

## Utilização de óleos vegetais ozonizados na inativação *in vitro* de *Candida tropicalis*

Os óleos vegetais ozonizados tem uma ampla gama de efeitos antimicrobianos, são eficazes na terapêuticas antifúngicas, antibacterianas e antivirais. Neste contexto objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia de óleos vegetais ozonizados e in natura na inativação *in vitro* de *Candida tropicalis* ATCC 4563. Para analisar a atividade antifúngica foram utilizados óleos vegetais de coco, de dendê, girassol, de oliva e de pequi, todos na forma in natura e ozonizados em concentrações que variaram de 0,32% a 100%. Foi determinada a concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em placa, posteriormente foram avaliadas a concentração fungicida mínima e a cinética fungicida dos óleos. Os resultados evidenciaram atividade antifúngica em todos os óleos, no entanto os óleos in natura de dendê, girassol e coco apresentaram concentrações inibitórias e fungicidas mínimas superiores aos óleos ozonizados, enquanto que os de oliva e de pequi não apresentaram diferenças. Em relação a capacidade de redução das unidades formadoras de colônias em função do tempo verificou-se que os óleos de oliva e de pequi, ozonizados e in natura foram mais eficazes. Pelos resultados os óleos vegetais apontam a possibilidade de utilização na terapêutica de *Candida tropicalis*.

**Palavras-chave:** Antifúngicos; Plantas medicinais; Ozônio; Sinergismo.

## Use of ozonized vegetable oils in the *in vitro* inactivation of *Candida tropicalis*

Ozonated vegetable oils have a wide range of antimicrobial effect, they are effective in antifungal, antibacterial and antiviral therapies. In this context, the objective of this research was to evaluate the effectiveness of ozonized and in natura vegetable oils in the *in vitro* inactivation of *Candida tropicalis* ATCC 4563. To analyze the antifungal activity, coconut, palm, sunflower, olive and pequi vegetable oils were used. All in the in natura form and ozonized in concentrations that varied from 0.32% to 100%. The minimum inhibitory concentration was determined by the microdilution plate method, then the minimum fungicidal concentration and the fungicidal kinetics of the oils were verified. The results showed antifungal activity in all oils, however in natura oil palm, sunflower and coconut showed minimum inhibitory and fungicide concentrations higher than ozonized oils, while olive and pequi oils showed no differences. Regarding the ability to reduce colony forming units as a function of time, it was found that olive and pequi, ozonized and in natura oils were more effective. From the results, vegetable oils indicate the possibility of use in the therapy of *Candida tropicalis*.

**Keywords:** Antifungals; Medicinal plants; Ozone; Synergism.

Topic: **Epidemiologia e Saúde Ambiental**

Received: **08/11/2022**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Approved: **21/11/2022**

Vanessa Barbosa Gimenez 

Universidade Brasil, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/5365995848389037>

<http://orcid.org/0000-0002-2413-0032>

[vanessagimenez1983@hotmail.com](mailto:vanessagimenez1983@hotmail.com)

Andressa Barbosa Gimenez 

Fundação Educacional de Fernandópolis, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1804467736635299>

<http://orcid.org/0000-0002-9818-1510>

[andressagimenez2010@hotmail.com](mailto:andressagimenez2010@hotmail.com)

Roberto Andreani Junior 

Universidade Brasil, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/5863157086821275>

<http://orcid.org/0000-0002-0290-3356>

[robertoandreani@uol.com.br](mailto:robertoandreani@uol.com.br)

Gisele Herbst Vazquez 

Universidade Brasil, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/3050276760782685>

<http://orcid.org/0000-0002-0957-329X>

[gisele.vazquez@universidadebrasil.edu.br](mailto:gisele.vazquez@universidadebrasil.edu.br)

Dora Inés Kozusny-Andreani 

Universidade Brasil, Brasil

<http://lattes.cnpq.br/1260217332585007>

<http://orcid.org/0000-0003-3579-6419>

[doraines@terra.com.br](mailto:doraines@terra.com.br)



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2022.011.0003

### Referencing this:

GIMENEZ, V. B.; GIMENEZ, A. B.; ANDREANI JUNIOR, R.; VAZQUEZ, G. H.; ANDREANI, D. I. K.. Utilização de óleos vegetais ozonizados na inativação *in vitro* de *Candida tropicalis*. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.13, n.11, p.22-32, 2022. DOI:

<http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2022.011.0003>

## INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas por *Candida* tem sido descritas como um grave problema de saúde pública nas regiões subdesenvolvidas e nos países desenvolvidos, representando 80% dos registros de infecções em hospitais, principalmente em unidades de terapia intensiva, o que não é surpreendente visto que o progresso e os avanços nos tratamentos médicos para doenças graves, aumentam a sobrevivência dos pacientes, porém, resultam em nichos ecológicos de microrganismos produtores de biofilme e de complicações infecciosas (TIAN et al., 2018, WANG et al., 2018).

Além disso, os fatores de risco para infecções por *Candida* incluem idade avançada, diabetes mellitus, cirurgia recentes, presença de um dispositivo médico permanente (por exemplo, cateter venoso central), um estado imunossuprimido, o uso de hemodiálise, um estado neutropênico, doença renal crônica ou o uso de antibióticos e / ou antifúngicos de amplo espectro (GAITAN et al., 2018, 2019).

Embora a maioria das infecções sejam prevalentes por *C. albicans*, espécies de *Candida* não *albicans* (NACs), resistentes tem sido isoladas em vários países nas últimas décadas. Ao contrário de *C. albicans*, que coloniza os trato gastrointestinal e geniturinário da maioria dos indivíduos saudáveis, *Candida tropicalis* tem sido amplamente considerada a segunda espécie mais virulenta, com capacidade de produzir biofilme, possui vários fatores de virulência, incluindo adesão a células epiteliais e endoteliais, secreção de enzimas líticas, como proteínases, fosfolipases e hemolisinas, transição de levedura para hifas (morfogênese) e o fenômeno comutação fenotípica (ALVES et al., 2017).

Isolados de espécies de *C. tropicalis* em infecções graves apresentaram resistência aos medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis, o que é um grave problema na terapêutica, já que vários fatores estão envolvidos no desenvolvimento da resistência antifúngica nos ambientes clínicos, incluindo o uso indiscriminado de antifúngicos no tratamento de infecções nosocomiais (CHOI et al., 2016).

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos pelas bactérias e fungos se tornou um grave problema na terapia de doenças infecciosas. Esta problemática evidenciou a necessidade de obtenção de novos fármacos de alta eficácia e que não gerassem resistência microbiana. Deste modo, o uso de óleos ozonizados na medicina ganhou importância recentemente, por seu reconhecido potencial antimicrobiano e pela disseminação mais frequente de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais. O composto derivado da reação do ozônio com ácidos graxos e outros substratos pode atuar como germicida, imunoestimulante e agente de restauração tecidual. As atividades biológicas e a estabilidade dos óleos ozonizados permitem o desenvolvimento de formulações padrão que entregam os benefícios do ozônio, apoiadas por estudos pré-clínicos e clínicos (SÁNCHEZ, 2021).

O óleo ozonizado tem uma ampla gama de efeito antimicrobiano e podem utilizados para tratar infecções bacterianas, fúngicas e virais. Além disso, os óleos ozonizados são empregados no tratamento de escaras e na profilaxia de diabéticos (AERTS et al., 2016). Neste contexto objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia de óleos vegetais ozonizados e *in natura* na inativação *in vitro* de *Candida tropicalis* ATCC 4563.

## **METODOLOGIA**

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

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

### **Meios de cultivo**

Os meios de cultura utilizados para manutenção das cepas e nos ensaios de atividade biológica foram os meios de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio líquido Caldo Sabouraud Dextrose (CSD), adquiridos da marca Kasvi<sup>®</sup>, e foram preparados conforme a descrição do fabricante sob condições de esterilidade.

### **Microrganismo**

Foi utilizada a cepa padrão: *Candida tropicalis* ATCC 4563. As cepas foram inoculadas nas placas de Petri estéril contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), em seguida incubados em temperatura de 35°C por 24 horas.

### **Inóculo**

Para preparação do inóculo, o microrganismo foram obtidos das colônias cultivadas em meio CSD submetido a agitação orbital constante (225 rpm) e temperatura controlada (28° C) por 24 horas. Foram preparadas suspensões em solução fisiológica estéril a (NaCl 0,5%), e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland para obtenção de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (CLSI, 2015).

### **Óleos vegetais ozonizados**

Foram utilizados na pesquisa cinco óleos vegetais, sendo eles, óleo de Coco Extra Virgem Copra<sup>®</sup>, óleo de Dendê Kidendê<sup>®</sup>, óleo de Girassol Liza<sup>®</sup>, azeite de Oliva Borges<sup>®</sup> e óleo de Pequi Aroma D´Minas<sup>®</sup>.

O ozônio foi produzido por meio de um gerador que tem como princípio o efeito corona (Ozon & Life) e o oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor por meio de pedra porosa, gerando assim 35 µg mL<sup>-1</sup>. Todo o procedimento de ozonização foi conduzido em uma capela de exaustão da marca Quimis modelo 216.11, visando minimizar os riscos de inalação do gás ozônio, seguindo as normas internacionais de segurança.

Todos os óleos foram expostos ao ozônio de forma direta por meio de um difusor, por um período de 2 horas, em temperatura controlada de 25° C.

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

### **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

Todas as avaliações foram realizadas em caldo Sabouraud-Dextrose (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. Os ensaios foram realizados conforme os protocolos estabelecidos pelo CLSI (2012). A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos vegetais *in natura* e ozonizados foi realizada através da técnica de microdiluição em placa de 96 poços.

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

Por último foram acrescentados 0,05mL do inóculo ( $10^6$  células viáveis mL<sup>-1</sup>) de cada linhagem, com exceção dos controles negativos. A coluna 1 e 2 foram destinadas aos controles negativos e a coluna 3 para controle positivo.

Após incubação a 37°C por 24h, foi adicionado 50 µL em todos os poços do corante 2,3,5 - *Triphenyltetrazolium Chloride*, o que tornou possível visualizar as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantiveram a sua cor. A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração de óleo vegetal capaz de inibir o desenvolvimento microbiano (SYLVESTER, 2011).

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

As placas foram incubadas a 28 ° C por 24/48 horas 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 vegetais, sem crescimento visível (AIEMSAARD et al., 2017).

### **Cinética fungicida dos óleos vegetais**

Em tubos de 40 µL foram adicionados de cada óleo vegetal *in natura* e ozonizado e CSD na diluição determinada pela CFM representando 1000 µL, foi então acrescentado a suspensão fúngica de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, em seguida incubados a 37°C. Alíquotas de 0,05 mL foram retiradas nos tempos: 0, 5', 10', 20', 60', 120',

240', 480' e 24 horas. As amostras foram inoculadas em Agar Sabouraud-Dextrose, incubadas durante 24/48 h a 37°C.

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

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

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

De acordo com a expressão acima, variações negativas mostram diminuição na contagem microbiana e variações positivas mostram aumento da contagem microbiana à medida que o tempo de exposição aumenta. A variação percentual da contagem microbiana foi determinada por meio de estatísticas descritivas a fim de observar quais óleos apresentaram maior eficácia na redução da contagem microbiana.

### **Avaliação dos dados e análise estatística**

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

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

O Teste de Kruskal-Wallis foi empregado para comparar a variação da contagem microbiana dos óleos avaliados restringindo o tipo de tratamento. Foram realizados gráficos de linha para a visualização da evolução da contagem microbiana em relação ao tempo de exposição do microrganismo ao óleo vegetal de acordo com o tratamento empregado. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). Na realização das análises foi empregado o Software Minitab 17 (Minitab Inc.)

## **RESULTADOS**

Em um primeiro momento foi realizado um estudo com todos os óleos essenciais com o objetivo de avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) a fim de caracterizar o potencial de cada um dos óleos para inativação de *Candida tropicalis* (Tabela 1).

A Tabela 1 evidencia que na grande maioria dos casos os óleos *in natura* apresentaram concentrações inibitórias e fungicidas mínimas superiores aos óleos ozonizados. Nos óleos de pequi e oliva, tais concentrações foram semelhantes para o óleo *in natura* e ozonizado para a atividade antifúngica.

**Tabela 1:** Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para cada um dos óleos avaliados frente *Candida tropicalis*.

Óleo vegetal	Tratamento	CIM (%) <sup>1</sup>	CFM (%) <sup>2</sup>
Pequi	In natura	100	100
	Ozonizado	100	100
Girassol	In natura	100	100
	Ozonizado	50	50
Dendê	In natura	12,5	50
	Ozonizado	1,6	6,2
Coco	In natura	50	100
	Ozonizado	25	50
Oliva	In natura	50	100
	Ozonizado	50	100

<sup>1</sup> CIM: concentração inibitória mínima e CFM: concentração fungicida mínima.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida tropicalis* submetida aos óleos vegetais *in natura* e ozonizados nas suas respectivas concentrações mínimas fungicidas (CFM).

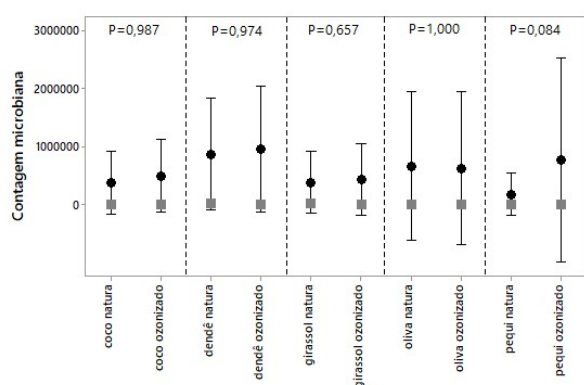
**Tabela 2:** Média  $\pm$  desvio padrão (Mediana) de *Candida tropicalis* submetida aos óleos vegetais *in natura* e ozonizados.

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

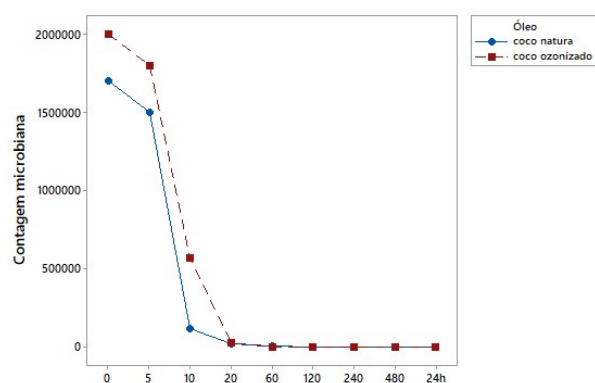
<sup>1</sup> Valor p referente ao teste de Mann-Whitney a P<0,05.

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

Na figura 1 estão representados os gráficos de intervalos de confiança para cada um dos óleos analisados de acordo com os tratamentos.

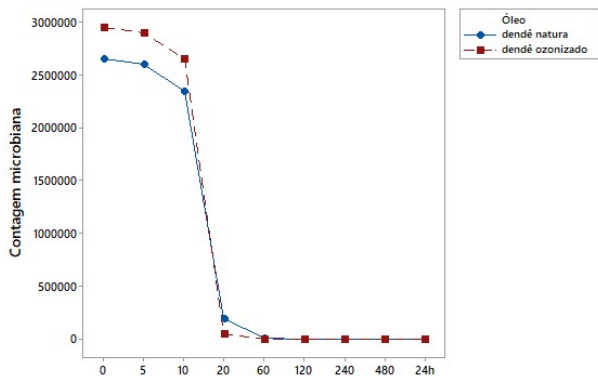


**Figura 1:** Intervalos de confiança (95%) para cada um dos óleos essenciais avaliados de acordo com os tratamentos estudados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.

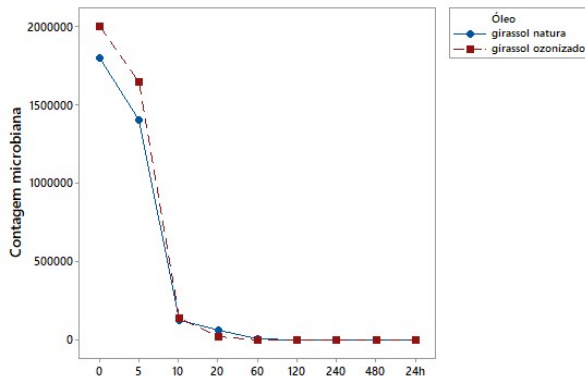


**Figura 2:** Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de coco *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

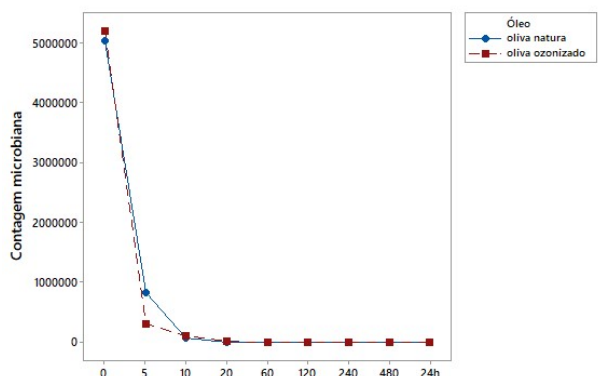
As Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 evidenciam o comportamento da contagem microbiana de cada um dos óleos vegetais de acordo com os tempos avaliados de exposição aos tratamentos.



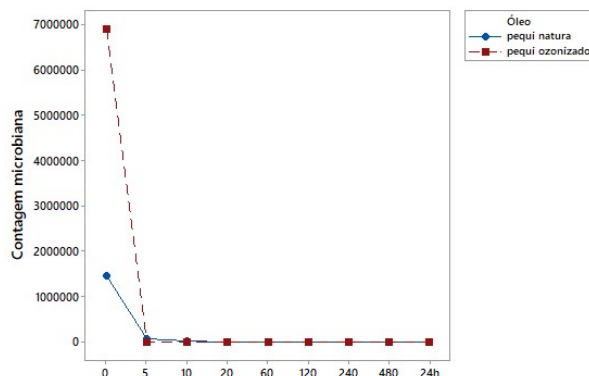
**Figura 3:** Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de dendê in natura e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.



**Figura 4:** Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de girassol in natura e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.



**Figura 5:** Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de oliva in natura e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.



**Figura 6:** Contagem microbiana de *Candida tropicalis* para o óleo de pequi in natura e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.

Os resultados obtidos evidenciaram que os óleos ozonizados foram responsáveis por diminuir a carga microbiana em tempos menores quando comparados aos óleos *in natura*. Verificou-se que a contagem nula de UFC foi obtida em menor tempo com o óleo ozonizado. Somente o óleo de oliva apresentou valores nulos de contagem microbiana no mesmo tempo para ambos os tratamentos (240 minutos).

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

A variação da carga microbiana também foi avaliada para cada óleo essencial (Tabela 3).

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

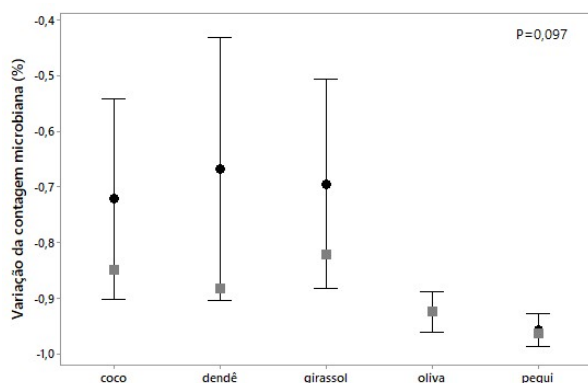
Óleos vegetais (CFM <i>in natura</i> /CFM ozonizado)	Tratamentos		Valor p <sup>1</sup>
	<i>In natura</i>	Ozonizado	
Coco (100%/50%)	-72,1±31,1 (-84,9)	-76,2±34,7 (-94,6)	0,625
Dendê (100%/3,1%)	-66,8±40,9 (-88,3)	-67,3±46,0 (-97,5)	0,537
Girassol (100%/50%)	-69,4±35,2 (-82,1)	-80,6±28,3 (-91,8)	0,063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

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

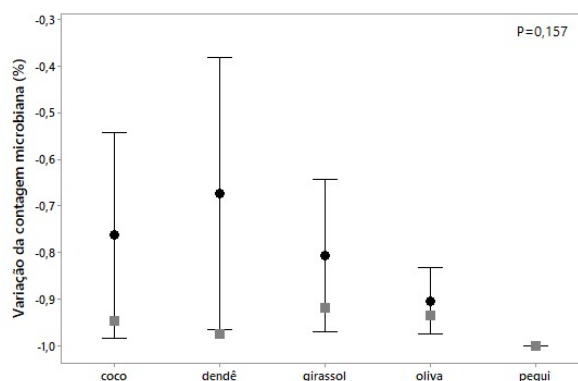
A comparação da variação da contagem microbiana entre os tratamentos *in natura* e ozonizado resultou na ausência de diferenças significativas (abordagem longitudinal, em linha), já que todos os valores p dos testes estatísticos resultaram superiores a 0,05. Desse modo, independentemente do tratamento,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

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

Apesar da ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, o óleo de pequi (95,6% de redução) foi o que apresentou maior média de redução microbiana para o tratamento *in natura*, seguido do óleo de oliva (92,4% de redução). Para o tratamento *in natura*, o óleo de dendê foi o que apresentou menor eficácia contra *Candida tropicalis* (Figura 7). Para o tratamento ozonizado, o óleo de pequi foi o que apresentou maior redução média da carga microbiana (99,9% de redução), seguido do óleo de oliva (90,3% de redução). O óleo de dendê ozonizado apresentou a menor eficácia dentre os óleos ozonizados avaliados no estudo (Figura 8).



**Figura 7:** Variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais *in natura*. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana.



**Figura 8:** Variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais ozonizados. Círculos e quadrados indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente.

Os óleos de pequi e oliva *in natura* apresentaram maior eficácia na redução de *Candida tropicalis*, sendo o óleo de dendê o que apresentou menor eficácia. Já para os óleos ozonizados pequi e oliva apresentaram maior eficácia no combate a *Candida tropicalis*, enquanto que o óleo de dendê apresentou menor eficácia.

## DISCUSSÃO

O ozônio é uma molécula gasosa capaz de matar microrganismos, como leveduras, fungos, bactérias e protozoários. No entanto, o gás ozônio é instável e não pode ser usado facilmente. A fim de utilizar o ozônio de forma adequada e eficiente, o óleo vegetal pode ser empregado. O ozônio reage com ligações duplas C-C de ácidos graxos, convertendo-se em óleo ozonizado. Nesta reação, o ozonídeo é produzido dentro dos ácidos graxos e o óleo ozonizado resultante tem várias funções biológicas (CHUNG et al., 2019).



A terapia com ozônio exibe uma ampla gama de efeitos benéficos clínicos, incluindo ações antimicrobianas, imunoestimulantes, analgésicas e anti-hipóxicas. No entanto, ainda há uma escassez de dados sobre a atividade fungicida de ozônio. *Candida* oral é a infecção fúngica mais comum na boca entre usuários de próteses e pessoas com sistema imunológico enfraquecido. No caso de candidíase generalizada ou pacientes imunocomprometidos, a terapia sistêmica é necessária, enquanto as infecções localizadas são tratadas com medicamentos tópicos (MONZILLO et al., 2020).

A ozonoterapia tem ganhado ênfase nos tratamentos em saúde, sobretudo o óleo vegetal adicionado de gás ozônio tem sido eficaz nas infecções de pele e mucosa. Os critérios para o uso de óleo ozonizado, baseia-se no mecanismo de ação de ambos, já que há sinergia quando são usados simultaneamente (SÁNCHEZ, 2021).

Kume et al. (2021), avaliaram *in vitro* as atividades do óleo de cravo da Índia *in natura* e ozonizado sobre cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, e verificaram sinergismo do gás ozônio adicionado ao óleo essencial, uma vez que quando ozonizado a concentração fungicida mínima foi de 0,4%, enquanto que para o óleo *in natura* foi de 12,5 %. Na presente pesquisa observou-se sinergismo do ozônio nos óleos de coco, dendê e girassol quando foram comparados com os óleos *in natura* (Tabela 1).

A eficácia dos óleos de girassol, coco, pequi, oliva e dendê *in natura* e ozonizado, no controle de *Acinetobacter baumannii*, foi observada por Silva et al. (2021), contudo o óleo de dendê *in natura* e ozonizado apresentou as menores CIM (25% e 6,25%, respectivamente), quando comparado com os demais óleos avaliados. Os resultados obtidos na presente pesquisa evidenciaram atividade antifúngica dos óleos de coco, pequi, oliva, dendê e girassol frente a *Candida tropicalis* (Tabela 2). No entanto, o óleo de dendê *in natura* e ozonizado apresentaram menor CIM (12,5% e 1,6%, respectivamente), revelando a ação sinérgica do ozônio.

Crastechini et al. (2018), avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* do óleo de oliva ozonizado sobre as espécies *Candida*. O óleo ozonizado mostrou atividade antifúngica *in vitro* contra todas as espécies de *Candida*, no entanto maiores concentrações foram necessárias para *C. Tropicalis*, uma vez que para *C. albicans* e *C. krusei* a CFM foi de 0,75%, enquanto que para *C. tropicalis* a CFM foi de 1,5%. A cepa de *Candida tropicalis* ATCC 4563, utilizada na presente pesquisa, evidenciou ser menos sensível ao óleos de oliva *in natura* e ozonizado, nesse caso as CFMs de ambos os óleos foram de 100% (Tabela 1). Entretanto, quando foi avaliada a capacidade de redução das UFCs em função do tempo verificou-se que os óleos de oliva e de pequi, ozonizados e *in natura* foram mais eficazes (Tabela 3, Figuras 7 e 8).

Maritza et al. (2017), em uma pesquisa *in vivo*, com ratas infectadas na vagina por *Candida albicans*, determinou a eficácia do óleo de *Theobroma* ozonizado a 20% no tratamento de candidíase vaginal, visto que houve diminuição da carga microbiana após cinco dias de tratamento, após dez dias não houve sinais de infecção.

Mesmo quando o mecanismo de ação exato do óleo ozonizado não é descrito, há muitas evidências pré-clínicas e clínicas de sua eficácia antimicrobiana e benéfica na cicatrização de feridas. O óleo ozonizado apresenta atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*. Em geral, o efeito letal do óleo ozonizado é evidente

quando aplicado a cepas multirresistentes de *Staphylococcus epidermis*, *Stafilococcus aureus*, também quando aplicado a fungos do gênero *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, leveduras como *Candida* sp e protozoários como *Giardia lamblia* (ZANNARDI et al., 2013, KUME et al., 2021).

## CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e pelos resultados obtidos pode concluir-se que: Os óleos veetais de girassol, coco, dendê, coco e oliva, *in natura* e ozonizados inativaram *Candida tropicalis*. Os óleos *in natura* de dendê, girassol e coco *in natura* apresentaram concentrações inibitórias e fungicidas mínimas superiores aos óleos ozonizados, enquanto que os de oliva e de pequi não apresentaram diferenças. Em relação a capacidade de redução das unidades formadoras de colônias em função do tempo verificou-se que os óleos de oliva e de pequi, ozonizados e *in natura* foram mais eficazes. Pelos resultados os óleos vegetais apontam a possibilidade de utilização na terapêutica de *C. tropicalis*.

## REFERÊNCIAS

AERTS, O.; LEYSEN, J.; HORST, N.; LAMBERT, J.; GOOSSENS, A. Contact dermatitis caused by pharmaceutical ointments containing 'ozonated' olive oil. **Contact Dermatitis Journal**, Heidelberg, v.75, n.2, p.123-126, 2016.

AIEMSAARD, J.; PUNAREEWATTANA, K.. Antifungal activities of essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Piper betle*, and *Ocimum sanctum* against clinical isolates of can.ine Dermatophytes. **Science Asia**, Bangkok, v.43, n.5, p.223-228, 2017. DOI: <http://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2017.43.223>

ALVES, D. L. Z.; ROCHA, W. P. S.; CHAVES, G. M.. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, Bern, v.8, n.1927, 2017. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927>

CHOI, M. J.; WON, E. J.; SHIN, J. H.; KIM, S. H.; LEE, W. G.; KIM, M. N.; LEE, K.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W.; IM, Y. J.. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, Washington, v.60, p.3653-3661, 2016.

CHUNG, K. T.; KIM, B. W.. Anti-microbial activity effects of ozonized olive oil against bacteria and *Candida albicans*. **Journal of Life Science**, Columbus, v.29, n.2, p.223-230, 2019. DOI: <http://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.2.223>

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M07-A10. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

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

CRASTECHINI, E.; KOGA-ITO, C. Y.; MACHADO, S.; TEODORO,

G. R.; BRITO, G. N. B.; SANGALLI, J.; ALMEIDA, J.. Effect of ozonized olive oil on oral levels of *Candida* spp. in patients with denture stomatitis. **Brazilian Dental Science**, São José dos Campos, v.21, n.1, 2018. DOI: <http://doi.org/10.14295/bds.2018.v21i1.1489>

GAITAN, A. R.; MARTÍNEZ, H.; MORET, A. M.; CALABUIG, E.; TASIAS, M.; IZQUIERDO, A. A.; ZARAGOZA, Ó.; MOLLAR, J.; FRASQUET, J.; LLETÍ, M. S.; RAMÍREZ, P.; HONTANGAS, J. L. L.; PEMÁN, J.. Detection and treatment of *Candida auris* in an outbreak situation: risk factors for developing colonization and candidemia by this new species in critically ill patients. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, London, v.17, n.4, p.295-305, 2019. DOI: <http://doi.org/10.1080/14787210.2019.1592675>

GAITAN, A. R.; MORET, A. M.; PITARCH, M. T.; LÓPEZ, A. I. A.; MOREL, H. M.; CALABUIG, E.; LLETÍ, M. S.; RAMÍREZ, P.; HONTANGAS, J. L. L.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; MASERES, J. M.; PEMÁN, J.. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. **Mycoses**, Berlin, v.6, n.7, p.1-12, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1111/myc.12781>

KUME, J. E. P.; DI TANNO, M. F. P.; ANDREANI JUNIOR, R.; ANDREANI, D. I. K.. Uso de óleos essenciais *in natura* e ozonizados no controle *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes*. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, 10.1: e4710111233-e4710111233, 2021. DOI: <http://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11233>

MARITZA, F. D.; MENEAU, R. I.; FERNÁNDEZ, I.; SÁNCHEZ, Y.; GARCÍA, G.. In Vivo Antimicrobial Activity of Ozonized *Theobroma* Oil Ovules against *Candida albicans*. **Archives of Clinical Microbiology**, London, v.8, n.6, p.1-7, 2017. DOI: <http://doi.org/10.4172/1989-8436.100070>

MONZILLO, V.; LALLITTO, F.; RUSSO, A.; POGGIO, C.; SCRIBANTE, A.; ARCIOLA, C. R.; BERTUCCIO, F. R.; COLOMBO, M.. Ozonized gel against four *Candida* species: a pilot study and clinical perspectives. **Materials**, Bern, v.13, 1731, 2020. DOI: <http://doi.org/10.3390/ma13071731>

SÁNCHEZ, G. M.. Scientific rationale for the medical application of ozonized oils, an up-date. **Ozone Therapy Global Journal**, Madrid, v.11, n.1, p.239-272, 2021.

SILVA, W. R.; ANDREANI, D. I. K.. Atividade antimicrobiana de óleos vegetais in natura e ozonizados no controle de *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Development Research**, Ancara, v.11, n.03, p.45330-45335, 2021.

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.

TIAN, S.; RONG, C.; NIAN, H.; LI, F.; CHU, Y.; CHENG, S.; SHANG H.. First cases and risk factors of super yeast *Candida auris* infection or colonization from Shenyang., China.

**Emerging Microbes and Infections**, Atlanta, v.7, p.128, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41426-018-0131-0>

WANG, X.; BING, J.; ZHENG, Q.; ZHANG, F.; LIU, J.; YUE, H.; TAO, L.; DU, H.; WANG, Y.; WANG, H.; HUANG, G.. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. **Emerging Microbes and Infections**, Atlanta, v.7, n.93, 2018. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41426-018-0095-0>

ZANARDI, I.; BURGASSI, S.; PACCAGNINI, E.; GENTILE, M.; BOCCI, V.; TRAVAGLI, V.. What is the best strategy for enhancing the effects of topically applied ozonated oils in cutaneous infections? **BioMed Research International**, London, v.2013, 702949, 2013.

ZAR, J. H.. **Biostatistical Analysis**. 5 ed. Essex: Prentice Hall, 2009.

Os autores detêm os direitos autorais de sua obra publicada. A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detêm os direitos materiais dos trabalhos publicados (obras, artigos etc.). Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas ou digitais sob coordenação da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.