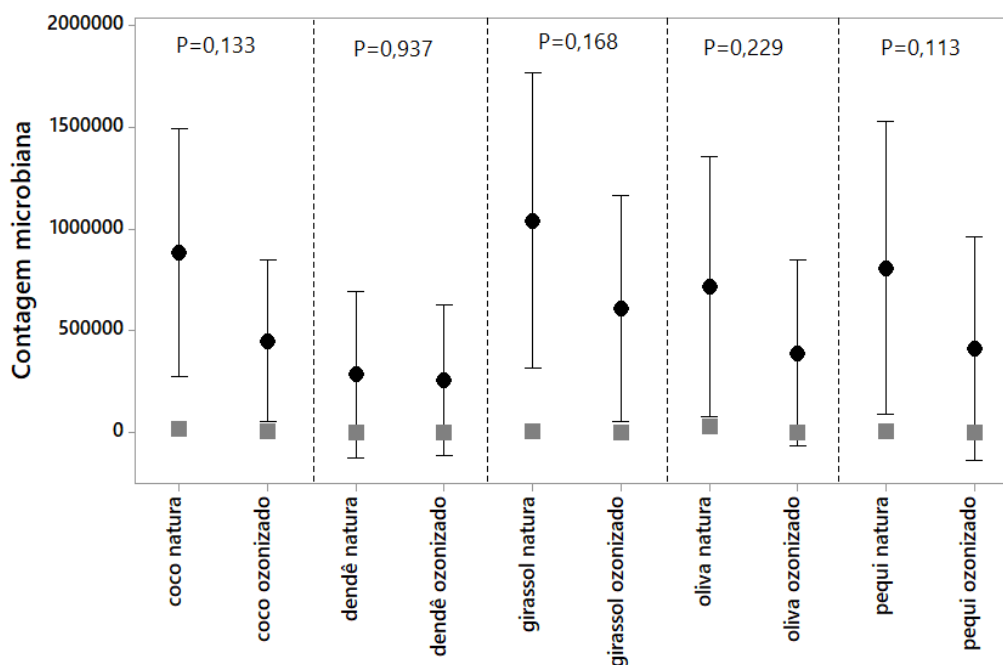
Óleos vegetais (CFM <i>in natura</i> /CFM ozonizado)	<i>In natura</i>	Ozonizado	Valor p ¹
Coco (100%/25%)	8,8.10 ⁵ ±1,2.10 ⁶ (1,8.10 ⁴)	4,5.10 ⁵ ±8,0.10 ⁵ (4,0.10 ³)	0,133
Dendê (100%/3,1%)	2,8.10 ⁵ ±8,2.10 ⁵ (0,0)	2,5.10 ⁵ ±7,4.10 ⁵ (0,0)	0,937
Girassol (25%/6,2%)	1,0.10 ⁶ ±1,4.10 ⁶ (2,1.10 ³)	6,1.10 ⁵ ±1,1.10 ⁶ (1,4.10 ²)	0,168
Oliva (100%/3,1%)	7,1.10 ⁵ ±1,3.10 ⁶ (3,0.10 ⁴)	3,8.10 ⁵ ±9,2.10 ⁵ (3,1.10 ²)	0,229
Pequi (6,2%/3,1%)	8,1.10 ⁵ ±1,4.10 ⁶ (3,4.10 ³)	4,1.10 ⁵ ±1,1.10 ⁶ (1,3.10 ²)	0,113

Valor P² referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05.

Os resultados da tabela 2 revelam que não houve diferenças significativas entre a contagem microbiana para todos os óleos vegetais avaliados quando o óleo *in natura* foi comparado com o óleo ozonizado, visto que todos os valores p do teste comparativo resultaram superiores ao nível de significância adotado.

Na figura 19 são apresentados os gráficos de intervalos de confiança para cada um dos óleos analisados de acordo com os tratamentos.

Figura 19. Intervalos de confiança (95%) para cada um dos óleos essenciais avaliados de acordo com os tratamentos estudados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.



Nas figuras 20 a 24 são apresentados o comportamento da contagem microbiana de cada um dos óleos vegetais de acordo com os tempos avaliados de exposição aos tratamentos.

Figura 20. Contagem microbiana de *Candida albicans* para o óleo de coco *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

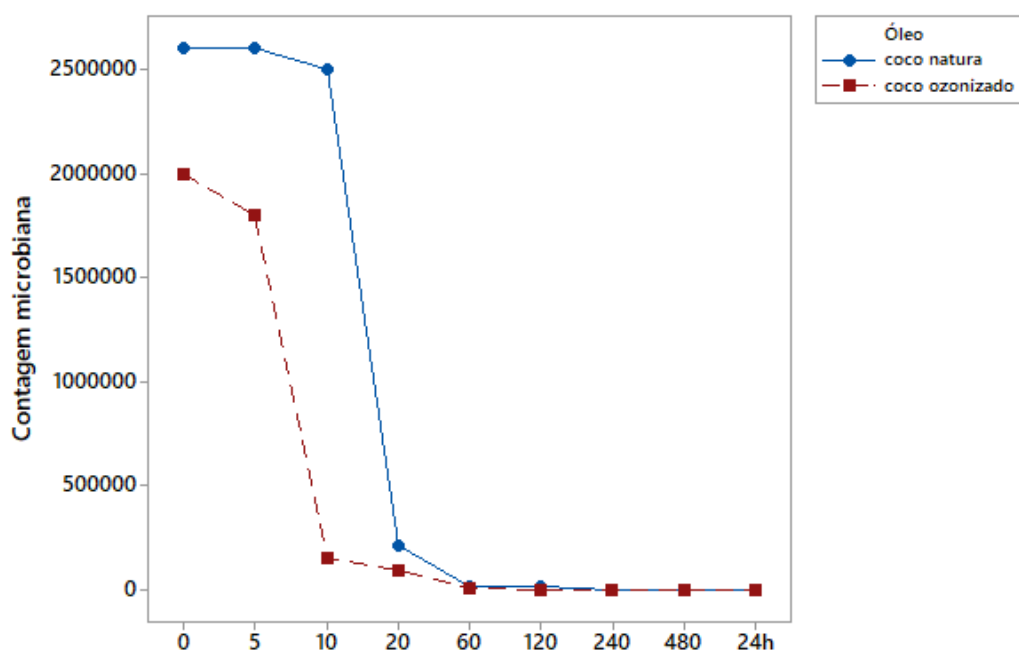


Figura 21. Contagem microbiana de *Candida albicans* para o óleo de dendê *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

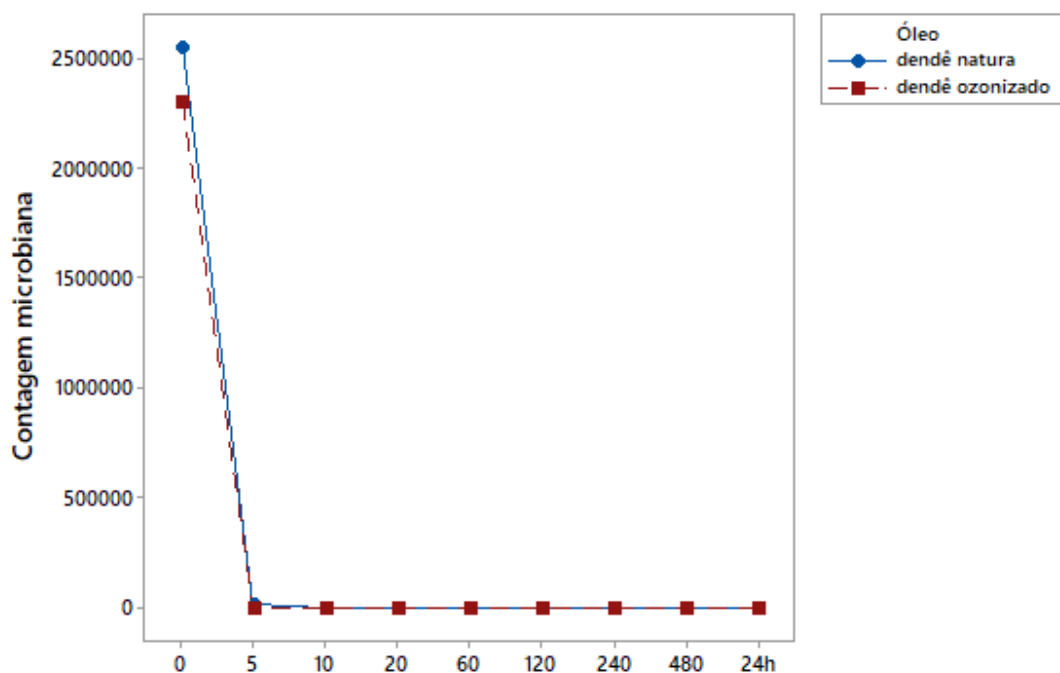


Figura 22. Contagem microbiana de *Candida albicans* para o óleo de girassol *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

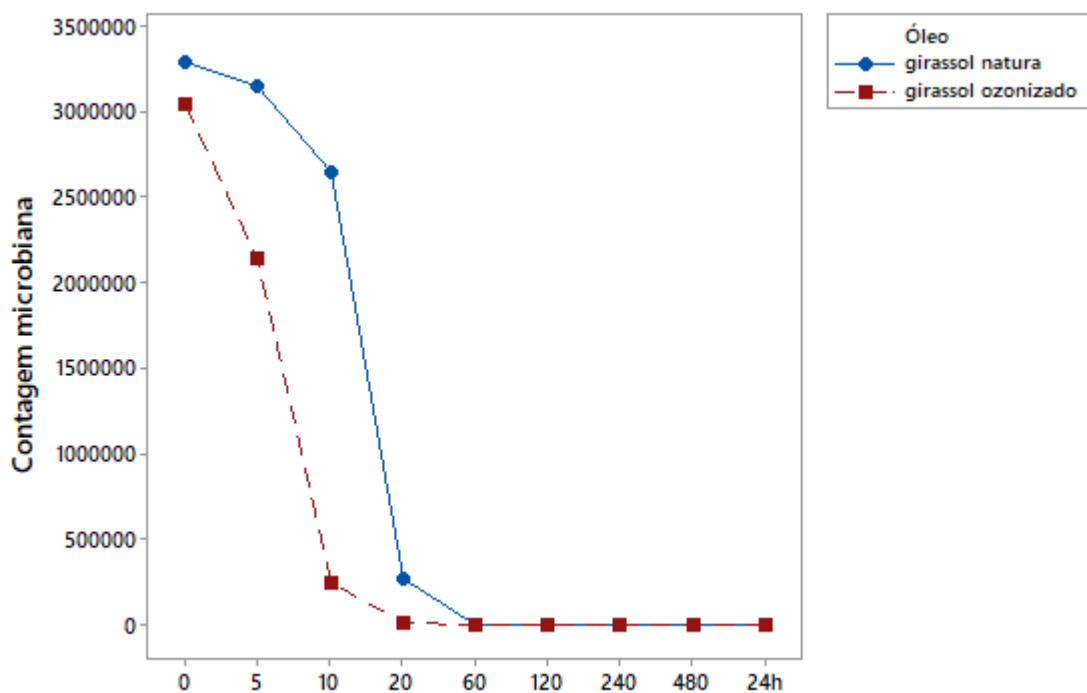


Figura 23. Contagem microbiana de *Candida albicans* para o óleo de oliva *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

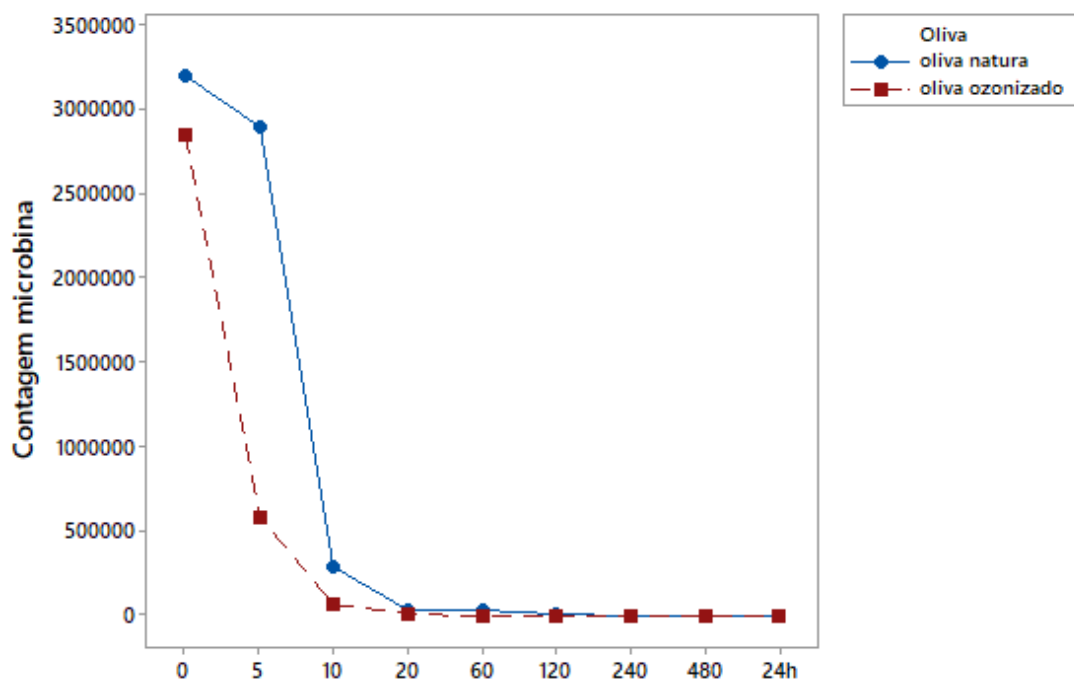
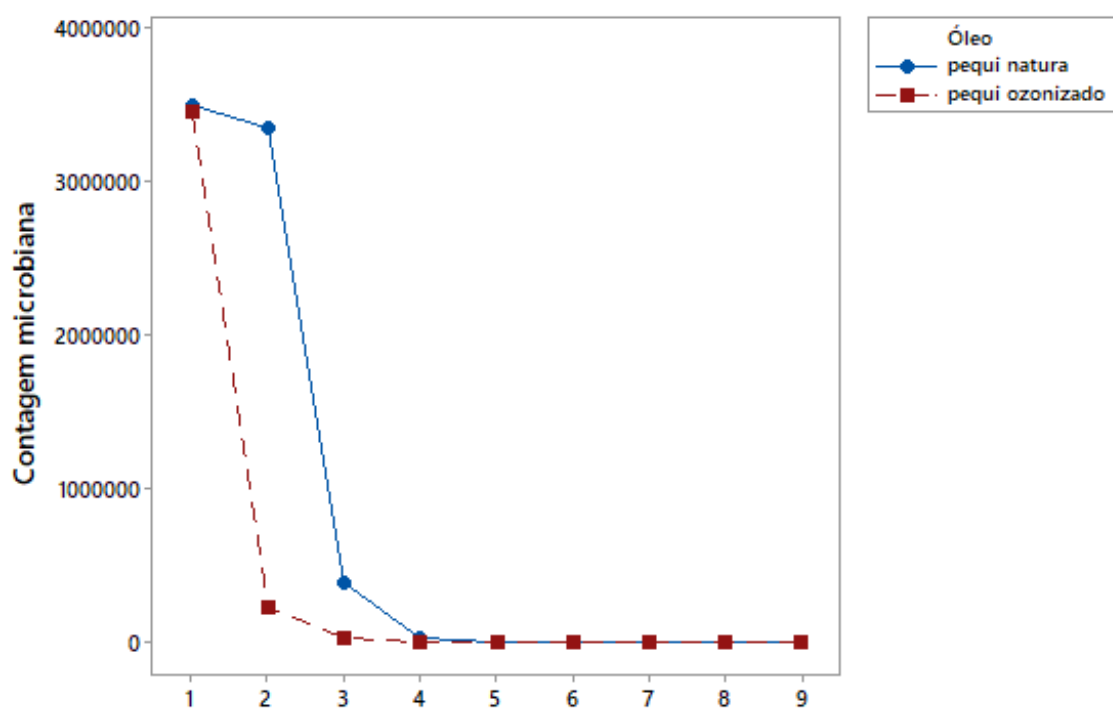


Figura 24. Contagem microbiana de *Candida albicans* para o óleo de pequi *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.



Em todos os óleos essenciais avaliados, a contagem microbiana apresentou valores nulos em tempos menores quando submetida ao tratamento com óleo ozonizado; ou seja, a carga microbiana atingiu contagem nula mais rapidamente quando comparada à carga microbiana do óleo *in natura*. Somente o óleo de dendê apresentou valores nulos de contagem microbiana no mesmo tempo para ambos os tratamentos (20 minutos de exposição ao óleo *in natura* e ao óleo ozonizado).

Mesmo que a comparação entre os óleos *in natura* e ozonizado não tenha resultado em diferenças estatisticamente significativas é possível pressupor que a eficácia dos óleos ozonizados é superior em relação aos óleos *in natura*, já que o tempo necessário para anular a contagem microbiana utilizando os óleos essenciais ozonizados é inferior ao tempo utilizado para anular a contagem microbiana utilizando os óleos *in natura*. Sendo assim, quando se utiliza o óleo tratado com O₃, a contagem microbiana atinge valores nulos mais rapidamente, em tempos menores.

Tabela 3. Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados.

Óleos essenciais (CFM <i>in natura</i> /CFM ozonizado)	Tratamentos		Valor P ¹
	<i>In natura</i>	Ozonizado	
Coco (100%/25%)	-58,9±41,9 (-90,5)	-73,7±32,9 (-91,3)	0,220
Dendê (100%/3,1%)	29,0±315 (-100)	-98,4±3,3 (-99,9)	0,936
Girassol (25%/6,2%)	-60,0±39,6 (-77,7)	-77,1±28,1 (-90,9)	0,275
Oliva (100%/3,1%)	-68,8±42,8 (-90,2)	-87,6±11,5 (-91,3)	0,349
Pequi (6,2%/3,1%)	-73,3±33,1 (-87,3)	-93,0±4,2 (-92,8)	0,099
Valor P	0,378	0,081	

¹ Valor P referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05. ² Valor P referente ao teste de Kruskal-Wallis a P<0,05.

A comparação da variação da contagem microbiana entre os tratamentos resultou na ausência de diferenças significativas (abordagem longitudinal, em linha), já que todos os valores P dos testes estatísticos resultaram superiores a 0,05. Desse modo, esse resultado indica que o comportamento da redução da carga microbiana, quando os tratamentos *in natura* e ozonizado foram comparados, não apresentou diferenças significativas, isto é, a redução da carga microbiana foi semelhante em ambos os tratamentos para todos os óleos essenciais avaliados.

Na comparação dos óleos essenciais, restringindo o tratamento, verificou-se ausência de diferenças significativas (abordagem transversal, em coluna), pois todos os valores P resultaram superiores a 0,05. Neste contexto, não houve um óleo essencial que se destacou na redução microbiana tanto no tratamento *in natura* quanto no ozonizado, todos apresentaram comportamento de redução microbiana semelhante.

Apesar da ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, o óleo de pequi (73,3% de redução) foi o que apresentou maior média de redução microbiana para o tratamento *in natura*, seguido do óleo de oliva (68,8% de redução). Para o tratamento *in natura*, o óleo de dendê foi o que apresentou menor eficácia contra *Candida albicans* (figura 25). Para o tratamento ozonizado, o óleo de dendê foi o que apresentou maior redução média da carga microbiana (98,4% de redução), seguido do óleo de pequi (93% de redução). O óleo de coco ozonizado apresentou a menor eficácia dentre os óleos ozonizados avaliados no estudo (figura 26).

Figura 25. Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos essenciais *in natura*. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.

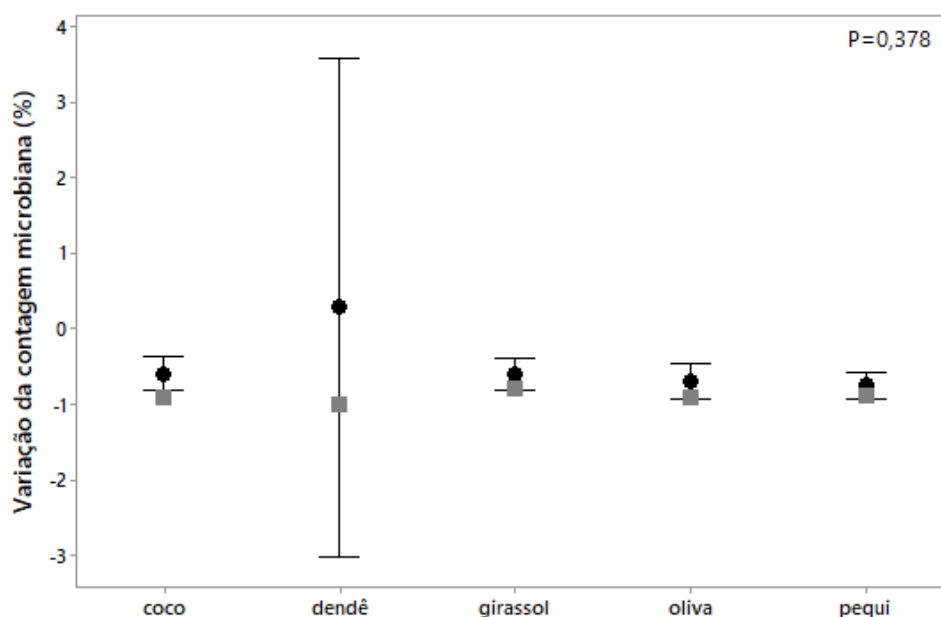
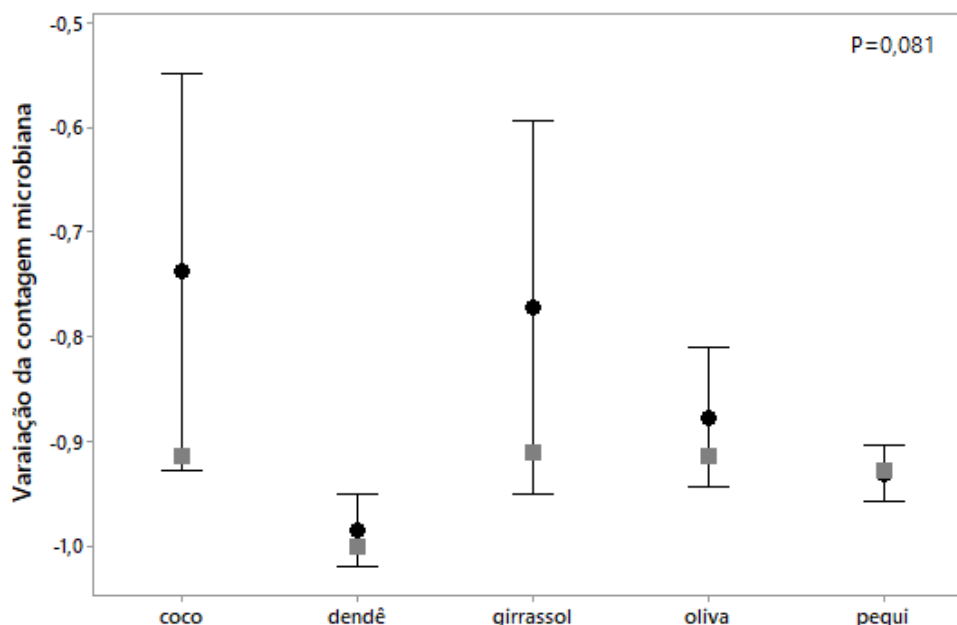


Figura 26. Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais ozonizados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.



5.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E *IN NATURA* FRENTE A *CANDIDA TROPICALIS*

Os resultados da tabela 4 revelam que não houve diferenças significativas entre a contagem microbiana para todos os óleos essenciais avaliados quando o óleo *in natura* foi comparado com o óleo ozonizado, visto que todos os valores P do teste comparativo resultaram superiores ao nível de significância adotado.

A tabela 4 evidencia a contagem do microrganismo *Candida tropicalis* submetido aos óleos essenciais estudados *in natura* e ozonizados nas suas respectivas concentrações mínimas fungicidas.

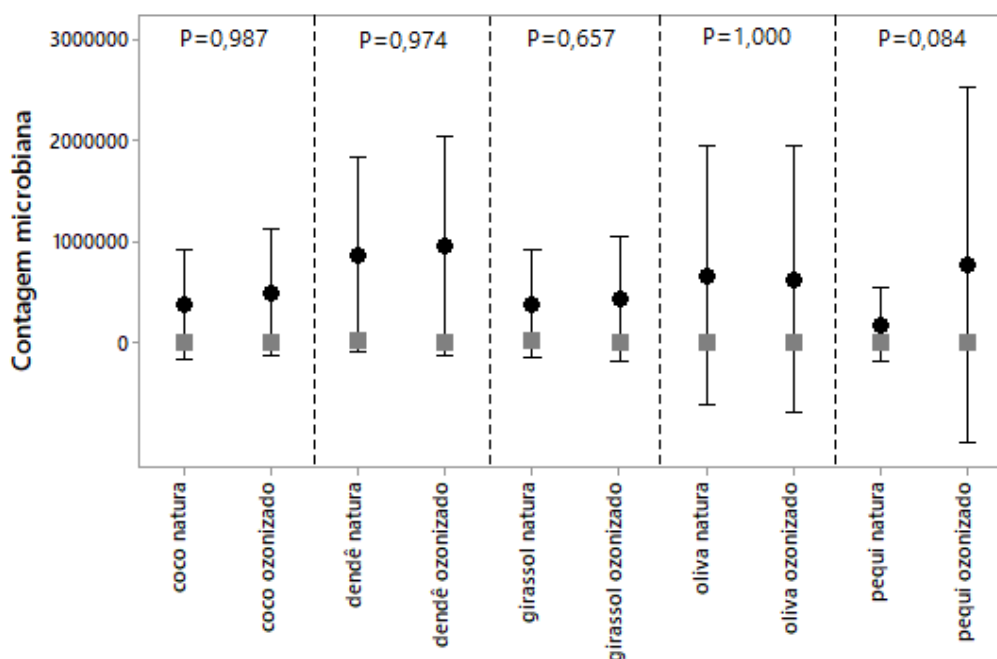
Tabela 4. Média±desvio padrão (Mediana) do microrganismo *Candida tropicalis* submetido aos óleos essenciais *in natura* e ozonizados.

Óleos essenciais (CFM in natura/CFM ozonizado)	<i>In natura</i>	Ozonizado	Valor p ¹
Coco (100%/50%)	3,7.10 ⁵ ±6,8.10 ⁵ (5,6.10 ³)	4,8.10 ⁵ ±8,1.10 ⁵ (5,0.10 ²)	0,987
Dendê (100%/3,1%)	8,6.10 ⁵ ±1,2.10 ⁶ (6,7.10 ³)	9,4.10 ⁵ ±1,3.10 ⁶ (7,7.10 ²)	0,974
Girassol (100%/50%)	3,7.10 ⁵ ±6,8.10 ⁵ (7,0.10 ³)	4,2.10 ⁵ ±7,71.10 ⁵ (6,8.10 ²)	0,657
Oliva (100%/100%)	6,6.10 ⁵ ±1,6.10 ⁶ (2,0.10 ²)	6,2.10 ⁵ ±1,6.10 ⁶ (2,3.10 ²)	1,000
Pequi (100%/100%)	1,6.10 ⁵ ±4,7.10 ⁵ (0,5.10 ¹)	7,6.10 ⁵ ±2,2.10 ⁶ (0,0)	0,084

¹ Valor P referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05.

Na figura 27 estão apresentados os intervalos de confiança para cada um dos óleos analisados de acordo com os tratamentos.

Figura 27. Intervalos de confiança (95%) para cada um dos óleos essenciais avaliados de acordo com os tratamentos estudados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.



As figuras 28 a 32 evidenciam o comportamento da contagem microbiana de cada um dos óleos essenciais de acordo com os tempos avaliados de exposição aos tratamentos.

Figura 28. Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de coco *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

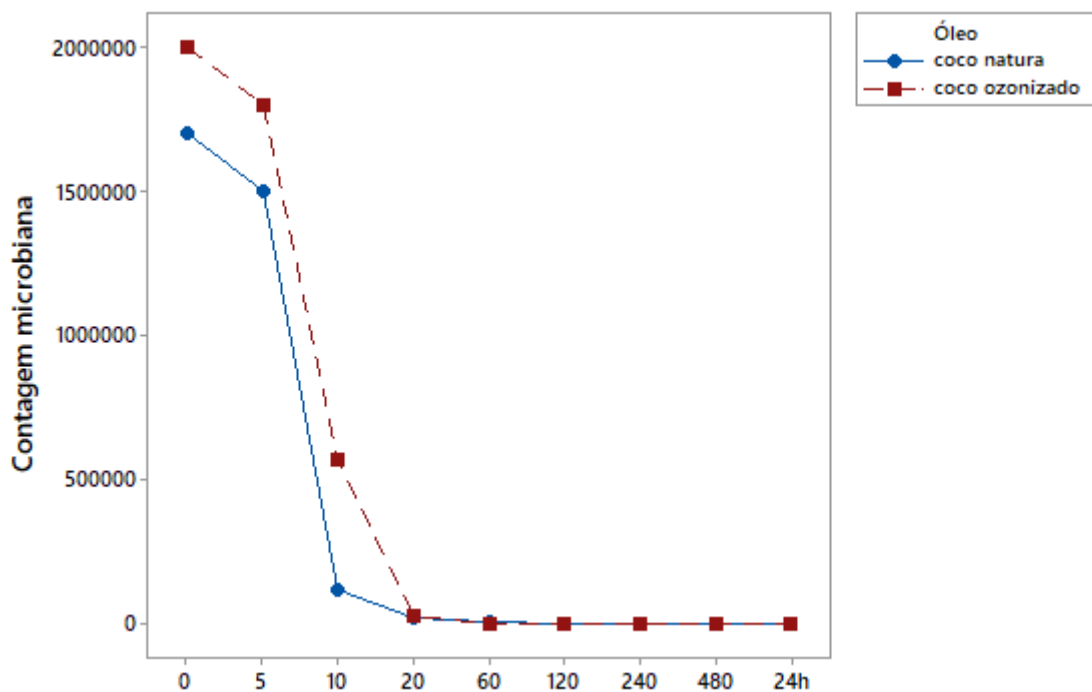


Figura 29. Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de dendê *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

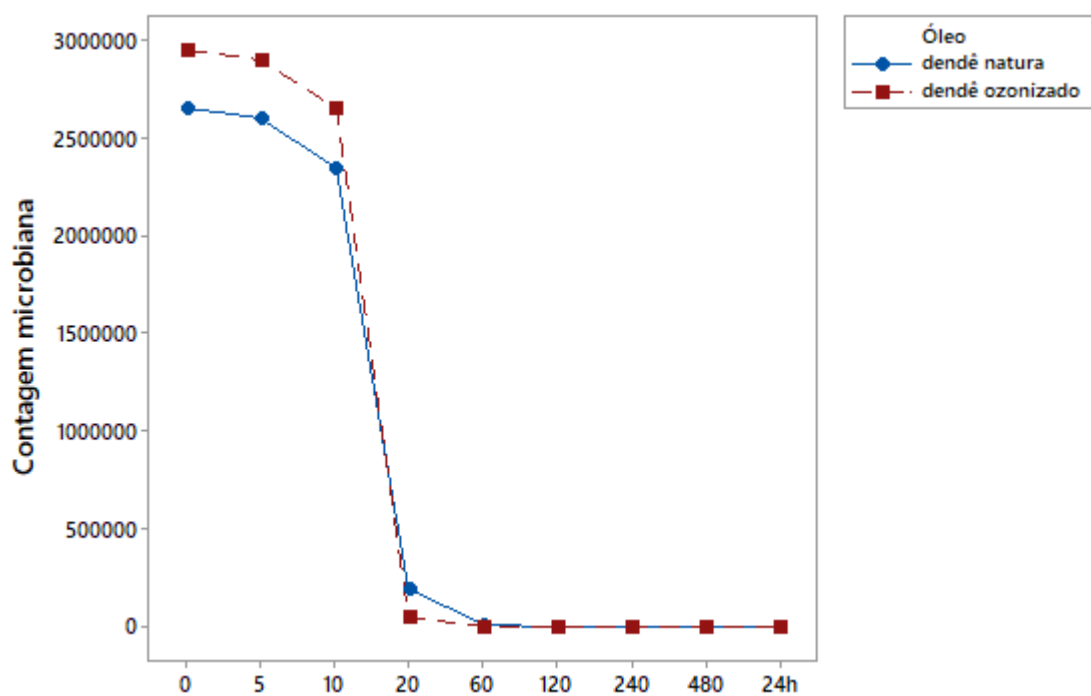


Figura 30. Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de girassol *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

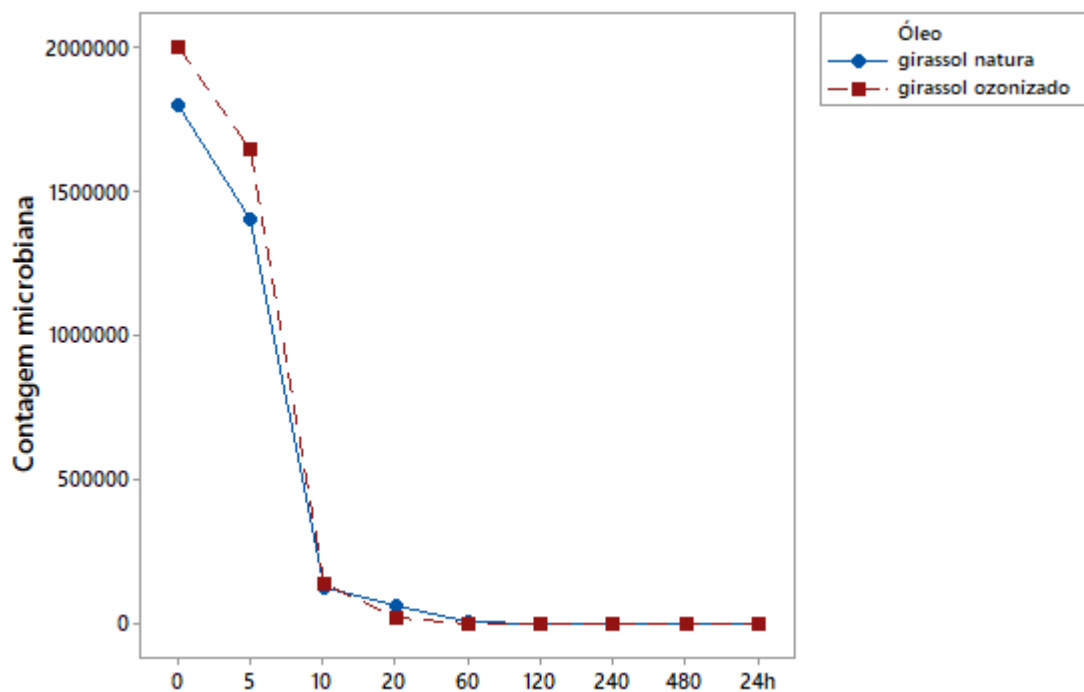


Figura 31. Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de oliva *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

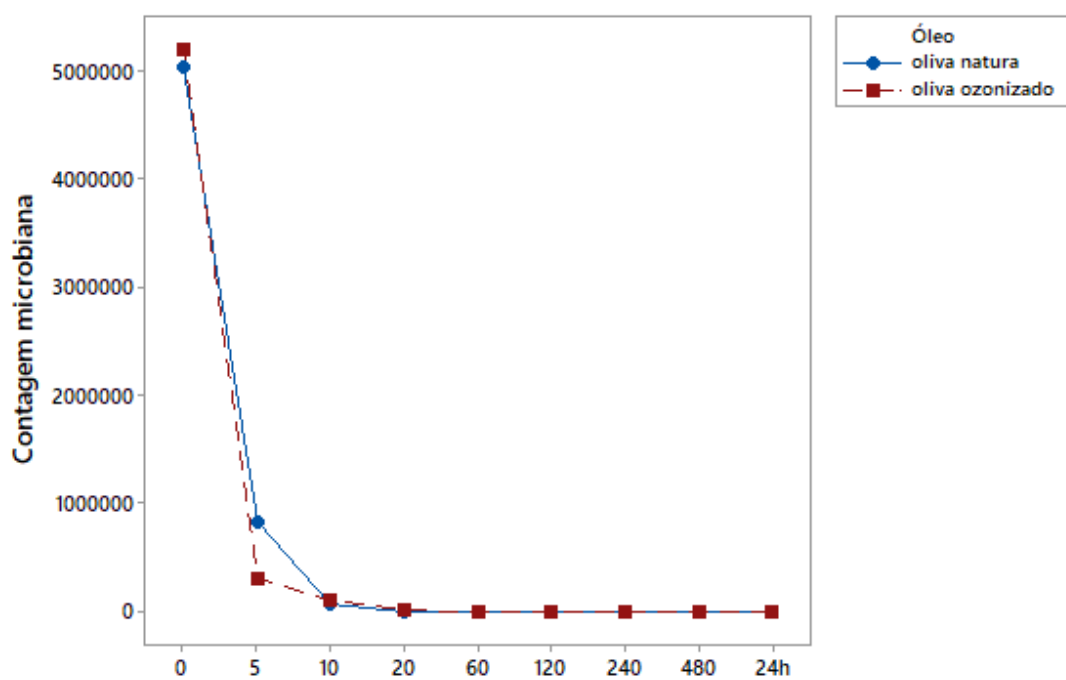
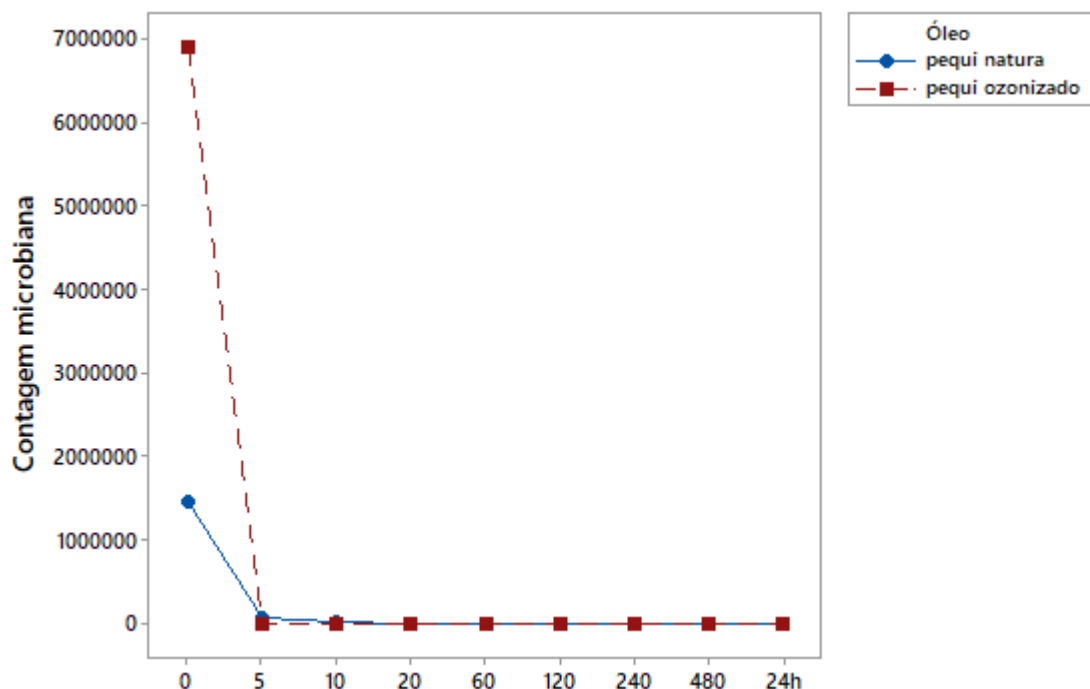


Figura 32. Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de pequi *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.



Verificou-se que os óleos ozonizados foram responsáveis por diminuir a carga microbiana em tempos menores quando comparados aos óleos *in natura*; ou seja, a carga microbiana atingiu contagem nula mais rapidamente no óleo ozonizado quando comparado à carga microbiana do óleo *in natura*. Somente o óleo de oliva apresentou valores nulos de contagem microbiana no mesmo tempo para ambos os tratamentos (240 minutos).

Apesar da ausência de diferenças estatisticamente significativas na comparação da contagem microbiana dos óleos essenciais estudados, é possível pressupor que a eficácia dos óleos ozonizados é superior em relação aos óleos *in natura*, pois o tempo necessário para diminuir a contagem microbiana utilizando os óleos essenciais ozonizados é menor que o tempo utilizado pelos óleos *in natura*.

A variação da carga microbiana também foi avaliada para cada óleo essencial (tabela 5).

Tabela 5. Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos extratos avaliados.

Óleos essenciais (CFM <i>in natura</i> /CFM ozonizado)	Tratamentos		Valor P ¹
	<i>In natura</i>	Ozonizado	
Coco (100%/50%)	-72,1±31,1 (-84,9)	-76,2±34,7 (-94,6)	0,625
Dendê (100%/3,1%)	-66,8±40,9 (-88,3)	-67,3±46,0 (-97,5)	0,537
Girassol (100%/50%)	-69,4±35,2 (-82,1)	-80,6±28,3 (-91,8)	0,063
Oliva (100%/100%)	-92,4±5,7 (-92,3)	-90,3±11,1 (-93,3)	0,839
Pequi (100%/100%)	-95,6±4,1 (-96,2)	-99,9±0,0 (-99,9)	0,056
Valor P	0,097	0,157	

Valor P referente ao teste de Mann-Whitney a $P < 0,05$. ² Valor P referente ao teste de Kruskal-Wallis a $P < 0,05$.

A comparação da variação da contagem microbiana entre os tratamentos *in natura* e ozonizado resultou na ausência de diferenças significativas (abordagem longitudinal, em linha), já que todos os valores P dos testes estatísticos resultaram superiores a 0,05. Desse modo, independentemente do tratamento, a variação da contagem microbiana foi estatisticamente semelhante.

Na comparação dos óleos essenciais, restringindo o tratamento, verificou-se ausência de diferenças significativas (abordagem transversal, em coluna), pois todos os valores P resultaram superiores a 0,05. Assim, independentemente do óleo essencial, não houve diferenças significativas na redução microbiana, ou seja, os óleos apresentaram comportamento semelhante em relação à redução da carga microbiana.

Apesar da ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, o óleo de pequi (95,6% de redução) foi o que apresentou maior média de redução microbiana para o tratamento *in natura*, seguido do óleo de oliva (92,4% de redução). Para o tratamento *in natura*, o óleo de dendê foi o que apresentou menor eficácia contra *Candida tropicalis* (figura 33).

Para o tratamento ozonizado, o óleo de pequi foi o que apresentou maior redução média da carga microbiana (99,9% de redução), seguido do óleo de oliva (90,3% de redução). O óleo de dendê ozonizado apresentou a menor eficácia dentre os óleos ozonizados avaliados no estudo (figura 34).

Figura 33. Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais *in natura*. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.

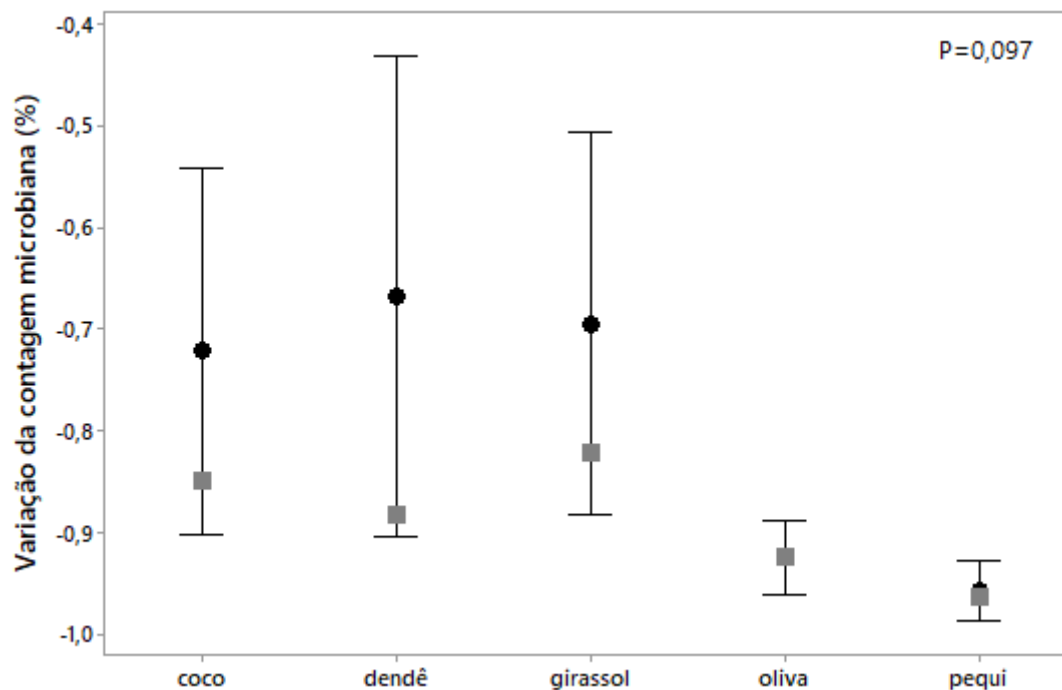
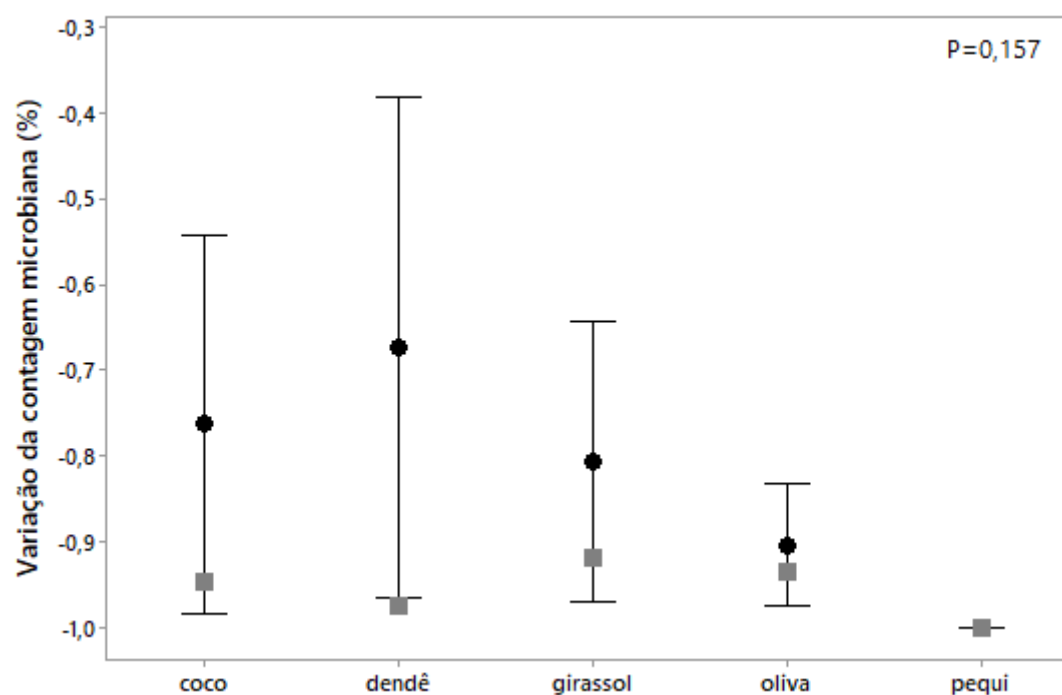


Figura 34. Intervalos de confiança da média para variação percentual da contagem microbiana dos óleos essenciais ozonizados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.



Os óleos de pequi e oliva *in natura* apresentaram maior eficácia na inativação tanto de *Candida albicans* quanto de *Candida tropicalis*, sendo o óleo de dendê o que apresentou menor eficácia para ambos os microrganismos. No entanto os óleos ozonizados, dendê e pequi apresentaram maior eficácia para *Candida albicans*, e pequi e oliva apresentaram maior eficácia para *Candida tropicalis*. Menor eficácia foi verificada para o óleo de coco em relação a *Candida albicans* e o óleo de dendê para *Candida tropicalis*.

Os resultados evidenciaram a presença de diferenças estatisticamente significativas na comparação dos óleos essenciais *in natura* e ozonizado juntamente com os microrganismos avaliados para os óleos de dendê e pequi. Para os demais óleos essenciais não houve diferenças significativas na comparação da carga microbiana ($P > 0,05$).

Para o óleo essencial de dendê foi possível observar que a carga microbiana foi significativamente superior para os óleos *in natura* e ozonizado referente ao microrganismo *Candida tropicalis*, evidenciando maior resistência deste microrganismo ao efeito antimicrobiano do óleo essencial. O fato de a carga microbiana do microrganismo *Candida albicans* ter apresentado valores inferiores mostra sua menor resistência ao efeito antimicrobiano do óleo essencial. Sendo assim, o óleo essencial de dendê foi mais efetivo contra *Candida albicans*, independentemente de ser *in natura* ou ozonizado.

Para o óleo essencial de pequi foi possível observar resultado contrário ao observado no óleo de dendê, visto que a carga microbiana foi significativamente inferior para os óleos essenciais *in natura* e ozonizado para *Candida tropicalis*, sendo o óleo ozonizado o que apresentou maior efeito antimicrobiano para este microrganismo. O fato de haver maior contagem microbiana para *Candida albicans* pressupõe que este óleo essencial apresenta menor efeito contra este microrganismo, sendo mais efetivo contra *Candida tropicalis*.

De uma forma geral, o óleo essencial de dendê foi mais efetivo contra *Candida albicans*, independentemente de ser *in natura* ou ozonizado; e o óleo essencial de pequi foi mais efetivo contra *Candida tropicalis*, sendo o ozonizado o que apresentou maior efeito antimicrobiano.

A tabela 6 evidencia os resultados comparativos entre as cepas de *Candida albicans* e *tropicalis*:

Tabela 6. Média±desvio padrão (Mediana) da carga microbiana para os óleos essenciais *in natura* e ozonizados de acordo com os microrganismos analisados.

Óleos essenciais (CFM <i>in natura</i> /CFM ozonizado)	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>		Valor P ¹
	<i>In natura</i>	Ozonizado	<i>In natura</i>	Ozonizado	
Coco (100%/50%)	8,8.10 ⁵ ±1,2.10 ⁶ (1,8.10 ⁴)	4,5.10 ⁵ ±8,0.10 ⁵ (4,0.10 ³)	3,7.10 ⁵ ±6,8.10 ⁵ (5,6.10 ³)	4,8.10 ⁵ ±8,1.10 ⁵ (5,0.10 ²)	0,217
Dendê (100%/3,1%) ²	2,8.10 ⁵ ±8,2.10 ⁵ (0,0) b	2,5.10 ⁵ ±7,4.10 ⁵ (0,0) b	8,6.10 ⁵ ±1,2.10 ⁶ (6,7.10 ³) a	9,4.10 ⁵ ±1,3.10 ⁶ (7,7.10 ²) a	0,003
Girassol (100%/50%)	1,0.10 ⁶ ±1,4.10 ⁶ (2,1.10 ³)	6,1.10 ⁵ ±1,1.10 ⁶ (1,4.10 ²)	3,7.10 ⁵ ±6,8.10 ⁵ (7,0.10 ³)	4,2.10 ⁵ ±7,7.10 ⁵ (6,8.10 ²)	0,403
Oliva (100%/100%)	7,1.10 ⁵ ±1,3.10 ⁶ (3,0.10 ⁴)	3,8.10 ⁵ ±9,2.10 ⁵ (3,1.10 ²)	6,6.10 ⁵ ±1,6.10 ⁶ (2,0.10 ²)	6,2.10 ⁵ ±1,6.10 ⁶ (2,3.10 ²)	0,505
Pequi (100%/100%) ²	8,1.10 ⁵ ±1,4.10 ⁶ (3,4.10 ³) a	4,1.10 ⁵ ±1,1.10 ⁶ (1,3.10 ²) ab	1,6.10 ⁵ ±4,7.10 ⁵ (0,5.10 ¹) bc	7,6.10 ⁵ ±2,2.10 ⁶ (0,0) c	0,004

¹ Valor P referente ao teste de Kruskal-Wallis a P<0,05. ² Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de comparação múltipla de Dunn a p<0,05.

6. DISCUSSÃO

O uso de óleos ozonizados na medicina ganhou importância recentemente, por seu reconhecido potencial antimicrobiano e pela disseminação mais frequente de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais. O composto derivado da reação do O₃ com ácidos graxos e outros substratos pode atuar como germicida, imunoestimulante e agente de restauração tecidual. As atividades biológicas e a estabilidade dos óleos ozonizados permitem o desenvolvimento de formulações padrão que entregam os benefícios do O₃, apoiadas por estudos pré-clínicos e clínicos. A qualidade do óleo ozonizado deve ser de suma importância para seu uso clínico, a fim de garantir sua eficácia e evitar toxicidade. A caracterização química e física e os valores precisos de peróxidos (como índice de dosagem) serão considerados como critério de qualidade de uma preparação de óleo ozonizado medicinal. Atualmente, as principais aplicações do óleo ozonizado são para uso externo essencialmente em dermatologia, odontologia, oftalmologia e ginecologia, porém existem evidências de efeitos imunoestimulantes, germicidas e reparadores quando usado por via oral (MARTÍNEZ-SANCHEZ, 2021).

Mesmo quando o mecanismo de ação exato do óleo ozonizado não é descrito, há muitas evidências pré-clínicas e clínicas de sua eficácia antimicrobiana e benéfica na cicatrização de feridas. O óleo ozonizado apresenta atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. Em geral, o efeito letal do óleo ozonizado é evidente quando aplicado a cepas multirresistentes de *Staphylococcus epidermis*, *S. aureus*, também quando aplicado a fungos do gênero *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, leveduras como *Candida* sp e protozoários como *Giardia lamblia* (BOCCI, ZANARDI, TRAVAGLI, 2011; KUME et al. 2021).

A eficácia dos óleos de girassol, coco, pequi, oliva e dendê *in natura* e ozonizado, no controle de *Acinetobacter baumannii*, foi observada por Silva e Kozusny-Andreani (2021), contudo o óleo de dendê *in natura* e ozonizado apresentou as menores CIM (25% e 6,25%, respectivamente), quando comparado com os demais óleos avaliados. Os resultados obtidos na presente pesquisa evidenciaram atividade antifúngica dos óleos de coco, pequi, oliva, dendê e girassol frente a *Candida tropicalis*

(tabela 2). No entanto, o óleo de dendê *in natura* e ozonizados apresentaram menor CIM (12,5% e 1,6%, respectivamente), revelando a ação sinérgica do O₃.

Crastechini et al. (2018), avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do óleo de oliva ozonizado sobre as espécies *Candida*. O óleo ozonizado mostrou atividade antifúngica *in vitro* contra todas as espécies de *Candida*, no entanto maiores concentrações foram necessárias para *tropicalis*, uma vez que para *albicans* e *krusei* a CFM foi de 0,75%, enquanto que para *tropicalis* a CFM foi de 1,5%. A cepa de *Candida tropicalis* ATCC 4563, utilizada na presente pesquisa, evidenciou ser menos sensível ao óleos de oliva *in natura* e ozonizado, nesse caso as CFMs de ambos os óleos foram de 100% (tabela 1). Entretanto, quando foi avaliada a capacidade de redução das UFCs em função do tempo verificou-se que os óleos de oliva e de pequi, ozonizados e *in natura* foram mais eficazes (Tabelas 3 e 5)

Celenza et al. (2020) avaliaram o óleo vegetal ozonizado (Ozodrop, FB Vision) contra *Candida albicans*, *glabrata*, *krusei* e *orthopsilosis* pelo método de microdiluição, e todos os isolados de *Candida* foram considerados suscetíveis com valores de concentração CIM variando de 0,195% a 6,25% concentrações de óleo ozonizado diluído em 0,9% salina; até 70% das células foram inativadas após 1 hora de exposição. Na presente pesquisa *Candida albicans* e *tropicalis* foram suscetíveis a todos os óleos vegetais ozonizados (tabela 1). Entretanto, a CIM obtida para *Candida albicans* foi variou entre 1,6% e 12,5%, valores semelhantes aos obtidos por Celenza et al. (2020), por sua vez a inativação de *Candida tropicalis* foi obtida em concentrações que variaram entre 25% e 100%, exceto para o óleo de dendê ozonizado com CIM de 6,25%.

De acordo com Tara et al. (2016) as infecções vulvovaginais causadas por *Candida spp* são as infecções mais comuns dos sistemas genitais femininos. Devido à terapia prolongada necessária para *Candida spp* e sua resistência aos tratamentos convencionais, os óleos vegetais ozonizados oferecem algumas vantagens na cicatrização de infecções fúngicas, incluindo baixo custo e ausência de efeitos colaterais, conseqüentemente, há um benefício significativo para a saúde humana.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e pelos resultados obtidos pode concluir-se que:

- Os óleos vegetais de girassol, coco, dendê, pequi e oliva, *in natura* e ozonizados inativaram *Candida tropicalis* e *Candida albicans*.

- Os óleos *in natura* de dendê, girassol e coco *in natura* apresentaram concentrações inibitórias e fungicidas mínimas superiores aos óleos ozonizados, enquanto que os de oliva e de pequi não apresentaram diferenças.

-Em relação a capacidade de redução das unidades formadoras de colônias em função do tempo verificou-se que os óleos de oliva e de pequi, ozonizados e *in natura* foram mais eficazes.

-Pelos resultados os óleos vegetais apontam a possibilidade de utilização na terapêutica de *Candida tropicalis* e *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

- ABOZ – Associação Brasileira de Ozonioterapia. **Ozonioterapia**. Disponível em: <https://www.aboz.org.br/ozonioterapia/> Acesso em: 05/04/2022.
- AIEMSAARD, Jareerat et al. **Antifungal activities of essential oils of Syzygium aromaticum, Piper betle, and Ocimum sanctum against clinical isolates of canine dermatophytes**. *Sci. Asia*, v. 43, p. 223, 2017.
- ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, p. 319-327, 2007.
- AHMAD, Aijaz; MOLEPO, Julitha; PATEL, Mrudula. **Challenges in the development of antifungal agents against Candida: scope of phytochemical research**. *Current Pharmaceutical Design*, v. 22, n. 27, p. 4135-4150, 2016.
- APPAIAH, Prakruthi et al. **Composition of coconut testa, coconut kernel and its oil**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 91, n. 6, p. 917-924, 2014.
- AQUINO, Ludmila Pereira. **Extração do óleo da polpa de pequi (Caryocar brasiliense): influência das variáveis operacionais**. 2007. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal de Lavras, <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/3139>.
- ARENSMAN, Kellie et al. Clinical outcomes of patients treated for Candida auris infections in a multisite health system, Illinois, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 5, p. 876, 2020.
- AULER, Marcos E. et al. **Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis**. *Medical mycology*, v. 48, n. 1, p. 211-216, 2010.
- BELTRAN, Marcela Soto et al. Antibacterial activity of ozonized olive (olea europaea l.) And venadillo (swietenia humilis zucc.) Oils against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 947-949, 2021.
- BEN-AMI, Ronen et al. **Multidrug-resistant candida haemulonii and C. Auris, tel aviv, Israel**. *Emerging infectious diseases*, v. 23, n. 2, p. 195, 2017.
- BENASSI, Antônio Carlos; DE SANTANA, E. N.; FANTON, C. J. **O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção**. 2014.
- BOCCI, Velio Alvaro. **Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art**. *Archives of medical research*, v. 37, n. 4, p. 425-435, 2006.
- BOCCI, Velio et al. **The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug**. *Medicinal research reviews*, v. 29, n. 4, p. 646-682, 2009.

BOCCI, Velio; ZANARDI, Iacopo; TRAVAGLI, Valter. **Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects.** *Medical gas research*, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2011.

BÖHMER, Bruna Wendt. **Potencial antimicrobiano e antitumoral de compostos fenólicos extraídos do bagaço oriundo da obtenção de azeite de oliva (*Olea europea* L.).** 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

BRANDÃO, Mitzi et al. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais.** 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 971, maio de 2006.** Práticas Integrativas e complementares. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **PORTARIA Nº 702, DE 21 DE MARÇO DE 2018.** Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - PNPIC. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.** (2005, setembro 22). Aprova o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal (Resolução – RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília.

CABRAL, Mirelle Márcio Santos et al. Aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol de segunda geração. 2015. 76f. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL.

CARDOSO, Irlaine da Conceição Costa et al. **Potencial antimicrobiano de óleos vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas: uma revisão integrativa.** *Research, Society and Development*, v. 10, n. 2, p. e22410212451-e22410212451, 2021.

CARNEIRO, Joara Nályda Pereira et al. **GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 135, p. 110987, 2020.

CELENZA, Giuseppe et al. **Antimycotic Activity of Ozonized Oil in Liposome Eye Drops against *Candida* spp.** *Translational vision science & technology*, v. 9, n. 8, p. 4-4, 2020.

CHANDRA, Jyotsna et al. **Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance.** *Journal of bacteriology*, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

CRASTECHINI, Erica et al. **Effect of ozonized olive oil on oral levels of *Candida* spp. in patients with denture stomatitis.** *Brazilian Dental Science*, v. 21, n. 1, p. 111-118, 2018.

COLOMBO, Arnaldo L. et al. Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. Infection Control & Hospital Epidemiology, v. 28, n. 5, p. 570-576, 2007.

CHOI, Min Ji et al. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 60, n. 6, p. 3653-3661, 2016.

CORNELY, Oliver A. et al. Epidemiology and outcome of fungemia in a cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 65031). Clinical infectious diseases, v. 61, n. 3, p. 324-331, 2015.

CORREIA, Iara Michelle Silva et al. Avaliação das potencialidades e características físico-químicas do óleo de Girassol (*Helianthus annuus* L.) e Coco (*Cocos nucifera* L.) produzidos no Nordeste brasileiro. Scientia plena, v. 10, n. 3, 2014.

CURVELO, Fabiana Martins. Uma imersão no tabuleiro da baiana: o estudo do óleo de palma. 2010. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Bahia.

FEROLDI, Michael; CREMONEZ, Paulo André; ESTEVAM, Andressa. Dendê: do cultivo da palma à produção de biodiesel. Revista Monografias Ambientais, p. 3800-3808, 2014.

DAY, Alison M. et al. Hog1 regulates stress tolerance and virulence in the emerging fungal pathogen *Candida auris*. MSphere, v. 3, n. 5, p. e00506-18, 2018.

DALCHIAVON, Flávio C.; MALACARNE, Bruno J.; DE CARVALHO, Claudio GP. Características agronômicas de genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) em segunda safra no Chapadão do Parecis–MT. Revista de ciências agrárias, v. 39, n. 1, p. 178-186, 2016.

DA ROCHA, Wilma Raianny Vieira et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. Research, Society and Development, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

D'ÊÇA JÚNIOR, A. Atividade in vitro de fosfolipases, proteinases ácidas e hemolisinas de isolados clínicos de *Candida*. São Luís [dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária–Universidade Ceuma, 2010.

D'ÊÇA JÚNIOR, Aurean et al. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, p. 334-338, 2011.

DE LACERDA NETO, Luís J. et al. Modulation of antibiotic activity by the hydroalcoholic extract from leaves of *Caryocar coriaceum* WITTM. Natural Product Research, v. 32, n. 4, p. 477-480, 2018.

LIMA, Alessandro de et al. **Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense, Camb.).** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 29, p. 695-698, 2007.

DUARTE, H. A., et. al. **Benefícios da intervenção com ozonioterapia em pacientes com pé diabético neuroinfeccioso.** Revista Cubana de Angiologia e Cirurgia Vascul. v.5, n.1, 2014.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA: **Pequizeiro comum.** Brasília, DF, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em: 03/03/2022.

EGGIMANN, Philippe; GARBINO, Jorge; PITTET, Didier. **Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients.** The Lancet infectious diseases, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

EMERENCIANO, Nathália Moura Jordão. **Avaliação da atividade antibacteriana do óleo de Pequi extraído artesanalmente (Caryocar sp.).** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso.

FALEIRO, Fábio Gelape et al. **O simpósio nacional sobre o cerrado e o simpósio internacional sobre savanas tropicais. Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais.** Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p. 33-46, 2008.

GAZOLA, A. et al. **A cultura do girassol.** Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Departamento de Produção Vegetal. Piracicaba – SP, 2012. Disponível em: <http://docente.ifsc.edu.br/>. Acesso em: 10/04/2022.

GAUWERKY, Katharina; BORELLI, Claudia; KORTING, Hans C. **Targeting virulence: a new paradigm for antifungals.** Drug discovery today, v. 14, n. 3-4, p. 214-222, 2009.

GRABHER, Isabele.; HARRIS, Maria Inês; **Uso do Azeite de Oliva em Cosméticos.** Instituto Harris, São Paulo/SP, Brasil. v. 28, 2016. Disponível em: www.cosmects.com.br. Acesso em: 20/03/2022.

HATA, D. Jane et al. **Candida auris: an emerging yeast pathogen posing distinct challenges for laboratory diagnostics, treatment, and infection prevention.** Archives of pathology & laboratory medicine, v. 144, n. 1, p. 107-114, 2020.

HILLIER, Sharon L. et al. **Diagnosis and treatment of vaginal discharge syndromes in community practice settings.** Clinical Infectious Diseases, v. 72, n. 9, p. 1538-1543, 2021.

HUANG, Guanghua. **Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen Candida albicans.** Virulence, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2012.

IBIAPINA, Waléria Viana et al. Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 60-70, 2014.

JEFFERY-SMITH, Anna et al. **Candida auris: a review of the literature. Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 1, p. e00029-17, 2018.

JORGE, Neuza. **Química e tecnologia de óleos vegetais. São Paulo: Cultura Acadêmica**, v. 1, p. 165, 2009.

KHALIFAH, M. A. A. **A comparative study for the efficacy of different forms of ozone as a treatment for alveolar osteitis. Oral Surgery**, v. 11, n. 3, p. 195-199, 2018.

KHAN, M. S. A, et al. **Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to Candida albicans. Combating Fungal Infections.** In: AHMAD, I., ET AL. **Combating Fungal Infection: problems and remedy.** Berlin: Springer, 2010. p.21 - 45.

KAUFFMAN CA. **Candidíase.** IN: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005; 359:2713-17.

KUMAR, C. P.; KUMAR, S.; MENON, Thangam. **Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of Candida from immunocompromised patients. Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 213-218, 2006.

KUME, Joelma Evelin Pereira et al. **Uso de óleos essenciais in natura e ozonizados no controle in vitro de Trichophyton mentagrophytes. Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e4710111233-e4710111233, 2021.

LARKIN, Emily et al. **The emerging pathogen Candida auris: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02396-16, 2017.

LIMA, Alessandro de et al. **Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (Caryocar brasiliense, Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 695-698, 2007.

LIMA, E. B. C. et al. **Cocos nucifera (L.)(Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 953-964, 2015.

LIMA, A. **Ouro do Cerrado.** Revista Minas faz Ciência, n. 27, p. 38-41, 2006.

LOCKHART, Shawn R. et al. **Simultaneous emergence of multidrug-resistant Candida auris on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134-140, 2017.

LONE, Shabir A.; AHMAD, Aijaz. **Candida auris**—the growing menace to global health. **Mycoses**, v. 62, n. 8, p. 620-637, 2019.

LORENÇATO, A. **Oliveira tem um dia mundial para chamar de seu**. Veja: São Paulo, 2020. Disponível em: <https://vejasp.abril.com.br/>. Acesso em: 20/03/2022.

LÓPEZ-ÁVILA, Karina et al. **Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en Candida albicans. Una revisión**. Revista biomédica, v. 27, n. 3, p. 127-136, 2016.

LOPEZ, C. et al. **Comparación de diferentes métodos de la identificación de especies del género Candida**. Rev. Argent Microbiol, Buenos Aires, v. 37, n. 1 p.16-21, jan-marc. 2005.

LUO, Gang; SAMARANAYAKE, Lakshman P.; YAU, Joyce YY. **Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities**. Journal of Clinical Microbiology, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.

MAGALHÃES, M. **Óleo de Girassol: benefícios e contra-indicações para a saúde**. 2020. Disponível em: <https://ncultura.pt/oleo-de-girassol-beneficios-e-contra-indicacoes/>. Acesso em: 25/03/2022.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, Fernanda Cristina et al. **Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 50, n. 4, p. 969-978, 2019.

MACALUPÚ, Susana Zurita. **Situation of anti-fungal resistance of species of the genus Candida in Peru**. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, v. 35, n. 1, p. 126-131, 2018.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, Gregorio. **Scientific rational for the medical application of ozonized oils, an up-date**. Ozone Therapy Global Journal, 2021, 11.1: 239-272.

MARTINS CC, KOZUSNY-ANDREANI DI, MENDES ECB. **[Ozone in the control of microorganisms in health care waste]**. Revista Baiana de Enfermagem. 2015;29(4):318-327.

MARTINS, Carlos Roberto; DE JESUS JÚNIOR, L. A. **Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010**. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documentos (INFOTECA-E), 2011.

MARITZA, F. D. et al. **In vivo Antimicrobial Activity of Ozonized Theobroma Oil Ovules against Candida albicans**. Archives of Clinical Microbiology, v. 8, n. 6, p. 0-0, 2017.

MATTOS, Gerson et al. **Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 23, p. 3735-3744, 2018.

MAUBON, Danièle et al. **Resistance of Candida spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now**. Intensive care medicine, v. 40, n. 9, p. 1241-1255, 2014.

DE MELO JÚNIOR, Afrânio Farias et al. **Estrutura genética de populações naturais de pequiheiro (Caryocar brasiliense Camb.) Genetic structure of natural populations of pequiheiro (Caryocar brasiliense Camb.).** Scientia Forestalis, Piracicaba, n. 66, p.56-65, 2004.

DE MENEZES, Viviane Menezes et al. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de Candida spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 42, n. 3, 2013.

MENEZES, Everardo Albuquerque et al. **Identificação preliminar de algumas espécies do gênero Candida spp. em meio cromógeno:** resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no Ceará. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 297-303, 2011.

BALLAL, Mamatha et al. **Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in Candida species isolated from blood.** Revista iberoamericana de micologia, v. 25, n. 4, p. 208-210, 2008.

MOREIRA, Laís Santos et al. **Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte.** Revista Univap, v. 23, n. 43, p. 44-52, 2017.

MORETTO, E.; FETT, R. Óleos e Gorduras vegetais-Na indústria de alimentos. São Paulo, 1998.

MUKHERJEE, Pranab K. et al. **Candida biofilm:** a well-designed protected environment. **Medical mycology**, v. 43, n. 3, p. 191-208, 2005.

NARAYANANKUTTY, Arunaksharan; ILLAM, Soorya Parathodi; RAGHAVAMENON, Achuthan C. **Health impacts of different edible oils prepared from coconut (Cocos nucifera):** A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 1-7, 2018.

NETO, Marcos Martins; DANESI, Cristiane Cademartori; UNFER, Daniele Taís. **Candidíase bucal revisão da literatura.** Saúde (Santa Maria), v. 31, n. 1 e 2, p. 16-26, 2005.

NOBILE, Clarissa J. et al. **Complementary adhesin function in C. albicans biofilm formation.** **Current biology**, v. 18, n. 14, p. 1017-1024, 2008.

NUCCI, Marcio; COLOMBO, Arnaldo L. **Candidemia due to Candida tropicalis: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals.** **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 58, n. 1, p. 77-82, 2007.

OLIVEIRA, Washington Luis de. **Ecologia Populacional e extrativismo de frutos de Caryocar brasiliense Camb. no Cerrado no norte de Minas Gerais.** 2009. Dissertação de Mestrado). Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2009, 82 pag.

OMBRELLA, Adriana M.; RACCA, Liliana; RAMOS, Laura. **Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de Candida albicans provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH.** Revista iberoamericana de micología, v. 25, n. 1, p. 12-16, 2008.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** Genebra: OMS, 2002. 67 p.

PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. **Epidemiologia das infecções por Candida spp. na corrente sanguínea: coorte retrospectiva em hospital terciário brasileiro.** 2004.

PASTOR GARCÍA, Hebert Jhimisy. **Evaluación del efecto in vitro del extracto hidroetanólico de Vaccinium corymbosum L. “arándano” sobre el crecimiento y algunos factores de virulencia de Candida albicans ATCC 10231.** 2020.

PEIXOTO, Segundo; MONTENEGRO, Fernando Luiz Brunetti. REVISÃO DE LITERATURA. **QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA E ANÁLISE ECONÔMICA DO CONSÓRCIO SERINGUEIRA-CACAU PARA GERAÇÃO DE CRÉDITOS DE CARBONO,** p. 4, 2005.

PEREIRA, Julio Abrantes et al. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero candida e perfil farmacológico e toxicológico em estudos in silico.** Tese, (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba (UFPB-BC), João Pessoa, PB. 2017.

RAUL, Lody. **Dendê: símbolo e sabor da Bahia.** Editora Senac São Paulo, 2019.

REIS, Moisés Santos dos. **Avaliação da estabilidade oxidativa de azeite de dendê, submetido ao armazenamento acelerado, na presença de extrato da casca de cebola (Allium cepa L.).** Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado da Bahia. Salvador, 2017.

RIZZATI, Olívia. **A crescente resistência de Candida spp. e seus desafios em ambientes hospitalares.** 2022.

RODRIGUES, Dality Keffelen de Barros. **Distribuição das espécies de crípticas de Candida em isolados de corrente sanguínea: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica.** 2020. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2020.

RODRIGUES, Luiz José et al. **Caracterização do desenvolvimento de pequi (Caryocar brasiliense) temporão do sul de Minas Gerais.** Pesquisa Agropecuária Tropical, p. 260-265, 2009.

ROSA, S. R. **COMO ESCOLHER O AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM.** 2020. Disponível em: www.ufrgs.br/laranjanacolher/2020/07/06/como-escolher-o-azeite-de-oliva-estra-virgem/. Acesso em: 06/02/2022.

RUIZ-GAITÁN, Alba et al. **An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital.** *Mycoses*, v. 61, n. 7, p. 498-505, 2018.

RUIZ-GAITÁN, Alba et al. **Detection and treatment of *Candida auris* in an outbreak situation: risk factors for developing colonization and candidemia by this new species in critically ill patients. Expert review of anti-infective therapy**, v. 17, n. 4, p. 295-305, 2019.

RUTHERFORD, Steven T.; BASSLER, Bonnie L. **Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 2, n. 11, p. a012427, 2012.

SANGUANINI, Rafael Cavalcante et al. **Efeitos da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos.** 2019.

SANTOS, Juliana Guimarães dos. **Influência de extratos vegetais nos fatores de virulência de *Candida albicans* em biofilme: estudo in vitro.** 2018.

SARDI, J. C. O. et al. ***Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.** *Journal of medical microbiology*, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARIGUZEL, Fatma Mutlu et al. **Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures.** *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 9, n. 08, p. 857-864, 2015.

SCHIESARI JUNIOR, A. et al. **Infecções por bactérias formadoras de biofilme: breve revisão.** *Revista Brasileira de Medicina Interna*, v.2 n. 1 p. 37-47, Cantanduva - São Paulo, 2015.

SENEVIRATNE, C. J. et al. **A suscetibilidade antifúngica em determinantes de soro e virulência da corrente sanguínea de *Candida* isola de Hong Kong.** *Frente. Microbiol.* 7:216. doi: 10.3389/fmicb.2016.

SILVA, Sónia et al. ***Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance.** *FEMS microbiology reviews*, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, Matheus Jacobina Andrade. **Formação de biofilme de *Candida albicans* na superfície de uma resina acrílica termopolimerizável tratada com polimento líquido.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SILVA, Naiara C.; NERY, Jessica M.; DIAS, Amanda LT. **Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance.** *Mycoses*, v. 57, n. 1, p. 1-11, 2014.

SILVA, Natália Cristina Sousa et al. **A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. Única cadernos acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017.

SILVA, Wagner Rafael da. **Composição química e atividade antimicrobiana de óleos vegetais in natura e ozonizados em Acinetobacter baumannii**. 2021.

SYLVESTER, Paul W. **Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability**. In: **Drug Design and Discovery**. Humana Press, 2011. p. 157-168.

SPIVAK, Emily S.; HANSON, Kimberly E. **Candida auris: an emerging fungal pathogen**. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 2, p. e01588-17, 2018.

SIQUEIRA, Jonathan Santos et al. **Candidíase oral em pacientes internados em UTI**. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 71, n. 2, p. 176, 2015.

TAMURA, Nathalie Kira et al. **Fatores de virulência de Candida spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares**. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 91-93, 2007.

TAORI, Surabhi K. et al. **Candida auris outbreak: Mortality, interventions and cost of sustaining control**. **Journal of Infection**, v. 79, n. 6, p. 601-611, 2019.

TARA, Fatemeh et al. **The effects of ozonated olive oil and Clotrimazole cream for treatment of vulvovaginal candidiasis**. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 44, 2016.

TERAMOTO, Juliana Rolim Salomé, et al. **Atividade antimicrobiana das folhas de duas variedades de oliveira e a contextualização deste coproduto da produção paulista e mundial de azeite de oliva**. **Revista Intellectus**, v. 37, p. 63-83, 2017.

TIAN, Sufei et al. **First cases and risk factors of super yeast Candida auris infection or colonization from Shenyang, China**. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

THOMPSON, Delma S.; CARLISLE, Patricia L.; KADOSH, David. **Coevolution of morphology and virulence in Candida species**. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TIRABOSCHI, Iris Nora et al. **Epidemiología, especies, resistencia antifúngica y evolución de las candidemias en un hospital universitario de Buenos Aires, Argentina, durante 16 años**. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 5, p. 431-440, 2017.

TRAVAGLI, Valter et al. **Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review**. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.

DA SILVA TRENTIN, Danielle; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate**. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

TOPAN, José Fernando. **Emulsões à base de óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética.** 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E. S. **Informações Tóxicas de Alguns Fitoterápicos Utilizados no Brasil.** Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas V.42, n.2, 2006.

UGAZIO, Elena et al. **Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques.** *Molecules*, v. 25, n. 2, p. 334, 2020.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. **Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado.** Uma compilação de dados. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.3, n.1, p.13-36, 2000.

VIEIRA, José Sebastião C. et al. **Esterificação e transesterificação homogênea de óleos vegetais contendo alto teor de ácidos graxos livres.** *Química Nova*, v. 41, p. 10-16, 2018.

WANG, Emily et al. **The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 8, p. 2362-2368, 2015.

WANG, Xiaojuan et al. **The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects.** *Emerging microbes & infections*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

WHIBLEY, Natasha; GAFFEN, Sarah L. **Beyond *Candida albicans*: mechanisms of immunity to non-albicans *Candida* species.** *Cytokine*, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

ZAR, Jerrold H. **Biostatistical analysis.** Pearson Education India, 1999.

ZUZA-ALVES, Diana L.; SILVA-ROCHA, Walicyranison P.; CHAVES, Guilherme M. **An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches.** *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1927, 2017.