

UNIVERSIDADE BRASIL  
CAMPUS DE FERNANDÓPOLIS

JOELMA ÉVELIN PEREIRA KUME

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *in natura* e OZONIZADOS SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

Fernandópolis, SP  
2020

UNIVERSIDADE BRASIL  
CAMPUS DE FERNANDÓPOLIS

Joelma Évelin Pereira Kume

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *in natura* e OZONIZADOS SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Dora Inés Kozusny-Andreani

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

Fernandópolis, SP  
2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

K96e Kume, Joelma Évelin Pereira.  
Efeito de óleos essenciais *in natura* e Ozonizados sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos/ Joelma Évelin Pereira Kume.  
São Paulo – SP: [s.n.], 2020.  
92 p.: il.; 29,5cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Inés Kozusny-Andreani.

1. *Trichophyton mentagrophyte*. 2. *Trichophyton rubru*.  
3. *Sporothrix schencki*. 4. Ozônio. 5. Plantas medicinais. I. Título.

CDD 616.969

UNIVERSIDADE  
BRASIL**Termo de Autorização****Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo 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: **"EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS in natura E OZONIZADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS PATOGÊNICOS"**

Autor(es):

Discente: Joelma Évelin Pereira Kume

Assinatura: \_\_\_\_\_



Orientadora: Dora Inés Kozusny-Andreani

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: 30/setembro/2020

**TERMO DE APROVAÇÃO****JOELMA ÉVELIN PEREIRA KUME****“EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS in natura E OZONIZADOS SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS PATOGÊNICOS”**

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 Inês Kozusny-Andreani (Presidente)  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Gisele Herbst Vazquez (Universidade Brasil)  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Marilisa Flavia Pereira Di-Tanno (CEETEPS)

Fernandópolis, 30 de setembro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me conceder a sabedoria e a energia para que meus sonhos se tornassem realidade.

Ao meu esposo Alexandre Domingos Kume por todo amor, apoio, paciência e pelo incentivo de todos os dias, sou grata por me ajudar a realizar este sonho.

Aos meus familiares, em especial minha querida mãe Terezinha Aparecida da Silva Santos e minha tia Nilcéia Santos Pereira, que sempre me apoiaram em tudo, sendo um suporte em minha vida, me proporcionando alcançar esta vitória.

À minha querida professora orientadora Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani agradeço pela orientação, pela confiança, atenção e por acreditar no meu potencial, agradeço também, por sua grande ajuda e pela amizade sincera.

Aos funcionários da Universidade Brasil, campus Fernandópolis, principalmente a Ana Cléia Limeira da Silva Abreu pela atenção, ajuda e apoio me dado durante a realização do experimento.

A todos os professores que sempre proporcionaram um ensino de qualidade e demonstraram estar comprometido com a excelência do ensino oferecido.

Aos amigos de sala, do curso de pós-graduação, que juntos compartilhamos momentos alegres e divertidos, dividimos experiências e conquistas.

E a todos aqueles que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma importante para a realização deste trabalho, meu sincero muito abrigada.

“Dificuldades preparam pessoas  
comuns para destinos  
extraordinários...”

(C. S. Lewis)

## RESUMO

Algumas espécies de fungos são capazes de provocar infecções micóticas. Uma dessas infecções, é a dermatofitose, causada por um grupo de fungos, denominados Dermatófitos, outra infecção é a esporotricose, provocada por espécies de *Sporothrix schenckii*. O tratamento da doença é realizada utilizando antifúngicos convencionais. A emergência de cepas resistentes tem ocasionado tratamento alternativos, como os medicamentos naturais ou emprego do gás ozônio. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais *in natura* e ozonizados frente ao *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, e *Sporothrix*. Foram empregados óleos essenciais *in natura* e ozonizados de *Cinnamomum cassia*, *Eugenia caryphollata*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana* e *Mentha piperita*, avaliados quanto a atividade antifúngica frente a linhagem dos microrganismos. Os óleos foram ozonizados em equipamento corona. Utilizou-se a técnica de microdiluição para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). Foi determinada a cinética fungicida dos óleos essenciais. Os dados obtidos foram avaliados pelos Teste de Mann-Whitney e pelo teste de Kruskal-Wallis. O fungo *T. mentagrophytes* apresentou-se como sendo mais resistente. O *T. rubrum* apresentou menor resistência aos tratamentos, evidenciando quedas na contagem microbiana nos primeiros momentos de exposição. O fungo *Sporothrix* apresentou maior resistência aos óleos de canela, cravo-da-Índia e eucalipto staigeriana, evidenciando queda de variação da contagem microbiana. De forma geral, os resultados evidenciaram a possibilidade do uso na terapêutica antifúngica frente aos microrganismos estudados.

**Palavras-chave:** *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Sporothrix schenckii*, ozônio, plantas medicinais.



## ABSTRACT

Some species of fungi are capable of causing mycotic infections. One of these infections is dermatophytosis, caused by a group of fungi, called dermatophytes. another infection is sporotrichosis, caused by species of *Prothorax schenckii*. The treatment of the disease is carried out using conventional antifungals. The emergence of resistant strains has led to alternative treatments, such as natural medicines or the use of ozone gas. The objective of this research was to evaluate the antifungal activity of fresh and ozonated essential oils against *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, and *Sporothrix schenckii*. *In natura* and ozonized essential oils of *Cinnamomum cassia*, *Eugenia Caryphollata*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus staigeriana* and *Mentha piperita* were used, evaluated for antifungal activity against the microorganism lineage. The oils were ozonized in corona equipment. The microdilution technique was used to assess the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC). The fungicidal kinetics of essential oils were determined. The data obtained were evaluated by the Mann-Whitney test and by the east of Kruskal-Wallis. The fungus *T. mentagrophytes* was more resistant. *T. rubrum* showed less resistance to treatments, showing decreases in microbial count in the first moments of exposure. The *Spothrix* fungus showed greater resistance to cinnamon, clove and *Eucalyptus staigeriana* oils, showing a decrease in microbial count variation. In general, the results show the possibility of use in antifungal therapy against the studied microorganisms.

**Keywords:** *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Sporothrix schenckii*, ozone, medicinal plants.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Cinnamomum cassia</i> A - Porte, B – Canela em pau .....	24
<b>Figura 2</b> <i>Eugenia caryophyllata</i> A - Porte, B - Projeção de um ramo com folhas, gomos e flores C - Broto seco.....	26
<b>Figura 3</b> <i>Cymbopogon winterianus</i> .....	27
<b>Figura 4</b> Partes do <i>Eucalyptus globulus</i> A - Porte, B - flores, C - folhas e frutos.....	28
<b>Figura 5</b> Partes do <i>Eucalyptus staigeriana</i> A - folhas, B - flores, C – galho de frutos secos .....	29
<b>Figura 6</b> <i>Mentha Piperita</i> A – folhas, B – caule e flores .....	30
<b>Figura 7</b> Cultura de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	35
<b>Figura 8</b> Cultura de <i>Trichophyton rubrum</i> .....	35
<b>Figura 9</b> Cultura de <i>Sporothrix</i> .....	35
<b>Figura 10</b> Ozonização do óleos essenciais .....	36
<b>Figura 11</b> Esquema representativo da metodologia de microdiluição .....	39
<b>Figura 12</b> Esquema representativo da determinação de CFM .....	40
<b>Figura 13</b> Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de <i>Sporothrix schenckii</i> , após cinco minutos de ação do óleo de cravo-da-Índia ozonizado (A) e óleo-de cravo-da-Índia <i>in natura</i> (B) .....	44
<b>Figura 14</b> Variação percentual da contagem microbiana do óleo essencial de cravo-da-Índia .....	45
<b>Figura 15</b> Variação percentual da contagem microbiana do óleo essencial de eucalipto <i>globulus</i> .....	46
<b>Figura 16</b> Variação percentual média da contagem de <i>Sporothrix schenckii</i> exposto aos óleos de citronela <i>in natura</i> e ozonizado .....	46
<b>Figura 17</b> Variação percentual média da contagem de <i>Sporothrix schenckii</i> exposto aos óleos de canela <i>in natura</i> e ozonizado .....	47
<b>Figura 18</b> Variação percentual média da contagem de <i>Sporothrix schenckii</i> exposto aos óleos de cravo-da-Índia <i>in natura</i> e ozonizado .....	48

<b>Figura 19</b> Variação percentual média da contagem de <i>Sporothrix schenckii</i> exposto aos óleos de Eucalipto globulus <i>in natura</i> e ozonizado .....	48
<b>Figura 20</b> Variação percentual média da contagem de <i>Sporothrix schenckii</i> exposto aos óleos de Eucalipto staigeriana <i>in natura</i> e ozonizado .....	49
<b>Figura 21</b> Variação percentual média da contagem de <i>Sporothrix schenckii</i> exposto aos óleos de Menta piperita <i>in natura</i> e ozonizado .....	49
<b>Figura 22</b> Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , após dez minutos de ação do óleo de citronela ozonizado (A) e óleo de citronela <i>in natura</i> (B) .....	53
<b>Figura 23</b> Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de <i>trichophyton mentagrophytes</i> após cinco minutos de ação do óleo de cravo-da-Índia ozonizado (A) e óleo-de cravo-da-Índia <i>in natura</i> (B) .....	54
<b>Figura 24</b> Variação percentual da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto ao óleo essencial de citronela <i>in natura</i> e ozonizado .....	55
<b>Figura 25</b> Variação percentual da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto ao óleo essencial de cravo-da-Índia <i>in natura</i> e ozonizado .....	56
<b>Figura 26</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto aos óleos de citronela <i>in natura</i> e ozonizado .....	57
<b>Figura 27</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto aos óleos de canela <i>in natura</i> e ozonizado .....	57
<b>Figura 28</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto aos óleos de cravo-da Índia <i>in natura</i> e ozonizado .....	58
<b>Figura 29</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto aos óleos de eucalipto globulus <i>in natura</i> e ozonizado.....	58
<b>Figura 30</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto aos óleos de eucalipto stageriana <i>in natura</i> e ozonizado .....	59
<b>Figura 31</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> exposto aos óleos de menta piperita <i>in natura</i> e ozonizado .....	59
<b>Figura 32</b> Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de <i>Trichophyton rubrum</i> após cinco minutos de ação do óleo de canela ozonizado (A) e óleo de canela <i>in natura</i> (B) ....	65

<b>Figura 33</b> Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de <i>Trichophyton rubrum</i> após cinco minutos de ação do óleo de eucalipto stageiriana ozonizado (A) e óleo de eucalipto stageiriana <i>in natura</i> (B) .....	65
<b>Figura 34</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de canela <i>in natura</i> e ozonizado .....	66
<b>Figura 35</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de cravo-da-Índia <i>in natura</i> e ozonizado .....	67
<b>Figura 36</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de eucalipto globulus <i>in natura</i> e ozonizado .....	67
<b>Figura 37</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de eucalipto staigeriana <i>in natura</i> e ozonizado .....	68
<b>Figura 38</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de citronela <i>in natura</i> e ozonizado .....	68
<b>Figura 39</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de canela <i>in natura</i> e ozonizado .....	69
<b>Figura 40</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de cravo-da-Índia <i>in natura</i> e ozonizado .....	69
<b>Figura 41</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de eucalipto globulus <i>in natura</i> e ozonizado .....	70
<b>Figura 42</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de eucalipto staigeriana <i>in natura</i> e ozonizado .....	70
<b>Figura 43</b> Variação percentual média da contagem de <i>Trichophyton rubrum</i> exposto aos óleos de menta piperita <i>in natura</i> e ozonizado .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Nomes vulgar e científico das plantas medicinais e características dos óleos essenciais .....	37
<b>Tabela 2</b> Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais <i>in natura</i> e ozonizados frente a <i>Sporothrix schenckii</i> .....	42
<b>Tabela 3</b> Estatísticas descritivas da variação percentual (%) global da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados .....	43
<b>Tabela 4</b> Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais <i>in natura</i> e ozonizados frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	52
<b>Tabela 5</b> Estatísticas descritivas da variação percentual (%) global da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados.....	53
<b>Tabela 6</b> Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais <i>in natura</i> e ozonizados frente a <i>Trichophyton rubrum</i> .....	62
<b>Tabela 7</b> Estatísticas descritivas da variação percentual (%) global da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados .....	63
<b>Tabela 8</b> Médias da variação microbiana dos fungos avaliados no estudo de acordo com os óleos essenciais e o uso de ozônio .....	73

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2.OBJETIVO .....	17
2.1. Objetivos gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1. Dermatófitos .....	18
3.2. Esporotricose .....	19
3.3. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	20
3.4. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	21
3.5. <i>Sporothrix</i> .....	22
3.6. Óleos essenciais .....	22
3.7. Plantas Estudadas .....	24
3.7.1. Canela Cássia ( <i>Cinnamomum cassia</i> ) .....	24
3.7.2. Cravo Folha ( <i>Eugenia caryphollata</i> ) .....	25
3.7.3. Citronela ( <i>Cymbopogon winterianus</i> ) .....	27
3.7.4. Eucalipto Globulus ( <i>Eucalyptus globulus</i> ) .....	28
3.7.5. Eucalipto Staigeriana ( <i>Eucalyptus staigeriana</i> ) .....	29
3.7.6. Menta Piperita ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	30
3.8. Ozônio .....	31
3.9. Óleos ozonizados .....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Local da Pesquisa .....	34
4.2. Linhagens e meios de cultivo .....	34
4.3. Inóculo .....	35

4.4. Óleos essenciais ozonizados .....	36
4.5. Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) .....	38
4.6. Cinética fungicida dos óleos essenciais .....	40
4.7. Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1. <i>Sporothrix schenckii</i> .....	42
5.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	51
5.3. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	61
5.4. Comparação geral entre os fungos .....	73
6. CONCLUSÃO .....	76
7. REFERÊNCIAS .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos formam um grupo de organismos com larga disseminação e variedade. Aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram descritas, e estima-se a possibilidade de existirem até 1,5 milhão de espécies, a maioria é microscópica e terrestre. Eles habitam o solo ou matéria vegetal morta e desempenham um papel importante na mineralização do carbono orgânico. Inúmeros fungos são parasitas de plantas, enquanto outros podem causar diversas doenças em animais e/ou seres humanos (MADIGAN et al., 2016).

O reino fungi é composto por organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos). As leveduras apresentam características esféricas, ovais ou cilíndricas, enquanto os fungos filamentosos, formam massas visíveis a olho nu chamadas de micélio, compostas de longos filamentos chamados de hifas que se ramificam e se entrelaçam (TAKAHASHI et al., 2017).

Algumas espécies de fungos são capazes de provocar infecções, denominadas micose. A dermatofitose é uma micose superficial que acomete as estruturas queratinizadas (pelos, unhas e pele) da pele. A doença é causada por um grupo de fungos, denominados dermatófitos classificados em três gêneros de fungos filamentosos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A esporotricose, trata-se de uma infecção crônica, caracterizada por lesões nodulares cutâneas, subcutâneas e linfáticas, provocada pelo *Sporothrix schenckii*, com características de dimorfismo (fase filamentosa e fase leveduriformes) (MENEZES E SILVA et al., 2006).

Na terapêutica dessas infecções são usados os agentes antifúngicos, que podem apresentar elevada toxicidade e/ou elevado custo (KHAN et al., 2013), o que ocasiona uma busca por alternativas mais eficientes e com teor tóxico baixo para o tratamento das micoses, pelo uso de produtos de origem vegetal (CORTEZ et al., 2015).

Na medicina popular as plantas tem o uso simultâneo à utilização de medicamentos sintéticos, o que torna alta a procura por plantas medicinais e aromáticas em diversos países, devido à tendência dos consumidores em utilizarem,



com preferência, os produtos farmacêuticos e os alimentícios de origem natural (SANTOS et al., 2011).

O conhecimento de uma possível atividade antifúngica dos óleos essenciais são de muita importância, pois abre possibilidades para a obtenção de futuros medicamentos antifúngicos de origem natural (KUMAR et al, 2014; CORTEZ et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2017, BATIHA et al., 2020; SIHAM et al., 2020).

Vários estudos evidenciam a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) (GUIMARÃES et al., 2011), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) (MEDICE et al., 2007), erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton e P. Wilson) (ROZWALKA et al., 2008) e menta (*Mentha piperita* L.) (PEREIRA et al., 2006) sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos. A promissora atividade antimicrobiana dos óleos essenciais levou os pesquisadores a usá-los em combinação com substâncias antimicrobianas para reduzir a toxicidade da droga, efeitos colaterais e resistência a agentes únicos (capacidade do microrganismo de resistir aos efeitos da medicação anteriormente utilizada para tratá-los, como antibióticos) (TULLIO et al., 2019).

Devido a vários benefícios apresentados, a ozonioterapia é uma técnica que vem se destacando como uma opção para o tratamento para diferentes enfermidades, pois apresentam vantagens como baixo custo, a baixa invasividade, a ação antimicrobiana, fácil aplicação sistêmica ou local e a ausência de efeitos colaterais, intolerância ou contraindicações quando utilizada em doses terapêuticas. Este método vem sendo utilizado tanto na medicina humana e como na medicina veterinária (BOCCI 2006; ZANARDI et al., 2016).

Estudos vem comprovando que os compostos oxigenados presentes em óleos ozonizados são os responsáveis pela larga atividade biológica, assim como pelas atividades antimicrobianas e antifúngicas (MENENDEZ et al., 2002; RODRIGUES et al., 2004; VALACCHI et al., 2005; SKALSKA et al., 2009).

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo Geral

Objetivou-se nesta pesquisa avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais *in natura* e ozonizados de Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*), Cravo Folha (*Eugenia caryphollata*), Citronela (*Cymbopogon winterianus*), Eucalipto globulus (*Eucalyptus globulus*), Eucalipto staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*) e Menta Piperita (*Mentha piperita*) em isolados de *Trichophyton mentagrophytes* ATTC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, e *Sporothrix* ATCC 16345.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais sobre as cepas de *Trichophyton mentagrophytes* ATTC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, e *Sporothrix* ATCC 16345.
- Avaliar o tempo de sobrevivência dos fungos por meio da curva de crescimento.
- Verificar presença de sinergismo do gás ozônio com os óleos essenciais *in natura*.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Dermatófitos

As infecções dermatofíticas em humanos e animais estão entre as formas mais comuns de doenças de pele em todo o mundo (MADHAVI et al., 2011). Os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (TORTORA et al., 2017). Além disso, são divididas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas, isto vai depender do seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente) (WHITE et al., 2008; PERES et al., 2010).

O gênero *Trichophyton* é definido pela produção de grande número de microconídias e celular fina e lisa. Já o gênero *Microsporum* se caracteriza pela produção de macroconídias, que são multicelulares, com parede celular grossa, e espiculada. As microconídias são pequenas, hialinas podendo apresentar-se em forma de gota ou elípticas e nascem diretamente das hifas. *Epidermophyton* é definido pela ausência de microconídios e pela produção de macroconídias em clave, com parede lisa, com duas a quatro células cada. São originadas individualmente da hifa ou, mais caracteristicamente, ocorrem em cachos de duas ou três macroconídias (WINN JUNIOR, 2006).

A contaminação com o hospedeiro pode ocorrer indiretamente através de fômites como os copos, talheres, brinquedos, cama, roupa, dinheiro, termômetro, e por contado direto com homens ou animais infectados, por partículas suspensas no ar por tosse, espirro, fala, até um metro do reservatório ao novo hospedeiro, ou também por veículo, dispersão do agente infeccioso através de alimento, água ou ar contaminado (TORTORA et al., 2017).

Para que os dermatófitos se instalem na superfície da pele, precisam desviar-se do mecanismo de defesa do hospedeiro, que é a “renovação do estrato-córneo”, que provoca a descamação e eliminação do fungo. Quando aderido na superfície da pele, o arthroconídio germina e a hifa penetra na camada córnea rapidamente para evitar a eliminação com a descamação. Uma vez aderidos, os dermatófitos buscam nutrientes (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre) para o seu crescimento, secretando

enzimas como proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases, degradando as macromoléculas presentes no hospedeiro (PEREZ, 2010).

As infecções cutâneas causadas pelos dermatófitos, são denominadas dermatofitose ou *Tinea* e acometem o tecido queratinizado (pelos, unhas e pele). O tratamento clínico de dermatofitose normalmente é longo e oneroso. Existe um número limitado de alvos celulares que são utilizados como alvos de drogas. Desta forma, muitos dos antifúngicos disponíveis no mercado atuam sobre o mesmo alvo celular, o ergosterol, principal componente da membrana celular fúngica, responsáveis por manter sua integridade e fluidez, ou nas enzimas envolvidas em sua biossíntese (PENA-MURALLA et al., 2002).

Verifica-se que existe uma dificuldade generalizada em tratar micoses, pois estas se revelam como um grande desafio, pois os dermatófitos são difíceis de erradicar (SIDRIM e ROCHA, 2004). E ainda existem as falhas terapêuticas que podem ser explicadas pelo baixo índice de aderência do paciente ao tratamento (LLAMBRICH e LECHA, 2002), pela longa duração do mesmo, pelos importantes efeitos colaterais, pelas interações medicamentosas, resistência antifúngica (GUPTA et al., 1998) e toxicidade renal e hepática (GIROIS et al., 2006).

### **3.2. Esporotricose**

A esporotricose é uma micose causada pelos fungos do gênero *Sporothrix* e apresenta características de lesões nodulares ou gomosas cutâneas, subcutâneas e linfáticas que podem supurar, fistular e ulcerar. O agente etiológico *Sporothrix* é dimórfico, ou seja, tem aspectos micro e macromorfológico distintos, em função do substrato e da temperatura (MENEZES E SILVA et al., 2006).

O fungo pode infectar várias espécies, entre elas felinos domésticos, cães, animais silvestres e o próprio homem. Os gatos, no entanto, são os maiores transmissores do fungo, apesar de serem uma entre várias espécies que podem transmiti-la. A infecção costuma ocorrer por vulnerações transcutâneas e a partir de materiais contaminados. Os casos de esporotricose no homem estão associados ao manuseio de vegetais ou ao contato com a terra. O gato pode contrair a doença graças ao hábito de arranhar pedaços de madeira, ou em brigas por alimento ou disputa por território com outros gatos (MEDLEAU e HNILICA, 2003).

O diagnóstico de esporotricose pode ser confirmado por meio de amostras de drenos ou de tecidos e posteriormente realizando o isolamento do microrganismo por meio de técnicas de cultura, ou pela inoculação em animais de laboratórios com material infectado. Não é comum a visualização direta do microrganismo nos exsudatos, por se encontrarem em baixas quantidades nestes materiais (WOLF e TROY, 1992).

O tratamento baseia-se na aplicação de droga antifúngica sistêmica por um longo período (semanas a meses), mantendo o uso durante, no mínimo 1 mês após a cura clínica completa (SCOTT et al., 1996).

### **3.3. *Trichophyton mentagrophytes***

*T. mentagrophytes* assim como outros dermatófitos, tem a capacidade de digerir áreas queratinizadas no homem, como também em outros mamíferos e aves, considerado um dos dermatófitos mais frequentemente encontrado no homem, nos animais e no solo (OYEKA, 2000).

Esta espécie de fungo possui pelo menos cinco diferentes variantes, o que distingue cada uma são suas características relacionadas à ecologia dos dermatófitos. *T. mentagrophytes* var *interdigitale* é um antropofílico causador de *tinea pedis*, *tinea corporis* e, podendo, afetar as unhas manifestando pontos brancos. A segunda variante o *T. mentagrophytes* var *modulare* é uma forma rara antropofílico, ocasionalmente isolado em casos de *tinea pedis*, o qual não invade o cabelo *in vivo*, mas perfura o pelo *in vitro*. Já o *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes* é zoofílico, infecta muitos animais, além de causar lesões inflamatórias na pele e couro cabeludo de humanos. O *T. mentagrophytes* var *quinckeanum* é zoofilia e causa lesões crostosas em camundongos e, sendo raro no homem. Por fim, o *T. mentagrophytes* var. *erinacei* é zoofilia, isolado em ouriços e dificilmente em humanos. Todas estas variantes compõem o complexo *T. mentagrophytes*, e sua diferenciação se torna impossível em um único meio, portanto será tratado nesse trabalho em sua totalidade, como o complexo (HOUCK et al., 1996, OYEKA, 2000, OUTERBRIDGE, 2006).

A taxa de crescimento é moderada atingindo a maturidade em 7-10 dias. Devido as variantes, as colônias de *T. mentagrophytes* podem apresentar pequenas

diferenciações como: de aspecto algodonosas ou granulares, sendo planas, de coloração creme a amarelada (MENEZES E SILVA et al., 2006).

A morfologia microscópica, apresenta hifas hialinas, septadas e ramificadas. Provavelmente o aspecto mais consistente do *T mentagrophytes* é a produção de microconídios em cachos. Os macroconídios podem estar presentes em associação com cachos de microconídios e hifas espiraladas bem desenvolvidas (MENEZES E SILVA et al., 2006).

### **3.4. *Trichophyton rubrum***

O *Trichophyton rubrum* é um dermatófito antropofílico, e recentemente se tornou o mais comum e largamente distribuído que acomete o homem, sendo um dos principais causadores de dermatofitoses. É responsável por cerca de 70% dos casos de dermatofitoses em humanos do mundo (SANTOS e HAMDAN, 2005). Dentre os fungos isolados de infecções cutâneas, o dermatófito antropofílico *T. rubrum* é o mais frequente em casos clínicos de *tinea pedis* (pés), *tinea unguium* (unhas), *tinea corporis* (corpo) e *tinea cruris* (virilhas) (SEEBACHER et al., 2008).

De acordo com Sidrim et al. (2004), o *Trichophyton rubrum* é um fungo de crescimento intermediário em ágar Sabouraud-Dextrose (ASD), a maturação pode levar de 12 a 16 dias a partir da primeira semeadura. As colônias caracterizam-se por textura cotonosa, granulares formando uma pequena saliência no centro. Apresenta coloração branca, que pode tornar-se avermelhada, esse tom pode ser observado também na borda da colônia.

Apresenta morfologia microscópica, com hifas hialinas, septadas ramificadas. Os isolados normalmente não produzem macroconídios, mas produzem microconídios pequenos, piriformes e em forma de "gota" lateralmente na hifa. Cachos de conídios em arranjo arborescente são vistos. Em isolados altamente esporulantes, macroconídios podem ser abundantemente produzidos no topo de uma hifa espessa ou em cachos diretamente na hifa vegetativa, mas também podem ser raros ou ausentes (MENEZES E SILVA et al., 2006).

### **3.5. *Sporothrix***

Os fungos do gênero *Sporothrix* são classificados como dimórficos, ou seja, apresentando-se na forma filamentosa em ambientes com temperaturas em torno de 28 °C e na forma leveduriforme quando estão em temperaturas em torno de 37 °C (LOPES-BEZERRA et al., 2017). É um fungo geofílico, distribuído na natureza, e sapróbio, isto é, que depende de matéria orgânica em decomposição para sobreviver, assim ele é encontrado em solo rico em matéria orgânica, em folhas secas, madeira, espinhos (principalmente de roseiras), entre outros (LOPES-BEZERRA et al., 2006).

O fungo tem a taxa de crescimento rápida, e pode atingir maturidade em quatro dias, eles apresentam colônias pequenas, planas, úmidas, membranosas e leveduriformes, depois se tornam consistentes, rugosas e com dobras. A pigmentação das colônias é bem variável, no início são brancas ou cremes, mas tornam-se amarelas ou marrom-escuro. As colônias dificilmente são flocosas ou algodonosas. Apesar de hifas aéreas serem raras, pode ser produzido um pequeno micélio aéreo, dando um aspecto velutino à cultura (MENEZES E SILVA et al., 2006).

Microscopicamente, em sua forma filamentosa, pode-se observar a presença de hifas hialinas, delgadas, septadas e ramificadas. Os conídios são unicelulares, hialinos ou demáceos, globosos a ovóides, dispostos na extremidade do conidióforo, lembrando a forma de uma margarida, ou diretamente ligados a hifa, que são os chamados conídios sésseis (LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Com relação a fase leveduriforme, apresenta colônia branca amarelo-acinzentada de consistência pastosa e leveduriforme e algumas vezes é glabrosa. Quanto a morfologia microscópica, as células de levedura gemulantes são esféricas, ovais e em forma de charuto (MENEZES E SILVA et al., 2006).

### **3.6. Óleos essenciais**

As plantas medicinais possuem grande potencial de recursos terapêuticos, como princípios ativos que atuam contra patógenos (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007;

SANTOS, 2017) Os medicamentos derivados de plantas são considerados alternativas seguras em comparação com os medicamentos sintéticos, devido à sua fácil disponibilidade, baixo custo e efeitos colaterais desprezíveis (MITTAL et al., 2019). Podem ser utilizadas de diversas formas, como extratos, chá, infusões e óleos essenciais (SANTOS, 2017).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos, com característica de aroma forte e quase sempre agradável, derivadas do metabolismo secundário vegetal, presente em quase duas mil espécies e distribuídos em sessenta famílias de plantas (TAIZ e ZEIGER, 2004). São misturas complexas de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis (GANDHI et al., 2020) e possuem grande importância na defesa contra microrganismos. Geralmente apresentam aspectos incolores ou amarelados e pouca estabilidade na presença de luz, ar, calor, umidade e metais (SANTOS, 2017).

São definidos pela ISO (International Standard Organization) como substâncias obtidas a partir de diferentes partes da planta (das flores, sementes, brotos, caule, galhos, cascas, frutas e raízes), através dos métodos de extração de destilação a vapor, da destilação a seco ou pelo uso de processos mecânicos de compressão dos pericarpos de frutos cítricos.

Quimicamente, os óleos essenciais podem ser definidos, como uma mistura complexa de substâncias com tensões de vapor elevadas, ou seja, voláteis; lipofílicas; geralmente odoríferas e líquidas; constituídas sobretudo de fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos. A sua solubilidade é limitada em água, mas o bastante para aromatizar as soluções aquosas, as quais chamamos de hidrolatos. No entanto, elas são solúveis em solventes orgânicos como o éter, o álcool, o clorofórmio e o benzeno (CARDOSO et al., 2001).

São conhecidos desde os tempos antigos por apresentarem propriedades antifúngicas cuja utilização representa um avanço contra os mecanismos de resistência que inativam antifúngicos padrões (CASTRO, 2010; SAAD et al., 2010). Assim, a descoberta de produtos naturais, tendo como princípios ativos a atividade antifúngica, poderá trazer uma nova ferramenta à produção e o uso de fitoterápicos no combate aos agentes infecciosos (MENDES, 2011; KHAN, et al., 2012).

Cientificamente foi estabelecido que cerca de 60% dos óleos essenciais atuam com propriedades antifúngicas e 35% mostram propriedades antibacterianas



(OLIVEIRA, 2006). Estudos relatam que os óleos essenciais possuem expressiva atividade antifúngica (CHAMI et al., 2004; LIMA et al, 2006; BANSOD e RAI, 2008; CASTRO e LIMA, 2010; RAUT e KARUPPAYIL, 2014; SHARMA et al, 2016; e antibacterianas (HASHIM et al., 2017; CONTRUCCI et al., 2019; VIVIAN et al., 2020).

Os óleos essenciais possuem uma característica na qual permite que seja combinado a fármacos (AMBER et al., 2019, MITTAL et al., 2019). A incorporação do óleo em formulações tópicas fornece uma alternativa vantajosa, segura e eficaz para o tratamento de onicomicose, devido a baixa ocorrência de resistência e efeitos colaterais (LOPES et al., 2017). Richards et al. (2016) destacam que uma abordagem química sinérgica integrada pode guiar o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças humana.

### 3.7. Plantas Estudadas

#### 3.7.1. Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*)

*Cinnamomum cassia* pertence à família da *Lauracea*, na qual o produto é popularmente conhecido como canela-da-china. Extraída a partir da casca interna da planta (Figura 1) é aplicada como agente antimicrobiano, aromatizante e muito utilizada no preparo de chás (MOHANDAS e BALLAL 2011; MEDAGAMA e BANDARA 2015).



**Figura 1:** *Cinnamomum cassia* A - Porte, B – Canela em pau. FONTE: AL-SAMYDAI, et al., 2018; ZHANG et al., 2019.

A canela é uma das especiarias mais conhecidas e importantes. Seu nome científico *Cinnamomum cassia* tem origem na Indonésia, onde recebe o nome de *kayu manis*, que significa “madeira doce”. Conhecida desde 2.500 anos a.C. pelos chineses, tinha um alto valor, maior até mesmo do que o ouro. No século XVIII, por volta de 1776, o seu cultivo começou a se espalhar pelo mundo. A canela era utilizada para aromatizar molhos e vinhos brancos, e usada para perfumes (ZANARDO, 2015).

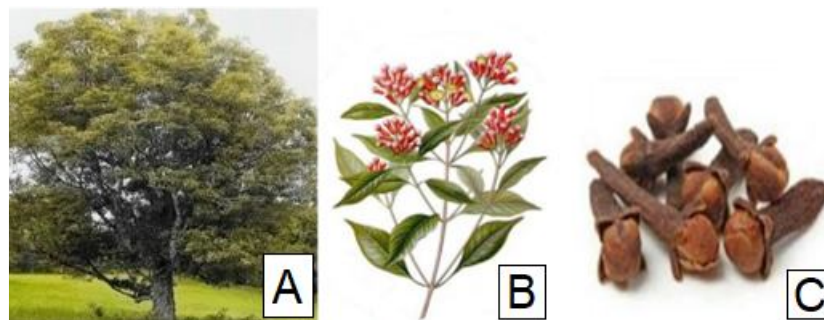
O óleo essencial da extraído da casca de canela é rico em aldeído cinâmico, enquanto que o das folhas apresenta composição diferente, sendo fonte de eugenol (SOUZA et al., 2014). O aldeído cinâmico e o eugenol apresenta atividade antimicrobiana.

Na medicina tradicional chinesa a *Cinnamomum cassia* é usada no tratamento de dispepsia, gastrite, distúrbios da circulação sanguínea e doenças inflamatórias (LIAO et al., 2012). Balijepalli et al. (2017) relatam que apenas 40 das 300 disponíveis espécies de *Cinnamomum* foram cientificamente investigadas para fins biológicos.

Estudos apresentaram que *Cinnamomum cassia* possui várias propriedades farmacológicas, como atividade antiulcerogênica, antiinflamatória, antipirética, antidiabética e antitumoral (LIAO et al., 2012; RANASINGHE et al., 2013), além de apresentarem atividades antimicrobiana (OOI et al., 2006) e antifúngicas (DE ALMEIDA et al., 2012; MAHBOUDI e KAZEMPOUR, 2015).

### **3.7.2. Cravo Folha (*Eugenia caryophyllata*)**

O género *Eugenia* pertence à família *Myrtaceae*, são mais de três mil espécies de arbustos e árvores nativas das regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América e Austrália (BATISTA, 2016). Popularmente conhecido como cravo-da-índia o *Eugenia caryophyllata* é uma planta arbórea (Figura 2), apresenta odor fortemente aromático, sabor ardente e característico (NASCIMENTO et al., 2000; SILVESTRI et al., 2010).



**Figura 2:** *Eugenia caryophyllata* A - Porte, B - Projeção de um ramo com folhas, gomos e flores C - Broto seco. FONTE: BATISTA, 2016.

Sua composição química é composta especialmente por eugenol, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis. O eugenol tem propriedade anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica e é eficiente no combate e na diminuição de bactérias presentes na boca (NASCIMENTO et al., 2000; HEMAISWARYA e DOBLE, 2009; SILVESTRI et al., 2010; PAVESI et al., 2018; KAUR e KAUSHAL, 2019).

Seus efeitos medicinais abrangem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão e diarreia. Pelas suas propriedades antibactericidas é usado como anestésico e antisséptico para o alívio de dores de dente (NASCIMENTO et al., 2000; SILVESTRI et al., 2010).

O óleo essencial apresenta propriedades biológicas, tais como, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e citotóxica (BATISTA, 2016), analgésica (HEMAISWARYA e DOBLE, 2009) anestésico (SEOL et al., 2007; HEMAISWARYA e DOBLE, 2009), antioxidante (YANISHLIEVA et al., 2006; CHAIEB et al., 2007; JIROVETZ et al., 2007), anticarcinogênico (LEE e SHIBAMOTO, 2001), atividade antimutagênica (MIYAZAWA e HISAMA, 2001), inseticida e repelente contra os mosquitos (TRONGTOKIT et al., 2005).

Estudos tem mostrado que o óleo essencial desta planta possui atividade antimicrobiana (CHAIEB et al., 2007; BABU et al., 2011; SIHAM et al., 2020) e antifúngica (PARK et al., 2007; BANSOD e RAI, 2008; BATIHA et al., 2020; SIHAM et al., 2020).

### 3.7.3. Citronela (*Cymbopogon winterianus*)

A citronela (*Cymbopogon winterianus*) é uma planta aromática que pertence à família *Poaceae* (DEVI et al., 2016). De origem indiana, a citronela foi introduzida no Brasil por volta do século XVIII (LISBOA, 2018).

Apresenta um caule de aproximadamente 1,5 m de altura (SANTOS, 2017), possui colmos rizomatoso e curto, semissubterrâneo, nodoso, com várias raízes fortes, fibrosas e longas. Deste rizoma emergem brotações achatadas firmadas pelas bainhas compridas de inúmeras folhas lisas, semilenhosas e de cor verde-clara (Figura 3) (LISBOA, 2018).



**Figura 3:** *Cymbopogon winterianus*. FONTE: SANTOS, 2017.

As atividades biológicas se destacam por sua ação repelente contra insetos, mostrando uma atividade importante contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (SILVEIRA, 2012; SANTOS, 2017; LISBOA, 2018). Possui valores terapêuticos e medicinais comprovados (DEVI et al., 2016), como atividade antimicrobiana e antifúngica (SILVEIRA, 2012; WANY, 2013; YOUSEF, 2013; SANTOS, 2017) e ação medicinal contra epilepsia, na ansiedade (QUINTANS-JÚNIOR, et al., 2008), atua como anti-inflamatório, anticâncer, antioxidante (GANJEWALA et al., 2009; DEVI et al., 2016) e anticonvulsivo (SILVA et al., 2010).

O óleo extraído das folhas é rico em aldeído citronelal (aproximadamente 40%) e tem pequenas quantidades de geraniol, citronelol e ésteres. O citronelol é maravilhoso aromatizante de ambientes e repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana local e acaricida (Mattos, 2000). Na aromaterapia seu uso está

relacionado em aumentar a acuidade mental, no combate a enxaquecas e dores de cabeça, além de ser um condicionador cutâneo. Propriedades antidepressivas, antissépticas, tônicas e estimulantes também foram observadas (LISBOA, 2018).

#### 3.7.4. Eucalipto Globulus (*Eucalyptus globulus*)

*Eucalyptus globulus* é a espécie que é conhecida no Brasil, principalmente como eucalipto, eucalyptus, eucalipto-comum e eucalipto-limão (RODRIGUES, 2018), pertencente à família as *Myrtaceae*, é amplamente utilizada na fabricação de papel (CASTRO e LIMA, 2010).

É uma árvore de médio porte que pode atingir até 90 metros de altura, apresenta tronco liso, folhas perenes, lanceoladas e opostas, cobertas por glândulas oleríferas (Figura 4). Sua espécie contém flores de até 4 cm de diâmetro, solitárias ou em pequenos grupos, que apresentam numerosos estames macios que podem ser branco, creme, amarelo, rosa ou vermelho. Seus frutos possuem forma de cápsula de aproximadamente 3 cm, e a casca possui coloração esverdeada, possuindo fibras e estrias cujo grau varia de acordo com a idade da planta (BRASIL, 2015).



**Figura 4:** Partes do *Eucalyptus globulus*. A - Porte, B - flores, C - folhas e frutos. FONTE: LOPES, 2005.

No Brasil, a *E. globulus* apresenta-se como um dos principais produtores de óleo essencial com propriedades medicinais. Isto está relacionado à presença de grandes quantidades de cineol, que também é conhecido como eucaliptol (BIZZO et al., 2009).

O seu uso medicinal é fundamentado em um conhecimento popular, que relata a sua poderosa ação antisséptica, desinfetante e expectorante (CASTRO e LIMA, 2010).

Os constituintes da planta e seus componentes essenciais bioativo se mostram favoráveis no tratamento de doenças infecciosas. Estas substâncias, em geral, são agentes que apresentam atividade antimicrobiana e antifúngica para muitos microrganismos (OGUNWANDE et al., 2005; DAMJANOVIĆ-VRATNICA et al., 2011).

### 3.7.5. Eucalipto Staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*)

*Eucalyptus staigeriana* pertence ao gênero *Eucalyptus* da família *Myrtaceae*, com aproximadamente 600 espécies. É uma árvore nativa da Austrália, de porte médio, podendo chegar a 22 metros de altura, com copa reduzida e espalhada (Figura 5), Esta espécie está adaptada a zonas climáticas quentes e subúmidas, solos pobres e bem drenados, matas ou florestas abertas. É cultivada basicamente para a produção de óleos essenciais para a perfumaria e a madeira é vendida como lenha (HERCULANO, 2014).



**Figura 5:** Partes do *Eucalyptus staigeriana* A - folhas, B - flores, C – galho de frutos secos Fonte: MACEDO, 2008; EUCLIDES, 2015.

Estas espécies apresentam folhas com cheiro caracteristicamente cítrico, que é proveniente do citral, uma mistura dos componentes neral e geranial. O seu rendimento, em óleo, varia de 1,2 a 1,5 %, com teor de citral entre 16 e 40 %, ele possui um aroma muito agradável, tanto que seu uso está presente nas indústrias de perfumaria (VITTI e BRITO, 2003).

Estudos mostram que o óleo essencial exibe atividade biológica antibacteriana (DUPONT et al., 2006; FISHER et al., 2007), antifúngica (YAMASAKI et al., 2007),



anti-inflamatório, antioxidante, repelente de mosquitos e propriedades anti-helmínticas (BENNET-JENKINS e BRYANT, 1996; RAMEZANI et al., 2002; SILVA et al., 2003; ERLER et al., 2006; SALARI et al., 2006)

### 3.7.6. Menta Piperita (*Mentha piperita*)

A hortelã pimenta, do gênero *Mentha*, que pertence à família *Lamiaceae*; é uma planta presente em todo o mundo, o seu centro de origem é a Europa, mais precisamente a região do Mediterrâneo. Ele suporta as temperaturas baixas, mas também se adapta ao clima tropical (GASPARIN et al., 2017).

O seu cultivo é de extrema importância para a economia, isso se dá ao fato de produzir e armazenar óleo essencial, na qual seu principal constituinte é o mentol, monoterpene utilizados em produtos de higiene bucal, fármacos, cosméticos e em alimentos (SCAVRONI et al., 2006).

A planta é rasteira e pode atingir de 30-60 cm de altura, possui raiz fibrosa, caule ereto de coloração arroxeada e ramificado, contém folhas pequenas, opostas, serrilhadas, na coloração verde escura, com intenso aroma característico (Figura 6). As flores apresentam coloração rosa claro, dispostas em espigas terminais (LAWRENCE, 2007).



**Figura 6:** *Mentha Piperita* A – folhas, B – caule e flores. FONTE: NEUGEBAUEROVÁ; KAFFKOVÁ 2013.

A hortelã-pimenta tem o seu uso há milhares de anos, através de suas intensas e diversas características aromáticas e medicinais, faz desta uma das aromáticas mais versáteis e procuradas do planeta na atualidade (CARVALHO, 2016). Em estudo

o óleo de *Mentha piperita* apresenta forte atividade antibacteriana (MIMICA et al, 2003) e atividade antifúngica (TULLIO et al., 2019).

A espécie é muito utilizada nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, apresentando propriedades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, antialérgico e imunomoduladora, além de ação no trato digestivo (MCKAY e BLUMBERG, 2006, CAPPELLO et al., 2007; LV et al., 2012; NYEGUE et al., 2014; IBRAHIM e EL-SALAM 2015).

### 3.8. Ozônio

Descoberto no século XIX, o gás ozônio vem sendo utilizado em muitas áreas, no tratamento de água, como higienizador de alimentos, em tratamento de enfermidades, antisséptico em hospitais entre outros (SANCHEZ, 2008).

O ozônio ( $O_3$ ) é formado por três átomos de oxigênio, se trata de uma molécula instável, de forma gasosa em condições normais de pressão e temperatura. É produzido por descarga elétrica ou por radiação ultravioleta. O ozônio se forma ao passar o gás, na descarga elétrica formada entre dois eletrodos separados por um dielétrico e um espaço dedicado ao fluxo gás (BOCCI, 2006).

O ozônio tem sido grandemente reconhecido como um dos mais potentes bactericidas, antivirais e agentes antifúngicos e vem sendo usado como um agente terapêutico para tratar feridas crônicas, como úlceras tróficas, úlceras isquêmicas e feridas diabéticas. O  $O_3$  traz grandes resultados na cicatrização de feridas, isso se dá ao fato de diminuir a infecção bacteriana (VIEBAHN, 2003).

O gás promove a inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários por meio da interrupção da integridade do envelope celular da bactéria pela oxidação dos fosfolípidios e lipoproteínas. Nos fungos, o  $O_3$  inibe o crescimento celular, em determinados estágios. Concernente ao vírus, o  $O_3$  danifica a cápsula viral e interfere no ciclo reprodutivo, interrompendo o contato vírus-célula como resultado da peroxidação. Desta forma os revestimentos enzimáticos fracos, nas células que são vulneráveis à invasão por vírus, tornam-se suscetíveis à oxidação e eliminação



pelo corpo, que então os substitui por células saudáveis (ELVIS e EKTA, 2011; HASHEMI, et al., 2015).

Na indústria de desinfecção, muitos dos numerosos compostos provocam mutações e sobra de resíduos. Já na técnica de ozonização realizado por meio de práticas, dosagens e tempo de exposição adequados, não foi encontrado resíduos, proporcionando assim uma ação muito eficaz, além de estarem comprovadas as propriedades germicidas do O<sub>3</sub> (TORRES, 1996; FREITAS, 2011). Outras vantagens seriam o baixo custo de investimento, fácil aplicação e manutenção (FALZONI, 2006). O uso do ozônio pode ser em forma de gás ou até mesmo introduzido em água, em veículo aquoso ou em óleo (BOCCI et al., 2009).

### **3.9. Óleos ozonizados**

O óleo ozonizado é um composto conseguido da mistura de óleo ou do azeite de oliva com o gás ozônio. Ao ozonizar o óleo ou azeite, é formada uma série de subprodutos, entre eles os peróxidos (MENENDEZ et al., 2002) que possui característica germicida, o que o torna útil no tratamento de feridas infectadas, fistulas e outros processos sépticos locais. (BOCCI et al., 2009).

Esses peróxidos realizam várias funções no organismo como, estimulação de vários sistemas enzimáticos de oxido redução por influência ao transporte de oxigênio nos tecidos e na cadeia respiratória mitocondrial, bloqueio dos receptores virais e morte de células infectadas por vírus, assim como uma ação simultânea na capacidade das células em englobar partículas (BOCCI et al. 2009).

O tratamento de óleos vegetais com ozônio dá origem à formação de espécies químicas que são responsáveis pelas propriedades terapêuticas dos derivados do óleo ozonizado em doenças dermatológicas. Nos últimos anos, esses produtos têm sido usados com sucesso como desinfetante tópico em várias afecções cutâneas graves (ZANARDI et al., 2008).

O uso de soluções ozonizadas em água e óleo, é muito prática, pois faz com que aplicação tópica do ozônio aconteça sem o risco de inalação. O gás presente nestes veículos age de forma mais eficiente quando aplicado sobre a pele, pois o ozônio reage melhor em ambiente úmido (SANGUANINI, 2019; UGAZIO et al., 2020).

Os compostos oxigenados presentes no óleo ozonizado são os responsáveis pela grande atividade biológica e pelas atividades antimicrobianas e antifúngicas (MENEZES et al., 2002; SKALSKA et al., 2008; UGAZIO et al., 2020). A melhor condição para preservar a composição inicial do óleo ozonizado é manter em baixa temperatura na geladeira ou no freezer (MOUREU, 2016).

O ozônio via tópica na forma gasosa ou em óleos se destaca como tratamento para a reparação de tecidos, pois promove a cicatrização de feridas e possui propriedades antimicrobianas, imunológicas, antioxidantes e oxigenantes. Para doenças como úlceras ou estomatite aftosa, gengivite e dermatite, o óleo ozonizado auxilia no alívio da dor e na aceleração do processo de cicatrização (ANZOLIN et al., 2020).

Em estudo Song et al. (2018) demonstraram efeitos profiláticos e terapêuticos da água e do óleo ozonizados contra infecções por microrganismos, o estudo mostrou que ambos possuem ação bactericida *in vitro* e *in vivo* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, um microrganismo geralmente envolvido em infecções de feridas cutâneas, incluindo as cepas MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), que são resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos.

Em estudo Ouf et al. (2016) detectaram atividade antimicrobiana do azeite de oliva ozonizado *in vitro* em fungos filamentosos causadores de dermatofitose. O estudo revelou que *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum* apresentaram as maiores atividades queratinolíticas, o tratamento com óleo ozonizado levou à redução constante da atividade queratinase (as queratinases são consideradas os fatores de virulência mais importantes dos dermatófitos na infecção cutânea) variando de 87,21% no caso de *Microsporum gypseum* e 49,64% no caso de *Trichophyton rubrum*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Local da Pesquisa

Os estudos de investigação da atividade antifúngica dos óleos essenciais foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil – localizado na cidade de Fernandópolis-SP.

### 4.2. Linhagens e meios de cultivo

Para avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 e *Sporothrix* ATCC 16345 (American Type Culture Collection), pertencentes à coleção Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil - campus Fernandópolis.

As quais foram reativadas em meio de cultura agarizado Sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD), adquiridos da Kasvi ® e preparados de acordo com as instruções do fabricante. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

As cepas de fungos foram isoladas nas placas de Petri estéril contendo meio de cultura e incubadas de 5 a 7 dias a temperatura de 28°. Nas Figuras 7, 8 e 9 apresentamos as placas com o cultivo dos microrganismos.



**Figura 7:** Cultura de *Trichophyton mentagrophytes* – Fonte: Autor



**Figura 8:** Cultura de *Trichophyton rubrum* – Fonte: Autor



**Figura 9:** Cultura de *Sporothrix* – Fonte: Autor

### 4.3. Inóculo

Para o procedimento de preparação do inóculo, primeiramente, os microrganismos foram cultivados em meio CSD, submetido a agitação orbital constante (225 rpm) e temperatura controlada (28° C) por 5 dias. Foram preparadas suspensões do microrganismo em tubos solução salina estéril (NaCl 0,5%), os quais foram

padronizados segundo solução padrão do tubo 0,5 da escala McFarland, que corresponde a um inóculo de aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colônias  $\text{mL}^{-1}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) (HADACEK e GREGER, 2000).

#### 4.4. Óleos essenciais ozonizados

Foram estudados seis óleos essenciais sendo eles, Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*), Cravo Folha (*Eugenia Caryphollata*), Citronela (*Cymbopogon winterianus*), Eucalipto globulus (*Eucalyptus globulus*), Eucalipto staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*) e Menta Piperita (*Mentha piperita*). Todos obtidos de indústria nacional (Ferquímica®, localizada em, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), sendo seus parâmetros físico-químicos como aparência, coloração, pureza, odor, densidade ( $20^\circ\text{C}$ ) e índice de refração ( $20^\circ\text{C}$ ), descritos pelo fornecedor, que produz e comercializa óleos essenciais em escala industrial (Tabela1).

Para ozonizar os óleos essenciais, foi utilizado um aparelho gerador corona (Ozon & Life) para a produção do gás ozônio e o oxigênio puro foi suprido via cilindro. O ozônio foi produzido de forma constante pelo equipamento e conduzido por um tubo de silicone para o difusor, pelo qual, os óleos foram expostos ao ozônio de forma direta por 30 minutos, em temperatura controlada de  $25^\circ\text{C}$ . Todo o procedimento de ozonização foi conduzido em uma capela de exaustão da marca Quimis modelo 216.11, visando minimizar os riscos de aspiração do gás ozônio, seguindo as normas internacionais de segurança, conforme demonstrado pela Figura 10.



**Figura 10:** Ozonização do óleos essenciais– Fonte: Autor

**Tabela 1:** Nomes vulgar e científico das plantas medicinais e características dos óleos essenciais

Características dos óleos essenciais							
Nome comum	Nome científico	Nº CAS*	Lote	Cor	Densidade (20°C)	IR**(20°C)	Principais componentes
Canela Cassia	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) Presl	84961-46-6	216	Amarelo – marrom	1,053	1,609	Aldeido cinâmico (81%); cumarina (3%); Benzaldeído (3%); Álcool cinâmico (3%); Estireno (3%)
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	8000-29-1	142	Amarelo claro	0,885	1,4670	Não determinado
Cravo (Folha)	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry	8015-87-2	218	Amarelo	1,047	1,536	Eugenol (86%)
Eucalipto staigeriana	<i>Eucalyptus staigeriana</i> F. Muell. ex F. M. Bailey	92502-70-0	116	Amarelo	0,878	1,475	Limonene (9%)
Eucalipto globulus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	8000-46-4	158	Incolor	0,913	1,461	1,8 Cineol (80%); Limonene (9%); Alpha pinene (9%)
Eucalipto Citriodora	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook	92502-70-0	107	Amarelo	0,864	1,454	Citronelal (76%)
Menta piperita	<i>Mentha piperita</i> L.	84082-70-2	185	Amarelo palha	0,902	1,460	l-mentol (33%); Mentona (30%); Acetato de metila (4%); Eucaliptol (6%)

\* Nº CAS: Chemical Abstracts Service

\*\*IR: Índice de Refração

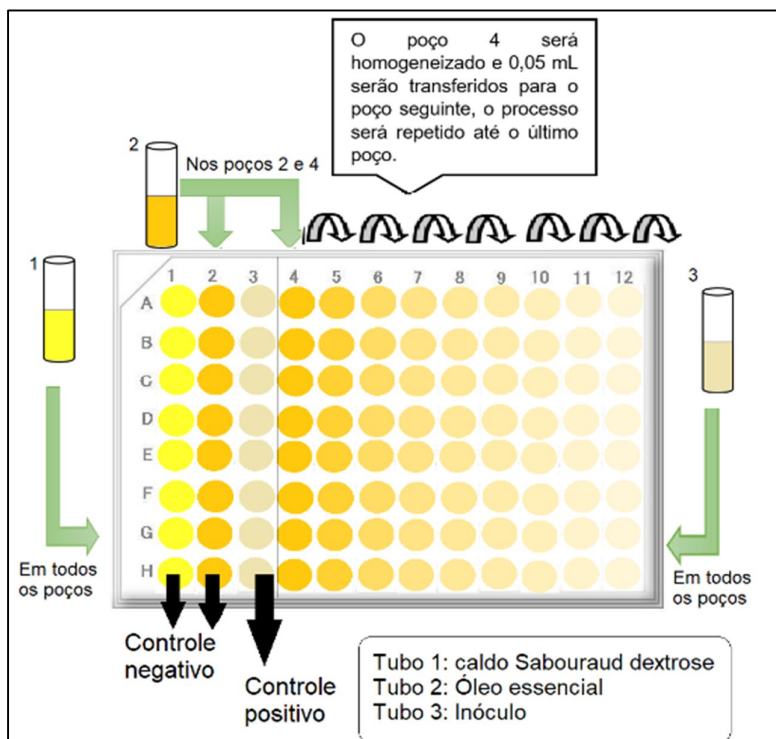
Após ozonização, os óleos foram avaliados quanto a sua esterilidade. Foram então retirados 0,1mL de cada óleo e inoculados em placas de Petri contendo meio ágar triptecaseína soja (TSA, Oxoid®), incubados a 37°C por 24/48 horas, quando será verificado a ausência de crescimento microbiano. Será considerado estéril os óleos que não apresentarem nenhuma colônia.

Os óleos essenciais ozonizado foram armazenados em frascos âmbar, identificados e mantidos sob refrigeração 8°C.

#### **4.5. Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM)**

Todas as avaliações foram realizadas em caldo CSD suplementado com detergente Tween 20 (concentração final de 0,5% (v/v)). As linhagens dos microrganismos foram suspensas em caldo CSD para dar uma densidade final de  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>, e estas foram confirmadas por contagens de células viáveis.

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram avaliadas de acordo o procedimento recomendado pela CLSI (2008, 2012). A CIM foi determinada por um método de microdiluição em placas de 96 poços conforme é mostrado na Figura 11. 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 0,05mL do óleo essencial. O conteúdo da quarta coluna, de forma a representar diluição 100%, foi homogeneizado e 0,05 mL foram transferidos para o poço seguinte, representando a diluição 50%. Estes procedimentos foram repetidos para as diluições 25%, 12,50%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78% e 0,39%. Por último foram, acrescentados 0,05mL do inóculo ( $10^6$  células viáveis mL<sup>-1</sup>) 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.

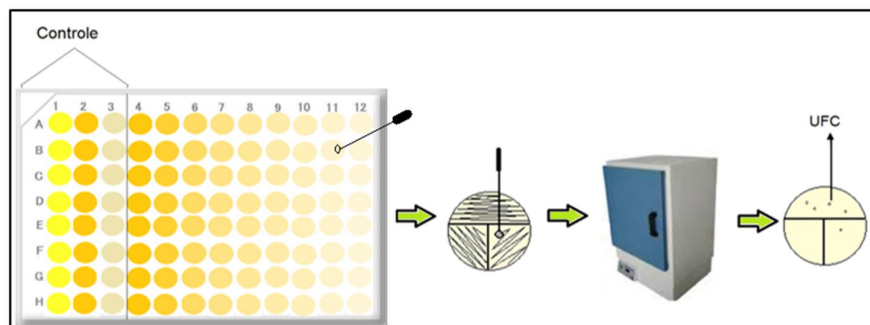


**Figura 11:** Esquema representativo da metodologia de microdiluição - Fonte: Autor

Após incubação a 37°C por 24h, a CIM foi determinada pela adição de 50 µL em cada amostra, do corante 2,3,5 -Triphenyltetrazolium Chloride. Isto tornou possível distinguir 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 essencial capaz de inibir o desenvolvimento bacteriano (SYLVESTER, 2011).

Para determinar a CFM, 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 ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 28 ° C por 3 dias ou até que o crescimento do fungo fosse observado nas amostras controle, conforme pode ser demonstrado na Figura 12. Os valores de CFM foram determinados como a concentração mais baixa de óleos essenciais, sem crescimento visível (AIEMSAARD e PUNAREEWATTANA, 2017).





**Figura 12:** Esquema representativo da determinação de CFM - Fonte: Autor

#### 4.6. Cinética fungicida dos óleos essenciais

Foi empregada a metodologia descrita por Allahghadri et al. (2010). Foram adicionados em tubos 40  $\mu$ L de cada óleo essencial na diluição determinada por CFM a cada 5 mL de caldo de CSD contendo suspensão fúngica de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> e foram em seguida incubados a 28°C. Amostras (0,1 mL) foram retiradas nos tempos: 0', 5', 10', 20', 60', 120', 240', 480' e 24horas. As amostras foram espalhadas em cultura em agar Sabouraud Dextrose, incubadas durante 24/48 h a 28°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 essencial apresentou a maior variação negativa (queda) na contagem microbiana. Nesse contexto, a variação percentual da contagem microbiana consistiu na seguinte relação:

$$\text{Variação da contagem microbiana(\%)} = \frac{(\text{Contagem}_{\text{tempo } 0\text{min}} - \text{Contagem}_{\text{tempo } 5\text{min}})}{\text{Contagem}_{\text{tempo } 0\text{min}}} \times 100$$

Essa relação foi empregada para todos os óleos essenciais avaliados e para os três micro-organismos estudados.

#### **4.7. Análise estatística**

Os dados foram avaliados através de análise descritiva da variação da contagem microbiana, conforme os tempos de exposição aos diferentes óleos essenciais. A abordagem dos dados de contagem microbiana, foi realizada, por meio de gráficos de linha, a fim de observar a evolução da variação da contagem microbiana com o tempo.

O Teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação da variação da contagem microbiana em relação ao tratamento com ozônio.

Foi empregado o Teste de Kruskal-Wallis para a comparação da variação da contagem microbiana em relação aos óleos essenciais e ao tratamento de ozonização.

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

Os Softwares utilizados foram Minitab 18 (Minitab Inc.) e MedCalc 14.8.1 (MedCalc Software Inc.).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. *Sporothrix schenckii*

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) concentração fungicida mínima (CFM) para cada um dos óleos essenciais avaliados.

Os resultados da CIM e da CFM, na grande maioria dos casos, evidenciaram que o efeito do ozônio é significativo, já que a sua utilização reduziu a concentração dos óleos essenciais estudados. Neste contexto, o uso do ozônio otimiza o efeito sobre *Sporothrix schenckii*, auxiliando no controle da contaminação e, por conseguinte, diminuindo o tempo de sobrevivência do fungo.

**Tabela 2:** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais *in natura* e ozonizados frente a *Sporothrix schenckii*.

Óleo essencial	CIM(%)		CFM(%)	
	<i>In natura</i>	Com ozônio	<i>In natura</i>	Com ozônio
Canela	12,5	3,1	12,5	1,5
Cravo	1,5	0,8	0,4	0,4
Citronela	0,8	0,8	0,8	0,8
Menta	25	3,1	50	6,2
Eucalipto G	6,25	0,8	1,5	0,4
Eucalipto S	3,1	3,1	6,25	0,4

Sharma et al. (2016) avaliaram efeitos antifúngicos sobre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 1322, de quatro óleos essenciais: cravo (*Syzygium aromaticum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e, verificaram que o efeito inibitório dos óleos evidenciou atividade dependente da dose no fungo testado. O mais ativo foi o óleo de cravo, exibindo inibição completa do crescimento micelial e germinação de esporos a 125 ppm com. Os óleos essenciais de capim-limão, menta e eucalipto foram inibitórios relativamente concentrações mais altas.

Na presente pesquisa o óleo de cravo foi o mais eficaz, tanto *in natura* como ozonizado, seguido pelos óleos de citronela e eucalipto globulus (Tabela 2).

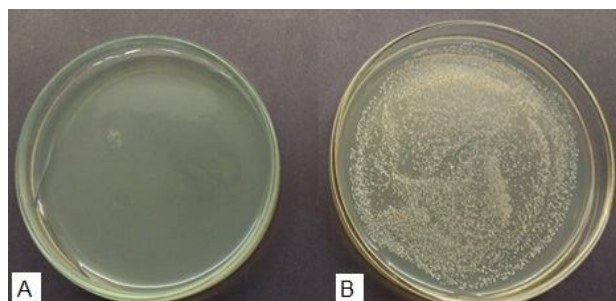
A Tabela 3 evidencia as estatísticas descritivas da variação global microbiana do *Sporothrix schenckii* ao longo dos períodos, e as discrepâncias observadas nos 'n' indicam que alguns óleos essenciais anularam a carga microbiana em tempos reduzidos e outros em tempos avançados. Neste contexto, quanto menor o valor de n, maior a eficácia à ação antifúngica do óleo essencial; em contrapartida, quanto maior o n, menor a eficácia da ação antifúngica do óleo.

**Tabela 3.** Estatísticas descritivas da variação percentual (%) global da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados.

Óleo essencial	<i>In natura</i>			Com ozônio			Valor p <sup>1</sup>
	n	Média±DP <sup>2</sup>	Mediana	n	Média±DP	Mediana	
Citronela	3	-99,9±0,0	-99,9	3	-99,9±0,0	-99,9	0,081
Canela	6	-55,8±48,5	-59,0	6	-67,0±36,1	-67,8	0,173
Cravo	18	-45,5±30,9	-46,4	3	-99,9±0,00	-99,9	0,007
Eucalipto G	6	-99,0±0,7	-99,1	3	-99,9±0,00	-99,9	0,028
Eucalipto S	15	-21,8±40,4	0,00	12	-37,3±43,1	-22,7	0,678
Menta	15	-66,2±30,1	-80,0	12	-66,1±32,2	-71,2	0,591

<sup>1</sup> Valor p referente ao teste de Mann-Whitney a  $p < 0,05$ . <sup>2</sup> DP: desvio padrão

Os resultados da Tabela 3 comprovam que o óleo de cravo-da-Índia apresentou maior eficácia após a ozonização (n=3, Figura 13), enquanto o óleo *in natura* (n=18). Evidenciando desta forma, sinergismo e efeito antifúngico frente ao *Sporothrix schenckii*. Os óleos citronela e canela *in natura* e ozonizados exibiram a mesma eficiência (n= 3 e n= 6, respectivamente).



**Figura 13:** Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de *Sporothrix schenckii*, após cinco minutos de ação do óleo de cravo-da-Índia ozonizado (A) e óleo-de cravo-da-Índia *in natura* (B). FONTE: Autor

O óleo de cravo contém compostos bioativos que pode ser potencialmente usado para fins medicinais. O eugenol é o principal componente do óleo essencial de cravo e é o principal responsável pela atividade antimicrobiana (PAVESI et al., 2018). No entanto, o mecanismo de ação exato deve ser totalmente compreendido e uma avaliação farmacológica é necessária para determinar a dosagem eficaz e minimizar quaisquer efeitos colaterais potenciais (HEMAISWARYA e DOBLE, 2009).

Os resultados indicam a presença de diferenças significativas da variação microbiana global em dois óleos essenciais: cravo ( $p=0,007$ ) e eucalipto globulus ( $p=0,028$ ), mostrando que o tratamento com ozônio surtiu efeito positivo e significativo na diminuição da carga microbiana. Em ambos os casos foi possível observar a queda da carga microbiana efetivamente significativa no tratamento desses óleos essenciais com ozônio. Nos demais óleos avaliados, o ozônio apresentou efeito positivo na redução da carga microbiana, porém este efeito não foi significativo ( $p>0,05$ ).

O provável efeito sinérgico apresentado pelo ozônio nos óleos de cravo, citronela e eucalipto globulus (Tabelas 2 e 3) evidenciam atividade antifúngica notável frente ao *Sporothrix schenckii*.

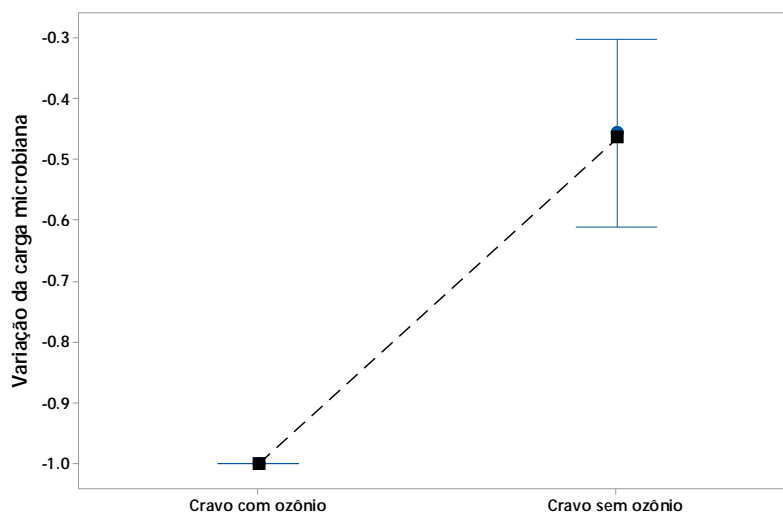
O tratamento de óleos vegetais com ozônio leva à criação de um reservatório de ozônio que é liberado lentamente na pele, graças ao fato de que o ozônio pode ser considerado ozonídeo de ácidos graxos insaturados (UGAZIO et al., 2020).

Sistemas sinérgicos biomiméticos podem fornecer novas soluções para combater os patógenos de humanos e de animais (GERSHENZON e

DUDAREVA, 2007). Os compostos orgânicos voláteis das plantas servem como respostas químicas à pressão de predadores e patógenos e em interações coespecíficas e mutualísticas. Atuam de diversos modos de ação ligados à diversidade estrutural e funcional de seus componentes (RICHARDS et al., 2016). Devido a essas características, misturas multifacetadas e versáteis podem encontrar numerosas aplicações. Individualmente ou em combinação com drogas clínicas, as misturas podem exibir resultados notáveis contra vários microrganismos patogênicos e apresentar efeitos sinérgicos positivos (LOPES et al., 2017).

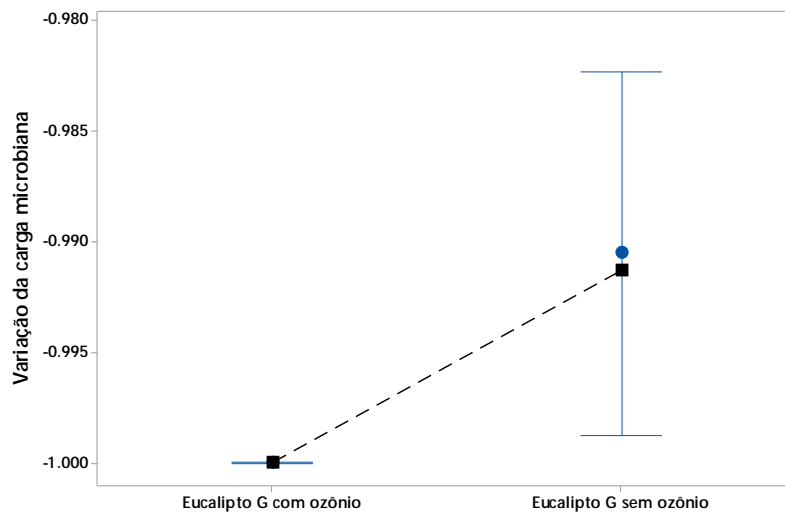
Nas Figuras 14 e 15 são apresentados o comportamento das variações percentuais da contagem microbiana do óleos de cravo e eucalipto. A disposição dos intervalos de confiança e a não sobreposição dos mesmos, reiteram a presença de diferenças significativas na contagem microbiana em relação ao tratamento com ozônio.

As figuras também evidenciam que os óleos com ozônio apresentam variações negativas menores (mais próxima de -100%), confirmando que a ação do ozônio é efetiva nos óleos observados, ou seja, diminuindo a carga microbiana.



**Figura 14:** Variação percentual da contagem microbiana do óleo essencial de cravo-da-índia.

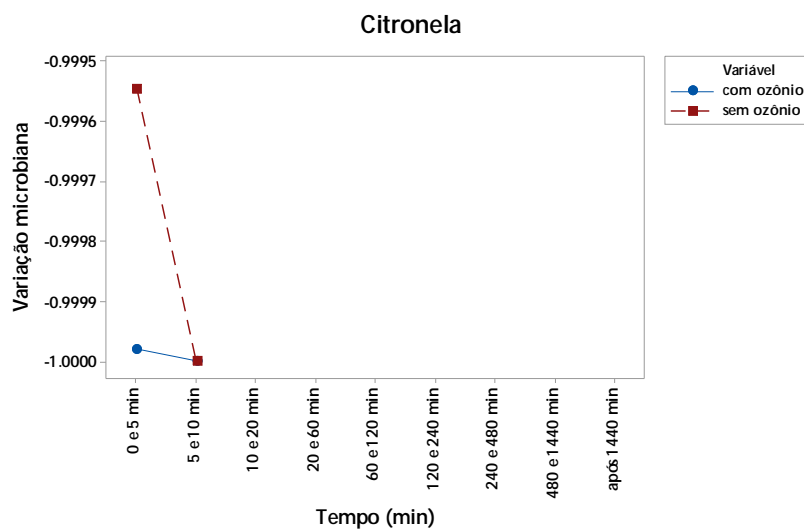
Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.



**Figura 15:** Variação percentual da contagem microbiana do óleo essencial de eucalipto globulus.

Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.

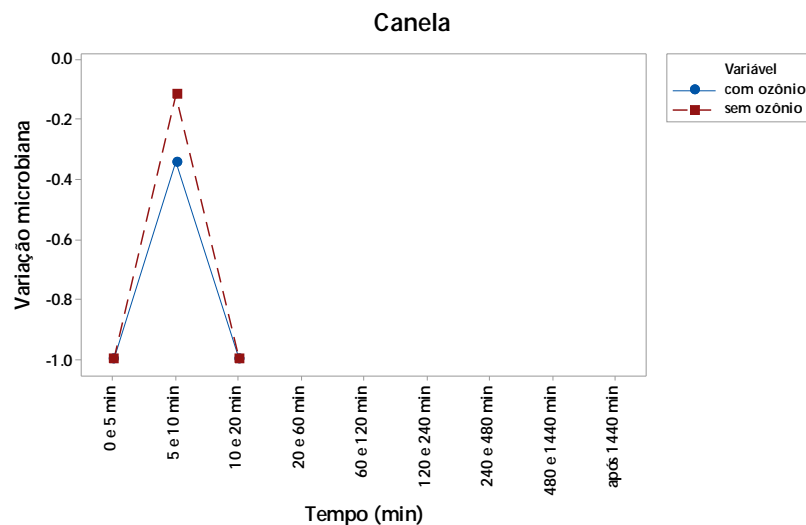
As Figuras 16 a 21 apresentam a variação percentual média da contagem microbiana em relação aos óleos essenciais *in natura* e óleos essenciais ozonizados.



**Figura 16:** Variação percentual média da contagem de *Sporothrix schenckii* exposto aos óleos de citronela *in natura* e ozonizado.

O óleo de citronela com e sem ozônio apresentaram-se capazes de inibir o crescimento de *S. schenckii* no intervalo de tempo de 5 a 10 minutos. No intervalo de 0 a 5 minutos verificou-se que o óleo ozonizado apresentou uma eficácia maior em relação ao óleo *in natura*. No entanto ambos foram capazes de anular a carga microbiana em um curto tempo de exposição.

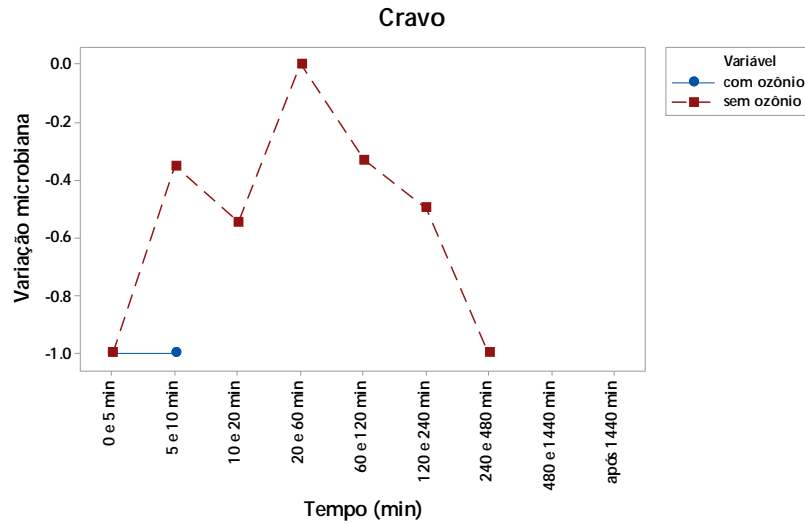
A Figura 17 evidencia que o óleo de canela apresentou queda na contagem do *S. Schenckii*, de 20% pra óleo *in natura* e de 40% para o óleo ozonizado, no intervalo de tempo de 5 a 10 minutos. No entanto, ambos os óleos inibiram o crescimento do fungo em 20 minutos, comprovando a atividade antifúngica.



**Figura 17:** Variação percentual média da contagem de *Sporothrix schenckii* exposto aos óleos de canela *in natura* e ozonizado.

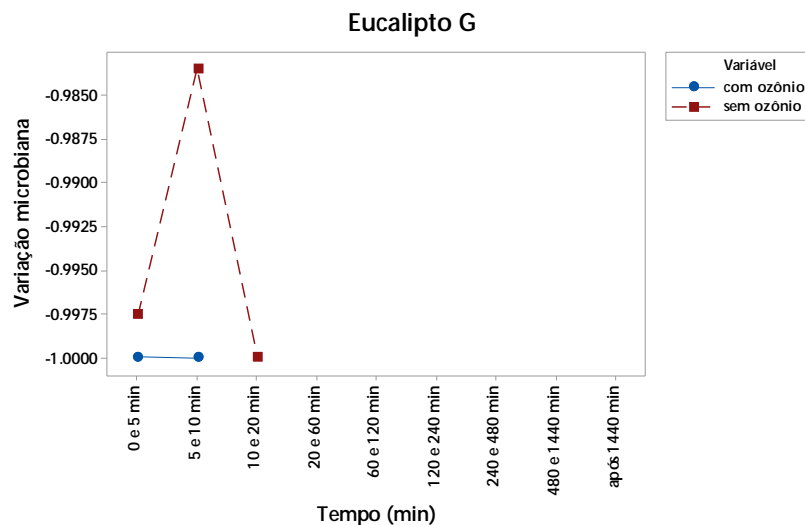
Na Figura 18 observa-se que o óleo de cravo-da-Índia ozonizado apresenta sinergismo relação ao óleo *in natura*, verificando-se diferença significativa, com inibição da carga microbiana em um intervalo de tempo curto (5 a 10 minutos), enquanto o óleo *in natura* anulou o crescimento do fungo no período de 240 - 480 minutos.





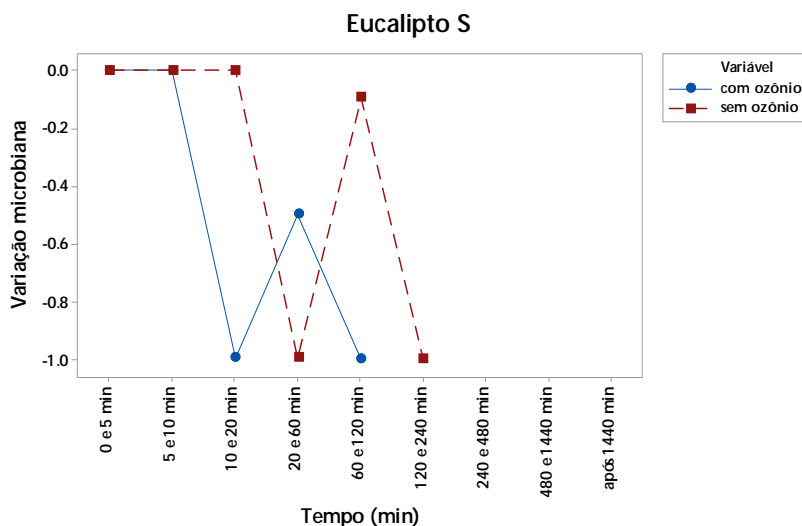
**Figura 18:** Variação percentual média da contagem de *Sporothrix schenckii* exposto aos óleos de cravo-da-Índia *in natura* e ozonizado.

Com relação ao óleo essencial de Eucalipto globulus, (Figura 19) *in natura* apresentou-se capaz de anular o crescimento do microrganismo no intervalo de 10 a 20 minutos, enquanto no óleo ozonizado a eficácia foi maior, pois no intervalo 5-10 minutos a redução da carga microbiana foi de 100%, no mesmo período o óleo *in natura* reduziu -98,5%.



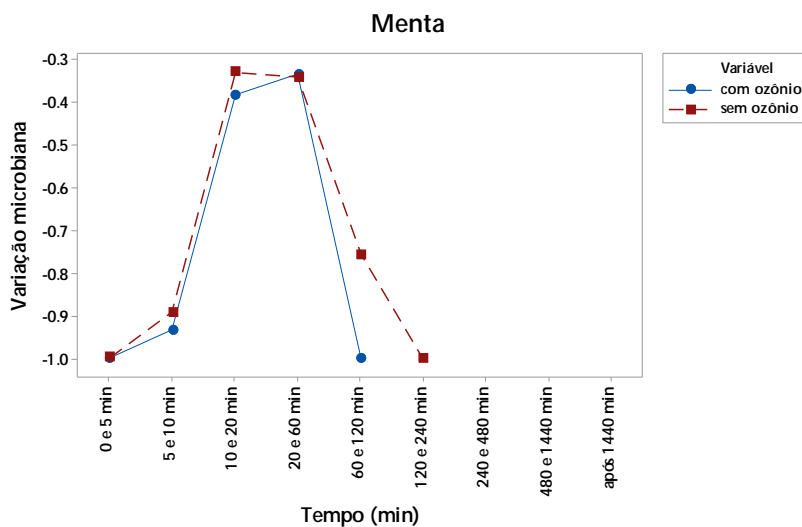
**Figura 19:** Variação percentual média da contagem de *Sporothrix schenckii* exposto aos óleos de Eucalipto globulus *in natura* e ozonizado.

O óleo de eucalipto *staigeriana* (Figura 20) com ozônio mostrou ser capaz de inibir o crescimento o intervalo de tempo de 60 a 120 minutos, enquanto o óleo *in natura* precisou de um período maior (120 a 240 minutos).



**Figura 20:** Variação percentual média da contagem de *Sporothrix schenckii* exposto aos óleos de Eucalipto *staigeriana* *in natura* e ozonizado.

Óleo de menta (Figura 21) ozonizado anulou a carga microbiana no intervalo de tempo de 20 a 60 minutos, enquanto o óleo *in natura* zerou no intervalo de tempo seguinte (120-240 minutos).



**Figura 21:** Variação percentual média da contagem de *Sporothrix schenckii* exposto aos óleos de Menta *piperita* *in natura* e ozonizado

Na maior parte dos resultados os óleos de citronela, canela, eucalipto globulus apresentaram-se como mais eficazes na diminuição da contaminação por *Sporothrix*, independentemente do tratamento com ozônio, pois nestes casos, a carga microbiana foi anulada em tempos curtos (até 20 minutos). O ozônio apresentou maior efetividade no óleo de cravo-da-Índia, agindo de forma pontual e auxiliando na redução da carga microbiana. Os óleos eucalipto staigeriana e menta foram menos eficazes, anulando a carga microbiana em até 240 minutos.

Os óleos essenciais são misturas complexas de origem vegetal cujos constituintes diferem com base em suas origens. Várias atividades biológicas foram relatadas, incluindo ação antimicrobiana, antiinflamatória, antimutagênica, antidiabética e anticâncer (RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

Os óleos essenciais de várias espécies de plantas, apresentam atividades antifúngicas entre elas a *Cinnamomum* spp. (MAHBOUDI e KAZEMPOUR, 2015), *Mentha piperita* (TULLIO et al., 2019) e *Syzygium aromaticum* (BATIHA et al., 2020), assim como o efeito antibacteriano frente a linhagens Gram-positivas e Gram-negativas (HASHIM et al., 2017). Além disso, os óleos essenciais são capazes de produzir efeito sinérgico quando combinados com antifúngicos sintéticos e outras moléculas (AMBER et al., 2019; MITTAL et al., 2019).

Na presente pesquisa, o óleo de cravo-da-índia em combinação com ozônio (óleo ozonizado) apresentou maior efetividade frente ao *Sporothrix*, agindo de forma pontual e auxiliando na redução da carga microbiana em 20 minutos, evidenciando a eficácia (Figura 18) e apresentando sinergismo sobre o óleo essencial *in natura*.

Devido a promissora atividade antimicrobiana, os óleos essenciais foram usados em combinação com outras moléculas com a finalidade para reduzir a toxicidade da droga, efeitos colaterais e resistência a agentes únicos (TULLIO et al., 2019).

A quimiorresistência de patógenos tem se tornado um fenômeno mundial preocupante, pois a mortalidade global de pacientes que sofrem de infecções microbianas está aumentando regularmente. A resistência a azóis e resistências cruzadas são consideráveis, o que dificulta a terapia antifúngica (WOOLHOUSE e FARRAR, 2014; SHOR e PERLIN, 2015).

O tratamento de micoses com agentes químicos antifúngicos sistêmicos, como cetoconazol, fluonazol e derivados de itraconazol, apresentam efeitos colaterais, em particular, quando esses produtos químicos são usados por longo prazo. Portanto, a busca por alternativas adequadas para essas drogas é continua (MITTAL et al., 2019). Uma abordagem possível é usar a terapia com ozônio no tratamento de fungos patogênicos (ZANARDI et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2012; UGAZIO et al., 2020). Na presente pesquisa os óleos de cravo, citronella e eucalipto (*E. globulus*) apresentaram eficácia no controle *in vitro* de *Sporothrix schenckii*, apontando assim a possibilidade de utilização como um método alternativo na terapêutica antifúngica.

## **5.2. *Trichophyton mentagrophytes***

A espécie *Trichophyton mentagrophytes* pertence ao grupo dos dermatófitos, fungos filamentosos microscópicos que possuem afinidade pela queratina. Eles afetam a pele, as unhas ou o cabelo e causam lesões superficiais em humanos chamadas dermatofitose, que são as formas mais comuns de micose superficial no mundo (TORTORA et al., 2017).

A dermatofitose é a principal causa de morbidade associada a micoses superficiais, com recidivas frequentes, muitas vezes refratárias à terapia (MADHAVI et al., 2011). Na terapia antifúngica muitos medicamentos convencionais são usados, no entanto, o impacto da dermatofitose está aumentando no mundo. Dessa forma, a busca por novas alternativas terapêuticas para um melhor manejo desta doença se faz necessária (HAVLICKOVA et al., 2008; YOUNSI FOKOUO et al., 2020). Segundo Karpinski (2020) uma alternativa aos medicamentos convencionais pode ser os óleos essenciais, que possuem um amplo espectro antimicrobiano.

Com o intuito de avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais, na presente pesquisa foram estimadas a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-Índia, citronela, eucalipto globulus, eucalipto staigeriana e menta pepirita *in natura* e ozonizados frente a *Trichophyton mentagrophytes*

(Tabela 4). Verificou-se que os óleos de canela, cravo-da-Índia, citronela, eucalipto *globulus* e eucalipto *stageriana* *in natura* apresentaram CIM e CFM que variaram entre 0,8% a 25%, enquanto os óleos ozonizados de 0,8 a 3,1%, evidenciando atividade antifúngica.

**Tabela 4.** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais *in natura* e ozonizados frente a *Trichophyton mentagrophytes*.

Óleo essencial	CIM (%)		CFM (%)	
	<i>In natura</i>	Com ozônio	<i>In natura</i>	Com ozônio
Canela	6,2	0,8	3,1	0,8
Cravo	6,2	0,8	12,5	0,4
Citronela	25	1,5	25	0,4
Menta	0,8	0,8	0,8	0,8
Eucalipto G	12,5	3,1	6,25	1,5
Eucalipto S	12,5	1,5	3,1	0,8

Os resultados das CFM, para maioria dos óleos, evidenciaram que o efeito do ozônio é significativo, uma vez que é necessário utilizar menor quantidade para o controle de *T. mentagrophytes*. Neste contexto, o uso do ozônio otimiza o combate ao fungo, auxiliando no controle da contaminação e, por conseguinte, diminuindo o tempo de desinfecção.

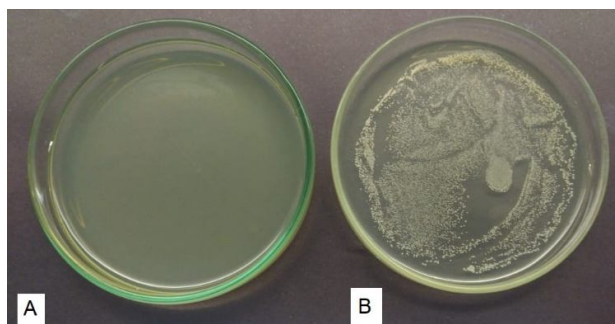
A Tabela 5 evidencia as estatísticas descritivas da variação global da carga microbiana do *Tricophyton mentagrophytes* ao longo dos períodos avaliados de acordo com os óleos essenciais e com o tratamento com ozônio. Verificou-se que os óleos essenciais de citronela, de canela e de cravo-da-Índia foram os mais eficazes após o tratamento com ozônio (n=3), indicando que houve uma ação do ozônio ao ser incorporado nos óleos, potencializando a ação antifúngica. Com relação ao eucalipto *globulus* ozonizado (n=12), não apresentou diferenças quando comparado com o óleo *in natura*, indicando que não houve diferenças quanto ao controle de *Tricophyton mentagrophytes*.

**Tabela 5.** Estatísticas descritivas da variação percentual (%) global da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados.

Óleo essencial	<i>In natura</i>			Com ozônio			Valor p <sup>1</sup>
	N	Média±DP <sup>2</sup>	Mediana	n	Média±DP	Mediana	
Citronela	9	-58,2±45,0	-80,0	3	-99,7±0,00	-99,7	0,015
Canela	6	-49,9±54,6	-49,9	3	-98,3±0,00	-98,3	1,000
Cravo	6	-82,9±17,8	-82,9	3	-99,7±0,00	-99,7	0,026
Eucalipto G	12	-68,2±19,1	-69,6	12	-72,3±18,1	-79,6	0,839
Eucalipto S	15	-60,7±29,2	-66,6	12	-67,2±25,0	-69,1	0,509
Menta	15	-41,6±42,9	-33,3	9	-37,8±65,2	-52,6	0,810

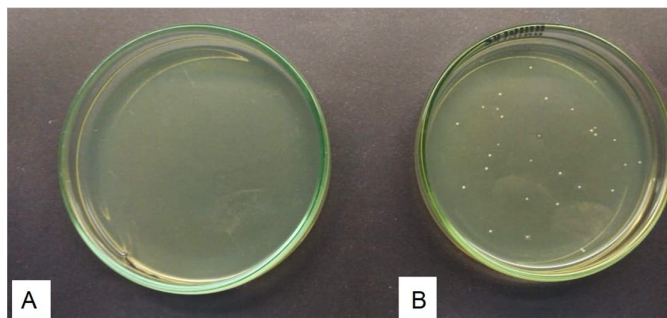
<sup>1</sup> Valor p referente ao teste de Mann-Whitney a  $p < 0,05$ . <sup>2</sup> DP: desvio padrão.

Os resultados da Tabela 5 indicam a existência de diferenças significativas na média da variação microbiana global em dois óleos essenciais ozonizados: citronela ( $p=0,015$ , Figura 22) e cravo-da-Índia ( $p=0,026$ , Figura 23), evidenciando que o tratamento com ozônio surtiu efeito positivo e significativo na diminuição da carga fúngica. Nos demais óleos avaliados, o ozônio apresentou efeito positivo na redução de *T. mentagrophytes*, porém este efeito não foi significativo ( $p > 0,05$ ).



**Figura 22:** Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de *Trichophyton mentagrophytes*, após dez minutos de ação do óleo de citronela ozonizado (A) e óleo de citronela *in natura* (B).

FONTE: Autor



**Figura 23:** Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de *trichophyton mentagrophytes* após cinco minutos de ação do óleo de cravo-da-Índia ozonizado (A) e óleo-de cravo-da-Índia *in natura* (B). FONTE: Autor

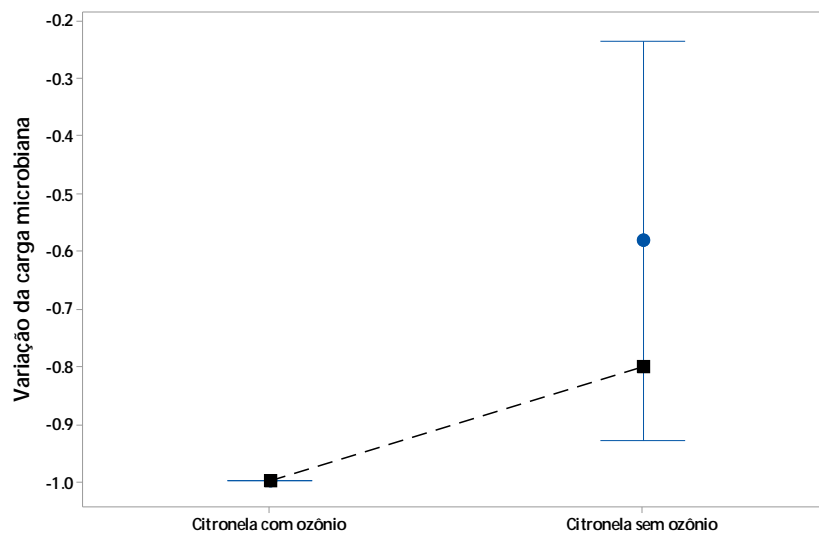
A eficácia do óleo de cravo-da-Índia no controle de *T. mentagrophytes* foi comprovada em pesquisa realizada por Park et al. (2007). Os resultados obtidos evidenciaram que as atividades antifúngicas contra dermatófitos foram elevadas, sendo necessários  $0,2\text{mg mL}^{-1}$  de óleo essencial para obter 60% de eficácia, inibindo completamente o crescimento de hifas.

Estudos de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) do óleo essencial de cravo-da-Índia revelaram a presença de eugenol como composto principal. A análise fitoquímica mostrou a presença de saponinas, alcalóides, flavonóides, glicosídeos, taninos e esteróides (KAUR e KAUSHAL, 2019). O eugenol é constituinte antifúngico mais eficaz do óleo de cravo-da-Índia contra os dermatófitos, provocando alterações morfológicas como danos à parede e membrana celular e expansão do retículo endoplasmático, que foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (PARK et al., 2007).

O óleo de cravo-da-Índia utilizado na presente pesquisa apresentou 86% de eugenol (Tabela 1), e a ação antifúngica deste composto foi eficaz no controle de *T. mentagrophytes*, e provavelmente, a sua atividade foi aumentada com a ozonização, em vista que foi verificado que o tempo necessário para o controle do fungo foi de 5 minutos (Figura 23). De acordo com Siham et al. (2020) poder inibitório do crescimento de espécies de fungos e de bactérias resistentes evidenciou que *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) possui propriedades para ser considerada uma planta medicinal, e ser utilizada como fonte de compostos biológicos ativos podem ser uma alternativa eficaz aos antifúngicos convencionais.

As Figuras 24 e 25 evidenciam o comportamento das variações percentuais da contagem microbiana de cada um dos óleos essenciais utilizados nesta pesquisa. A discrepância na localização das medianas reitera a existência de diferenças estatísticas significativas, revelando que os tratamentos sem ozônio apresentaram maior dificuldade em diminuir a carga microbiana. Neste caso, os óleos ozonizados apresentam maior eficácia em auxiliar na diminuição da contaminação e otimizar o processo de desinfecção.

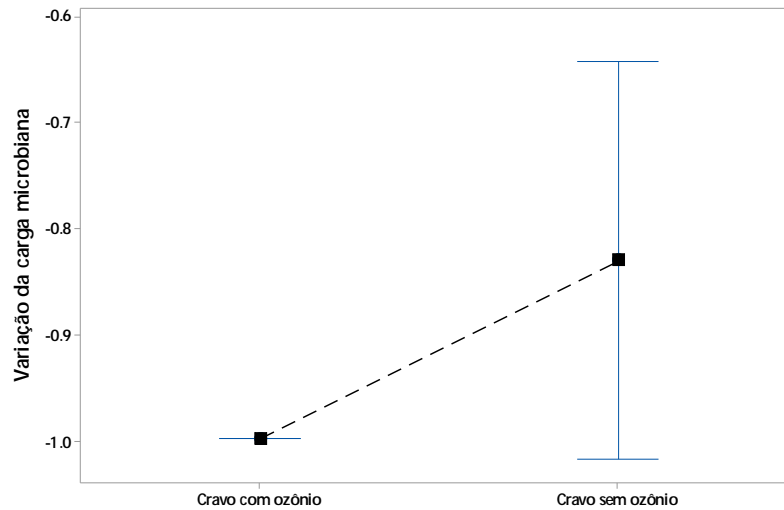
A atividade antifúngica do óleo de citronela sobre espécies de *Aspergillus* foi demonstrada por Yousef (2013). Foi verificado no estudo realizado por este autor que o óleo de citronela indicou que o citral é o componente principal (70,17%), com bioatividade sobre *A. niger* e *A. fumigatus*. O óleo essencial foi considerado altamente fungicida, pois apresentou os menores valores de MIC e CFM e a maior inibição de crescimento e foi eficaz na inibição da viabilidade fúngica e germinação de esporos. Ainda de acordo com este autor, os resultados mostraram que o óleo de citronela produz um efeito fungitóxico, o que apóia seu possível uso na medicina para terapêutica das infecções micóticas.



**Figura 24:** Variação percentual da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto ao óleo essencial de citronela *in natura* e ozonizado.

Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.



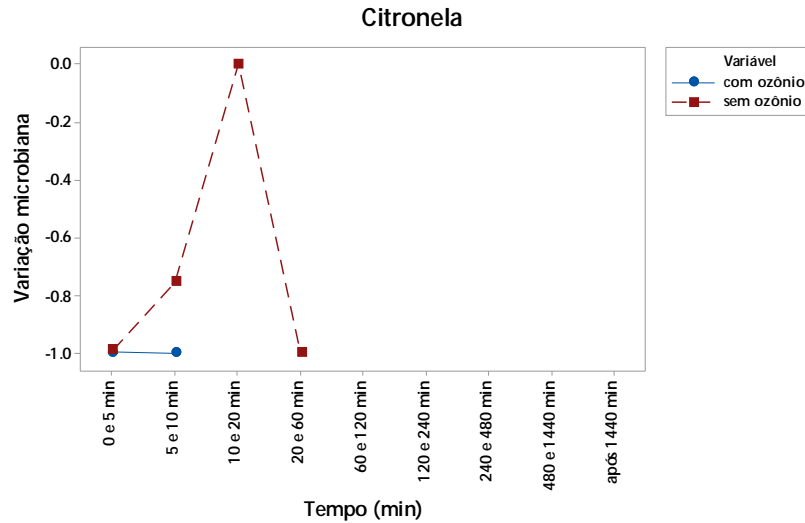


**Figura 25:** Variação percentual da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto ao óleo essencial de cravo-da-Índia *in natura* e ozonizado.

Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.

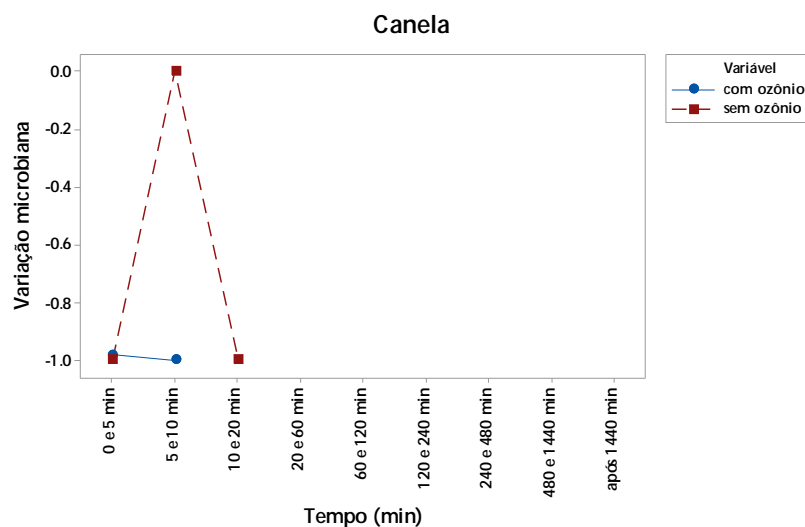
Nas Figuras 26 a 31 são apresentados o comportamento da variação da carga microbiana do *T. mentagrophytes* em relação aos óleos essenciais estudados e uso do ozônio.

Os resultados obtidos com o óleo de citronela ozonizado revelaram efeito sinérgico, sendo capaz de zerar a carga microbiana no intervalo de tempo de 5 a 10 minutos, enquanto, o óleo *in natura* precisou de um tempo de ação maior (20 a 60 minutos), evidenciando diferenças estatísticas significativas.

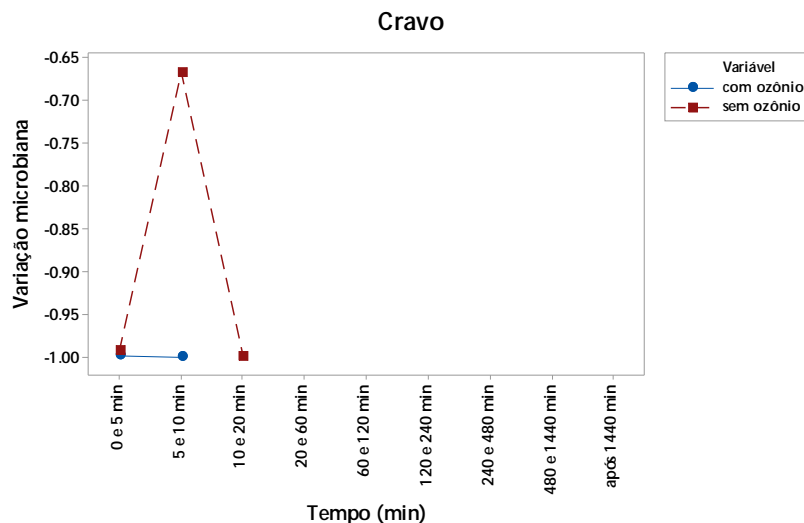


**Figura 26:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de citronela *in natura* e ozonizado.

Sinergismo foi observado, também com os óleos de canela (Figura 27) e de cravo-da-Índia (Figura 28) ozonizados, evidenciando nulidade na contagem de *T. mentagrophytes* no intervalo de 5 a 10 minutos, enquanto que, o óleo *in natura* apresentou um resultado nulo nos intervalos de tempo de 10 a 20 minutos.

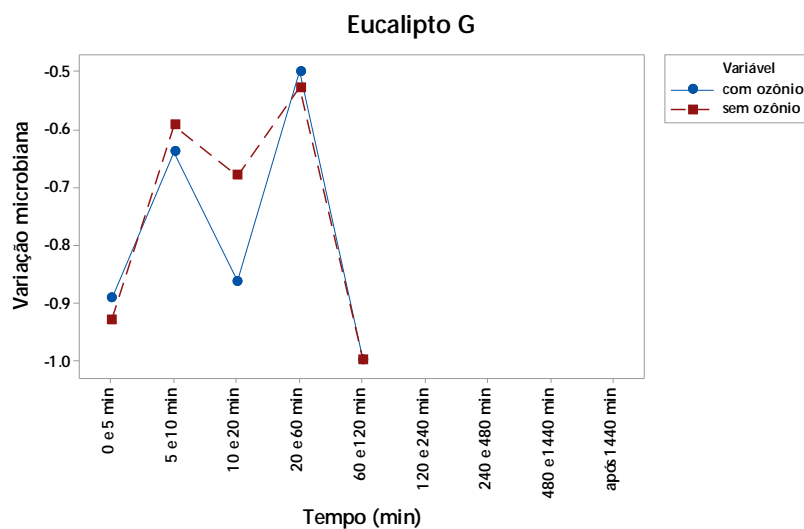


**Figura 27:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de canela *in natura* e ozonizado.

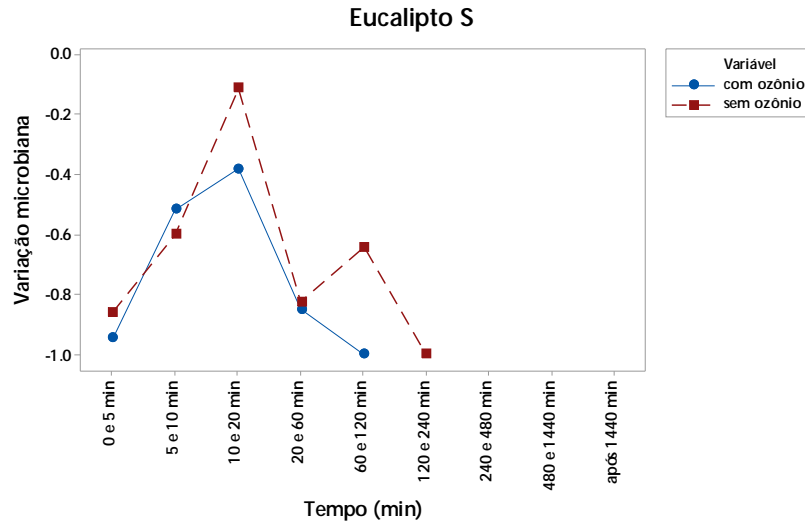


**Figura 28:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de cravo-da Índia *in natura* e ozonizado.

As Figuras 29 e 30 apresentam a percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de eucalipto *in natura* e ozonizado. Verificou-se que os óleos essenciais de ambas as espécies utilizados *in natura* e ozonizados apresentaram atividade antifúngica semelhante, sendo necessário períodos de exposição mais prolongados.

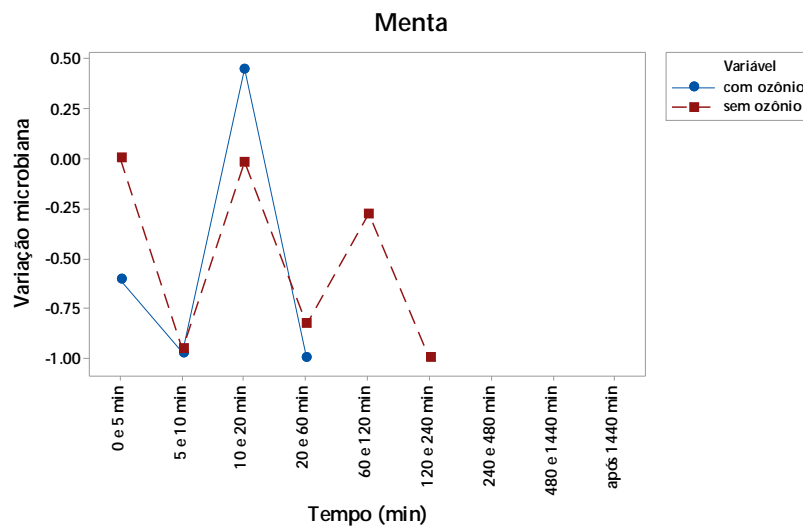


**Figura 29:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de eucalipto *globulus in natura* e ozonizado.



**Figura 30:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de eucalipto stageriana *in natura* e ozonizado

O óleo de menta piperita *in natura* e ozonizado (Figura 31) apresentou grandes variações ao longo dos intervalos de tempo. Observou-se que o óleo ozonizado anulou a carga microbiana no intervalo de tempo de 20 a 60 minutos enquanto que o óleo *in natura* foi entre 120 a 240 minutos.



**Figura 31:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton mentagrophytes* exposto aos óleos de menta piperita *in natura* e ozonizado.

Segundo Sabo e Knezevic (2019) a aplicação médica tradicional do óleo essencial e extratos de eucalipto indica grandes propriedades antimicrobianas.

Estes autores afirmam que o óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* é mais ativo contra bactérias e fungos quando comparados com os de outras espécies do gênero *Eucalyptus*, em Gram negativas de 0,01–3,2%, e fungos a 0,125–1,0%.

Na presente pesquisa os óleos de *Eucalyptus globulus* e *E. staigeriana* apresentaram eficácia em concentrações inibitória mínima (CIM) de 12,5%, e fungicida mínima (CFM) de 6,25% e 3,1%, respectivamente. No entanto, quando estes óleos foram ozonizados apresentaram atividade antifúngica com CIM de 1,5% e 3,1% e CFM de 0,8% e 1,5% para os óleos de *E. globulus* e *E. staigeriana*, respectivamente (Tabela 4), evidenciando a ação sinérgica do ozônio.

A atividade antidermatofítica do óleo essencial de *Mentha piperita* foi observada por Ibrahim e El-Salam (2015) contra quatro fungos dermatófitos queratinofílicos (*Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*). Os resultados evidenciaram eficácia na concentração de 12,5%. Estes resultados corroboram os obtidos na presente pesquisa, em vista que a atividade antifúngica foi verificada nas concentrações de 0,8% (Tabela 3), No entanto o tempo necessário para eliminar totalmente *T. mentagrophytes* foi no intervalo de 120 a 240 minutos para o óleo *in natura* e de 20 a 40 minutos para o óleo ozonizado, evidenciando a ação sinérgica do ozônio (Tabela 4, Figura 30).

A administração terapêutica do ozônio, conhecida como terapia de ozônio, surgiu como um possível tratamento para a reparação de tecidos, pois promove a cicatrização de feridas. Apresenta propriedades bactericidas, antivirais e antifúngicas e tem sido utilizado como recurso terapêutico no tratamento da inflamação e da infecção (ZANARDI et al., 2008).

O ozônio via tópica na forma gasosa ou em óleos se destaca como tratamento para a reparação de tecidos, pois promove a cicatrização de feridas e possui propriedades antimicrobianas, imunológicas, antioxidantes e oxigenantes. A eficácia do óleo ozonizado pode representar uma terapia integrativa no tratamento de lesões teciduais, principalmente em pacientes que apresentam patologias como diabetes mellitus, aterosclerose e no processo de envelhecimento. Para doenças como úlceras ou estomatite aftosa, gengivite e

dermatite, o óleo ozonizado auxilia no alívio da dor e na aceleração do processo de cicatrização (DE ALMEIDA et al., 2012; ANZOLIN et al., 2020).

Segundo Moureu et al. (2016). o uso de óleos ozonizados como fármacos ou cosméticos requer informações sobre sua estabilidade ao longo do tempo. Estes autores destacam que a melhor forma de preservar a composição inicial do óleo ozonizado é mantendo em baixa temperatura. Este critério foi observado na presente pesquisa, sendo assim os óleos ozonizados foram mantidos sob refrigeração.

De acordo com Ugazio et al.(2020) a busca por um amplo espectro de agentes antimicrobianos que auxiliem a evitar a resistência dos microrganismos e ao mesmo tempo em que mantenham efeitos colaterais razoáveis, fez com que os óleos ozonizados experimentassem um aumento de interesse científico e das aplicações clínicas.

### **5.3 *Trichophyton rubrum***

A dermatofitose constitui um importante problema de saúde pública, não só em países subdesenvolvidos, mas também em pacientes idosos e imunocomprometidos em todo o mundo (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2008). O tratamento com antifúngicos sistêmicos, como cetoconazol, fluonazol e derivados de itraconazol, apresentam efeitos colaterais, principalmente, quando usados por longo prazo (MADHAVI et al., 2011; MITTAL et al., 2019). Deste modo, a busca por alternativas adequadas para substituir essas drogas continua. Uma abordagem possível é utilizar métodos alternativos, como os óleos essenciais e a terapia com ozônio (ZANARDI et al., 2008; UGAZIO et al., 2020; ANZOLIN et al., 2020).

Na presente pesquisa foi avaliada a atividade antifúngica de seis óleos essenciais *in natura* e a sua combinação com o gás ozônio. Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos para concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais *in natura* e ozonizados frente a *Trichophyton rubrum*. Verificou-se que todos os óleos apresentaram atividade antifúngica em concentrações variáveis.

**Tabela 6.** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais *in natura* e ozonizados frente a *Trichophyton rubrum*.

Óleo essencial	CIM (%)		CFM (%)	
	<i>In natura</i>	Com ozônio	<i>In natura</i>	Com ozônio
Canela	12,5	1,5	12,5	0,8
Cravo	25	1,5	25	1,6
Citronela	6,25	3,1	25	1,5
Menta	25	3,1	12,5	3,1
Eucalipto G	12,5	1,5	6,25	0,4
Eucalipto S	50	3,1	50	3,1

Os óleos essenciais de canela, citronela e eucalipto globulus apresentaram maior atividade antifúngica (CIM de 12,5%, 6,25% e 12,5% de respectivamente). O sinergismo do ozônio sobre todos os óleos essenciais foi verificado, visto que a CIM e a CFM foram inferiores quando comparadas com os óleos *in natura* (Tabela 6).

A Tabela 7 evidencia as estatísticas descritivas da variação global da carga microbiana do *T. rubrum* ao longo dos períodos avaliados de acordo com os óleos essenciais e com o tratamento com ozônio.

**Tabela 7.** Estatísticas descritivas da variação percentual (%) global da contagem microbiana em relação aos óleos avaliados.

Óleo essencial	<i>In natura</i>			Com ozônio			Valor p <sup>1</sup>
	n	Média±DP <sup>2</sup>	Mediana	n	Média±DP	Mediana	
Citronela	3	-99,9±0,00	-99,9	3	-99,9±0,00	-99,9	0,081
Canela	6	-77,1±25,5	-81,2	3	-99,9±0,00	-99,9	0,028
Cravo	6	-96,4±3,0	-96,5	3	-99,9±0,00	-99,9	0,028
Eucalipto G	6	-95,1±0,9	-95,2	3	-99,9±0,00	-99,9	0,026
Eucalipto S	6	-90,5±10,3	-90,6	3	-99,9±0,00	-99,9	0,028
Menta	3	-99,6±0,00	-99,6	3	-99,9±0,00	-99,9	0,081

<sup>1</sup> Valor p referente ao teste de Mann-Whitney a  $p < 0,05$ . <sup>2</sup> DP: desvio padrão.

Os óleos essenciais de citronela e de menta piperita *in natura* e ozonizados apresentaram maior eficácia no controle de *T. rubrum* (n=3), no entanto não se verificaram diferenças estatísticas (p=0,081). Os resultados obtidos para *M. piperita* se contrapõem aos observados por Nyegue et al. (2014), os autores verificaram que óleo essencial de *Mentha piperita* apresentou escassa atividade antifúngica nas cepas de *Trichophyton*, enquanto nenhuma atividade foi exibida para *Candida albicans*.

Estudos realizados por Ibrahim e El-Salam (2015) com a finalidade de avaliar a atividade antifúngica de *Mentha piperita* frente a diferentes espécies de dermatofitos verificaram ação antidermatofítica do óleo essencial, com CIM de 12,5. Estes autores afirmam que uso de produtos naturais como óleos essenciais derivados de plantas em patógenos, em vez da quimioterapia convencional, pode ser considerado um modo de segurança ambiental no tratamento de doenças.

Pesquisas tem demonstrado diferenças na composição química do óleo *Mentha piperita*. O óleo empregado por Nyegue et al. (2014) foi piperitona (67,5%), mentol (10,0%) e β-felandrene (5,8%). Estudos realizados Gandhi et al. (2020), verificaram a presença de mentol (37,4%), acetato de mentila (17,4%) e mentona (12,7%) como os principais componentes, composição semelhante ao utilizado na presente pesquisa que continha l-mentol (33%); Mentona (30%);



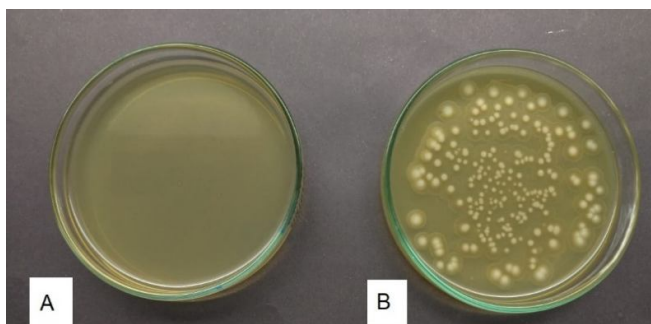
Acetato de metila (4%); Eucaliptol (6%). As diferenças químicas dos óleos essenciais podem influenciar na eficiência da atividade antimicrobiana.

Com relação aos óleos essenciais de canela (Figura 32), cravo, eucalipto glóbulos e eucalipto staigeriana (Figura 33) ozonizados evidenciaram maior eficácia (n=3), e revelaram ação sinérgica do ozônio com os óleos *in natura*. O aumento da eficácia pode estar relacionado ao fato do gás ozônio reagir com as duplas ligações dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, formando principalmente ozonídeos (1,2,4-trioxolanos) e peróxidos como hidroperóxidos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxidos poliméricos e outros peróxidos orgânicos (ZANARDI et al., 2008).

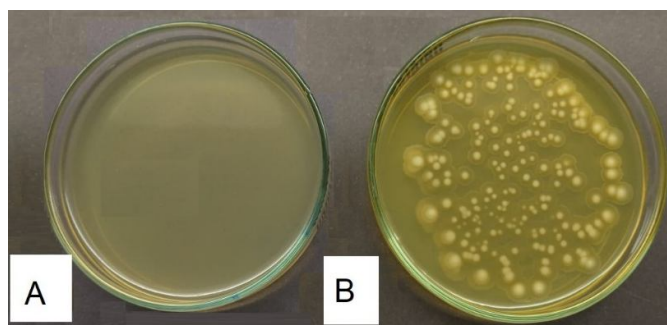
A planta *Cinnamomum cassia* possui uma ampla difusão de atividades biológicas, validando seu uso na medicina tradicional. No entanto, Balijepalli et al. (2017) salientam a necessidade de maiores informações sobre constituintes ativos, doses, duração do tratamento, condições de armazenamento e controles positivos para o exame de atividades biológicas, assim como os mecanismos moleculares envolvidos na eliciação de atividades biológicas não foram elucidados de forma abrangente.

O óleo de canela utilizado na presente pesquisa apresentou como componente principal aldeído cinâmico (81%), em menor quantidade a cumarina (3%); benzaldeído (3%); álcool cinâmico (3%); estireno (3%). Sing et al. (2020) analisaram os constituintes do óleo essencial de *C. cassia*, e verificaram que os principais constituintes foram aldeído cinâmico (75.65%), (E)-o-methoxycinnamaldehyde (6,08%), e apresentaram bom efeito antimicrobiano nas cepas de bactérias Gram-positiva e Gram-negativas testadas.

Para ampliar os recursos disponíveis de *C. cassia* quanto a sua capacidade antimicrobiana, Powers et al. (2018) analisaram as composições de óleos essenciais de casca fresca e seca e de folhas e verificaram que existem similaridade nos componentes, sendo os principais aldeído cinâmico (79.9%), (E)-o-methoxycinnamaldehyde (12.0%). Os autores concluíram que o óleo essencial de *C. cassia* tem potencial antimicrobiano, com possibilidade de uso para reduzir agentes patogênicos.



**Figura 32:** Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de *Trichophyton rubrum* após cinco minutos de ação do óleo de canela ozonizado (A) e óleo de canela *in natura* (B).



**Figura 33:** Cultivo em ágar Sabouraud-Dextrose de *Trichophyton rubrum* após cinco minutos de ação do óleo de eucalipto stageiriana ozonizado (A) e óleo de eucalipto stageiriana *in natura* (B).

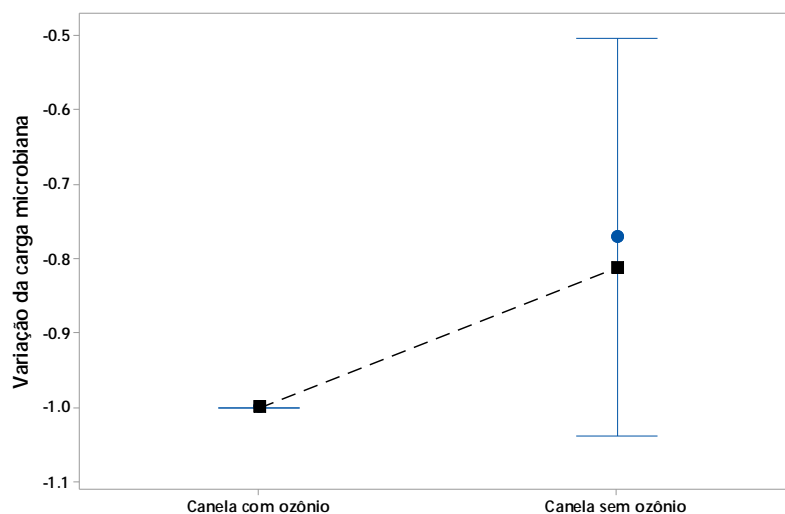
Os resultados apresentados na Tabela 7 indicam a presença de diferenças significativas na média da variação microbiana global em quatro óleos essenciais: canela ( $p=0,028$ ), cravo-da-Índia ( $p=0,028$ ), eucalipto globulus ( $p=0,026$ ) e eucalipto stageiriana ( $p=0,028$ ). Nos óleos de citronela e menta piperita, o ozônio apresentou efeito positivo na redução da carga microbiana, porém este efeito não foi significativo ( $p>0,05$ ).

Damjanović-Vratnica et al. (2011) verificaram atividade antimicrobiana do óleo essencial de eucalipto, especialmente contra as bactérias *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* e o fungo *Candida albicans*.

A atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de eucalipto pode estar associada à presença de 1,8-cineol, linalol, pinocarveol e limoneno. Outros componentes presentes em quantidades inferiores, tais como  $\alpha$ -terpineol e terpinen-4-ol, também podem contribuir para a atividade antimicrobiana do óleo (VILJOEN et al., 2003). Os óleos essenciais empregados nesta pesquisa

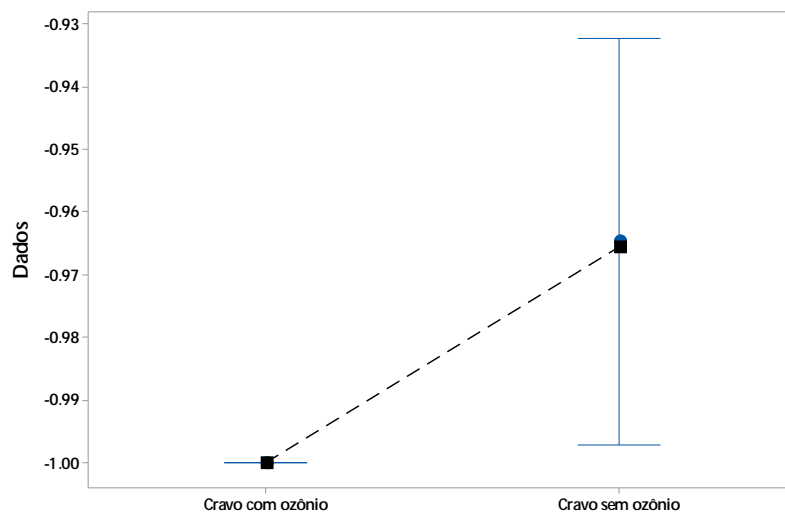
apresentaram (Tabela1) como componentes principais 1,8 Cineol (80%); Limonene (9%); Alpha pinene (9%). Provavelmente o 1,8 cineol presente em maior quantidade agiu como agente antifúngico contra *Trichophyton rubrum*. Os óleos de eucalipto globulus e eucalipto stigeriana quando ozonizados expressaram aumento na atividade antifúngica, evidenciando sinergismo do ozônio sobre estes óleos (Figuras 36 e 37).

As Figuras 34, 35, 36 e 37 evidenciam o comportamento das variações percentuais da contagem *Trichophyton rubrum* dos óleos essenciais de canela, cravo-da-Índia, eucalipto globulus e eucalipto staigeriana nos diferentes períodos de exposição aos óleos. Em todas as figuras, as medianas dos tratamentos com óleos *in natura* apresentam menores variações negativas evidenciando que a ação do ozônio é efetiva em todos os casos observados, ou seja, diminuindo a carga microbiana.



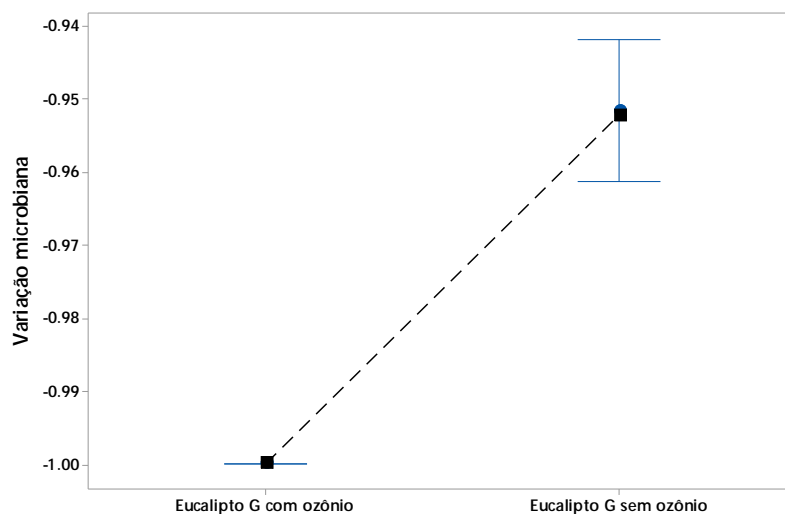
**Figura 34:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de canela *in natura* e ozonizado.

Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.



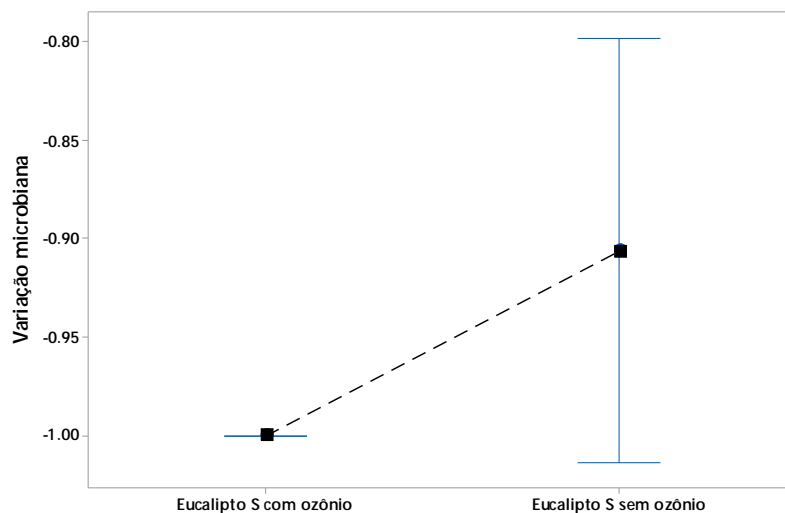
**Figura 35:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de cravo-da-Índia *in natura* e ozonizado.

Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.



**Figura 36:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de eucalipto glouolus *in natura* e ozonizado.

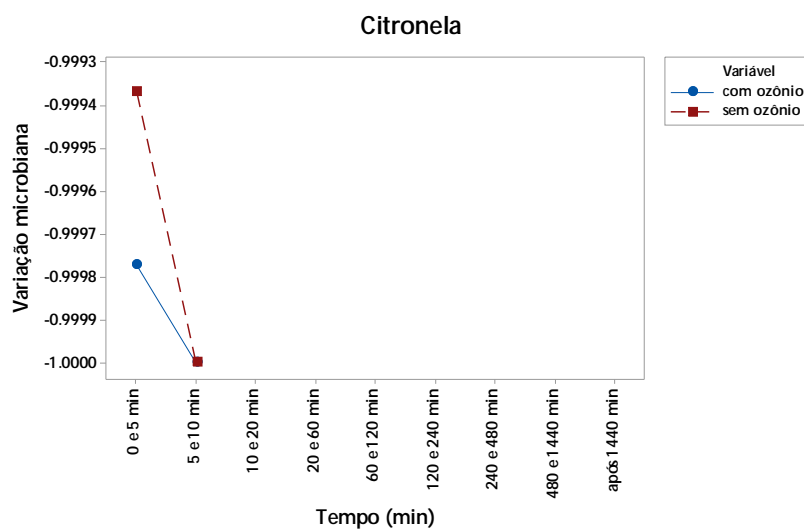
Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.



**Figura 37:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de eucalipto staigeriana *in natura* e ozonizado.

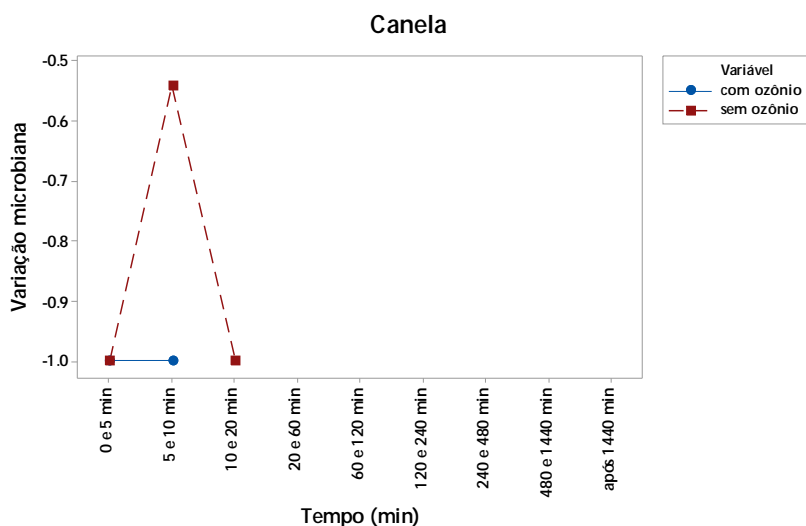
Nota: Pontos azuis referem-se à média e pontos pretos à mediana.

As Figuras 38 a 43 revelam o comportamento da variação da carga microbiana média do *T. rubrum* em relação aos óleos essenciais ozonizados e *in natura* avaliados. Observou-se que os óleos de citronela ozonizado e *in natura* foram capazes de inibir o crescimento do fungo no intervalo de 5 a 10 minutos indicando potencial antifúngico elevado em relação a *Trichophyton rubrum*.

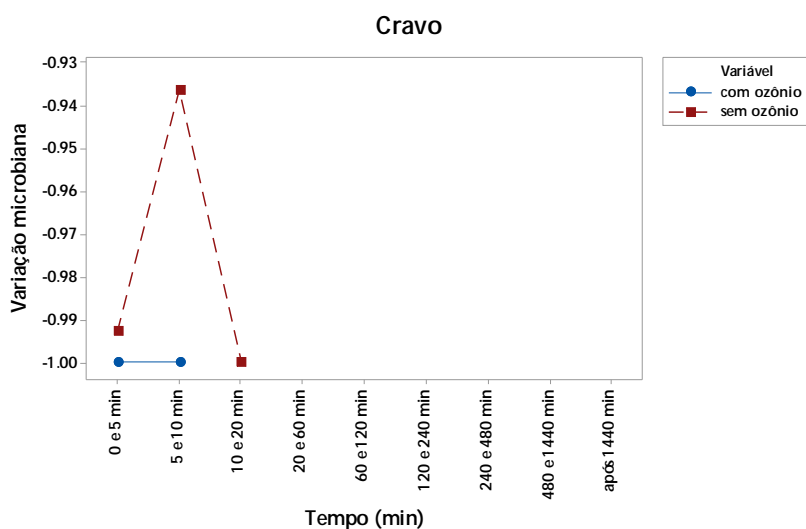


**Figura 38:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de citronela *in natura* e ozonizado.

Em relação aos óleos de canela e cravo-da-Índia ozonizado (Figuras 39 e 40) verificou-se que no intervalo de tempo de 5 a 10 minutos houve inibição da carga microbiana em 100% no óleo de canela ozonizado, enquanto que, no mesmo período de exposição de *T. rubrum* o óleo *in natura* houve a redução foi 50%. O óleo de cravo reduziu no primeiro intervalo de tempo 99% e no mesmo período o óleo *in natura* reduziu 94%. Sendo então, ambos os óleos capaz de anular por completo a carga microbiana no intervalo de 10 a 20 minutos.

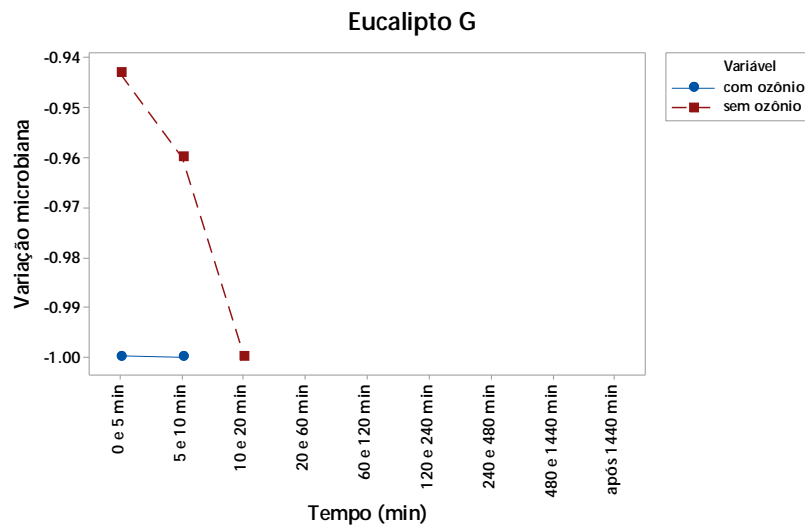


**Figura 39:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de canela *in natura* e ozonizado.

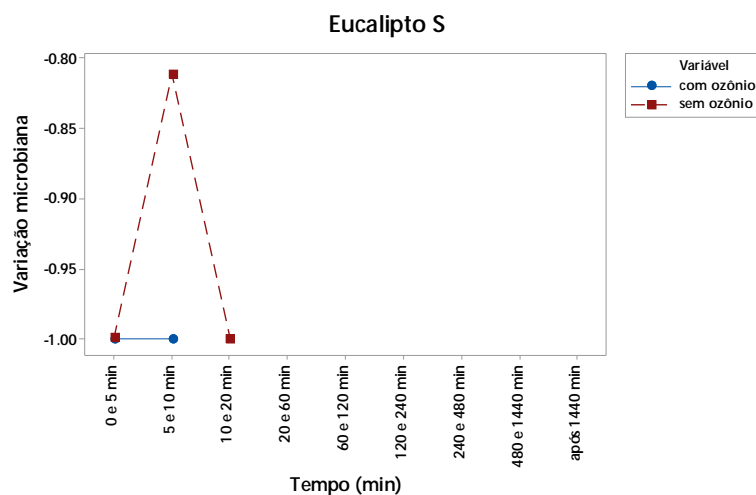


**Figura 40:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de cravo-da-Índia *in natura* e ozonizado.

Os óleos essenciais de eucalipto globulus e eucalipto staigeriana *in natura* apresentaram redução de 100% da carga microbiana no intervalo de 10 a 20 minutos (Figura 40 e 41), enquanto os óleos ozonizados foram capazes de reduzir 100% de *T. rubrum* nos primeiros minutos de exposição (0 a 5 minutos).



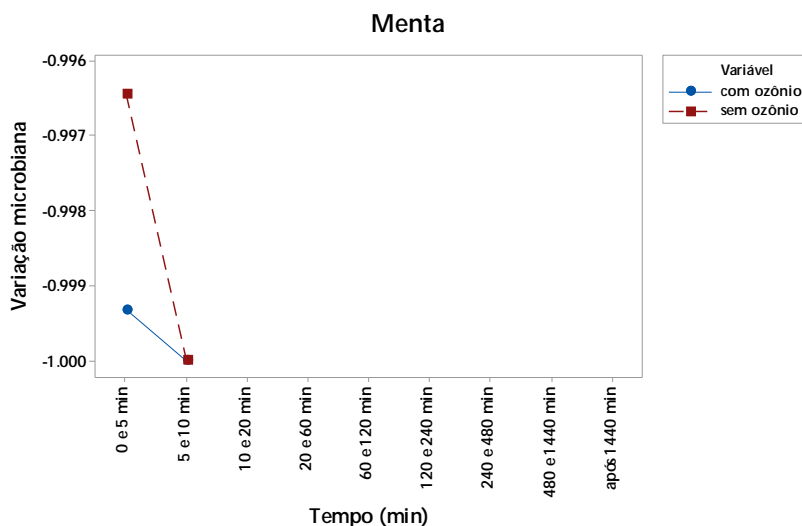
**Figura 41:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de eucalipto globulus *in natura* e ozonizado.



**Figura 42:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de eucalipto staigeriana *in natura* e ozonizado.

Os resultados obtidos em relação exposição de *Trichophyton rubrum* ao óleo essencial de menta piperita ozonizado e *in natura* evidenciaram que no

intervalo de 5 a 10 minutos houve redução de 100% das células fúngicas (Figura 43).



**Figura 43:** Variação percentual média da contagem de *Trichophyton rubrum* exposto aos óleos de menta piperita *in natura* e ozonizado.

Segundo Boukhraz et al. (2016), o efeito de um agente antimicrobiano também pode ser expresso como a taxa de morte para uma determinada concentração do agente sob condições controladas (cinética bactericida ou fungicida dos óleos essenciais). Esta taxa é determinada pela medição do número de microrganismos viáveis em intervalos de tempo diferentes. A representação gráfica resultante é conhecida como “curva de morte”. O qual foi possível determinar aa presente pesquisa.

Pelos resultados obtidos por meio da cinética fungicida dos óleos essenciais *in natura* e ozonizados, utilizados nesta pesquisa, foi possível afirmar que todos os óleos avaliados foram eficazes no controle de *Trichophyton rubrum*. Entretanto, todos os óleos essenciais ozonizados se destacaram, mostrando elevada eficiência no combate ao *T. rubrum*, pois a contagem microbiana foi nula aos 10 minutos de tratamento.



#### **5.4 Comparação geral entre os fungos**

A Tabela 8 evidencia as estatísticas descritivas da variação microbiana nos tempos avaliados de cada um dos micro-organismos, de acordo com os óleos essenciais *in natura* e os óleos essenciais ozonizados. A ideia central desta análise é verificar qual dos fungos apresentou maior sensibilidade ao tratamento.

Os resultados das CFM, para maioria dos óleos, evidenciaram que o efeito do ozônio é significativo.

**Tabela 8.** Médias da variação microbiana dos fungos avaliados no estudo de acordo com os óleos essenciais e o uso de ozônio.

Óleo essencial <sup>2</sup>	Tratamento	<i>Spothrix schenckii</i>		<i>T. mentagrophytes</i>		<i>T. rubrum</i>		Valor p <sup>1</sup>
		Média±DP <sup>2</sup>	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	
Citronela	Com ozônio	-99,9±0,0	-99,9 a	-99,7±0,0	-99,7 b	-99,9±0,0	-99,9 a	<b>0,024</b>
	Sem ozônio	-99,9±0,00	-99,9 a	-87,2±13,7	-89,3 b	-99,9±0,0	-99,9 a	<b>0,009</b>
Canela	Com ozônio	-67,0±36,1	-67,8 b	-98,3±0,00	-98,3 a	-99,9±0,0	-99,9 a	<b>0,044</b>
	Sem ozônio	-55,8±48,5	-59,0	49,9±54,6	-49,9	-77,1±25,5	-81,2	0,149
Cravo	Com ozônio	-99,9±0,00	-99,9	-99,7±0,00	-99,7	-99,9±0,00	-99,9	0,055
	Sem ozônio	-45,5±30,9	-46,4 b	-82,9±17,8	-82,9 ab	96,4±3,0	-96,5 a	<b>0,009</b>
Eucalipto G	Com ozônio	-99,9±0,00	-99,9 a	-72,3±18,1	-79,6 b	-99,9±0,00	-99,9 a	<b>0,003</b>
	Sem ozônio	-99,0±0,7	-99,1 a	-68,2±19,1	-69,6 b	-95,1±0,9	-95,2 a	<b>&lt;0,001</b>
Eucalipto S	Com ozônio	-37,3±43,1	-22,7 b	-67,2±25,0	-69,1 ab	-99,9±0,00	-99,9 a	<b>0,008</b>
	Sem ozônio	-21,8±40,4	0,0 b	-60,7±29,2	-66,6 ab	-90,6±10,3	-90,6 a	<b>0,002</b>
Menta	Com ozônio	-66,1±32,2	-71,2 b	-37,8±65,2	-52,6 b	99,9±0,00	-99,9 a	<b>0,019</b>
	Sem ozônio	-66,2±30,2	-80,0 ab	-41,6±42,9	-33,3 b	-99,6±0,00	-99,6 a	<b>0,008</b>

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

Todas as comparações entre os fungos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), exceto para o óleo de canela sem ozônio ( $P = 0,149$ ) e para o óleo de cravo com ozônio ( $p = 0,055$ ). Para o óleo de citronela, eucalipto globulus e menta piperita, independentemente do tratamento de ozonização, o fungo *T. mentagrophytes* apresentou-se como sendo mais resistente, já que a queda da variação da contagem microbiana foi significativamente inferior à queda da variação da contagem microbiana dos demais fungos.

O fungo *Sporothrix schenckii* apresentou maior resistência aos óleos de canela, cravo-da-Índia e eucalipto staigeriana, evidenciando queda de variação da contagem microbiana significativamente inferior à dos demais fungos avaliados.

De uma forma geral, o fungo *T. rubrum* foi o que apresentou menor resistência aos tratamentos, evidenciando quedas expressivas na contagem microbiana nos primeiros momentos de exposição ao tratamento (até 20 min). Este fungo apresentou maior resistência ao óleo de canela não ozonizado, resultando em uma variação negativa (queda) em torno de 77%.

Os óleos essenciais têm se mostrado agentes antimicrobianos extremamente eficazes em comparação aos antibióticos e antifúngicos. Além disso, a sua combinação com drogas sintéticas e outros compostos melhora sua eficácia, pela ação sinérgica. Assim, os óleos essenciais podem ser estabelecidos como uma alternativa aos agentes antimicrobianos sintéticos para erradicar a forma resistente de microrganismos infecciosos. Estes óleos podem interagir com vários locais alvo, como a destruição da membrana citoplasmática ou inibição da síntese de proteínas e de esporos fúngicos entre outros (MITTAL et al., 2019).

O tratamento de óleos vegetais com ozônio leva à criação de um reservatório de ozônio que é liberado lentamente na pele, graças ao fato de que o ozônio pode ser mantido como ozonídeo de ácidos graxos insaturados. O interesse no uso de óleos ozonizados, fez com que esses compostos fossem comercializados como agentes cosméticos, farmacêuticos e produtos inovadores com atividade antibacteriana (UGAZIO et al., 2020).

Atualmente, há muito interesse clínico e científico em encontrar, entre os produtos naturais, ingredientes ativos adicionais como fontes que possam ajudar a desenvolver novos medicamentos baseados na natureza, e auxiliar os medicamentos convencionais e fitoterápicos, atualmente disponíveis, para o tratamento de doenças

humanas. Os novos medicamentos fitoterápicos só serão aceitos pelos consumidores e agências regulatória, se a eficácia para certas doenças bem definidas tiver sido estabelecida por meio de ensaios clínicos randomizados e, se efeitos adversos graves não tiverem sido observados, fornecendo assim um perfil favorável de benefícios sobre os riscos (TESCHKE e XUAN, 2020).

## 6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesta pesquisa tratam-se de resultados de um experimento *in vitro*, no qual, demonstraram de forma geral, que os óleos essenciais *in natura* e ozonizados apresentaram atividade antifúngica contra *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

Com relação ao fungo *Sporothrix* os óleos de cravo e eucalipto globulus ozonizados foram os mais eficazes, mostrando-se capaz de agir em sinergismo e anulando o microrganismo nos primeiros intervalos de exposição. Já o óleo de citronela foi o mais ativo *in natura* e os óleos de eucalipto staigeriana e menta foram menos efetivos, levando mais tempo para reduzir o *Sporothrix*.

Frente ao *Trichophyton mentagrophytes* a citronela, canela e o cravo ozonizados se mostraram capazes de anular o microrganismo em um tempo curto de exposição (5-10 minutos), mostrando-se mais eficientes. Os óleos de eucalipto staigeriana, eucalipto globulus e menta se revelaram menos potentes sendo necessário períodos maiores para anular o *Trichophyton mentagrophytes*.

Quanto ao *Trichophyton rubrum* os óleos de canela, cravo e os dois óleos de eucalipto (globulus e staigeriana) ozonizados foram mais eficiente na redução do microrganismo, evidenciando o efeito sinérgico. Já a citronela e a menta foram eficazes *in natura*.

Pode-se verificar que o tratamento com ozônio produziu, para a maioria dos óleos, um efeito sinérgico potencializando assim sua ação antifúngica com relação aos microrganismos estudados, evidenciando que o tratamento de óleos essenciais com ozônio é promissor.

Desta forma, fica evidente a possibilidade do uso dos óleos essenciais “*in natura*” e ozonizados na terapêutica antifúngica contra infecções causadas por *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

## 7. REFERÊNCIAS

AIEMSAARD, J.; PUNAREEWATTANA, K. Antifungal activities of essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Piper betle*, and *Ocimum sanctum* against clinical isolates of canine Dermatophytes. **Sci. Asia**. v.43, n.5, p: 223-228, 2017. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2017.43.223

ALLAHGHADRI, T.; RASOOLI, I.; OWLIA, P.; NADOOSHAN, M. J.; GHAZANFARI, T, TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S.D. Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumi.; produced in Iran, **J. Food Sci**. v.75, n.2: H54-H61, 2010.

AL-SAMYDAI, Ali et al. Anti-Diabetic Activity of Cinnamon: A Review. **International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences**, v. 1, n. 5, p. 43-45, 2018.

AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine** v.17, p.921–925, 2010. doi: 10.1016/j.phymed.2010.02.012

ANZOLIN AP, SILVEIRA-KAROSS NL, BERTOL CD. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? *Med Gas Res*. v.10, n.1, p.54-59, 2020. doi:10.4103/2045-9912.279985

BABU, A. J, et al. Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils of Spices. *Veterinary World*, v. 4. p. 311-316, 2011.

BALIJEPAI, M.K; BURU, A.S.; SAKIROLLA, S.; PICHKA, M.R. *Cinnamomum* genus: a review on its biological activities. *Int J Pharm Pharm Sci*, v.9, n. 2, p.1-11, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i2.11156>

BANSOD, S.; RAI, M. Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 81-88, 2008.

BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev**. v.24, n.4, p.633-654, 2011. doi:10.1128/CMR.00007-11

BATIHA, G. E. S.; ALKAZMI, L .M.; WASEF, L. G.; BESHBIHY, A. M.; NADWA; E. H.; RASHWAN, E. K. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. **Biomolecules**. v:10, n:202; p:1-16, 2020. doi:10.3390/biom10020202

BATISTA, D. S. B. Aplicações tradicionais e potencial bioativo de *Eugenia caryophyllata*: revisão bibliográfica. Tese de Doutorado, 2016.

BENNET-JENKINS, E.; BRYANT, C. Novel sources of anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8-9, p. 937-947, 1996.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of medical research**, v. 37, n. 4, p. 425-435, 2006.

BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V. ZANARDI, I. 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.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **J. Fungi**. v.3, n.6, p.1-13, 2017. doi:10.3390/jof3010006

BOUKHRAZ A, ELHARTITI H, BARRAHI M, SEDKI H, SAOUIDE EL AYNE N, LAKHRISSI B, RHAJEM N, OUHSSINE M. Evaluation of the Bacteriostatic and Bactericidal Activity of Essential Oil of *Thymus Satureioides*. *Int. J. Res. Studies Science, Eng. Tech.* v.3, n.3, p.24-28, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia da Espécie *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto). Brasília, 2015.

CAPPELLO G.; SPEZZAFERRO M.; GROSSIL L., et al. Peppermint oil (Mintoil) in the treatment of irritable bowel syndrome: a prospective double blind placebo controlled randomized trial. *Dig Liver Dis.* v. 39, n. 6, p. 530-536, 2007.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; SOUZA, J. A. Fitoquímica e Química de Produtos Naturais, 67p. Lavras, MG: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2001.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; CARDENES, D.; HERNANDEZ-MOLINA, J.; ERASO, E.; QUINDOS, G., et al. Terbinafine susceptibility patterns for onychomycosis-causative dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Int J Antimicrob Agents*. v.31, p.540–543, 2008. DOI: 10.1016 / j.ijantimicag.2008.01.023

CARVALHO, S. C. R. S. Efeito da correção orgânica e da fertirrigação na cultura da hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*) no modo de produção biológico. Dissertação de Mestrado, 2016.

CASTRO, R. D. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida*. Tese, 169p. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2010.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Edeltrudes. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus L.* sobre *Candida spp.* *Rev Odontol UNESP*, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

CHAIIB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): A short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 501-506, 2007.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S., et al. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 217-226, 2004.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement; Document M27-S4; CLSI:Wayne, PA, USA, 2012.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard CLSI Document M38-A2; CLSI: Wayne, PA, USA, 2008.

CONTRUCCI, B. A.; SILVA, R.; JUNIOR, R. A.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Efeito de óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas isoladas de alimentos. **Ensaio e Ciência**, v. 23, n. 3, p. 180-184, 2019.

CORTEZ, L. E. R.; YAMAGUCHI, M. U.; CORTEZ, D. A. G.; PESCO, D. C. S. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (*Verbenaceae*) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (*Poaceae*). **Mundo saúde (Impr.)**, v. 39, n. 4, p. 433-440, 2015.

DAMJANOVIĆ-VRATNICA B; ĐAKOV T; ŠUKOVIĆ D.; DAMJANOVIĆ J. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech J. Food Sci.* v29, n.3, 277–284. 2011.

DE ALMEIDA, L. D. F. D.; CAVALCANTI, Y. W.; DE CASTRO, R. D.; EDELTRUDES DE OLIVEIRA, L. I. M. A. Atividade antifúngica e alterações morfológicas induzidas pelo óleo essencial de *Cinnamomum cassia* frente cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 12, n. 3, p. 393-398, 2012.

DE ALMEIDA, N. R.; BEATRIZ, A.; MICHELETTI, A. C.; DE ARRUDA E. J. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. **Electron J Chem.** v.4, p.313-326, 2012.

DEVI, K.; MISHRA, S. K.; SAHU, J.; PANDA, D.; MODI, M. K.; SEN, P. Genome wide transcriptome profiling reveals differential gene expression in secondary metabolite pathway of *Cymbopogon winterianus*. **Scientific reports**, v. 6, p. 21026, 2016.

DUPONT, S.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B.; DYKES, G. A. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food Control**, v. 17, n. 11, p. 929-932, 2006.



ELVIS, A.M.; EKTA, J.S. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science**, Biology, and Medicine 2:66-70, 2011.

ERLER, F.; ULUG, I.; YALCINKAYA, B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7-8, p. 491-494, 2006.

EUCLIDES, Centre for Australian National Biodiversity Research. *Eucalyptus staigeriana*. Disponível em: [http://keyserver.lucidcentral.org:8080/euclid/data/02050e02-0108-490e-8900-0e0601070d00/media/Html/Eucalyptus\\_staigeriana.htm](http://keyserver.lucidcentral.org:8080/euclid/data/02050e02-0108-490e-8900-0e0601070d00/media/Html/Eucalyptus_staigeriana.htm). Acesso em: 20 de Dezembro de 2019.

FALZONI, W. O ozônio: ozonioterapia: um "novo" tratamento, com uma longa tradição In: **1º Congresso Internacional de Ozonioterapia**; 2006; Belo Horizonte, MG. Disponível em: <http://www.ozonoterapiamedica.com.br/o-ozonio.html>. Acesso em: 11 de Janeiro 2020.

FISHER, K; ROWE, C.; PHILLIPS, C. A. The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. **Letters in applied microbiology**, v. 44, n. 5, p. 495-499, 2007.

FREITAS, A.I.A. Eficiência da Ozonioterapia como protocolo de tratamento alternativo das diversas enfermidades na Medicina Veterinária (Revisão de literatura). **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 30, Ed. 177, Art. 1194, 2011.

GANDHI, G. R.; VASCONCELOS, A.B.S.; HARAN, G.H. et al. Essential oils and its bioactive compounds modulating cytokines: A systematic review on anti-asthmatic and immunomodulatory properties. *Phytomedicine*. v.73,152854, 2020. doi:10.1016/j.phymed.2019.152854

GANJEWALA, D.; SILVIYA, S.; KHAN, K. Biochemical composition and antibacterial activities of Lantana Camera plants with yellow, lavender, red and white flowers. **Eur Asia Journal Bioscience** 3, 69–77, 2009.

GASPARIN, P. P.; CHRIST, D.; COELHO, S. R. M. Secagem de folhas *Mentha piperita* em leito fixo utilizando diferentes temperaturas e velocidades de ar. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 242-250, 2017.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nat. Chem. Biol.** v.3, p.408–414, 2007. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>

GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. P. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 25, p. 138-149, 2006.

GUIMARÃES, L. G. D. L.; CARDOSO, M. D. G.; SOUSA, P. E. D.; ANDRADE, J. D.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p.464-472, 2011.

GUPTA, A. K.; DE DONCKER, P.; SCHER, R. K. et al. Itraconazole for the treatment of onychomycosis. **Int J Dermatol**. v. 37, p. 303-308, 1998.

GURTLER, T.G.R.; DINIZ, L.M.; NICCHIO, L. Microepidemia de tinha do couro cabeludo por *Microsporum canis* em creche de Vitória - Espírito Santo (Brasil). **An. Bras. Dermatol**. Rio de Janeiro, v.80, n.3, p. 2672722005

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HASHEMI, M.; JALILI, P.; MENNATI, S.; KOOSHA, A.; ROHANIFAR, R.; MADADI, F.; TAHERI, F. The effects of prolotherapy with hypertonic dextrose versus prolozone (intraarticular ozone) in patients with knee osteoarthritis. **Anesthesiology and Pain Medicine** 5:37-45, 2015.

HASHIM, G. M.; ALMASAUDI, S. B.; AZHAR, E.; AL JAOUNI, S. K.; HARAKEH, S. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. **Saudi J. Biol. Sci.** v.24, n.7, p.1458-1464, 2017. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.06.001

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V.A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses** v.51 Suppl 4, p.2-15, 2008.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomed. Inter. J; Phytother. Phytopharmacol.** v.16, n.11, p.997-1005, 2009. doi: 10.1016/j.phymed.2009.04.006

HERCULANO, E. D. Óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* nanoencapsulado para utilização como conservante em alimentos. 2014.

HOUCK, H. E. et al. Tinea caput medusa: an unusual presentation of *Trichophyton mentagrophytes* on the scalp. **Cutis**, v. 58, n. 1, p. 4852, 1996.

IBRAHIM, S. Y.; EL-SALAM, M. M. A. Anti-dermatophyte efficacy and environmental safety of some essential oils commercial and in vitro extracted pure and combined against four keratinophilic pathogenic fungi. **Environ Health Prev Med** v.20, p.279–286, 2015. DOI 10.1007/s12199-015-0462-6

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 9235:2013. Aromatic natural raw materials - Vocabulary. Genebra, 2013 p.35. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en> Acesso em: 15 dezembro 2019.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A., S.; DENKOVA, Z.; NIKOLOVA, R.; GEISLER, M. Purity, antimicrobial activities and olfactive

evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 288-91, 2007.

KARPINSKI, T.M. Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals. *Biomolecules*. v.10, n.103, p: 1-35, 2020. doi:10.3390/biom10010103

KAUR, K.; KAUSHAL, S. Phytochemistry and pharmacological aspects of *Syzygium aromaticum*: **A review. J. Pharmacog Phytochem.** v.8, n.1, p.398-406, 2019. www.phytojournal.com

KHAN, M. S. A.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.

KHAN, M. S. A; AHMAD, I; CAMEOTRA, S. S. Phenyl aldehyde and propano ids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 54, 2013.

KUMAR, V.; MATHELA, C. S.; TEWARI, A. K.; BISHT, K. S. In vitro inhibition activity of essential oils from some Lamiaceae species against phytopathogenic fungi, **Pestic. Biochem. Phys.** v.114, 67e71, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.07.001>

LAWRENCE, B. M. The composition of commercially importante mints. Mint: the genus *Mentha*. Florida: CRC Press, P. 217-323, 2007.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*, v. 74, p. 443-448, 2001.

LIAO, J. C.; DENG, J. S.; CHIU, C. S.; HOU, W.C.; HUANG, S.S.; SHIE, P.H.; HUANG, G.J.; Anti-inflammatory activities of *Cinnamomum cassia* constituents in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R, A. G.; LIMA, E, O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.

LISBOA, A. R. Uso do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) no controle biológico do pulgão preto do feijoeiro (*Aphis craccivora*)(Hemiptera: Aphididae). 2018.

LIAMBRICH, A.; LECHA, M. Tratamiento actual de las onicomicosis. **Rev. Iberoam. Micol.** Barcelona, v. 19, n. 3, p.127-129, 2002.

LOPES, G.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis? **Mycopathologia**. v.182, p.143–167,2017. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0081-9>

LOPES, L. *Eucalyptus globulus* Labill. Diversidade vegetal. Disponível em: <http://www.biorede.pt/page.asp?id=1850>. Acesso em: 20 de Dezembro 2019.

LOPES-BEZERRA, L. M.; MORA-MONTES, H. M., BONIFAZ, A. *Sporothrix* and Sporotrichosis. In: Current Progress in Medical Mycology. New York: Springer, p. 309-331, 2017.

LOPES-BEZERRA L.M.; SCHUBACH A.; COSTA R.O Sporothrix schenckii and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.

LV, W. W.; WEI, H. M.; WANG, D. L.; NI, J. Q.; SUN, F. L Depletion of histone deacetylase antagonizes PI3K-mediated overgrowth of Drosophila organs through the acetylation of histone H4 at lysine 16. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 22, p. 5369-5378, 2012.

MACEDO, I. T. F. Atividade anti-helmíntica de óleos essenciais de Eucalyptus spp sobre nematóides gastrintestinais. 2008.

MADHAVI, S.; RAMA, R.M.V.; JYOTHSNA, K. Mycological study of dermatophytoses in rural population. **Ann Biol Res**. v.2, p.88-93, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock-14<sup>a</sup> Edição. Artmed Editora, 2016.

MAHBOUDI, M.; KAZEMPOUR, N. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. **J. Mycol. Méd.** v.25, e65–71, 2015. doi: 10.1016/j.mycmed.2015.02.042

MATTOS, S. H. Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. Holmes como produtora de mentol no Ceará. Fortaleza: UFC/CCA. 98p, 2000.

MCKAY, L. D.; BLUMBERG, B. J. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, v. 20, n. 8, p. 619-633, 2006.

MEDAGAMA, A.B.; BANDARA, R. The use of Complementary and Alternative Medicines (CAMs) in the treatment of diabetes mellitus: is continued use safe and effective. **Nutrition Journal**, 13: 102, 2014.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T. D.; MAGNO JÚNIOR, R. G.; LOPES, E. A. D. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.1, p.83-90, 2007.

MEDLEAU, Linda; HNILICA, Keith A. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**. Roca, 2003.

MENDES, J. M. Investigação da atividade antifúngica de óleo essencial de *Eugenia coryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis*. 78p. Dissertação (Mestrado

em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Concentração: Farmacologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2011.

MENENDEZ, S.; FALCON, L.; SIMON, D. R.; LANDA, N. Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses*, v. 45, n. 7-8, p. 329-332, 2002.

MENEZES E SILVA, C. H. P.; NEUFELD, P. M.; SATO, D. *Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico. Livraria e Editora Revinter Ltda.: Rio de Janeiro*, 2006.

MIMICA-DUKIĆ, N. M.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MATAVUKLJ, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta medica*, v. 69, n. 05, p. 413-419, 2003.

MITTAL, R. P.; RANA, A.; JAITAK, V. Essential Oils: An Impending Substitute of Synthetic Antimicrobial Agents to Overcome Antimicrobial Resistance. *Curr Drug Targets*. v.20, n.6, p.605-624, 2019. doi:10.2174/1389450119666181031122917

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Suppression of chemical mutagen induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 49, p. 4019–4025, 2001.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3: 4, 2011.

MOUREU, S.; VIOLLEAU, F.; HAIMOUD-LEKHAL, A.; DÉCRIAUD-CALMON, D.A. Influence of Storage Temperature on the Composition and the Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil. *Ozone: Science & Engineering*, v.38, n.2, p.143-149, 2016.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:247-256, 2000.

NEUGEBAUEROVÁ, J.; KAFFKOVÁ, K. Variability of essential oil content of *Mentha L. taxa*. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, v. 60, n. 8, p. 187-190, 2013.

NYEGUE, M. A.; NDOYÉ-FOE, F. M-C; RIWOM ESSAMA, S.; HOCKMENI, T. C.; ETOA, F-X; MENUT, C. Chemical composition of essential oils of *Eugenia caryophylla* and *Mentha sp cf piperita* and their *in vitro* antifungal activities on six human pathogenic fungi. *African Journal Tradit Complement Altern Med*. v.11, n.6, p.40-46, 2014. <http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v11i6.3>

OGUNWANDE, I. A.; OLOWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMID, J. M.; SETZER, W. N. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora L.* *Int J Aromather*. 15: 147-52, 2005.

OLIVEIRA, R. A.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Brasileira Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

OOI, L.S.; LI, Y. KAM, S.L.; WANG, H.; WONG, E.Y.; OOI, V. E. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American journal of Chinese medicine**, 34: 511–522, 2006.

OUF, S.A.; MOUSSA, T.A.; ABD-ELMEGEED, A.M.; ELTAHLAWY, S.R. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 3, p. 697-702, 2016.

OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. Topics in Companion Animal Medicine, v.21, n.3, p. 128-134, 2006.

OYEKA, C. A. *Trichophyton mentagrophytes* a keratinophilic fungus. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 60-65, 2000.

PARK, M.J.; GWAK, K.S.; YANG, I. et al. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. **Journal of Microbiology** (Seoul, Korea). v.45, n.5, p.460-465, 2007.

PAVESI, C.; BANKS, L. A.; HUDAIB, T. Antifungal and antibacterial activities of augenol and non-polar extract of *Syzygium aromaticum* L. **J. Pharm. Sci. Res.** v.10, n.2, p. 337-339, 2018

PENA-MURALLA, R.; AYOUBI, P.; GRAMINHA, M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A.; PRADE, R. A. Antifungal target selection in *Aspergillus nidulans*. Using Bioinformatics to make the difference. **Pathogen Genomics. Impact on Human Health.** v.14, p.215-230, 2002.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F. D.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N. D.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

PERES, N. T. D. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PEREZ, N. T. A. E. A. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

POWERS, C.N.; OSIER, J.L.; MCFEETERS, R.L.; BRAZELL, C.B.; OLSEN, E.L.; MORIARITY, D.M.; SATYAL, P.; SETZER, W.N. Antifungal and Cytotoxic Activities of Sixty Commercially-Available Essential Oils. *Molecules* v.23, 1549, 2018.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v. 15, p. 619–624, 2008.

RAMEZANI, H.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 261-262, 2002.

RANASINGHE, P.; PIGERA, S.; PREMAKUMARA, G. S.; GALAPPATHTHY, P.; CONSTANTINE, G. R.; KATULANDA, P. Medicinal properties of 'true'cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC complementary and alternative medicine**, London, v. 13, n. 1, p. 275-284, 2013.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Ind. Crop. Prod.** v.62, p. 250–64, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>

RICHARDS, L. A.; GLASSMIRE, A. E.; OCHSEN RIDER, K. M.; SMILANICH, M. A.; DODSON, C. D.; JEFFREY, C. S.; DYER, L. A.. Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. **Phytochem. Rev.** v.15, p. 1153–1166, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9479-8>

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med. Mycol.** v.51, n.4, p.405-412, 013. doi:10.3109/13693786.2012.719648

RODRIGUES, K. L.; CARDOSO, C. C.; CAPUTO, L. R.; CARVALHO, J. C. T.; FIORINI, J. E.; SCHNEEDORF, J. M. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 261-270, 2004.

RODRIGUES, L.; Toxicidade do odor de óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Corymbia citriodora* sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus*. Nova Odessa, SP, 2018.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M. L. R. Z. D. C.; MIO, L. L. M. D.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SAAD, A.; FADLI, M.; BOUAZIZ, M.; BENHARREF, A; MEZRIOUI, N.E.; HASSANI, L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1057-1060, 2010.

SABO, V. A.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: **A review. Industrial Crops and Products**, v.132, p. 413-429, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.051>

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

SALARI, M. H.; AMINE, G.; SHIRAZI, M. H.; HAFEZI, R.; MOHAMMADYPOUR, M. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 2, p. 194-196, 2006.

SANCHEZ, C. M. A. Utilização de óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinho da índia (*Cavia porcellus*) - relato de caso. 2008. 38 f. Monografia (PósGraduação em Clínica Médica e Cirúrgica e Animais Selvagens) – Universidade Camilo Castelo Branco, Itatiba. 2008.

SANGUANINI, R. C. Efeitos da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), 2019.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1917-1920, 2005.

SANTOS, F. D. Potencial de inibição de óleos essenciais alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e citronela (*Cymbopogon winterianus*) para controle in vitro do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, 2017.

SANTOS, R. L.; GUIMARÃES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu. v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SCAVRONI, J.; VASCONCELLOS, M. C.; VALMORBIDA, J.; FERRI, A. F.; MARQUES, M. O. M.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Rendimento e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicações de giberelina e citocinina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p. 40-43, 2006.

SCOTT, D.W., MILLER, W.H., GRIFFIN, C.E. *Dermatologia de pequenos animais*. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, p. 1130, 1996.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J.P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 335-352, 2008

SEOL, D-W.; LEE, J.; IM, S-Y.; PARK, I-S. Clove oil as an anesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). **Aquaculture Research**, v.38, p.45-9, 2007.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 73, n. 1-2, p. 243–249, 2000.



SHARMA, A.; RAJENDRAN, S.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; KUNDU, B. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil, **J. Biosci. Bioeng.** v. xx, p: 1-6, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>

SHOR, E.; PERLIN, D. S. Coping with stress and the emergence of multidrug resistance in fungi. **PLoS Pathog.** v.11, e1004668, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004668>

SIDDIQUI, S. A.; ISLAM, R.; ISLAM, R.; JAMAL, A. H. M.; PARVIN, T.; RAHMAN; A. Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and various extracts of *Mikania scandens* (L.) Willd, **Arabian Journal Chemistry** v.10, n.2, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.050>

SIDRIM, J.J.; ROCHA, M. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12:107-131, 2004.

SIDRIM, J.J.C.; MEIRELES, T.E.F.; OLIVEIRA, L.P.M.; DIOGENES, M.J.N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2004.

SIHAM, Y.; HAJAR, B.; MILOUD, E. K.; BRAHIM, M.; HOUSAINE, T.; MUSTAPHA, B. Determination of chemical composition and evaluation of antioxidant, and antimicrobial activities of Clove oil obtained from *Syzygium aromaticum* Moroccan species. *Inter. J. Res. Pharm. Sci.* v. 11, n. 2, p. 2568-2574, 2020. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i2.2261>

SILVA, C. F.; MOURA, F. C.; MENDES, M. F.; PESSOA, F. L. P. Extraction of Citronella (*Cymbopogon nardus*) essential oil using supercritical co<sub>2</sub>, experimental data and mathematical modelling. **Braz J ChemEng** 28, 343–350, 2010.

SILVA, J.; ABEBE, W., SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVEIRA S. M.; CUNHA Jr. A, SCHEUERMANN G.N.; SECCHI F.L.; VERRUCK S.; KROHN M, et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2012.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN.; et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SINGH, J.; RASVIN SINGH, R.; PARASURAMAN, S.; KATHIRESA. S. Antimicrobial activity of extracts of bark of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Int. J. Pharm. Investigation*, v,10, n.2, p.141-145, 2020. DOI: 10.5530/ijpi.2020.2.26

SKALSKA, K.; LEDAKOWICZ, S.; PERKOWSKI, J.; SENCIO, B. Germicidal properties of ozonated sunflower oil. *Ozone: Science & Engineering*, v. 31, n. 3, p. 232-237, 2009.

SONG, M. ZENG Q, XIANG Y, GAO L, HUANG J, HUANG J, WU K, LU J. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep.*2018;17(2): 2449-2455, 2018.

SONG, Y.; LI, S. S.; ZHONG, S. X.; LIU, Y. Y.; YAO, L.; HUO, S.S. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **J Eur Acad. Dermatol. Venereol.** V.27, n.3, p.313-318, 2013. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x

SOUZA, M. B.; MARQUES, F. R. O.; DA SILVA, E.; BRASIL, H. O. B. Estudo fitoquímico do óleo fixo da casca da Anibacanelilla (Casca-preciosa, Canela-cheirosa). **Revista Farociencia**, v. 1, p. 206-208, 2014.

SYLVESTER, P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Meth. Mol. Biol.* v.716, p.157-168, 2011.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3ª edição. Editora: Artmed, p. 719. Porto Alegre, 2004.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C., BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, I.Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiol.* v.160, n.11, p.2352-2365, 2014. doi:10.1099/mic.0.081794-0

TESCHKE, R.; XUAN, T.D. Active nature based ingredients for drug discovery with pivotalrole of clinical efficacy: review and prospective, **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, v.8, p.4-18, 2020. doi: <https://doi.org/10.12970/2308-8044.2020.08.02>

TORRES, E. A. F. S.; ROGÊ FERREIRA, A. F.; OLIVO, R. Estudo das propriedades desinfectantes do ozônio em alimentos. *Higiene Alimentar*, v.10, n.42, p.18-23, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12.ed. Artmed: Porto Alegre, 939p. 2017.

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAM, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 303-309, 2005.

TULLIO, V.; ROANA, J.; SCALAS, D.; MANDRAS, N. Evaluation of the Antifungal Activity of Mentha x piperita (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles. **Molecules.** v.24, 3148; 2019. doi:10.3390/molecules24173148

UGAZIO, E.; TULLIO, V.; BINELL, A.; TAGLIAPIETRA, S.; DOSIO, F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. **Molecules**. v.25, 334, 2020. doi:10.3390/molecules25020334

VALACCHI, G.; FORTINO, V.; BOCCI, V. The dual action of ozone on the skin. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 6, p. 1096-1100, 2005.

VIEBAHN, H. R. The use of ozone in medicine: mechanisms of action. Munich; 2003.

VILJOEN A, VUUREN SV, ERNST E, KLEPSE M, DEMIRCI B., BASER H, WYK BEV. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae) – the antimicrobial and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, 137–143, 2003.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Documentos florestais, n. 17, p. 1-26, 2003.

VIVIAN, P. G.; MELLO, G.; PORTO, R.; TIMM, C. D.; GANDRA, E. A.; FREITAG, R. A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) e sua aplicação em massa para embutido carne. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 62143-62156, 2020.

WANY, A.; JHA, S.; NIGAM, V. K.; PANDEY, D. M. Chemical analysis and therapeutic uses of citronella oil from *Cymbopogon winterianus*: A short review. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 6, p. 504–521, 2013.

WHITE, T. C.; OLIVER, B.G.; GRASER, Y.; HENN, M. R.; Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.

WINN JUNIOR, W. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2006.

WOLF, A. M.; TROY, G. C. Moléstias micóticas profundas. Tratado de medicina interna veterinária, v. 4, p. 632-664, 1992.

WOOLHOUSE, M.; FARRAR, J. Policy: an intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**. v.509, p.555–557, 2014 <https://doi.org/10.1038/509555a>

YAMASAKI, Y.; KUNOH, H.; YAMAMOTO, H.; AKIMITSU, K. Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 3, p. 168-179, 2007.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.; POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and species. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p.776-93, 2006.

YOUSMI FOKOUO, R.D.; TSOUH FOKOU, P.V.; JIATSA MBOUNA, C.D.; BOYOM, FF. Antidermatophyte activity of *Syzygium aromaticum*, *Petroselinum crispum*, and *Tetrapleura tetraptera*. **Biomedical and Biotechnology Res. Journal** v.4, p.55-60, 2020. <http://www.bmbtrj.org>

YOUSEF, S. A. A. Antifungal Activity of Volatiles from Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and Peppermint (*Mentha piperita*) Oils Against Some Respiratory Pathogenic Species of *Aspergillus*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* v.2, n.6, p.261-272, 2013 <http://www.ijcmas.com>

ZANARDI, I.; BORRELLI, E.; VALACCHI, G.; TRAVAGLI, V.; BOCCI, V.; Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 304-314, 2016.

ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V.; GABBRIELLI, A.; CHIASSERINI, L.; BOCCI, V. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. **Lipids**. v.43, p.877-886, 2008.

ZANARDO, V. P. S.; RAMBO, D.F.; SCHWANKE, C.H.A. Eficácia da ingestão de canela (*Cinnamomum* sp) na síndrome metabólica e seus componentes em idosos. 2015.

ZHANG, C.; FAN, L.; FAN, S.; WANG, J.; LUO, T.; TANG, Y.; YU, L. *Cinnamomum cassia* Presl: a review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3473, 2019.

ZHENG G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 999–1003, 1992.