

EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

Data de submissão: 21/03/2023

Data de aceite: 02/05/2023

Joelma Evelin Pereira Kume

Universidade Brasil, Campus
Fernandópolis, São Paulo
<https://orcid.org/0000-0003-3486-7633>

Roberto Andreani Junior

Universidade Brasil, Campus
Fernandópolis, São Paulo
<https://orcid.org/0000-0003-3486-7633>

Dora Inés Kozusny-Andreani

Universidade Brasil, Campus
Fernandópolis, São Paulo
<https://orcid.org/0000-0003-1366-6525>

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* (Canela da China), *Eugenia caryphollata* (Cravo da Índia), *Cymbopogon winterianus* (Citronela de Java), *Eucalyptus globulus* (Eucalipto globolus), *Eucalyptus staigeriana* (Eucalipto staigeriana) e *Mentha piperita* (Hortelã pimenta), 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.

EFFECT OF *IN NATURA* AND OZONIZED ESSENTIAL OILS ON THE DEVELOPMENT OF PATHOGENIC FUNGI

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.

1 | INTRODUÇÃO

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*, *Microsporium* e *Epidermophyton* (TORTORA et al., 2017). Além disso, são divididos em zoofílicos, geofílicos e antropofílicos, 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 microconídios e parede celular fina e lisa. Já o gênero *Microsporium* se caracteriza pela produção de macroconídios, 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 (WINN JUNIOR, 2006).

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). 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).

Verifica-se que existe 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 há 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, pela resistência antifúngica (GUPTA et al., 1998) e pela toxicidade renal e hepática (GIROIS et al., 2006).

A resistência dos fungos aos antimicrobianos convencionais tem sido um alerta para a necessidade de pesquisas para obtenção de novas moléculas para o tratamento de micoses. As plantas medicinais possuem grande potencial de recursos terapêuticos, como princípios ativos que atuam contra patógenos (SANTOS, 2017). Os medicamentos derivados de plantas são considerados alternativas seguras em comparação com os fármacos sintéticos, devido à sua fácil disponibilidade, baixo custo e efeitos colaterais desprezíveis (MITTAL et al., 2019). As plantas medicinais 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).

Cientificamente foi estabelecido que cerca de 60% dos óleos essenciais atuam com propriedades antifúngicas e 35% mostram propriedades antibacterianas (OLIVEIRA et al, 2006). Estudos relatam que os óleos essenciais possuem expressiva atividade antifúngica (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 que 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 onicomicoses, devido à 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.

Outra alternativa de uso dos óleos vegetais e essências é a ozonização dos mesmos. O óleo ozonizado é um composto conseguido da mistura de óleo com o gás ozônio. Ao ozonizar o óleo, 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). Neste contexto, objetivou-se nesta pesquisa avaliar *in vitro* a atividade antifúngica dos óleos essenciais *in natura* e ozonizados de Canela da China (*Cinnamomum cassia*), Folhas de Cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), 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 | MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens e meios de cultivo

Para avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, foi utilizada a linhagem padrão de *Trichophyton mentagrophytes* ATTC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 e *Sporothrix schenckii* ATCC 16345 (*American Type Culture Collection*).

As linhagens foram reativadas em meio de cultura agarizado Sabouraud Dextrose (ASD) e caldo Sabouraud Dextrose (CSD, 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.

A linhagem de *S. schenckii* foi isolado em placas de Petri contendo meio de cultura estéril (ASD) e incubadas em temperatura de 28°C, por um período 5 à 7 dias.

Óleos essenciais

Foram utilizados seis óleos essenciais sendo eles, *Cinnamomum cassia* (L.) Presl (Canela da China), *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill. & L. M. Perry (folhas de Cravo da Índia), *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela), *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto Globulus), *Eucalyptus staigeriana* F. Muell. ex F. M. Bailey (Eucalipto Staigeriana) e *Mentha piperita* L. (Menta Piperita), todos obtidos de indústria nacional (Ferquímica®, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), sendo seus parâmetros físico-químicos como aparência, coloração,

pureza, odor, densidade (20°C) e índice de refração (20°C), descritos pelo fornecedor, que produz e comercializa óleos essenciais em escala industrial.

Ozonização dos óleos essenciais

Para ozonizar os óleos essenciais, o gás ozônio (O_3), foi produzido por meio de um gerador corona (Ozon & Life), e o oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor. Os óleos foram expostos ao ozônio de forma direta por meio do difusor por 30 minutos, em temperatura controlada de 25°C. Todo o procedimento de ozonização foi conduzido em uma capela de exaustão da marca Quimis modelo 216.11, visando minimizar os riscos de aspiração do gás ozônio, seguindo as normas internacionais de segurança.

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 foi verificada a ausência de crescimento microbiano. Foi considerado estéril o óleo que não apresentou nenhuma colônia no meio de cultura.

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

Preparação do inóculo

Para o procedimento de preparação do inóculo, primeiramente, *S. schenckii* foi cultivado 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 mL^{-1} (UFC mL^{-1}).

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)). A linhagem de *S. schenckii* foi suspensa em caldo CSD para dar uma densidade final de 10^6 CFU mL^{-1} , e estas foram confirmadas por contagens de células viáveis.

Os experimentos foram conduzidos empregando-se concentrações que variaram de 0,00 a 100%, sendo elas: 0,39%, 0,78%, 1,56%, 3,12%, 6,25%, 12,50%, 25%, 50% 100% e os controle negativos e positivos.

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 noventa e seis poços. Após incubação a 37°C por 24h, a CIM foi avaliada, sendo que a presença de células bacterianas viáveis nas concentrações não inibitórias foi determinada pela adição, em cada amostra,

do corante 2,3,5 -Triphenyltetrazolium Chloride , no volume de 50 μ L. 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 concentração fungicida mínima (CFM), 20 μ l 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. Os valores de CFM foram determinados como a concentração mais baixa de óleos essenciais, sem crescimento visível (AIEMSAARD, PUNAREEWATTANA, 2017).

Cinética fungicida dos óleos essenciais

Foi empregada a metodologia descrita por Allahghadri et al. (2010). Foram adicionados em tubos 40 mL de cada óleo essencial na diluição determinada por CFM a cada 5 mL de caldo de CSD contendo suspensão fúngica de 10⁶ UFC mL⁻¹ 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 24 horas. 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 colónias 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. Essa análise mostrou que quanto maior a variação negativa, maior foi a eficácia do óleo essencial. Nesse contexto, a variação percentual da contagem microbiana consistiu da seguinte relação:

$$\text{Contagem microbiana}_{\text{óleo essencial}} (\%) = \frac{(\text{Contagem}_{0,39\%} - \text{Contagem}_{0,0\%})}{\text{Contagem}_{0,0\%}} \times 100$$

Essa relação foi empregada para todos os óleos essenciais avaliados e para todas as concentrações empregadas. De acordo com a expressão acima, variações negativas mostram diminuição na contagem microbiana e variações positivas mostram aumento da contagem microbiana à medida que a concentração do respectivo óleo essencial aumenta.

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados por meio de análise descritiva da variação da contagem microbiana de acordo com os tempos de exposição a diferentes óleos essenciais. Abordagem dos dados de contagem microbiana por meio de gráficos de linha a fim de observar a evolução da variação da contagem microbiana com o tempo. Foram empregados os testes de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% (P<0,05).

3 | RESULTADOS

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 da China, citronela, cravo-da-Índia, citronela, eucalipto globulus, eucalipto staigeriana e menta pepirita *in natura* e ozonizados frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Sporothrix schenckii*. 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 *S. schenckii*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* auxiliando no controle da contaminação e, por conseguinte, diminuindo o tempo de sobrevivência do fungo.

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, independente da dose no fungo testado. O mais ativo foi o óleo de cravo-da-Índia, 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.

Óleo essencial	Tratamento	S. schenckii		T. mentagrophytes		T. rubrum	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Canela	<i>In natura</i>	12,5	12,5	6,2	6,2	12,5	12,5
	Ozonizado	3,1	1,5	0,8	0,8	1,5	0,8
Cravo da Índia	<i>In natura</i>	1,5	0,8	6,2	12,5	25	25
	Ozonizado	0,8	0,4	0,8	0,4	1,5	1,5
Citronela	<i>In natura</i>	0,8	0,8	25	25	6,25	25
	Ozonizado	0,8	0,8	1,5	1,8	3,1	1,5
Menta	<i>In natura</i>	25	50	0,8	0,8	25	12,5
	Ozonizado	3,1	6,2	0,8	0,8	3,1	3,1
Eucalipto globulus	<i>In natura</i>	6,25	1,5	12,5	6,25	12,5	6,25
	Ozonizado	0,8	0,4	3,1	3,1	1,5	0,4
Eucalipto stageriana	<i>In natura</i>	3,1	6,25	12,5	12,5	50	50
	Ozonizado	3,1	0,4	1,5	0,8	3,1	3,1

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para os óleos essenciais *in natura* e ozonizados frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Sporothrix schenckii*.

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

dos fungos avaliados (Tabela 1). Neste contexto, o uso do ozônio otimiza o combate ao fungo, auxiliando no controle da contaminação e, por conseguinte, diminuindo o tempo de desinfecção. 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).

A Tabela 2 evidencia as estatísticas descritivas da variação da contagem 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. 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 *Spothrix 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). Na presente pesquisa verificou-se que a ozonização dos mesmos apresentaram sinergismo em relação aos *in natura* (Tabelas 1 e 2), evidenciando que o gás ozônio potencializa a atividade antifúngica.

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). Na presente pesquisa verificou-se sinergismo em todos os óleos ozonizados, exceto o óleo de citronela ozonizado que apresentou as mesma CIM que o *in natura*, quando avaliado frente a *S. Schenckii* (Tabela 1).

Óleo essencial ²	Tratamento	<i>Spothrix schenckii</i>		<i>T. mentagrophytes</i>		<i>T. rubrum</i>		Valor p ¹
		Média±DP ²	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	0,024
	Sem ozônio	-99,9±0,00	-99,9 a	-87,2±13,7	-89,3 b	-99,9±0,0	-99,9 a	0,009
Canela	Com ozônio	-67,0±36,1	-67,8 b	-98,3±0,00	-98,3 a	-99,9±0,0	-99,9 a	0,044
	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	0,009
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	0,003
	Sem ozônio	-99,0±0,7	-99,1 a	-68,2±19,1	-69,6 b	-95,1±0,9	-95,2 a	<0,001
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	0,008
	Sem ozônio	-21,8±40,4	0,0 b	-60,7±29,2	-66,6 ab	-90,6±10,3	-90,6 a	0,002
Menta	Com ozônio	-66,1±32,2	-71,2 b	-37,8±65,2	-52,6 b	99,9±0,00	-99,9 a	0,019
	Sem ozônio	-66,2±30,2	-80,0 ab	-41,6±42,9	-33,3 b	-99,6±0,00	-99,6 a	0,008

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

Tabela 2. Médias da variação microbiana dos fungos avaliados no estudo de acordo com os óleos essenciais e o uso de ozônio.

O tratamento de lesões cutâneas com 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 descobrir, entre os produtos naturais, ingredientes ativos adicionais como fontes que possam ajudar a desenvolver novos fármacos baseados em produtos naturais, e auxiliar os medicamentos convencionais e fitoterápicos, atualmente disponíveis, para o tratamento de doenças. No entanto, os novos medicamentos fitoterápicos só serão aceitos pelos consumidores e agências regulatórias,

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).

4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa, que se referem a um experimento *in vitro*, demonstraram de forma geral, que os óleos essenciais *in natura* e ozonizados apresentaram atividade antifúngica contra *Sprothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

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 *Sprothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*.

REFERÊNCIAS

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

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, **Journal of Food Science**. v.75, n.2: H54-H61, 2010.

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.

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.

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.

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.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Natural of Chemical and Biology**, v.3, p.408–414, 2007.

GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. P. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p. 138-149, 2006.

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

HASHIM, G. M.; ALMASAUDI, S. B.; AZHAR, E.; AL JAOUNI, S. K.; HARAKEH, S. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. **Saudi Journal of Biology Science**, v.24, n.7, p.1458-1464, 2017.

LIAMBRICH, A.; LECHA, M. Tratamiento actual de las onicomicosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, 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.

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.

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

MAHBOUDI, M.; KAZEMPOUR, N. The antifungal activity of *Artemisia sieberi* essential oil from different localities of Iran against dermatophyte fungi. **Journal of Medical Mycology**, v.25, e65–71, 2015.

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.

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

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. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 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.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **India Crop Production**, v.62, p. 250–64, 2014.

RICHARDS, L. A.; GLASSMIRE, A. E.; OCHSENIDER, K. M.; SMILANICH, M. A.; DODSON, C. D.; JEFFREY, C. S.; DYER, L. A.. Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. **Phytochemistry Reviews**, v.15, p, 1153–1166, 2016.

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. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Farmácia, Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, 2017.

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. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, p: 1-6, 2016.

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

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

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

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.

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

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.

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.

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* (manjeriçã) e sua aplicação em massa para embutido cárneo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 62143-62156, 2020.

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.