



ISSN: 2230-9926

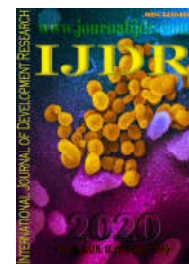
Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 10, Issue, 11, pp. 41970-41974, November, 2020

<https://doi.org/10.37118/ijdr.20361.11.2020>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

EFICÁCIA DE ÓLEOS VEGETAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS NO CONTROLE DE *SPOROTHRIX SCHENCKII*

¹Nara Moraes Guimarães, ²Isabela Fernandes de Oliveira and ^{*3}Dora Inés Kozusny-Andreani

¹Graduanda em Medicina pela Universidade Brasil, Fernandópolis-SP

²Graduanda em Medicina pela Universidade de Marília, Marília - SP

³Professora Titular do curso de Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, Fernandópolis - SP

ARTICLE INFO

Article History:

Received 28th August, 2020

Received in revised form

14th September, 2020

Accepted 19th October, 2020

Published online 24th November, 2020

Key Words:

Esporotricose,
Óleos Vegetais,
Ozônio,
Atividade Antimicrobiana.

*Corresponding author:

Dora Inés Kozusny-Andreani

ABSTRACT

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por *Sporothrix schenckii*, um fungo dimórfico muito disperso na natureza, especialmente em climas temperados e tropicais. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia dos óleos de girassol, oliva e dendê *in natura* e ozonizados no controle *in vitro* de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345. Para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos foi utilizada a linhagem padrão de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345. Os óleos foram ozonizados por meio de um gerador corona. Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), diluições seriadas dos óleos foram preparadas em placas de microdiluição com 96 poços. A seguir, acrescentados 0,05L da suspensão padronizada (10^6 células viáveis mL⁻¹) da linhagem de *S. schenckii*. Avaliação foi realizada após incubação a 28°C por 24h. Verificou-se que todos os óleos apresentaram atividade antifúngica. Os óleos de girassol e de dendê ozonizados apresentaram a menor CIM (6,25% e 12,5%, respectivamente) e a menor CFM (12,5%), para os demais óleos os valores variaram entre 25% a 100%. Os óleos vegetais *in natura* e ozonizados representam uma abordagem interessante do ponto de vista farmacêutico para o manejo de uma variedade de patologias em humanos e animais.

Copyright © 2020, Nara Moraes Guimarães et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Nara Moraes Guimarães, Isabela Fernandes de Oliveira and Dora Inés Kozusny-Andreani. 2020. "Eficácia de óleos vegetais *in natura* e ozonizados no controle de *sporothrix schenckii*", *International Journal of Development Research*, 10, (11), 41970-41974.

INTRODUCTION

A esporotricose é uma infecção micótica granulomatosa crônica causada por *Sporothrix schenckii*, um saprófito comum do solo, madeira em decomposição, feno e musgo esfagno, que é endêmico em áreas tropicais / subtropicais. Os estudos filogenéticos recentes delimitaram a distribuição geográfica de várias espécies distintas de *Sporothrix* causando esporotricose (Mahajan, 2014; Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017). Com a invasão da derme e do tecido subcutâneo, a doença pode evoluir de forma localizada ou mesmo generalizar-se ou, como é mais comum, pode ocorrer evolução para uma forma cutâneo-linfática. Há outras manifestações clínico-patológicas menos frequentes e, dentre elas deve-se destacar a forma respiratória que pode ser adquirida pela inalação de propágulos fúngicos eliminados por animais mediante espirros provocados por lesões nasais (Rosa et al., 2005, Tortora et al., 2017). O gênero *Sporothrix* é classificado como dimórfico, 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 (Mora-Montes, 2018). A pigmentação das colônias é bem variável: no início são brancas ou cremes, mas tornam-se amarelas, marrom-escuro, cinza-escuro ou frequentemente negras. As colônias dificilmente são flocosas ou algodonosas (Menezes e Silva et al., 2006). As espécies patogênicas de *Sporothrix* têm a capacidade de produzir colônias pigmentadas por meio da produção de melanina (Romero-Martinez et al., 2000, Tortora et al., 2017). As melaninas têm se mostrado importantes fatores de virulência em vários fungos, incluindo a proteção dos fungos das condições adversas encontradas durante o parasitismo devido à resposta imune do hospedeiro, assim com a proteção contra drogas antifúngicas (Taborda et al., 2008). Para o tratamento da esporotricose é recomendado o uso de itraconazol. Anfotericina B é usado inicialmente para o tratamento de doença sistêmica grave, durante a gravidez e em pacientes imunossuprimidos até a recuperação, em seguida, seguido por itraconazol para o resto da terapia.

A terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, foi considerada eficaz no tratamento da esporotricose cutânea, não demonstrando problemas de resistência frente ao agente, além de efeitos tóxicos reduzidos quando comparado ao itraconazol (Coskun *et al.*, 2004; Mahajan, 2014). A quimiorresistência de patógenos microbianos tem se tornado um fenômeno mundial preocupante e a mortalidade global de pacientes que sofrem de infecções microbianas está aumentando regularmente (Woodhouse e Farrar, 2014). O uso inadequado de antimicrobianos também pode promover a seleção de elementos de resistência pré-existentes. Portanto, mesmo o uso bem fundamentado de compostos antibacterianos e antifúngicos pode ser insuficiente para prevenir a aquisição de resistência, e novos conceitos e técnicas são necessários para gerenciar patologias microbianas (Reardon, 2014; Shor e Perlín, 2015). A busca por um amplo espectro de agentes antimicrobianos que possam evitar a resistência ao mesmo tempo em que mantêm efeitos colaterais razoáveis fez com que os óleos ozonizados experimentassem um aumento de interesse científico e de aplicações clínicas. O tratamento de óleos vegetais com ozônio leva à criação de um reservatório de ozônio que é liberado lentamente na pele, graças ao fato de que o ozônio pode ser mantido como ozonídeo de ácidos graxos insaturados (Ugazio *et al.*, 2020). Segundo Borrelli e Bocci (2018) tem se mostrado muito eficaz e absolutamente atóxico quando usado em dosagens que induzem apenas um estresse oxidativo. Neste contexto, objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia de óleos in natura e óleos ozonizados no controle *in vitro* de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem e meios de cultivo: Para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos *in natura* e óleos ozonizados, se utilizou a linhagem padrão de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345 (American Type Culture Collection), reativada em meio agarizado Sabouraud-Dextrose (SAB, Oxoid®) com cloranfenicol e incubada por 7 dias a 35°C e, posteriormente cultivadas em Caldo Sabouraud (CS, Oxoid®) acrescido com cloranfenicol sob agitação orbital (200rpm) por 5 dias a 35°C

Óleos ozonizados: Para ozonização foi empregado 1 litro de cada óleo vegetal: girassol (Liza®), Oliva (Borges®) e dendê (Hemmer®). O ozônio foi produzido por meio de um gerador que tem como princípio o efeito corona (Ozon & Life, 1,5RM, registro ANVISA 81509100001) 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, gerando, assim, 15µg minuto⁻¹ de ozônio. Os óleos vegetais foram expostos ao ozônio de forma direta por meio de um difusor, por um período de 4 horas. Todo o procedimento foi conduzido em temperatura controlada de 25°C em uma capela de exaustão, visando minimizar os riscos de inalação do gás ozônio, seguindo as normas internacionais de segurança. Após ozonização, os óleos foram avaliados quanto à sua esterilidade, sendo retirado 0,1mL de cada óleo e inoculado em placas de Petri contendo meio ágar triptecaseína de soja (TSA, Oxoid®), incubado 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 mantidos sob refrigeração (8°C).

Avaliação da atividade antimicrobiana de células em suspensão: Para avaliar a atividade antimicrobiana foram

preparadas suspensões em solução salina (NaCl a 0,85%) de *Sporothrix schenckii* ATCC 16345 contendo 10⁶ células viáveis mL⁻¹ do micro-organismo, padronizadas pela escala 0,5 de McFarland standard (BioMérieux). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2008, 2012). Inicialmente, realizou-se a diluição dos óleos. Para tal fim, foram distribuídos 50µL de caldo Sabouraud nos poços das microplacas. Nos primeiros poços foram adicionados 50 µL dos óleos, obtendo-se uma diluição de 50% (1/2). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas nos 6 poços subsequentes, retirando-se 50 µL do poço de maior concentração para o seguinte, até a obtenção da concentração 0,78% (1/128). Assim, a série de diluições obtidas corresponderam a 50% (1/2), 25% (1/4), 12,5% (1/8), 6,25% (1/16), 3,12% (1/32), 1,562% (1/64) e 0,78% (1/128). Em seguida, foram adicionados 50 µL da suspensão fúngica. Foram realizados controles positivos (suspensões fúngicas) e negativos (óleos isentos de suspensões fúngicas e meio de cultura estéril). As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas, em condições de aerobiose. Ao término desse período, determinou-se a CIM, que foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento microbiano.

Para se determinar a CIM, foi adicionado, em cada poço, o corante 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), no volume de 50µL, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Pela hidrogenação do TTC é produzida nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusível, o trifenil formazan. Isto tornou possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor (Sylvester, 2011). Para determinação da concentração fungicida mínima (CFM), alíquotas de 0,1 mL, de cada poço, foram semeadas em triplicata, em placas de ágar Sabouraud-Dextrose. Após período de incubação de 4-7 dias horas a 35°C, será verificada ausência ou presença de crescimento microbiano (unidades formadoras de colônias - UFC). Para determinação da CFM foram consideradas as placas que apresentarem ausência de crescimento fúngico.

Viabilidade Fúngica: Para avaliação da viabilidade fúngica foi adotada a metodologia descrita por Kozusny-Andreani *et al.* (2018), com adaptações. A linhagem de *Sporothrix schenckii* foi reativada em ágar Sabouraud-Dextrose, incubadas a 35°C por 5 dias. Uma colônia foi inoculada em 1000 mL de caldo Sabouraud (Oxoid®) e incubada a 37°C por 5 dias. A densidade celular inicial foi determinada pela absorbância a 550nm usando a escala de McFarland standard (BioMérieux) que corresponde a concentração de 1,0x10⁸ UFC mL⁻¹. Para o tratamento com ozônio a densidade celular foi ajustada para concentração de 1,0x10⁶ UFC mL⁻¹ em solução de NaCl (0,5%). Como controle (sem tratamento com ozônio) foi utilizada uma amostra de *S. schenckii* na concentração de 1,0x10⁶ UFC mL⁻¹. Das amostras tratadas com óleos ozonizados *in natura* foram coletados 0,1mL, em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 620 minutos e 24 horas), inoculadas em ágar Sabouraud-Dextrose e incubadas a 35°C por 5 dias quando as colônias foram contadas. Também nesses intervalos de tempo foi retirado 1mL de amostra para confirmação da presença de micro-organismos viáveis nas concentrações não inibitórias. Foi adicionado em cada amostra 50µL de 2,3,5-

Triphenyltetrazolium Chloride (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). O experimento foi repetido por quatro vezes, quando foi obtida a média de UFC mL⁻¹ e calculada a porcentagem de viabilidade celular para cada intervalo de tempo.

Formação de biofilme, avaliação antimicrobiana e microscopia: Para a formação do biofilme foi preparada uma suspensão celular com uma concentração final de 1x10⁶ cels mL⁻¹ em caldo Sabouraud-Dextrose. Para a realização dos ensaios se utilizaram placas de cultura celular de 8 poços, em cada poço foi colocado 300 µL da suspensão celular para o crescimento do biofilme e, no poço usado para o branco 300 µL de meio de cultura estéril. As placas foram incubadas a 35°C por 5 dias. O crescimento do biofilme foi verificado periodicamente. Durante a formação do biofilme o meio existente nos poços foi substituído por meio fresco de 12 em 12 horas. Após este período foram adicionadas sobre os biofilmes concentrações crescentes de óleos ozonizados e *in natura*. As placas foram novamente incubadas a 35°C, por 15, 30, 60, 120, 240, 280 minutos e 24 horas, quando foi retirado o líquido dos poços e os biofilmes corados com azul de algodão (Newprov®), para observação em microscópio de luz.

Análise estatística: Os resultados foram expressos como a porcentagem de viabilidade de quatro medidas independentes para cada experimento. As avaliações estatísticas foram realizadas usando o software estatístico SPSS ver. 10. A significância foi definida como um valor de p <0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e à concentração fungicida mínima (CFM) para cada um dos óleos avaliados *in natura* e ozonizados. Verificou-se que todos óleos apresentaram atividade antifúngica. Os óleos de girassol e de dendê ozonizados evidenciaram a menor CIM (6,25% e 12,5%, respectivamente) e a menor CFM (12,5%), para os demais óleos os valores variaram entre 25% a 100%.

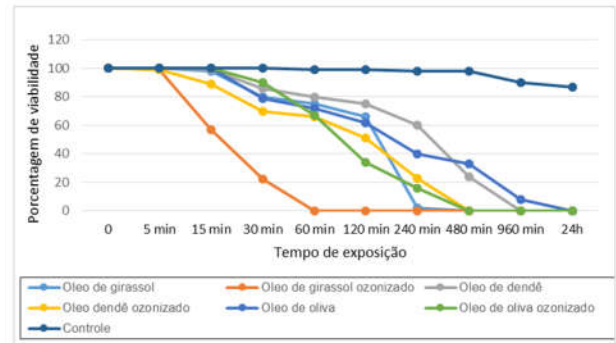
Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima de óleos vegetais *in natura* e óleos vegetais ozonizados

ÓLEOS	CIM (%)	CFM (%)
Óleo de girassol	25	25
Óleo de girassol ozonizado	6,25	12,5
Óleo de dendê	25	25
Óleo de dendê ozonizado	12,5	12,5
Óleo de oliva	100	100
Óleo de oliva ozonizado	25	25

Fonte: Elaborado pelas autoras

Quando a viabilidade das células fúngicas foi avaliada verificou-se que os óleos de girassol *in natura* e ozonizados inativaram *Sporothrix schenckii* 60 minutos e 240 minutos respectivamente (Figura 1). Foram necessários tempos maiores de exposição aos óleos de dendê e de oliva *in natura* e ozonizados foram eliminar as células fúngicas. Verificou-se nulidade da viabilidade de *S. schenckii* aos 480 minutos frente aos óleos ozonizados de oliva e dendê, e de 960 minutos e 24 horas quando foram expostos aos óleos de dendê e oliva, respectivamente. Os resultados evidenciam que a inativação de *S. Schenckii* pelos óleos vegetais *in natura* e ozonizados depende do tempo de exposição quando comparados com o

controle positivo, evidenciando diferenças significativas (p <0,05, Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Kozusny-Andreani *et al.* (2018), em pesquisa realizada com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os autores verificaram a inativação pelo ozônio das estirpes bacterianas estudadas depende da espécie, sua concentração e do tempo de exposição ao gás.

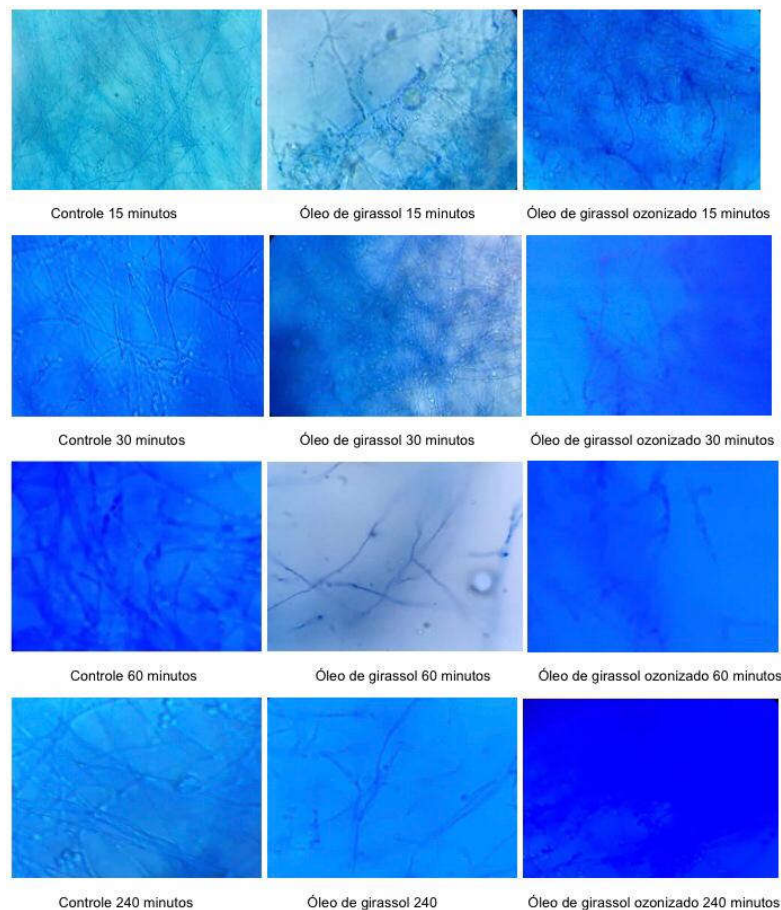


Fonte: Elaborado pelas autoras

Figura 1. Porcentagem de viabilidade de *Sporothrix schenckii* exposto à óleos vegetais *in natura* e óleos vegetais ozonizados

Na figura 2 são apresentadas imagens obtidas pela microscopia de luz. Os biofilmes de *Sporothrix schenckii* expostos à atividade de dos óleos de girassol *in natura* e girassol ozonizado (concentração 25% e 12,5%, respectivamente) e sem exposição (controle). Verificou-se que nos primeiros 15 minutos o controle e o óleo *in natura* não apresentaram alterações nas estruturas fúngicas, enquanto que o óleo ozonizado evidenciou modificações na morfologia das hifas. Após 30 minutos, o controle não apresentou mudanças estruturais, o óleo *in natura* evidenciou leve efeito modificador sobre as hifas, enquanto que o óleo ozonizado teve ação destrutiva das células fúngicas. Verificou-se que o tempo necessário para eliminação de todas as células de *S. schenckii*, quando o biofilme foi tratado com óleo de girassol ozonizado, foi de 60 minutos e do óleo *in natura* de duas horas. As estruturas celulares do controle permaneceram sem alterações durante todo o período de avaliação (24 horas, Figura 2).

A incidência de infecções fúngicas e infecções nosocomiais aumentou dramaticamente nos últimos anos, especialmente em pacientes com imunidade prejudicada. Ao mesmo tempo, a maioria dos antifúngicos convencionais tem muitos problemas em termos de toxicidade, interações medicamentosas, falta de eficácia fungicida, o custo do tratamento e emergências de cepas resistentes. Portanto, uma intenção de remédios naturais com plantas com virtudes terapêuticas que impulsiona uma intensa busca por novos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos (Siham *et al.*, 2020). *Sporothrix schenckii* é um complexo de várias espécies de fungos encontrados em solos, plantas, vegetais em decomposição e outros ambientes externos. É o agente etiológico da esporotricose em humanos e vários animais. Humanos e animais podem adquirir a doença por meio da inoculação traumática do fungo no tecido subcutâneo. Apesar da importância da esporotricose, atualmente considerada uma doença emergente em vários países, os fatores que impulsionam sua crescente importância médica ainda são amplamente desconhecidos (Tellez *et al.*, 2014). Há mais de um século, o ozônio é conhecido por ser um excelente desinfetante que, no entanto, teve que ser usado por longo tempo com cautela devido às suas propriedades



Fonte: As autoras

Figura 2. Microscopia de biofilmes de *Sporothrix schenckii* expostos à atividade de dos óleos de girassol in natura e girassol ozonizado e sem exposição (controle). Aumento:400X.

oxidantes. Somente nas últimas décadas tem sido possível medir com precisão sua concentração e incorporar permanentemente o gás em compostos como óleos essenciais e vegetais, nos quais o ozônio gasoso reage quimicamente com substratos insaturados, levando à formação de derivados de ozônio terapeuticamente ativos (Salsabila *et al.*, 2018). A atividade farmacológica dos óleos ozonizados é dependente do nível de ozonização e da composição do óleo (Batool *et al.*, 2009). No processo de ozonização de óleos, o ozônio reage com duplas ligações carbono-carbono de ácidos graxos insaturados, formando ozonídeos ou anéis e peróxidos 1,2,4-trioxolano considerados como os principais produtos responsáveis pela atividade antimicrobiana e pela estimulação de reparação e regeneração tecidual (Zanardi *et al.*, 2008; Almeida *et al.* 2012). Os óleos vegetais *in natura* e ozonizados representam uma abordagem interessante do ponto de vista farmacêutico para o manejo de uma variedade de patologias em humanos e animais (Captain, 2018). Em alguns países, os óleos ozonizados estão disponíveis para o uso alternativo dos recursos disponíveis, caracterizados por serem fontes naturais e renováveis, obtidos por meio de tecnologia simples, de baixo custo e com ampla atividade biológica com redução de efeitos colaterais (Tofanini, 2004). O ozônio via tópica na forma gasosa ou em óleos se destaca como tratamento para a reparação de tecidos, pois promove a cicatrização de feridas e possui propriedades antimicrobianas, imunológicas, antioxidantes e oxigenantes. A eficácia do óleo ozonizado pode representar uma terapia integrativa no tratamento de lesões teciduais, principalmente em pacientes

que apresentam patologias como diabetes mellitus, aterosclerose e no processo de envelhecimento. Para doenças como úlceras ou estomatite aftosa, gengivite e dermatite, o óleo ozonizado auxilia no alívio da dor e na aceleração do processo de cicatrização (Anzolin *et al.*, 2020). Óleos vegetais ozonizados podem ser líquidos ou semi-sólidos à temperatura ambiente. Óleos ozonizados, contendo anéis 1,2,4-trioxolano formados em cadeia de ácidos graxos insaturados, podem ser considerados como um princípio ativo e um veículo ao mesmo tempo, aumentando a absorção e penetração na pele (Travagli *et al.*, 2010).

O interesse no uso de óleos ozonizados, significou que vários produtos contendo foram comercializados como agentes cosméticos e farmacêuticos, e em produtos têxteis inovadores com atividade antibacteriana. No entanto, novas abordagens para a obtenção de óleos ozonizados surgiram muito recentemente na tentativa de melhorar suas características e reduzir desvantagens, como odor desagradável, alta viscosidade e efeitos indesejáveis na pele, incluindo irritações e erupções cutâneas (Ugazio *et al.*, 2020).

Conclusão

Todos os óleos apresentaram atividade antifúngica. O óleo de girassol e de dendê ozonizados foram mais eficazes controle de *Sporothrix senckii*, evidenciando a possibilidade ser utilizado como alternativa ao tratamento da esporotricose.

REFERÊNCIAS

- Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, Astaneh SD. 2010. Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumim produced in Iran, J. Food Sci. 752: H54-H61.
- Almeida-Paes R, Figueiredo-Carvalho MHG, Brito-Santos F, Almeida-Silva F, Oliveira Mme, Zancopé-Oliveira RM 2016. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. PLoS ONE. 113: e0152796.
- Anzolin AP, Silveira-Kaross NL, Bertol CD 2020. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? Med. Gas. Res. 101:54-59.
- Batool N, Arshad M, Fayyaz-UI-Hassan F, Ilyas N, Shahzad A 2018. Physicochemical and antimicrobial properties of canola *Brassica napus L.* seed oil. Pak. J. Pharm. Sci. 315:2005-2009.
- Bonifaz A, Tirado-Sánchez A 2017. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. J. Fungi, 36:1-13.
- Borrelli E, BOCCI V 2018. The Use of Ozone in Medicine. Ann Med Health Sci Res. 8:117-119.
- Captain J 2018. Ozonated water, ozonated oil and its products. J Ozone Ther. 22:1-3.
- 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.
- 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.
- Coskun B, Saral Y, Ataseven A, Çiçek D 2004. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. Mycopathologia. 151:53-56.
- Kozusny-Andreani DI, Andreani G, Prado LFA, Spaziani AO, Kairala RCOM, Silva F S, Zangaro RA 2018. In vitro inactivation of pathogenic bacteria by the use of ozone in different exposure times. Rev Cub Med Trop. 701:1-8
- Mahajan VK 2014. Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options. Dermatol Res Pract. ID 272376:1-13.
- Menezes e Silva CHP, Neufeld PM, Sato D 2006. Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico. Livraria e Editora Revinter Ltda.: Rio de Janeiro.
- Mora-Montes HM 2018. Special Issue "Sporothrix and Sporotrichosis". J. Fungi. 4116:1-4.
- Reardon S 2014. Antibiotic resistance sweeping developing world. Nature. 509:141-142.
- Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. Infect Immun. 686:3696-3703.
- Rosa Ac, Scroferneker MI, Vettorato R, Gervini RI, Vettorato G, Weber A 2005. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. J Am Acad Dermatol. 52:451-459.
- Salsabila N, Moulydia F, Bismo S 2018. Formulation of oleozon with *Phaleria macrocarpa* and *Cinnamomum burmanii* extract for diabetic wound treatment. IOP Conf Ser: Mate Sci Em. 334:012069.
- Siham Y, Hajar B, Miloud EK, Brahim M, Housaine T, Mustapha B 2020. Determination of chemical composition and evaluation of Antioxidant, and Antimicrobial activities of Clove Oil obtained from *Syzygium Aromaticum* Moroccan species. Int J Pharm Sci Res. 112:2568-2574.
- Shor E, Perlin D S 2015. Coping with stress and the emergence of multidrug resistance in fungi. PLoS Pathog. 11:e1004668.
- Sylvester PW 2011. Optimization of the tetrazolium dye MTT colorimetric assay for cellular growth and viability. Meth Mol Biol. 716:157-168.
- Taborda CP, da Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR 2008. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. Mycopathologia. 1654-5:331-339.
- Téllez MD, Batista-Duharte A, Portuondo D, Quinello C, Bonne-Hernández R, Carlos IZ 2014. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. Microbiology. 16011:2352-2365.
- Tofanini AJ. Controle de qualidade de óleos comestíveis. Monografia Bacharelado em Química – Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina; 2004. 40 p.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL 2017. Microbiologia. 12.ed. Artmed: Porto Alegre, 939p.
- Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review 2010. Mediators Inflamm. 19:ID 610418.
- Ugazio E, Tullio V, Binell A, Tagliapietra S; Dosio F 2020. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. Molecules, 25:3.34-340
- Woodhouse M, Farrar J 2014. Policy: an intergovernmental panel on antimicrobial resistance. Nature. 509:555-557.
- Zanardi I, Travagli V, Gabbrielli A, Chiasserini L, Bocci V 2008. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. Lipids. 43:877-886.
