



ARTIGO ORIGINAL

Análise da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais ozonizados e não ozonizados de *Eugenia Caryophyllus*, *Melaleuca Alternifolia* e *Pelargonium Graveolens*

Bruno Leonardo Almeida Viana¹; Herbert Lima Batista²; Ana Flávia Machado de Carvalho³

Como Citar:

VIANA, Bruno Leonardo Almeida; BATISTA, Herbert Lima, DE CARVALHO, Ana Flávia Machado. Análise da atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais ozonizados e não ozonizados de *Eugenia Caryophyllus*, *Melaleuca Alternifolia* e *Pelargonium Graveolens*. Revista Sociedade Científica, vol.7, n.1, p.1447-1479, 2024.
<https://doi.org/10.61411/rsc202439317>

DOI: [10.61411/rsc202439317](https://doi.org/10.61411/rsc202439317)

Área do conhecimento: Biotecnologia

Palavras-chaves: Atividade antifúngica; Análise química; Óleos essenciais; Ozonização.

Publicado: 19 de março de 2024

Resumo

Este estudo teve como objetivo analisar a eficácia da atividade antifúngica dos óleos essenciais ozonizados e não ozonizados extraídos de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Pelargonium graveolens* frente a diferentes cepas de fungos patogênicos. A metodologia empregada incluiu o método de difusão em Ágar para determinar o potencial antifúngico dos óleos essenciais. Tratou-se de uma pesquisa experimental, comparativa e com delineamento casual. A investigação da atividade antifúngica desses óleos essenciais foi conduzida no laboratório de bioprocessos do Instituto Federal do Tocantins, campus Araguaína-TO. Os óleos foram armazenados e refrigerados até o uso e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos antes dos procedimentos. Os resultados mostraram diferenças na ozonização dos óleos, com o óleo de cravo botão apresentando a maior atividade inibitória. Esses achados têm implicações importantes para o uso de óleos essenciais como agentes antifúngicos.

In vitro analysis of the antifungal activity of ozonized and non-ozonized essential oils from *Eugenia Caryophyllus*, *Melaleuca Alternifolia*, and *Pelargonium Graveolens*.

Abstract

This study aimed to analyze the effectiveness of the antifungal activity of ozonized and non-ozonized essential oils extracted from *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*,

¹Centro Universitário UniFacid Wyden, Teresina, Brasil ✉

²Instituto Federal do Tocantins, Araguaína, Brasil ✉

³Centro Universitário UniFacid Wyden, Teresina, Brasil ✉



and *Pelargonium graveolens* against different strains of pathogenic fungi. The methodology employed included the Agar diffusion method to determine the antifungal potential of the essential oils. It was an experimental, comparative study with a casual design. The investigation of the antifungal activity of these essential oils was conducted in the bioprocess laboratory of the Federal Institute of Tocantins, Araguaína campus. The oils were stored and refrigerated until use and left at room temperature for 30 minutes before procedures. The results showed differences in the ozoneization of the oils, with clove bud oil exhibiting the highest inhibitory activity. These findings have important implications for the use of essential oils as antifungal agents.

1. **Introdução**

As plantas medicinais e aromáticas integram grande parte da flora natural e são consideradas um importante recurso em várias áreas, como na indústria farmacêutica, de aromas e fragrâncias, perfumaria e cosmética. Tal fato acarretou um crescimento do emprego de medicamentos à base desses fitoterápicos para o tratamento de inúmeros problemas da saúde humana¹.

A planta do cravo-da-índia é comumente cultivada no Brasil e em diversas nações tropicais. No território brasileiro, seu cultivo é predominante no sul da Bahia, onde é regularmente explorada para a extração de óleo essencial, proveniente dos botões florais, folhas e outras partes da planta². A espécie *alternifolia*, conhecida como árvore do chá, geralmente floresce em regiões pantanosas e próximas a rios, provém do gênero *Melaleuca*, pertencente à família *Myrtaceae*³.

Outra planta medicinal aromática, originária da África do Sul e Austrália, é o gerânio. Seu aroma remete à fragrância da rosa, embora existam outras espécies que imitem diferentes odores. Além de serem cultivados em jardins por razões estéticas, os gerânios têm diversas propriedades medicinais, como ação bactericida, antiespasmódica, antisséptica, adstringente, cicatrizante, diurética, hemostática e tônica



para a pele. No passado, era utilizado como remédio para feridas, úlceras e cuidados dermatológicos⁴.

O uso de compostos com atividade antifúngica deu início a uma nova fase no combate às patologias, reduzindo a taxa de mortalidade e morbidade, porém o consumo acentuado dessas substâncias gerou um elevado grau de resistência aos medicamentos e, conseqüentemente, a ausência de soluções para combater a patogenicidade dos microrganismos, o que ocasionou uma busca por novas alternativas de tratamento⁵.

No tocante à atividade fúngica, verifica-se que nem todos os fungos causam problemas à saúde, uma vez que existem alguns que são importantes para a vida do ser humano, como por exemplo, os usados na fermentação para a produção de alimentos e de bebidas, aqueles utilizados na fabricação da penicilina e os cogumelos comestíveis, dentre outros¹. Por sua vez, os fungos prejudiciais à saúde devem ser combatidos através de aditivos conservantes antifúngicos que são substâncias usadas com o objetivo de prevenir ou eliminar o desenvolvimento desses microrganismos. Os antifúngicos atuam diretamente na membrana plasmática das células fúngicas, modificando-as e ocasionando sua redução, o que leva à cura do paciente⁶.

Os óleos essenciais possuem uma vasta gama de compostos voláteis e são conhecidos pelas suas propriedades medicinais, empregadas como agentes antibacterianos, analgésicos, sedativos e anti-inflamatórios, sendo estes uma proposta de terapêutica⁷. Desse modo, os óleos essenciais são moléculas lipofílicas pequenas e apolares que se caracterizam por sua volatilidade, o que possibilita sua extração através da destilação a vapor e também por outros métodos, tais como a difusão de hidrogenação e pressão^{8,1}.

Atualmente, algumas das drogas sintéticas disponíveis no mercado não conseguem inibir muitos micróbios patogênicos. Ademais, o uso desses produtos químicos para controlar esses microrganismos é limitado devido a seus efeitos carcinogênicos, toxicidade aguda e potencial de risco ambiental. Nesse sentido, a



exploração dos óleos essenciais para controlar este problema é de grande utilidade para combater as enfermidades infecciosas⁴. Logo, há uma crescente demanda por produtos vegetais de alta qualidade e que não contenham resíduos químicos, levando as pessoas a procurarem produtos com baixa toxicidade para o ser humano e que não causem prejuízo ao planeta⁹.

A ozonoterapia emerge como uma alternativa promissora no tratamento de diversas doenças, oferecendo vantagens distintas em relação aos fármacos convencionais encontrados em farmácias antifúngicas¹⁰. Dessa forma, como objetivo geral, o trabalho em questão analisou a eficácia da atividade antifúngica dos óleos essenciais ozonizados e não ozonizados extraídos de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Pelargonium graveolens* frente à diferentes cepas de fungos patogênicos, utilizando o método de difusão em Ágar, a fim de determinar seus potenciais como agentes.

Portanto, o interesse em pesquisar os efeitos e desenvolver os óleos essenciais ozonizados como agentes antifúngicos é de extrema importância como proposta de tratamento, na tentativa de atender as demandas da saúde pública e ambiental, sendo esta uma alternativa viável e segura para combater enfermidades infecciosas, promovendo simultaneamente a preservação da saúde humana e do meio ambiente. O presente estudo se propõe a analisar de forma abrangente a eficácia dos óleos essenciais ozonizados e não ozonizados de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Pelargonium graveolens*. Por meio de uma investigação metódica, buscou-se não apenas contribuir para o desenvolvimento de terapias antifúngicas mais eficazes, mas também para o avanço do conhecimento científico em prol da saúde pública e da conservação ambiental.



2. Metodologia

Trata-se de uma pesquisa experimental e comparativa, cujo delineamento foi mera casualidade. Foi realizada no Laboratório de Bioprocessos do Instituto Federal do Tocantins (IFTO), Campus Araguaína–TO. O efeito da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Pelargonium graveolens* foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo em placas contendo poços, como descrito pelo M27- A2 (2002) para leveduras. A concentração inibitória mínima (CIM) é determinada após 24 horas. O antifúngico Fluconazol foi utilizado como controle positivo.

Os óleos essenciais foram adquiridos na FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda., empresa especializada na venda desses itens, conforme a tabela abaixo, com lotes de procedência conhecida e laudos técnicos, com especificidades que comprovam suas características físico-químicas dentro do padrão de aceitabilidade para os óleos, segundo a literatura e legislação. Os óleos, após aquisição, permaneceram sob refrigeração até o momento do uso, sendo colocados em temperatura ambiente laboratorial cerca de 30 minutos antes de se iniciarem os procedimentos de análises químicas e antifúngica.

2.1 Ozonização dos óleos

Os óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Pelargonium graveolens* receberam a ozonização por meio de difusão do O₃, administrado de forma direta no óleo conforme descrito a seguir.

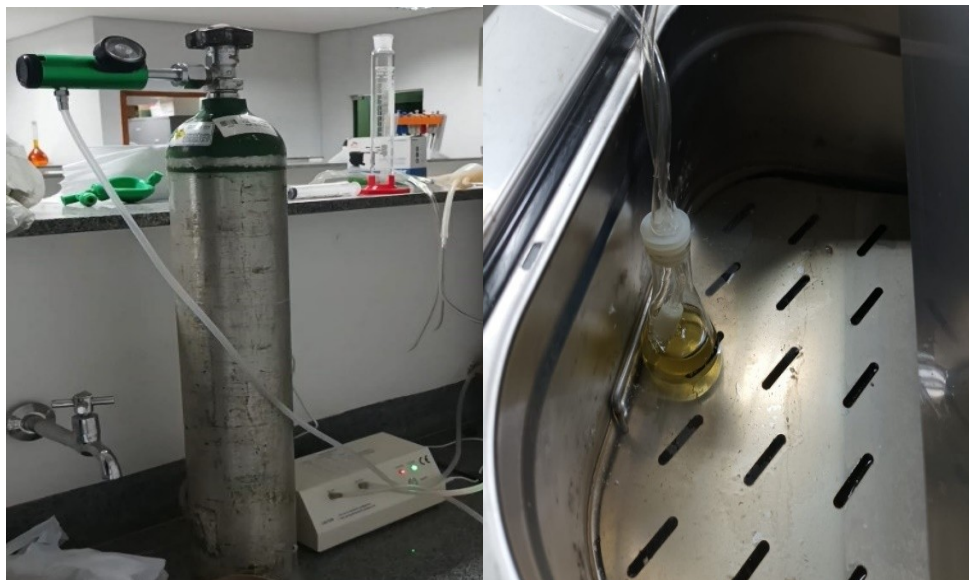


Figura 1 - Imagens da ozonização do óleo essencial. Fonte: Autor (2023).

A produção do ozônio foi realizada através de um aparelho gerador, cor branca, modelo MOG003, da marca Ozone Generator, que produz descargas elétricas sob O₂ medicinal (efeito Corona), proveniente de um cilindro industrial, da marca AIR GAS Health Solution, com especificações ONU 1072 oxigênio, comprimido 2.2 (5.1) e grau de concentração 99,5% vol., que abastece o aparelho, liberando o O₃ em uma concentração de 20 µg/ml, segundo as especificações do equipamento fornecido pela fabricante, que realiza a conversão de oxigênio medicinal em ozônio.

O gás rico O₃, produzido continuamente pelo aparelho numa taxa de 1/2 litro por minuto, é conduzido por um tubo de silicone para um difusor, que mergulhado no óleo vegetal ou óleo essencial é perfundido por 30 minutos. A temperatura dos óleos essenciais durante a perfusão foi controlada de 5°C com um banho ultratermotizado, com intuito de diminuir a perda por evaporação dos óleos essenciais, como exposto na Figura 1.



2.2 Caracterização química dos óleos

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

Nome Comum	Nome Científico	Nº CAS*	Lote	Cor	Densidade (20°C)	IR** (20°C)	Principais Componentes
Gerânio Egito	Pelargonium graveolens	90082-51-2	149	Amarelo a Esverdeado	0,8887	1,4654	Citronelol = 33,73% Geraniol = 15,35% Formiato de citronelila = 6,65% Linalol = 5,24% Formiato de geranila = 2,65% Isomentona = 6,16%
Melaleuca	Melaleuca alternifolia	68647-73-4	220	Incolor a Amarelo Palha	0,8952	1,4788	Terpinen-4-ol = 40,31% Gamma terpinene = 21,21% Alpha terpinene = 10,63% Cineol = 1% Tepinolene = 3,35% Alfa terpineol = 3,92% Alfa pineno = 2,76% Para cimeno = 2,20%
Cravo Botão	Eugenia caryophyllus	8000-34-8	226	Amarelo Claro a Castanho	1,0545	1,5337	Eugenol = 81,84% Acetato Eugenila = 9,66% Beta-cariofileno = 6,31% Alfa-humuleno = 2%

*Nº CAS: Chemical Abstracts Service

**IR: Índice de Refração. Fonte: FFERQUIMA Indústria e Comércio Ltda (2023).

2.3 Atividade Antifúngica

2.3.1 Linhagens fúngicas e meio de cultura

O ensaio antifúngico foi conduzido com fungos de estirpes padronizadas e provenientes de coleção internacional, de acordo com o método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de leveduras¹¹.

Tabela 2 - Cepas de fungos utilizadas nos ensaios antifúngicos.

Microorganismo	Referência	NB ⁴	Lote
Candida parapsilosis	ATCC® 22019™	2	726-64
Issatchenkia orientalis	ATCC® 6258™	2	227-52
Candida albicans	ATCC® 90028™	2	264-37
Candida tropicalis	ATCC® 750™	2	847-49

Fonte: Catálogo de Linhagens, Laboratório Microbiologics, INC., 2022.

⁴ NB = Nível de Biossegurança exigido para manipulação da linhagem



Os fungos, tabela 2, foram adquiridos no Laboratório Microbiologics, INC., o qual está licenciado a usar marcas de catálogo ATCC®, com laudos de autenticidade e de procedimentos (Anexo Y) e mantidas no laboratório do Bioprocesso do IFTO Campus Araguaína-TO, conforme recomendação do Microbiologics, INC., em meio de cultura Muelle Hinton. Para os ensaios, as suspensões dos fungos utilizados foram provenientes da primeira passagem (repique) das estirpes recebidas pelo laboratório do IFTO.

O meio de cultura utilizado foi o Ágar Sabouraud Dextrose, marca ION, Lote 0719/0354, cuja composição em um preparo de 65g/L: Dextrose: 40 g/L; Digestão peptídica de tecido animal: 5g/L; Digestão pancreática de caseína: 5 g/L; Ágar: 15 g/L; pH Final: 5.6 ± 0.2 a 25°C. O preparo do meio foi realizado conforme instruções descritas pelo fabricante, no qual foi necessário suspender 65g do meio em 1L de água destilada. Agitou-se adequadamente e dissolveu-se o meio por aquecimento e frequente agitação. Ferveu-se por 1 minuto até a completa dissolução. Esterilizou-se em autoclave a 118°C - 121°C por 15 minutos. Evitou-se o superaquecimento, pois facilitou-se a hidrólise dos componentes do meio. O meio preparado foi armazenado entre 8°C a 15°C e em seguida, levado para análises microbiológicas.



Figura 2 - Meios de cultura com ensaios antifúngicos dos microrganismos testados com os óleos essenciais. A: Cultura *Issatchenkia orientalis* ATCC® 6258™. B - Cultura *Candida parapsilosis* ATCC® 22019™. C – Cultura *Candida tropicalis* ATCC® 750™. D – Cultura *Candida albicans* ATCC® 90028™.

2.2.2 Análise fúngica dos óleos essenciais

O uso dos testes de atividade antifúngica “in vitro” é uma prática usual, inicialmente padronizada para uso com bactérias por Kirby e Bawer desde 1966, porém o uso em atividades fúngicas foi revisto e modificado por diversos autores. Atualmente são adotados métodos padronizados por diversos organismos como: NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, como Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras; à Terapia



Antifúngica; Approved Guideline”, norma M27-A2, 2002, que foi seguido realizando-se pequenas adaptações conforme discutidas abaixo.

Uma quantidade de 1ml de cada óleo essencial foi solubilizada em solução de Dimetil-Sulfoxido (DMSO) em água 1:1 e posteriormente diluída, obtendo respectivamente uma concentração de óleos de 4, 2, 1, 0,5 e 0,25%. Estes extratos diluídos foram submetidos aos testes fúngicos, em placas estéreis de 20x150mm, em que era depositado 1mL de solução fisiológica contendo microrganismos em suspensões (solução salina a 0,85%NaCl), padronizada pelo tubo 0,5 na escala de *Mac Farland*, ajustada para 90% transmitância (530nm). Em seguida, eram adicionados por placa 50mL de meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose, preparados segundo as normas do fabricante (ION), fundido a 50°C, utilizando a técnica “Pour Plate”, homogeneizadas pela técnica de “oito”^{12,13}. O processo de análise fúngica em sua totalidade foi aduzido em uma capela de exaustão da marca BSTEC, na tentativa de diminuir os perigos de aspiração, assim seguindo as normas internacionais de segurança¹⁴.

2.2.3 Análise Química dos óleos essenciais ozonizados e não ozonizados

A partir dos óleos de cravo botão, gerânio egito e melaleuca, ozonizados e não ozonizados, foram preparadas soluções de 20 mg/mL em acetato de etila. Essas amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás *Agilent Technologies 7890B*, hifenizado a um espectrômetro de massas (GC-MS) 5977B. O cromatógrafo operou com colunas capilares HP-5MS (5% Fenil Metil Siloxano), L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 µm e o gás de arraste utilizado foi o Hélio (99.999%) com fluxo de 1.2 mL/min. O GC-MS foi empregado com temperatura do injetor em 270°C, da *transfer line* em 250°C, do quadrupolo em 150°C e da fonte 230°C, com o fluxo da purga em 100 mL/min.

O modo de análise foi o *Split* em modo scan, com uma razão de divisão de 80:1 e uma varredura de 40 até 500 Da. O programa de temperatura do forno do GC foi definido inicialmente em 40°C por 2 min e aumentou em 5°C por minuto até 170°C, seguindo por um adicional de 25°C por minuto até 270°C, que foi mantido em isoterma por 3 minutos. No total as corridas duraram 35 minutos.

Os espectros de massa obtidos foram analisados em *software* da *Agilent*, *MSD ChemStation F.01.03.2357* e comparados com espectros presentes em Adams (2017), juntamente com o índice de similaridade. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma série homóloga de n-alcenos, C7 a C30, injetados no mesmo método das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz de 1963¹⁵.



Figura 3 - Cromatógrafo Gasoso com Espectrômetro de Massa (CG-EM), Universidade Federal Norte do Tocantins. Fonte: Autor (2023).

Após realização das análises cromatográficas, os valores determinados das áreas relativas de cada composto identificado, foram geradas tabelas em Excel que processaram essa matriz de dados e converteu-se para o formato ".csv" para o estudo estatístico em Análise de Agrupamento de Hierárquico (HCA), Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimo Quadrados



Parciais (PLS-DA). Para validação da estatística, foi utilizado o software online *MetaboAnalyst* 5.0, que possibilitou a geração de representações gráficas das matrizes de dados. Para normalização das áreas dos óleos ozonizados e não ozonizados de cravo botão, gerânio egito e melaleuca, utilizando como transformação de dados a escala de intervalo (range scaling).

3. Desenvolvimento e discussão

3.1 Atividade Fúngica

Este trabalho constituiu-se em uma avaliação da sensibilidade e ou resistência dos óleos essenciais de gerânio egito, melaleuca e cravo botão ozonizados e não ozonizados em diferentes concentrações frente a fungos conhecidos internacionalmente de coleção ATCC, utilizando a técnica de difusão em ágar.

A análise estatística por ANOVA (análise de variância), apresentou-se significativa para todas as possíveis variáveis empregadas. Verificou-se que existem médias com comportamentos idênticos ou aproximados dentro dos eventos, sugerindo-se que os óleos nas respectivas concentrações, ozonizados ou não, devem ser analisadas de duas a duas, utilizando o Teste de Tukey, chamado também de Teste de Amplitude Estudentizadas¹⁶.

Tabela 3 - Resultado da sensibilidade antifúngica dos óleos essenciais de Gerânio Egito, Cravo Botão e Melaleuca com óleos ozonizados.

Fungos	Ozonizado		
	<i>Pelargonium graveolens</i> (Gerânio Egito) Média ± Desvio Padrão (CIM)	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Melaleuca) Média ± Desvio Padrão (CIM)	<i>Eugenia caryophyllus</i> (Cravo Botão) Média ± Desvio Padrão (CIM)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019™	-	12.67± 1,21 ^{Ca} (2%)	22,83 ±3,25 ^{Ba} (1%)
<i>Candida albicans</i> ATCC® 90028™	12.6± 6,63 ^C (4%)	12.0± 4,83 ^{Ca} (2%)	19.67± 1,63 ^{Ba} (0,5%)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC® 750™	-	10.0± 1,58 ^{Ca} (4%)	18,17 ± 2,93 ^{Ba} (2%)



<i>Issatchenkia orientalis</i> ATCC® 6258™	-	10,0 ± 0,82 ^{Aa} (4%)	16,00 ± 4,19 ^{Ab} (1%)
---	---	-----------------------------------	------------------------------------

Todos os resultados positivos foram significativos quando utilizados o teste T em comparação com o Fluconazol, chamado de controle positivo, inclusive para as diluições ($p < 0,05$; IC:95%). Os ensaios para o líquido diluidor (solvente) não demonstraram inibição dos microrganismos testados. Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferem estatisticamente, a um nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Fonte: Resultados da pesquisa (2023).

Os resultados apresentados (Tabela 3 e 4), revelam que a ozonização dos óleos essenciais de gerânio egito, cravo botão e melaleuca, apontaram resultados significativos que demonstraram ser estatisticamente diferentes. O óleo ozonizado produz maior inibição do crescimento dos fungos que o óleo não ozonizado, quando comparado às médias dos halos de inibição. O óleo de cravo botão possui maiores halos de inibição que o óleo de melaleuca, sendo que a melaleuca possui maiores halos de inibição que o gerânio egito, quando comparado às médias dos comportamentos dos halos de inibição. Verificou-se que o óleo de cravo botão ozonizado foi mais efetivo para inibir o crescimento da *Candida parapsilosis* ATCC® 22019™ na diluição de 1%, e na menor diluição de 0,5% a *Candida albicans* ATCC® 90028™.

O óleo de gerânio egito ozonizado demonstrou-se pouco eficaz na maioria dos fungos, tendo ação inibitória apenas na diluição 4% na *Candida albicans* ATCC® 90028™.

Tabela 4 - Resultado da sensibilidade antifúngica dos óleos essenciais de Gerânio Egito, Cravo Botão e Melaleuca com óleos não ozonizados.

Fungos	Não Ozonizado			
	Pelargonium graveolens (Gerânio Egito) Média ± Desvio Padrão (CIM)	Melaleuca alternifolia (Melaleuca) Média ± Desvio Padrão (CIM)	Eugenia caryophyllus (Cravo Botão) Média ± Desvio Padrão (CIM)	Fluconazol 1mg/ml
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC® 22019™	-	-	20,33 ± 5,01 ^{BCab} (2%)	29,58 ± 1,44 ^{Aa}
<i>Candida albicans</i> ATCC® 90028™	-	-	14,17 ± 3,43 ^{Ca} (4%)	34,16 ± 4,62 ^{Aa}
<i>Candida tropicalis</i> ATCC® 750™	-	-	13,67 ± 1,97 ^{BCa} (4%)	33,08 ± 3,53 ^{Aa}
<i>Issatchenkia orientalis</i>	-	-	12,83 ± 5,23 ^{Ab}	12,5 ± 6,12 ^{Ab}



ATCC® 6258™			(2%)	
-------------	--	--	------	--

Todos os resultados positivos foram significativos quando utilizados o teste T em comparação com o Fluconazol, chamado de controle positivo, inclusive para as diluições ($p < 0,05$; IC:95%). Os ensaios para o líquido diluidor (solvente) não demonstraram inibição dos microrganismos testados. Médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferem estatisticamente, a um nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Quanto aos óleos essenciais não ozonizados, verificou-se nenhum efeito antifúngico para nenhuma diluição do gerânio egito e melaleuca. Para o óleo essencial de cravo botão não ozonizado a função antifúngica foi eficaz na diluição de 2% e 4% nas quatro diferentes amostras de fungos deste estudo. O fluconazol mostrou-se eficaz para todas as amostras utilizadas, demonstrando seu efeito antifúngico como já reconhecido por várias literaturas científicas.

3.2 **Análise Química dos óleos Essenciais**

3.2.1 **Análise Química do óleo essencial do Cravo botão.**

A identificação de compostos químicos nas amostras de óleo ozonizado e não ozonizado do cravo botão foi semelhante, em análise realizada por CG-MS, obtendo os compostos majoritários: Eugenol; m-eugenol; Acetato de eugenol; E-cariofileno; α -humuleno e Óxido de cariofileno. O composto α -humuleno no óleo essencial ozonizado apresentou concentração centesimal não detectável.

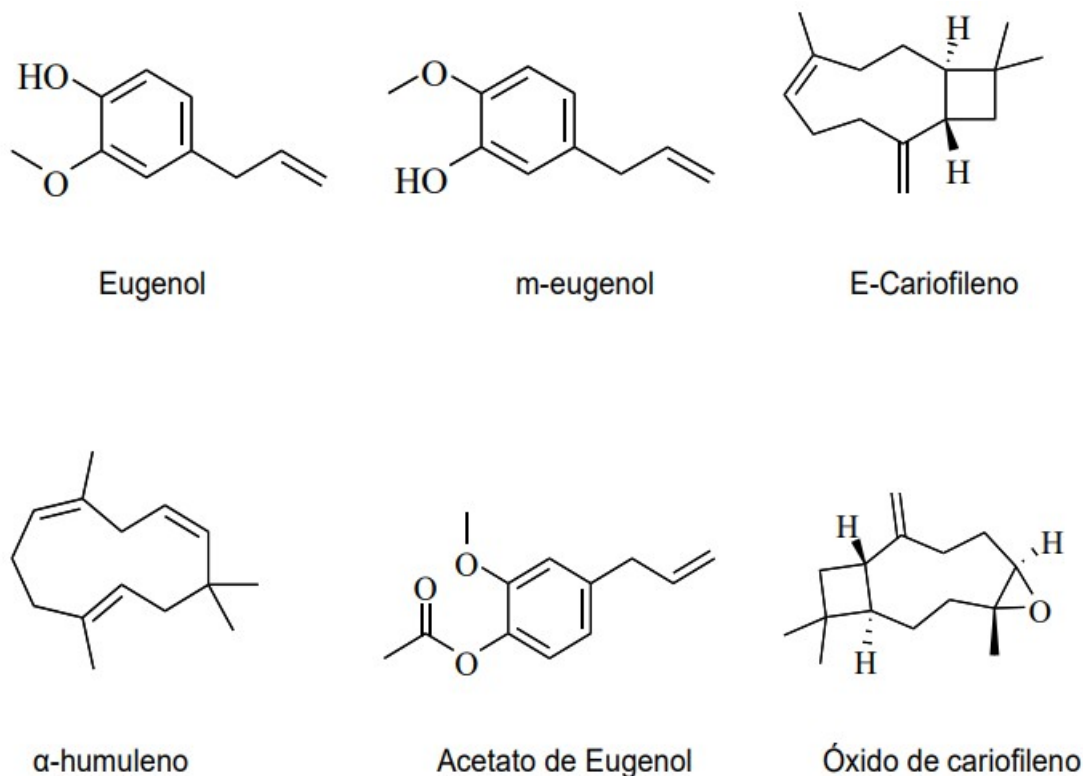


Figura 4 – Estrutura química dos compostos majoritários contido nos óleos essenciais de Cravo botão “Ozonizado” e “Não Ozonizado” Fonte: ChemDraw Professional 16.0 (2023).

Em seguida, é apresentado o cromatograma dos óleos de cravo botão, conforme a Figura 5, no qual se observa que o óleo "Não Ozonizado" é representado em preto, enquanto o óleo "Ozonizado" é destacado em azul. Adicionalmente, são indicados os principais compostos presentes em cada um dos óleos.

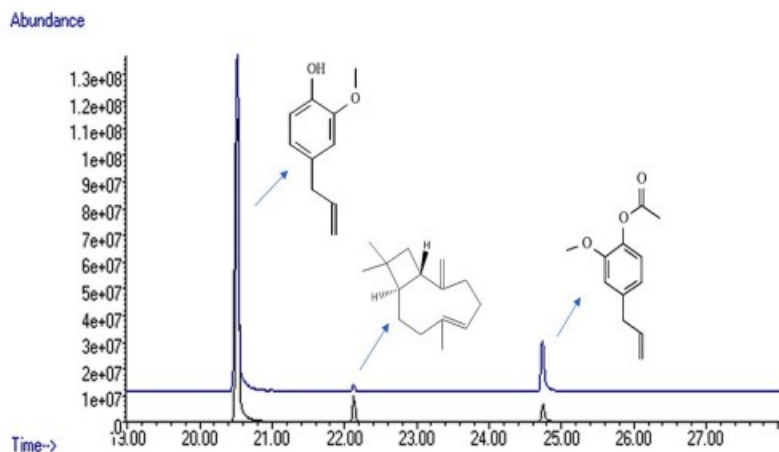


Figura 5 – Comparação dos óleos de cravo botão ozonizado e não ozonizado. Preto: não ozonizado; Azul: ozonizado. Fonte: Resultados da Pesquisa (2023).

Após serem identificados, os componentes foram quantificados utilizando a área sob os picos nos cromatogramas, conforme representado na Figura 5.

Tabela 5 - Identificação dos compostos presentes no óleo de cravo botão ozonizado e não ozonizado.

Nº	TR	Componente	IR _{exp}	IR _{lit}	% média das áreas dos picos		Ref.
					OCO	OCI	
1	20.529	Eugenol	1361	1356	85,35±0,98	86,32±1,35	Adams (2017)
2	21.002	m-eugenol	1379	-	0,56±0,33	0,44±0,06	Adams (2017)
3	22.134	E-Cariofileno	1423	1417	1,18±0,11	5,79±0,16	Adams (2017)
4	22.987	α-humuleno	1457	1452	-	0,30±0,03	Adams (2017)
5	24.749	Acetato de eugenol	1530	1521	11,72±0,52	7,01±1,10	Adams(2017)

6	26.111	Óxido de cariofileno	1588	1582	0,29±0,04	0,13±0,01	Adams (2017)
---	--------	----------------------	------	------	-----------	-----------	-----------------

Nº: ordenação dos compostos por eluição; TR: tempo de retenção dos compostos; IR_{exp}: Índice de retenção experimental; IR_{lit} = Índice de retenção da literatura; %: Área percentual dos compostos com base na normalização das áreas por GC-MS; OCO: óleo de cravo ozonizado; OCI: óleo de cravo não ozonizado; Ref: referência. Fonte: Resultados da pesquisa (2023).

Isso permitiu a detecção e análise de cada composto individual. Possibilitou também a determinação da quantidade relativa de cada composto químico nos óleos essenciais de Cravo botão, tanto o "Ozonizado" quanto o "Não Ozonizado". Os resultados da análise indicam que os óleos essenciais possuem composições diferentes em termos de proporções percentuais de seus componentes. Em outras palavras, a ozonização causa alterações na composição do óleo essencial, como detalhado na Tabela 5.

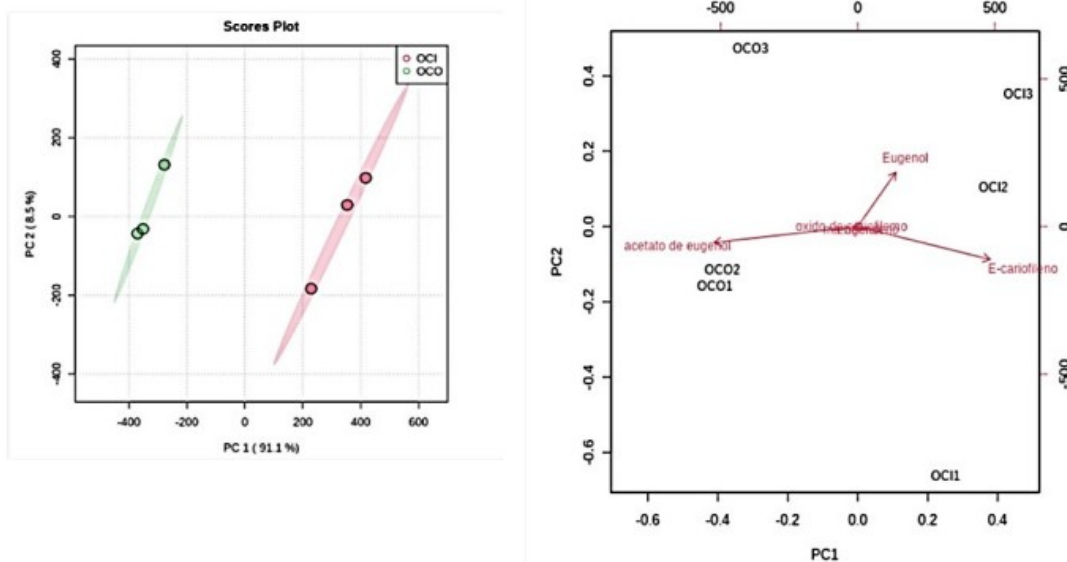


Figura 6 – Resultados da análise dos componentes principais – PCA do óleo essencial do cravo ozonizados e não ozonizado. A – Score dos valores entre os compostos selecionados, com valores das variâncias estendidas, Figura B – Plotagem do gráfico da dispersão central das análises dos componentes principais - PCA. Fonte: Resultados da Pesquisa (2023).

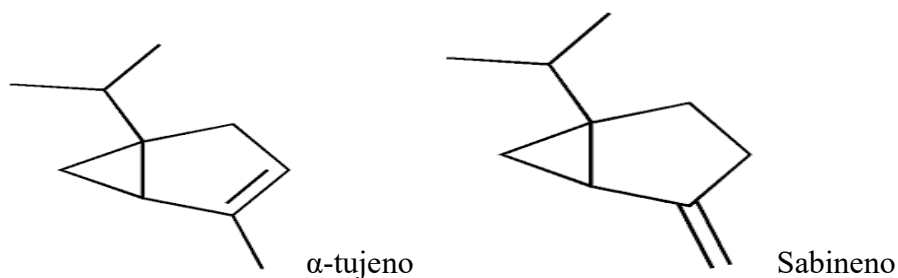
Ao analisar a média das áreas dos picos nos cromatogramas dos óleos essenciais "ozonizado" e "não ozonizado", que representam as análises percentuais de cada óleo, é



evidente que exibem proporções distintas. A ozonização não teve um efeito estatisticamente significativo na quantidade dos compostos eugenol e m-eugenol. Através da aplicação da análise multivariada de componentes principais (PCA), ficou evidente que o óleo essencial "Ozonizado" difere estatisticamente do óleo "Não Ozonizado" quando consideramos todos os compostos presentes. Isso é ilustrado na Figura 6 apresentada acima.

3.2.2 Análise Química do óleo essencial de Melaleuca.

A identificação de compostos químicos nas amostras de óleo ozonizado e não ozonizado de Melaleuca foi semelhante, em análise realizada por CG-MS, obtendo os compostos majoritários: Triciclono; α -tujeno; Sabineno; β -pineno; Mirceno; α -felandreno; α -terpineno; o-cimeno; Limoneno; 1,8-cineol; γ -terpineno; Isoterpinoleno; Cis-p-ment-2-en-1-ol; Trans-p-ment-2-en-1-ol; Trans-sabinol; e Terpinen-4-ol; α -terpineol; cis-acetato de crisantenila; α -gurjuneno; aromandendreno; aloaromadendreno; γ -gurjuneno; β -cis-guaieno; δ -cadinene.



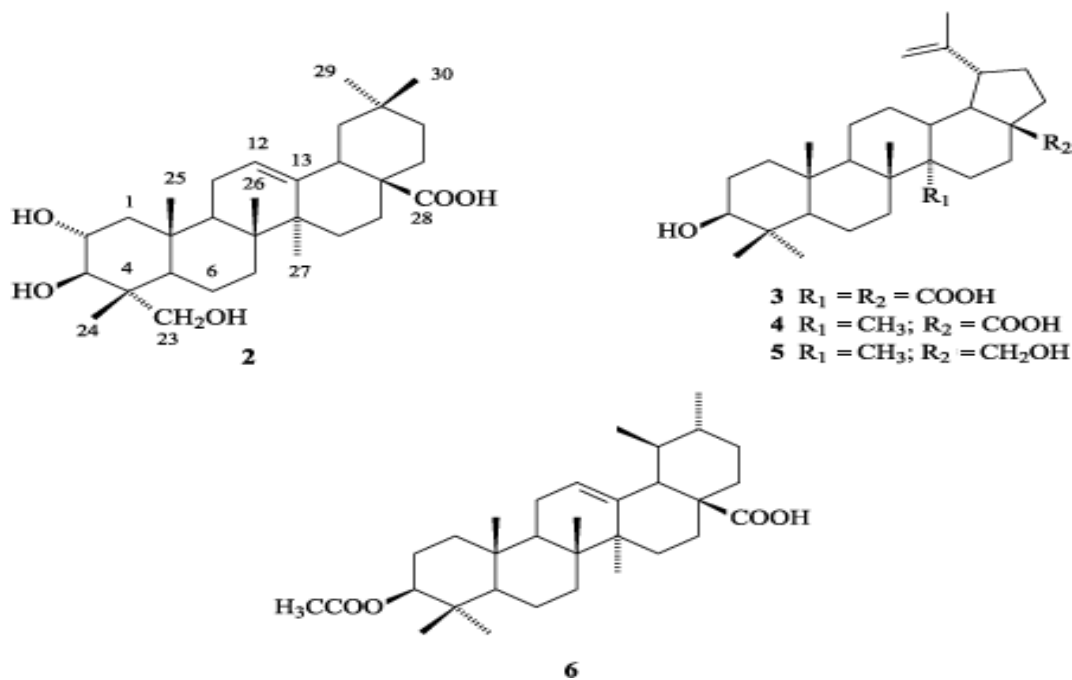


Figura 7 – Estrutura química dos compostos majoritários contido nos óleos essenciais de Melaleuca “Ozonizado” e “Não Ozonizado”. Fonte: ChemDraw Professional 16.0 (2023).

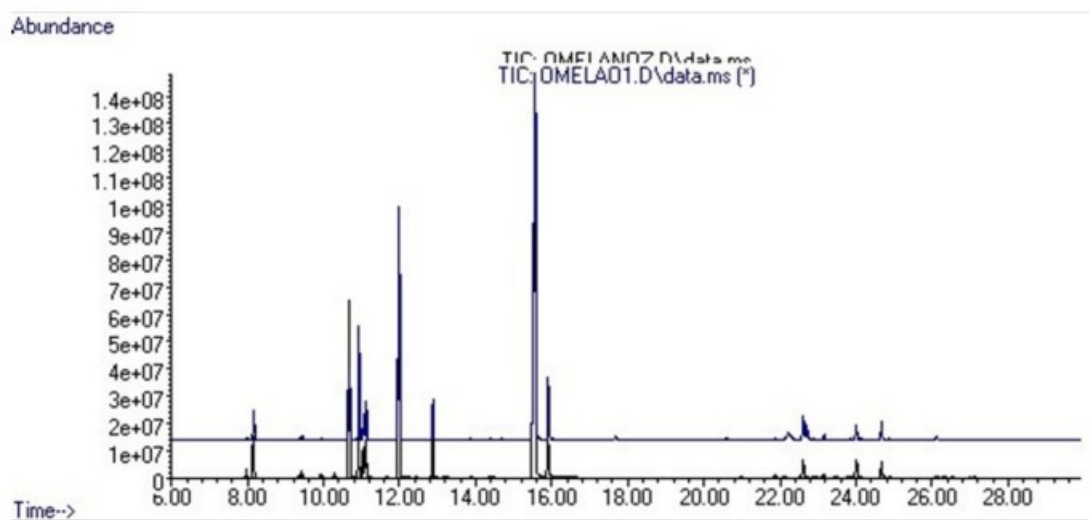


Figura 8 – Comparação dos cromatogramas do óleo de melaleuca ozonizado (azul) e não ozonizado (preto). Fonte: Resultados da Pesquisa (2023).



Os resultados da análise indicam que os óleos essenciais possuem composições diferentes em termos de proporções percentuais de seus componentes. Em outras palavras, a ozonização causa alterações na composição do óleo essencial, como detalhado na Tabela 6.

Tabela 6 – Identificação dos compostos presentes no óleo de melaleuca ozonizado e não ozonizado

TR	Composto	IR _{exp}	IR _{lit}	média das áreas (%)		IS (%)
				M1	M2	
7.990	triciclono	919	921	0,45±0,05	0,26±0,03	78,9
8.167	?-tujeno	925	924	2,70±0,07	2,10±0,10	89,9
9.378	Sabineno	968	969	0,23±0,02	0,21±0,02	91,9
9.447	?-pineno	970	974	0,41±0,01	0,39±0,03	87,2
9.948	Mirceno	988	988	0,24±0,02	0,27±0,01	83,2
0.308	?-felandreno	1000	1002	0,27±0,02	0,14±0,02	83,4
10.685	?- terpineno	1013	1014	12,58±0,02	5,00±0,11	89,6
10.931	?-cimeno	1021	1022	2,55±0,03	8,50±0,16	94,0
11.054	Limoneno	1025	1024	1,90±0,02	1,91±0,04	86,2
11.128	1,8 – cineol	1028	1026	2,69±0,02	3,12±0,02	93,4
11.994	?-terpineno	1057	1054	21,51±0,35	19,26±0,17	92,8
12.877	Isoterpinoleno	1086	1085	3,82±0,02	2,96±0,07	92,4
13.867	Cis-p-ment-2-em-1-ol	1120	1118	-	0,19±0,02	80,8
14.411	Trans-pment-2-em-1-ol	1139	1136	-	0,20±0,02	79,6
14.690	Trans-sabinol	1149	1137	-	0,19±0,02	72,7
15.569	Terpinen-4-ol	1179	1174	41,86±0,32	43,99±0,55	84,9
15.911	?-terpineol	1191	1186	4,25±0,37	4,76±0,18	93,9
17.688	Cis-acetato de crisantenila	1255	1261	-	0,50±0,03	78,7
21.880	?-gurjuneno	1413	1409	0,16±0,01	0,27±0,01	88,2
22.617	Aromandendreno	1442	1439	1,14±0,03	2,04±0,03	90,8
23.164	Aloaromadendreno	1464	1458	0,23±0,01	0,53±0,03	91,6
23.469	?-gurjuneno	1477	1475	0,18±0,01	0,15±0,01	84,3
24.008	?-cis-guaieno	1499	1492	1,66±0,02	1,44±0,11	85,0
24.675	?-candinese	1522	1522	1,18±0,03	1,62±0,03	84,2

Fonte – Resultados da pesquisa (2023).

Ao analisar-se a média das áreas dos picos nos cromatogramas dos óleos essenciais de melaleuca "ozonizado" e "não ozonizado", que representam as análises percentuais de cada óleo, é evidente que exibem proporções distintas.

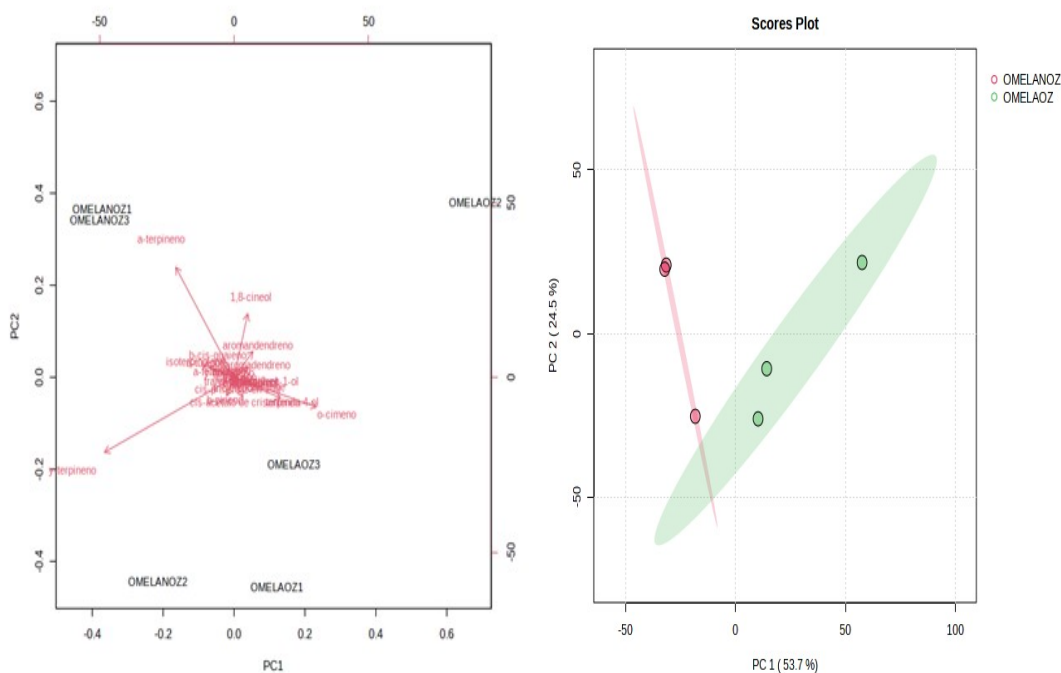


Figura 9 – Resultados das análises dos componentes principais. A - PCA do óleo essencial de Melaleuca “Ozonizado” e “Não Ozonizado”. B - Score dos valores entre os compostos selecionados com valores das variâncias estendidas e Plotagem do gráfico da dispersão central das análises dos componentes principais - PCA. Fonte: Resultados da pesquisa (2023).

3.2.3 Análise Química do óleo essencial de Gerânio egito.

A identificação de compostos químicos nas amostras de óleo ozonizado e não ozonizado de gerânio egito foi semelhante, em análise realizada por CG-MS, obtendo os compostos majoritários: α -pineno; terpinoleno; cis-óxido de rosa; trans-óxido de rosa; Mentona; isomentona; isomentol; α -terpineol; (4E)-decenal; Citronellol; trans-acetato de crisantenila; acetato de linalol; geraniale; formato de citronelila; acetato de terpinen-4-ol; α -cubebeno; acetato de citronelila; α -ilangeno; acetato de geraniale; β -bourboneno; (E)-cariofileno; 6,9-guaiadieno; α -neocloveno; humuleno; aloaromadendreno; γ -

gurjuneno; germacreno D; δ -selineno; β -guaiano; trans-murolo-4(14),5-dieno; γ -amorfeno; valenceno; trans- β -guaiano; δ -amorfeno; γ -cadineno; δ -cadineno; butanoato de citronelila; α -agarofurano; germacreno B; (E)-nerolidol; espatulenol; 2-fenil etil tigelato; óxido de cariofileno; di-epi-1,10-cubenol; γ -eudesmol; cis-cadin-4-en-7-ol; hinesol; khusilal

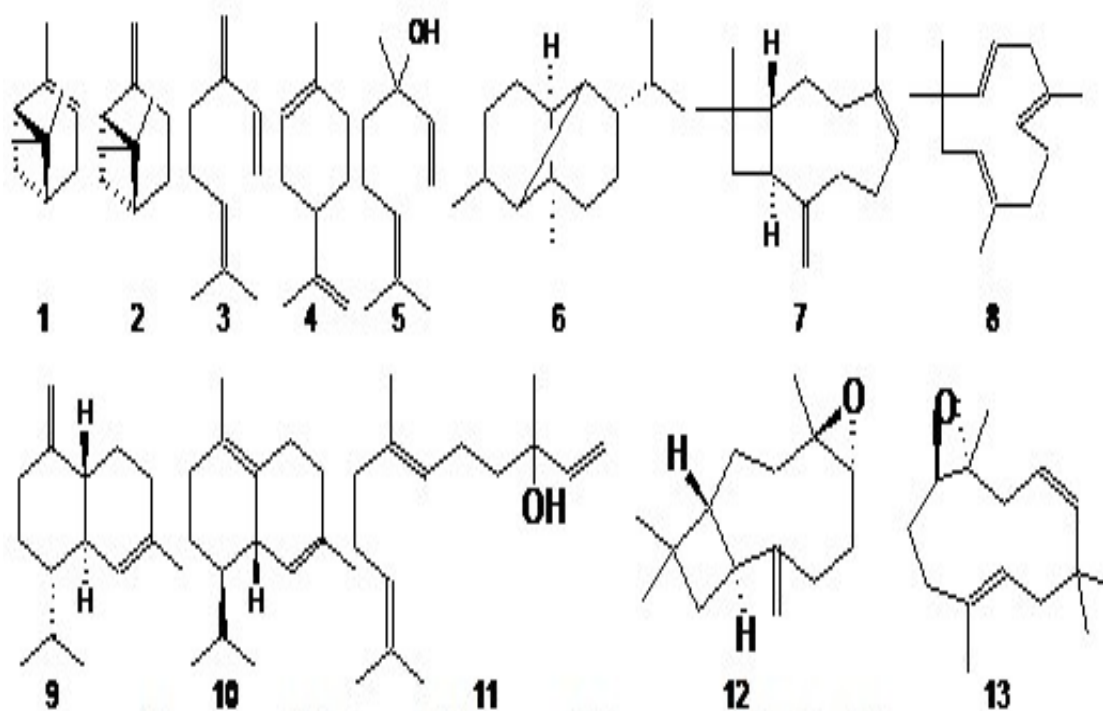


Figura 10 – Estrutura química dos compostos majoritários contido nos óleos essenciais de Gerânio egito “Ozonizado” e “Não Ozonizado”. Fonte: ChemDram Professional 16.0 (2023).

No cromatograma dos óleos de gerânio, conforme a figura 10, observa-se que o óleo "Não Ozonizado" é representado em preto, enquanto o óleo "Ozonizado" é destacado em azul.

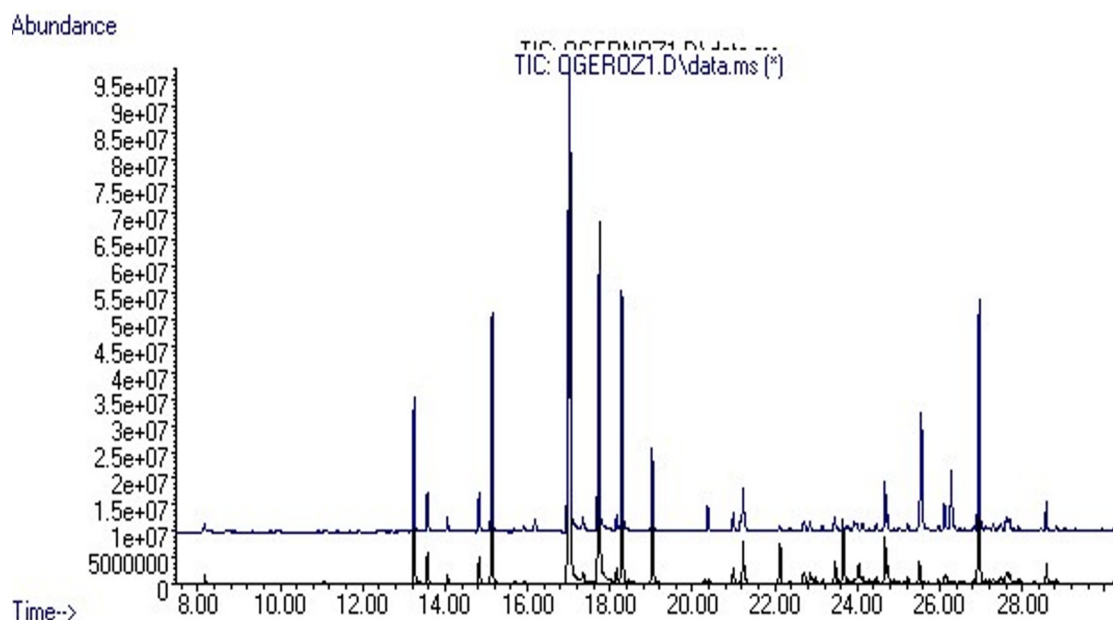


Figura 11 – Comparação dos cromatogramas do óleo de gerânio egito ozonizado (azul) e não ozonizado (preto). Fonte: Resultados da pesquisa (2023).

Os resultados da análise indicam que os óleos essenciais possuem composições diferentes em termos de proporções percentuais de seus componentes. Em outras palavras, a ozonização causa alterações na composição do óleo essencial, como detalhado na Tabela 7.

Tabela 7 - Identificação dos compostos presentes no óleo de gerânio egito ozonizado e não ozonizado.

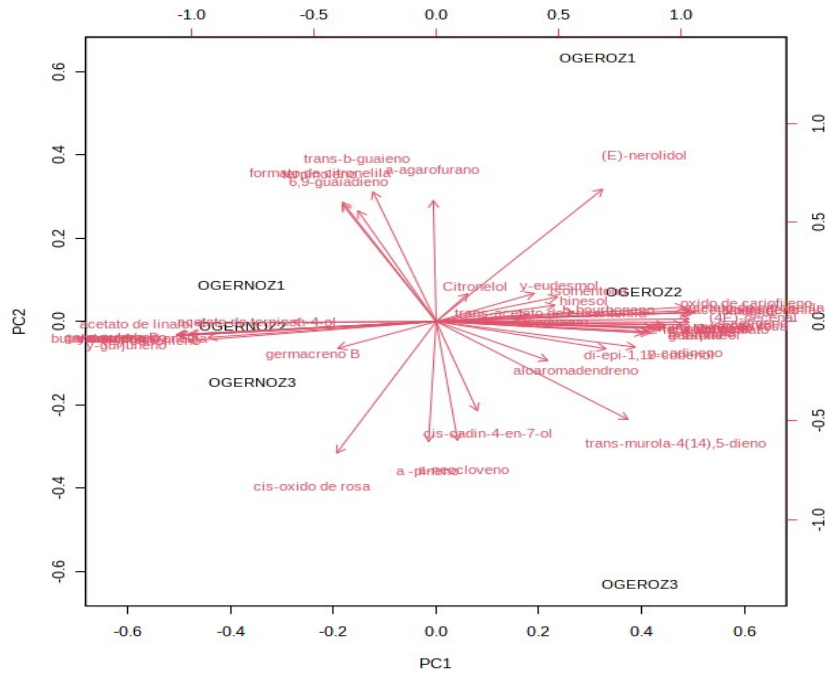
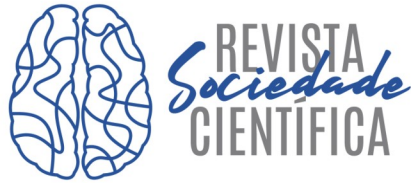
TR	Composto	IR _(exp)	IR _(lit)	Média das áreas (%)		
				G1	G2	S (%)
8.168	α -pineno	925	932	0,34±0,03	0,44±0,03	89,1
13.245	terpinoleno	1099	1086	4,91±0,06	4,90±0,09	84,3
13.571	cis-óxido de rosa	1110	1106	1,13±0,05	1,43±0,04	88,9
14.063	trans-óxido de rosa	1127	1122	0,35±0,02	0,54±0,01	92,5
14.826	Mentona	1154	1148	1,02±0,04	1,45±0,03	96,7
15.138	isomentona	1164	1158	6,75±0,04	8,34±0,01	95,3
15.689	isomentol	1183	1179	-	0,18±0,01	85,0
15.914	α -terpineol	1191	1186	0,17±0,01	0,26±0,02	87,3
16.182	(4E)-decenal	1201	1196	-	0,55±0,02	71,2
17.019	Citronellol	1231	1223	29,94±0,24	24,65±0,27	94,4
17.347	trans-acetato de crisantenila	1243	1235	0,70±0,01	0,72±0,01	84,3
17.732	acetato de linalol	1256	1254	15,88±0,26	11,14±0,17	79,8
18.168	geranial	1272	1264	0,51±0,01	0,56±0,01	84,4



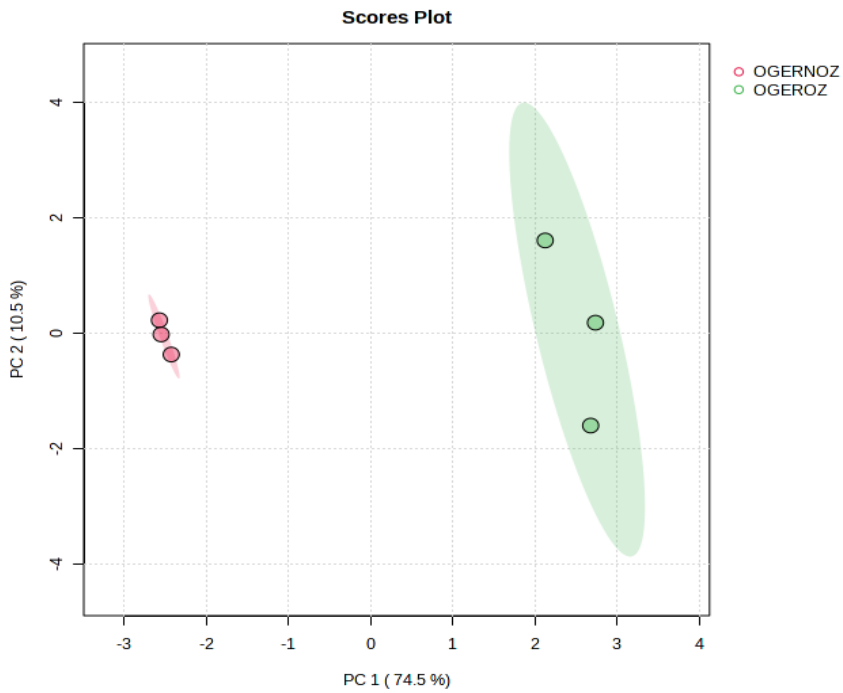
18.297	formato de citronelila	1277	1271	9,01±0,09	8,93±0,05	93,0
19.029	acetato de terpinen-4-ol	1303	2999	3,25±0,02	3,20±0,03	80,5
20.303	α-cubebeno	1352	1348	0,14±0,00	-	73,6
20.391	acetato de citronelila	1355	1350	0,20±0,01	0,95±0,02	76,1
20.999	α-ilangeno	1378	1373	0,57±0,02	0,72±0,01	89,8
21.176	acetato de geranial	1385	1379	-	0,37±0,01	72,0
21.238	β-bourboneno	1388	1387	1,88±0,06	1,97±0,01	93,5
22.119	(E)-cariofileno	1422	1417	1,56±0,04	0,29±0,02	84,2
22.710	6,9-guaiadieno	1446	1442	0,73±0,01	0,77±0,04	86,6
22.857	α-neocloveno	1452	1452	0,61±0,02	0,61±0,07	85,1
22.982	humuleno	1457	1452	0,34±0,01	-	90,5
23.164	aloaromadendreno	1465	1458	0,21±0,01	0,26±0,04	90,2
23.465	γ-gurjuneno	1477	1475	1,08±0,02	0,63±0,01	83,6
23.665	germacreno D	1485	1480	2,54±0,01	-	94,5
23.719	δ-selineno	1487	1492	-	0,20±0,01	83,6
23.791	β-guaieno	1490	1492	0,22±0,01	0,27±0,01	78,7
23.933	trans-murola-4(14),5-dieno	1495	1493	-	0,62±0,02	79,1
23.993	γ-amorfenos	1498	1495	-	0,3	81,8
24.044	valenceno	1500	1496	1,30±0,01	8±0,00	86,8
24.127	trans-β-guaieno	1504	1502	0,39±0,00	0,49±0,01	78,6
24.290	δ-amorfenos	1510	1511	0,22±0,00	-	85,8
24.460	γ-cadineno	1518	1513	0,36±0,01	0,42±0,01	87,4
24.675	δ-cadineno	1527	1522	1,80±0,04	1,85±0,02	83,5
24.744	butanoato de citronelila	1530	1530	0,73±0,01	0,61±0,00	90,6
25.233	α-agarofurano	1551	1548	0,26±0,01	0,39±0,01	81,6
25.512	germacreno B	1562	1559	0,90±0,00	-	77,6
25.558	(E)-nerolidol	1564	1561	-	5,94±0,11	82,7
25.972	espatulenol	1585	1577	0,14±0,03	0,26±0,01	86,7
26.121	2-fenil etil tiralato	1588	1584	0,63±0,11	1,21±0,05	81,9
26.280	óxido de cariofileno	1595	1582	-	2,72±0,11	75,8
26.837	di-epi-1,10-cubenol	1621	1618	0,14±0,02	0,19±0,02	78,5
26.957	γ-eudesmol	1626	1630	8,60±0,11	9,37±0,05	88,2
27.127	cis-cadin-4-en-7-ol	1634	1635	0,19±0,01	0,21±0,01	81,1
27.299	hinesol	1642	1640	0,28±0,28	0,34±0,01	86,6
27.488	khusilal	1651	1647	-	0,66±0,02	80,6

TR: tempo de retenção dos compostos; IR_(exp): Índice de retenção experimental; IR_(lit) = Índice de retenção da literatura; %: Área percentual dos compostos com base na normalização das áreas por GC-MS; G1: óleo de gerânio não ozonizado; G2: óleo de gerânio egito ozonizado; IS (%): índice de similaridade. Fonte: Resultados da pesquisa (2023).

Ao analisarmos a média das áreas dos picos nos cromatogramas dos óleos essenciais "ozonizado" e "não ozonizado", que representam as análises percentuais de cada óleo, é evidente que exibem proporções distintas.



A



B

Figura 12 – Resultados das análises dos componentes principais - PCA do óleo essencial de Gerânio “Ozonizado” e “Não Ozonizado” b. Figura A e B respectivamente: Score dos valores entre os compostos selecionados com valores das variâncias estendidas e Plotagem do gráfico da dispersão central das análises dos componentes principais - PCA. Fonte: Resultados da Pesquisa (2023).

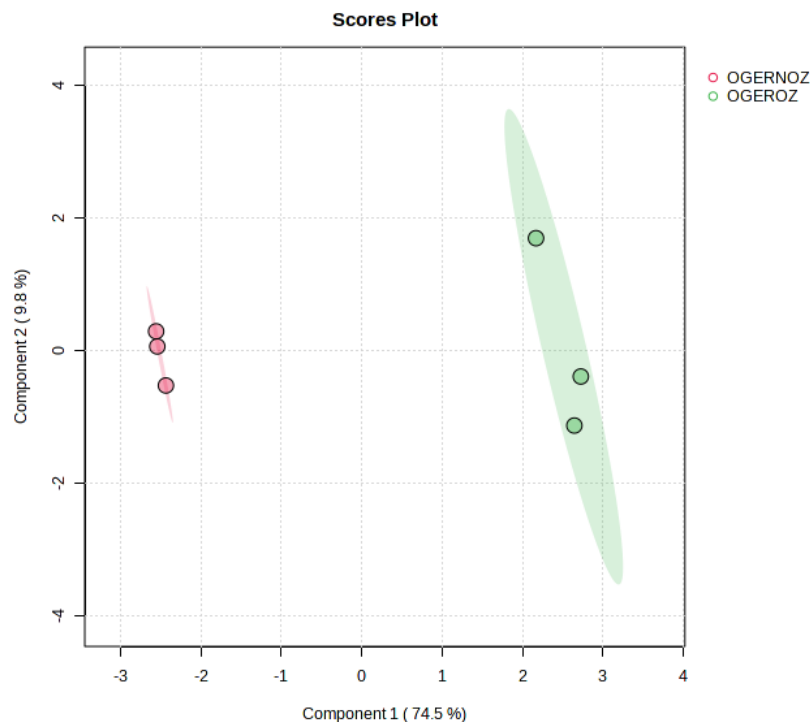


Figura 13 – Score dos valores entre os compostos selecionados com valores das variâncias estendidas. Fonte: Resultados da Pesquisa (2023).

Inicialmente verificou-se que o óleo essencial ozonizado tem um efeito antifúngico mais eficaz que o óleo não ozonizado. Estudos têm demonstrado que a ozonização pode aumentar significativamente a atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra diferentes patógenos, incluindo fungos. Por exemplo, a ozonização do óleo essencial de *Origanum vulgare* resultou em um aumento significativo da atividade antifúngica contra *Candida albicans*. De forma semelhante, a ozonização do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* levou a um aumento na atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum*¹⁷.

O óleo ozonizado produz maior inibição do crescimento das leveduras que o óleo não ozonizado, quando comparado às médias dos halos de inibição, sendo os



valores destas de 5,236^{a1} e 2,722^{a2}, respectivamente (DMS-Diferença Média Significativa: 0,587095107980051; r-repetições=360; EP - Erro Padrão: 0,211423; ANOVA, Tukey; P<0,05; IC:95%).

O óleo de cravo botão apresentou maiores halos de inibição que óleo de melaleuca, sendo que a melaleuca possui maiores halos de inibição que o gerânio egito, quando comparado às médias dos comportamentos dos halos de inibição, sendo 7,375^{a1}; 3,508^{a2} e 1,054^{a3} respectivamente (DMS: 0,860416338319318; r=240; EP: 0,25895; ANOVA, Tukey; P<0,05; IC:95%). Nisto o cravo botão foi melhor que o de melaleuca, o qual foi melhor que o gerânio egito.

A média do tamanho dos halos de inibição do crescimento das leveduras durante o ensaio de difusão em ágar manteve uma correspondência direta para as concentrações utilizadas nos ensaios até uma concentração de 0,5% dos óleos essenciais diluídos no solvente, com resultado médio de 9,79mm^{a1} para 4%; 6,53mm^{a3} para 2%; 2,69mm^{a2} para 1%. Já a concentração de 0,5% obteve um halo médio de 0,89mm^{a1}, enquanto para 0,25% a média foi de 0,0mm, revelando um comportamento idêntico estatisticamente (DMS: 0,334299675235212; r=144; EP: 0,3342997; ANOVA, Tukey; P<0,05; IC:95%).

Segundo alguns autores pesquisados, verificou-se que dentre os óleos essenciais estudados cientificamente, destacam-se os óleos de *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia* e *Pelargonium graveolens*, que apresentam alta eficácia contra diferentes espécies de fungos, incluindo *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Issatchenkia orientalis*. Desse modo, os estudos de Silva, no ano de 2021, demonstraram que o óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* é composto principalmente por eugenol, um composto fenólico com atividade antifúngica, o que corrobora com o achado cromatográfico realizado no presente estudo¹⁸.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* apresenta atividade significativa contra várias espécies de candida e outras leveduras,



inclusive as que são resistentes aos antifúngicos convencionais, sendo afirmativo o achado encontrado na pesquisa com óleo essencial de cravo botão não ozonizado e ozonizado. Reforçando o entendimento de que o óleo de cravo botão é um eficaz antifúngico, HSU *et al.*, no ano de 2021, relataram em seus estudos que o eugenol é responsável pela atividade antifúngica do óleo essencial de cravo, atuando diretamente na membrana celular dos fungos e inibindo a síntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica. Além disso, o eugenol também inibe a produção de enzimas essenciais para a sobrevivência dos fungos, como a quitina sintase, inibindo assim o crescimento e a proliferação desses microrganismos¹⁹.

O segundo óleo essencial ozonizado foi o de *Melaleuca alternifolia*. Ele mostrou-se eficaz como antifúngico, segundo as pesquisas, conforme a cromatografia e corroborando com a afirmativa^{20,21,22}, aduzem que a composição química do óleo essencial pode variar, mas geralmente é composto principalmente por monoterpenos, com terpinen-4-ol como o principal composto bioativo responsável pela atividade antifúngica. Além disso, a proporção de terpinen-4-ol em relação aos demais compostos do óleo essencial também pode influenciar a atividade antifúngica.

Os pesquisadores²³ investigaram a composição química do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* e sua atividade antifúngica. Um estudo identificou o geraniol como o principal componente do óleo essencial de gerânio e mostrou que este composto exibiu atividade antifúngica contra *Candida albicans* e outras cepas de candida em concentrações tão baixas quanto 0,125%. Outro estudo comparou a atividade antifúngica do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* com a do fluconazol, um antifúngico sintético amplamente utilizado. Os resultados mostraram que o óleo essencial de gerânio foi tão eficaz quanto o fluconazol contra *Candida albicans* e *Candida glabrata* em concentrações de 0,25% e 0,125%, respectivamente²⁴. Além disso, estudos também sugerem que o óleo essencial de gerânio pode inibir a formação de biofilmes fúngicos, o que pode aumentar a eficácia do tratamento antifúngico²⁵.



Mesmo com toda literatura científica pesquisada, e corroborando com alguns autores acima, encontrou-se na pesquisa uma atividade antifúngica de baixíssima eficácia, em que não houve formações de halos de inibição de forma satisfatória, com exceção do óleo essencial de gerânio egito ozonizado diluição 4% contra a *Candida albicans* apenas.

Evidenciou-se no estudo que o óleo essencial não ozonizado de melaleuca e de gerânio egito foram ineficazes na inibição dos microrganismos, uma vez que eles não produziram halos de inibição para nenhuma das quatro leveduras analisadas. Já o óleo essencial de cravo obteve atividade inibitória dos microrganismos. No tocante a ozonização, o óleo essencial de cravo apresentou uma maior atividade do que o não ozonizado, que inibiu somente com diluições maiores.

O óleo de cravo botão ozonizado foi mais efetivo para inibir o crescimento da *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida albicans* ATCC 90028, quando comparado ao tamanho do halo de inibição, entretanto o primeiro precisou de uma diluição de 1% e o segundo 0,5%. Quando comparado à levedura de *Candida tropicalis* ATCC 750 com a *Isatchenkia orientalis* ATCC 6258, são estatisticamente idênticas as inibições, quanto ao tamanho do halo.

A ozonização do óleo essencial de melaleuca obteve, estatisticamente, a mesma atividade para todos os microrganismos testados. O óleo de gerânio egito ozonizado com diluição de 4% foi o único que demonstrou ter atividade antifúngica, ocasionando um halo de inibição na *Candida albicans*, estaticamente comparável ao halo de inibição do óleo essencial de melaleuca nesta mesma levedura.

A elevada concentração dos óleos gerou níveis mais intensos de inibição nos inóculos, contribuindo para a determinação da concentração mínima inibitória. Os resultados evidenciaram que o óleo de cravo ozonizado apresentou maior eficácia inibitória em comparação com o não ozonizado. Este estudo, por conseguinte,



estabelecerá uma fundamentação para futuras investigações relacionadas ao tema, sendo ainda prevista a realização de um estudo *in vivo*.

4. **Considerações finais**

O estudo revelou que os óleos essenciais não ozonizados de melaleuca e gerânio do Egito não foram eficazes na inibição dos microrganismos testados, enquanto o óleo essencial de cravo apresentou atividade inibitória. A ozonização do óleo de cravo resultou em maior eficácia na inibição dos microrganismos em comparação com o não ozonizado, especialmente contra *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*. O óleo de *gerânio do Egito* ozonizado a 4% mostrou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, e o óleo de *melaleuca* ozonizado e não ozonizado, sendo que esta não apresentou nenhuma resposta inibitória. A concentração elevada dos óleos essenciais contribuiu para determinar a concentração mínima inibitória. Esses resultados estabelecem uma base para futuras investigações, incluindo estudos *in vivo*.

5. **Declaração de direitos**

O(s)/A(s) autor(s)/autora(s) declara(m) ser detentores dos direitos autorais da presente obra, que o artigo não foi publicado anteriormente e que não está sendo considerado por outra(o) Revista/Journal. Declara(m) que as imagens e textos publicados são de responsabilidade do(s) autor(s), e não possuem direitos autorais reservados a terceiros. Textos e/ou imagens de terceiros são devidamente citados ou devidamente autorizados com concessão de direitos para publicação quando necessário. Declara(m) respeitar os direitos de terceiros e de Instituições públicas e privadas. Declara(m) não cometer plágio ou auto plágio e não ter considerado/gerado conteúdos falsos e que a obra é original e de responsabilidade dos autores.

6. **Referências**

1. Nascimento, A.; Prade, A. C. K. Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais. *Observa PICS*, n. 2, p. 1-33, 2020.
2. Budke, R. C. K.; Paludo; R.P.; Milezzi, A. F. Avaliação do efeito fungicida do óleo essencial de folha de cravo-da-índia (*eugenia caryophyllata*) e eugenol



- contra o fungo *fusarium solan*. Anais da XIII Mostra de Iniciação Científica do IFCCampus Concórdia, ISSN 2317-8671.v. 13 n. 1, 2023.
3. Zanchettin, M. Efeito antifúngico de óleos essenciais isolados e combinados frente a fungos filamentosos. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2021.
 4. Oliveira, R. K. B De; Sarmiento, A. M. M. F. O uso dos óleos essenciais de gerânio e junípero no rejuvenescimento facial. Revista Diálogos em Saúde, v. 2, p. 38-52, 2019. Disponível em: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:rc4MFYk6vIUJ:https://periodicos.iesp.edu.br/index.php/dialogosemsaude/article/download/240/213+&cd=2&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 26 mar. 2023.
 5. Rocha, L. Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global. Fiocruz, nov. 2019
 6. Araújo, L. F. Plantas medicinais no controle de fungos patogênicos humanos. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Patos de Minas, MG, p.55, 2018.
 7. Cutrim, E. S. M. *et al.* Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante dos Óleos Essenciais e Extratos Hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim). Rev. Virtual Quím, v. 11, n. 1, p. 60-81, jan. 2019.
 8. Guidoni, M. *et al.* Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 52, n. 2, 2019.
 9. Marcolina, M. Óleos essenciais: estudo de extração e atividade antimicrobiana. 41 f. Monografia (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2021.
 10. Lima, M. J. A.; Felix, E. P.; Cardoso, A. A. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. Quim. Nova, v. 44, n. 9, p. 1151-1158, 2021.



11. NCCLS, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
12. Mc Ginnis, M. R. Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, New York. p. 643. 1980.
13. Bauer, A. W. Teste de suscetibilidade a antibióticos por um método padronizado de disco único. American Journal Clinical Pathology. v. 45, n. 4, p. 493. 1966.
14. Kume, J. E. P. Efeito de óleos essenciais in natura e ozonizados sobre o desenvolvimento de fungos patogênicos. 92 f. Dissertação (mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Brasil, Fernandópolis, SP, 2020.
15. Van Den Dool, H; Kratz, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. Journal Chromatography A. v. 11, p. 463-471, 1963.
16. Motta, V. T. Bioestatística. 2. ed. Caxias do Sul. Editora EDUCS, p. 127-134. 2006.
17. Pinheiro, E. O. *et al.* Identificação genotípica e fenotípica de leveduras de importância clínica para autenticação em banco de dados de leveduras de Instituição Militar de Saúde. 2019. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/asa/article/view/46260/30434>. Acesso em: 14 abr. 2023.
18. Silva, W. R. da. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos vegetais in natura e ozonizados em *Acinetobacter baumannii*. Universidade Brasil, São Paulo, 2021.
19. Hsu, H.; Sheth, C. C.; Veses, V.. Herbal extracts with antifungal activity against *Candida albicans*: A systematic review. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, v. 21, n. 1, p. 90-117, 2021.



20. Peña, G. A. *et al.* Host-guest inclusion complexes of natural products and nanosystems: applications in the development of repellents. *Molecules*, v. 27, n. 8, p. 2519, 2022.
21. Wani, A. R. *et al.* An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, v. 152, p. 104620, 2019.
22. Altiner, A.; Bilal, T. *Essential Oils and Their Antimicrobial Effects*. All Rights Reserved It may not be reproduced in any way without the written permission of the publisher and the editor, except for short excerpts for promotion by reference. ISBN: 978-625-7799-69-0 1st Edition, 2023.
23. De Jesus, G.; Toreli, J. D. Efeitos antimicrobianos dos extratos de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry aplicados à saúde, indústria e agricultura. *Atas de Saúde Ambiental-ASA*, v. 7, p. 113-113, 2019.
24. De Paiva, L. F. Combinado com nistatina frente à leveduras de cavidade oral. 2017. Disponível em:
http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/331040/1/De%20Paiva_LuizFrancisley_D.pdf. Acesso em: 14 abr. 2023.
25. Zuzarte, M. *et al.* Are natural products an alternative therapy for dermatophytosis? In: *Dermatophytes and Dermatophytoses*. Springer. p. 473-519. 2021.