

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**MELISSA ZUCCOLOTTI SOARES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DE UMA EMULSÃO OZONIZADA E  
ANÁLISE ATRAVÉS DE FT-IR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, setembro/2022**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**MELISSA ZUCCOLOTTI SOARES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DE UMA EMULSÃO OZONIZADA E  
ANÁLISE ATRAVÉS DE FT-IR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da  
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Engenharia  
Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José de Lima

**São José dos Campos, setembro/2022**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**MELISSA ZUCCOLOTTI SOARES**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO MICROBICIDA DE UMA EMULSÃO OZONIZADA E  
ANÁLISE ATRAVÉS DE FT-IR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti**

Orientadora

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Bianca Akemi Kawata**

Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ)

**Prof. Dr. Carlos José de Lima**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Leandro Procópio Alves**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Túlia de Souza Botelho Almeida**

Universidade Santo Antonio

**São José dos Campos, setembro/2022**

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

## MELISSA ZUCCOLOTTI SOARES

Graduada em Bacharel em Enfermagem pela Universidade de Taubaté - UNITAU – SP, 2004, aprimoranda em Enfermagem Cirúrgica pelo Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, pós-graduada em Unidade de Terapia Intensiva e Estomaterapia pela Universidade de Taubaté, pós-graduada em Gestão de Qualidade nos Serviços de Saúde pela Universidade Cruzeiro do Sul.

### Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

676a Soares, Melissa Zuccolotti  
Avaliação do efeito microbicida de uma emulsão ozonizada e análise através de FT-IR / Melissa Zuccolotti Soares. - 2022.  
44f. : il.; 30cm.

Orientador: Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica); co-orientador Dr. Carlos José de Lima - Universidade Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2022.  
Bibliografia: f.39

1. Engenharia Biomédica. 2. Ozônio. 3. Método reator de coluna de borbulhamento. 4. Óleo Ozonizado. 5. Efeito microbicida.

CDD 610.28

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, pela vida, saúde e coragem para atingir os meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Milton (em memória) e Sonia que nunca mediram esforços para me ensinar o caminho do bem, e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

A meu esposo Everton, pelo apoio nas minhas decisões de aperfeiçoamento profissional. Sou grata por todas as ocasiões que ele precisou se desdobrar para suprir as lacunas acarretadas pela minha dedicação aos estudos.

Às minhas filhas, Alice e Elisa, razão de minha vida, por entenderem as inúmeras vezes que me ausentei em prol dos estudos. Não há palavras para expressar o meu amor por vocês!

À minha orientadora Adriana Barrinha Fernandes Moretti pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança e por me atender sempre com paciência e boa vontade. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável. Muito obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Carlos José de Lima agradeço pelos ensinamentos e pelo rigor na condução de todo o trabalho. Sou grata por todos os momentos em que não mediu esforços para auxiliar-me.

Ao professor Adjaci Uchoa Fernandes pela disponibilidade em auxiliar nos experimentos. Sou grata pelos ensinamentos. Seu auxílio foi fundamental para conclusão deste trabalho.

À minha amiga Camila, minha parceira nos estudos. Sou grata pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos Leandro e Maycon que me ajudaram durante este período. Auxiliaram-me inúmeras vezes, e em todas fui atendida com paciência e tranquilidade.

Ao meu amigo Milton pelo apoio e disponibilidade na pesquisa, sempre com dedicação e paciência. Serei eternamente grata.

A todos os professores da Pós-Graduação de Engenharia Biomédica da Universidade Anhembi Morumbi, meus sinceros agradecimentos.

A secretária da pós-graduação, em especial à Nidia Macedo, que desde o princípio demonstrou gentileza, atenção e eficiência em atender às solicitações e dúvidas.

Financiadores:

A Universidade Anhembi Morumbi pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

O gás ozônio é uma molécula natural presente na atmosfera terrestre proveniente da interação da luz ultravioleta do sol com as moléculas de oxigênio. É uma molécula extremamente oxidante, o que justifica o seu uso como um agente microbicida. O gás ozônio pode ser transferido para meio líquido, como é o caso dos óleos vegetais empregando-se o método reator de coluna de borbulhamento. O óleo ozonizado apresenta propriedade microbicida, além de ser um cicatrizante em aplicações dermatológicas melhorando o desempenho no tratamento de lesões cutâneas. Estudos demonstraram que a adição de água ao óleo ozonizado potencializa o efeito microbicida, no entanto, a imiscibilidade destes componentes gera uma instabilidade química na formulação o que dificulta seu uso e aplicação em lesões de pele. Diante deste conceito, o desenvolvimento de uma emulsão a base de óleo de girassol ozonizado foi proposto neste estudo para potencializar e acelerar o efeito microbicida. No presente estudo foi desenvolvida a emulsão a partir da ozonização de amostras de 500 ml de óleo por período de 4 horas através de um difusor de aço inoxidável, foi empregado um agente emulsificante a frio para o preparo dos cremes. Foram determinados 5 grupos experimentais: óleo de girassol *in natura* (OG), óleo de girassol ozonizado ( $OGO_3$ ), óleo de girassol ozonizado com adição de 10% de água ( $OGO_3H_2O$ ), Creme com óleo de girassol *in natura* (CR), creme com óleo ozonizado ( $CRO_3$ ). Em todas as amostras dos diferentes grupos houve determinação do índice de peróxido e pH. Além da análise espectral no infravermelho e a avaliação microbiológica envolvendo a formação do halo de inibição do crescimento microbiano. Os resultados deste estudo mostraram que o efeito microbicida foi potencializado com a adição de água destilada no óleo antes da ozonização ( $OGO_3H_2O$ ), sugerindo a formação de uma maior quantidade de peróxidos, a partir da redução dos grupos funcionais insaturados. Com relação a emulsão desenvolvida a base de óleo de girassol ozonizado ( $CRO_3$ ), foi observado um efeito microbicida para as bactérias Gram-positivas e negativas, a análise estatística dos dados demonstrou que não houve diferença significativa nos halos de inibição quando comparados ao grupo  $OGO_3H_2O$ , e que o  $CRO_3$  apresentou maior efeito microbicida que o  $OGO_3$  ( $p < 0,05$ ). Com isso, conclui-se que o  $CRO_3$  apresentou efeito microbicida comparável ao grupo  $OGO_3H_2O$ , esses resultados são promissores no sentido de uma futura aplicação desta emulsão no tratamento de lesões de pele, uma vez que é estável quimicamente e de fácil aplicação.

**Palavras-chave:** Engenharia Biomédica; Ozônio; método reator de coluna de borbulhamento; Óleo Ozonizado; Efeito microbicida.

# EVALUATION OF THE MICROBICIDAL EFFECT OF AN OZONIZED EMULSION AND ANALYSIS THROUGH FT-IR

## ABSTRACT

Ozone gas is a natural molecule present in the Earth's atmosphere from the interaction of ultraviolet light from the sun with oxygen molecules. It is an extremely oxidizing molecule, which justifies its use as a microbicidal agent. Ozone gas can be transferred to a liquid medium, as is the case with vegetable oils, using the bubbling column reactor method. The ozonized oil has microbicidal properties, in addition to being a healing agent in dermatological applications, improving performance in the treatment of skin lesions. Studies have shown that the addition of water to ozonized oil potentiates the microbicidal effect, however, the immiscibility of these components generates chemical instability in the formulation, which makes its use and application in skin lesions difficult. Given this concept, the development of an emulsion based on ozonized sunflower oil was proposed in this study to potentiate and accelerate the microbicidal effect. In the present study, the emulsion was developed from the ozonation of samples of 500 ml of oil for a period of 4 hours through a stainless-steel diffuser, a cold emulsifying agent was used to prepare the creams. Five experimental groups were determined: *in natura* sunflower oil (OG), ozonized sunflower oil (OGO<sub>3</sub>), ozonized sunflower oil with the addition of 10% water (OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O), cream with *in natura* sunflower oil (CR), cream with ozonized oil (CRO<sub>3</sub>). In all samples of the different groups, there was the determination of the peroxide index and pH. In addition to infrared spectral analysis and microbiological evaluation involving the formation of the microbial growth inhibition halo. The results of this study showed that the microbicidal effect was potentiated with the addition of distilled water in the oil before ozonation (OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O), suggesting the formation of a greater amount of peroxides, from the reduction of unsaturated functional groups. Regarding the emulsion developed based on ozonized sunflower oil (CRO<sub>3</sub>), a microbicidal effect was observed for Gram-positive and negative bacteria, the statistical analysis of the data showed that there was no significant difference in the inhibition halos when compared to the OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O group and that CRO<sub>3</sub> had a greater microbicidal effect than OGO<sub>3</sub> (p<0.05). With this, it is concluded that CRO<sub>3</sub> presented a microbicidal effect comparable to the OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O group, these results are promising in the sense of a future application of this emulsion in the treatment of skin lesions since it is chemically stable and easy to apply.

**Keywords:** Biomedical engineering; Ozone; bubbling column reactor method; Ozonized Oil; Microbicidal effect.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVO.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivo específico.....	16
2.3 Justificativa.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Tipo de estudo.....	23
4.2 Local e período de estudo.....	23
4.3 Ozonização do Óleo de girassol e preparo da emulsão ozonizada.....	23
4.4 Determinação dos parâmetros físico-químicos.....	24
4.5 Análise Microbiológica.....	25
4.6 Caracterização do óleo e do creme por espectroscopia FT-IR.....	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Obtenção das amostras de óleos e emulsões ozonizadas.....	28
5.2 Análise por Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR).....	29
5.3 Análise Microbiológica.....	32
5.4 Análise dos parâmetros físico-químicos.....	33
5.4.1 Índice de peróxido.....	33
5.4.2 Índice de pH.....	34
6 DISCUSSÃO.....	35
7 CONCLUSÃO.....	38
8 REFERENCIAS.....	39

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Desenho esquemático do reator de um gerador de ozônio.....	18
Figura 2- Ozonização do óleo através pelo método reator de coluna de borbulhamento.....	19
Figura 3- Mensuração do halo de inibição nas amostras de (A) óleo de girassol <i>in natura</i> (OG) e (B) óleo ozonizado com adição de 10% de água destilada (OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O).....	26
Figura 4- Amostras de óleo de girassol (A) <i>in natura</i> , (B) ozonizado (OGO <sub>3</sub> ) e (C) ozonizado com adição de 10% de água destilada (OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O).....	28
Figura 5- Amostras de creme a base de óleo de girassol (A) <i>in natura</i> (CR) e (B) ozonizado (CRO <sub>3</sub> ).....	29
Figura 6- Espectros FT-IR das amostras de óleo de girassol <i>in natura</i> (OG), óleo de girassol ozonizado (OGO <sub>3</sub> ) e óleo de girassol ozonizado com adição de 10% de água destilada (OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O).....	30
Figura 7- Faixa espectral em torno de 1100 cm <sup>-1</sup> referente à formação de ozonídeos.....	30
Figura 8- Faixa espectral em torno de 1650 cm <sup>-1</sup> referente à dupla ligação C=C.....	31
Figura 9- Faixa espectral em torno de 3010 cm <sup>-1</sup> referente à dupla ligação C=C.....	31
Figura 10- Espectros FT-IR das amostras de Creme à base de OG <i>in natura</i> (CR) e Creme à base de OG ozonizado (CRO <sub>3</sub> ) comparado com o espectro da Água destilada (AD).....	32
Figura 11- Determinação do Índice Peróxido (IP) das amostras das amostras de OG, OGO <sub>3</sub> , OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O, CR e CRO <sub>3</sub> .....	34
Figura 12- Determinação do pH das amostras de OG, OGO <sub>3</sub> , OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O, CR e CRO <sub>3</sub> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição das amostras de óleos e emulsões desenvolvidas.....	24
Tabela 2- Diâmetro dos halos de inibição de crescimento (Média $\pm$ DP [mm]) destacando o efeito microbicida das amostras de óleos e cremes em bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e levedura.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOD - Applied Ozone Dosage

CITÉ – Centro de Inovação e Tecnologia

CR – Creme *in natura*

CRO<sub>3</sub> – Creme ozonizado

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FT-IR – *Fourier Transformed Infrared*

g - Gramas

IA – Índice de acidez

II – Índice de lodo

IP- Índice de Peróxido

KI – Iodeto de Potássio

L – Litro

mEq – Miliequivalente

mg - Miligramas

mL - Mililitros

O<sub>2</sub> – Oxigênio

O<sub>3</sub> - Ozônio

OG – Óleo de Girassol

OGO<sub>3</sub> – Óleo de Girassol Ozonizado

OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O – Óleo de Girassol Ozonizado com água

O/A – Óleo em água

OFR – Ozone Feed Rate

pH – Potencial de Hidrogênio

UAM – Universidade Anhembi Morumbi

UATR - *Universal Attenuated Total Reflectance*

UFC – Unidade Formadora de colônia

μL – Microlitros

## 1 INTRODUÇÃO

O uso frequente de medicamentos para tratamento de infecções aumenta a resistência antimicrobiana resultando, assim, em maior gravidade das infecções, aumento de taxas de morbidade, além do aumento de períodos de hospitalizações (RODRIGUES et al., 2004). Como alternativa para redução do uso frequente de medicamentos utiliza-se produtos naturais com propriedades farmacológicas para tratamento de diversas infecções (BOUZID et al., 2021). Dentre os produtos naturais existentes para tratamento dessas doenças se destaca o uso de óleos vegetais que tem o seu potencial de ação elevado com a incorporação de gás ozônio em sua estrutura química (CARDOSO et al., 2002).

O ozônio ( $O_3$ ) é uma molécula instável formada por três átomos de oxigênio, sendo a ligação do terceiro átomo de oxigênio fraca tornando o composto instável e altamente reativo. A redução do oxigênio molecular forma radicais livres que induzirão danos às moléculas biológicas e, portanto, fazendo o uso controlado das moléculas de  $O_3$  acarretam defesas antioxidantes enzimáticas, por outro lado o uso descontrolado causa danos e morte celular (CAMPANATI et al., 2013). A ação do gás  $O_3$  ocorre diretamente nos ácidos graxos poli insaturados para formar espécies reativas de oxigênio (EROs) através do efeito sistêmico, tais como peróxido de hidrogênio, que pode induzir a síntese de fatores de crescimento e acelerar o ciclo celular através da ativação de fatores redox de transcrição, como fator *kappa B* nuclear (CAMPANATI et al., 2013). O  $O_3$  é conhecido como um poderoso agente bactericida, antiviral e antifúngico e é utilizado em terapias para o tratamento de feridas crônicas, como feridas tróficas e as provocadas pela diabetes e (SERIO et al., 2017; CLAVO et al., 2020).

A ozonização em óleos vegetais ocorre através da incorporação do gás  $O_3$  neste meio líquido, os radicais oxidantes gerados são liberados e reagem com os componentes moleculares presentes no óleo, principalmente com as saturações, assim, há a produção de peróxidos lipídicos e hidroperóxidos, que possuem propriedades semelhantes ao efeito bactericida e bioestimulante do ozônio (SILVA et al., 2011). O mecanismo de formação de ozonídeos, peróxidos, aldeídos e ácidos carboxílicos foram descritos por Criegee, em 1975. Além da capacidade de estimular a regeneração tecidual e oxigenar células e tecidos, os produtos derivados da ozonização de compostos insaturados como terpenos, ácidos graxos, triglicerídeos e

óleos vegetais também são conhecidos por possuírem propriedades bactericidas. Compostos com alto teor de oxigênio, como os óleos vegetais ozonizados, tornam a pele mais macia e elástica, e são utilizados na preparação de cremes para reparação do tecido epitelial, o que justifica o uso dos óleos ozonizados para tratar topicamente feridas na pele. (TRAVAGLI et al., 2010; VALACCHI et al., 2011).

As análises químicas mais comumente utilizadas na caracterização de óleos ozonizados, baseam-se em índices de acidez (IA), índice de potencial de hidrogênio (pH), índice de iodo (II) e índice de peróxido (IP) que são técnicas analíticas de verificação da qualidade de óleo (DÍAZ et al., 2006a; ALMEIDA et al., 2013, TIĞLI AYDIN et al., 2018).

O uso da Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica também utilizada atualmente como forma de análise de parâmetros físico-químicos de qualidade, estudo de autenticidade e adulteração de óleos vegetais. A FT-IR permite a determinação e caracterização das propriedades químicas dos compostos por meio de seus espectros de absorção na região do infravermelho, a partir de movimentos vibracionais e rotacionais das ligações moleculares. Os efeitos vibracionais e rotacionais das moléculas provocam aparecimento de bandas espectrais em frequências específicas atuando como uma impressão digital da amostra (DE SOUZA; POPPI, 2012; BICAS et al., 2017).

Estudos demonstraram que a adição de água ao óleo ozonizado potencializa o efeito microbicida (MOREAU et al, 2016; DÍAZ et al, 2006a). Em contrapartida a imiscibilidade destes componentes gera uma instabilidade química na formulação o que dificulta seu uso e aplicação em alguns tipos de lesões de pele. Baseado nestas informações, no presente estudo foi desenvolvido uma emulsão de óleo ozonizado em água (O/A) com efeito microbicida, neste sentido, foi feita uma avaliação comparando o efeito microbicida da emulsão ozonizada com a não ozonizada. Além, disso, foi realizada a determinação de parâmetros físico-químicos das amostras e análise através da Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a ação microbicida de uma emulsão desenvolvida a base de óleo de girassol ozonizado pelo método reator de coluna de borbulhamento.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar o valor de pH e o índice de peróxido das amostras de emulsões desenvolvidas;
- Comparar a eficácia microbicida das emulsões desenvolvidas;
- Realizar a análise química das emulsões através da Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR).

### **2.3 Justificativa**

Estudos demonstraram que a adição de água ao óleo ozonizado potencializa o efeito microbicida (MOREAU et al, 2016; DÍAZ et al, 2006a), porém, a imiscibilidade proveniente destes componentes gera uma instabilidade química na formulação o que dificulta seu uso e aplicação em lesões de pele. Baseado nestas informações, no presente estudo foi desenvolvida uma emulsão de óleo ozonizado em água (O/A) com o intuito de verificar seu efeito microbicida, visando futuramente empregá-la no tratamento de feridas infectadas e doenças dermatológicas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

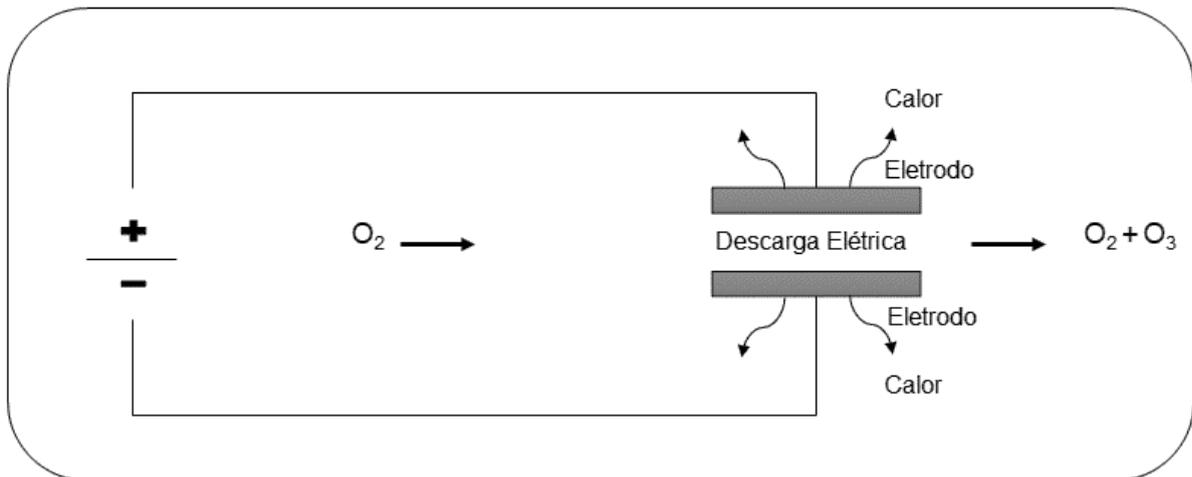
O Ozônio é uma molécula instável formada por três átomos de oxigênio ( $O_3$ ), em condições normais de pressão e temperatura encontra-se na forma gasosa (BOCCI, 2006). O ozônio é um gás muito reativo que é encontrado naturalmente na troposfera superior (camada de ozônio) a cerca de 20 a 25 quilômetros de altitude. Este gás desempenha um papel importante na absorção da radiação ultravioleta do sol, que é muito prejudicial à saúde humana (BALAKRISHNAN; ARUNAGIRI; RAO, 2002).

Em seu estado gasoso, além de ser altamente oxidante, é facilmente solúvel em água, essas características fazem do ozônio um poderoso composto usado como desinfetante (SILVA et al., 2011). O ozônio é conhecido como o segundo mais poderoso agente oxidante que pode ser utilizado em escala para aplicações em tratamento de água e esgoto, sendo adotado por diversos países em milhares de sistemas de tratamento de efluentes e água potável (SCHIAVON et al., 2012). Quando aplicado aos tecidos orgânicos o  $O_3$  reage imediatamente com várias moléculas presentes nos fluidos biológicos: proteínas, hidratos de carbono e preferencialmente gorduras de ácidos insaturados (BOCCI, 2004).

A produção do ozônio ( $O_3$ ) pode ser naturalmente pela ação da tempestade atmosférica com a presença de raios no ar. A descarga elétrica dissocia a molécula de oxigênio em dois átomos íons oxidante. Estas duas partículas instáveis podem se combinar com outras moléculas de oxigênio, resultando na formação das moléculas de ozônio. Outra forma de produção natural do ozônio é pela ação fotoquímica dos raios ultravioleta (~260nm) sobre as moléculas de oxigênio ( $O_2$ ) na estratosfera, esta radiação contém energia suficiente para separar os dois átomos que compõem a molécula de  $O_2$ , produzindo assim íons reagentes que podem recombinar com moléculas de  $O_2$ , culminando na formação do  $O_3$  (PÉREZ, 2014).

O  $O_3$  possui três formas para ser produzido, não naturalmente, por eletrólise, pela ação da radiação ultravioleta e descarga corona. Nos geradores comerciais, o ozônio é produzido principalmente por descarga corona ou radiação e consequente geração da luz ultravioleta. A radiação ultravioleta, todavia, não atende as necessidades de produção requeridas pela indústria. Assim a descarga elétrica do tipo corona é o método mais utilizado para se obter ozônio em quantidades significativas, devido a maior taxa de conversão do oxigênio em ozônio. Neste

método, o ozônio é gerado pela passagem de ar (previamente tratado) ou oxigênio puro entre dois eletrodos metálicos, separados também por um material dielétrico, e submetidos a uma elevada diferença de potencial elétrico em volts (ALMEIDA et al., 2004).



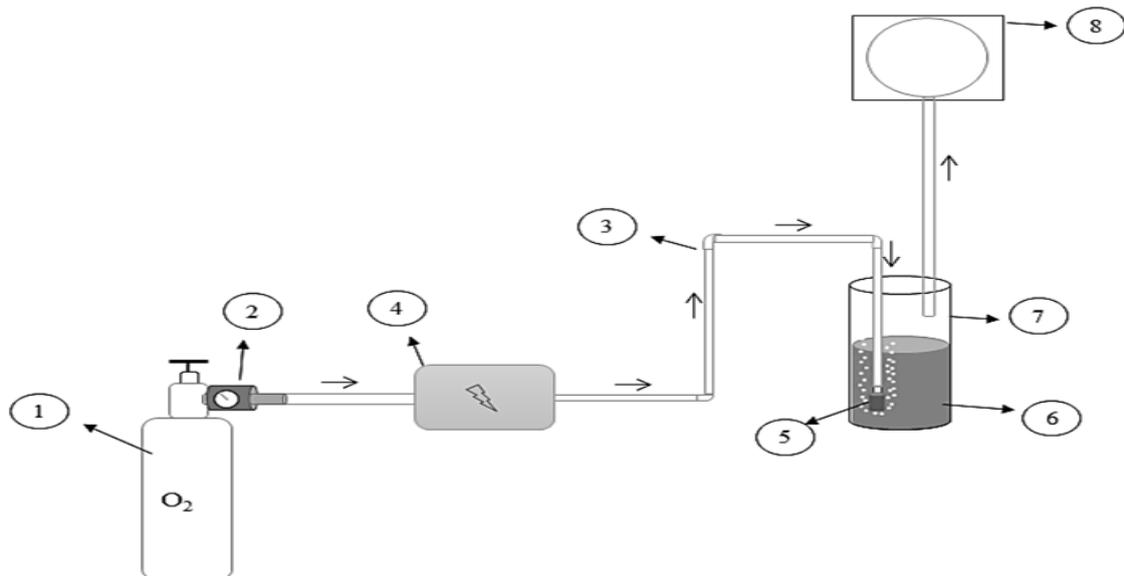
**Figura 1.** Desenho esquemático do reator de um gerador de ozônio. Fonte: Adaptado de Silva et al., 2011.

Tecnicamente a concentração de gás ozônio produzida pode ser especificado em gramas por metro cúbico ( $g/m^3$ ), ou miligramas por litro ( $mg/L$ ), ou ainda microgramas por mililitros ( $\mu g/ml$ ). O tempo de exposição deste gás é especificado normalmente em minutos, e a dosagem é estabelecida pelo produto da concentração de ozônio na saída do gerador pela vazão de oxigênio na entrada desse mesmo equipamento, em seguida é multiplicado pelo tempo em minutos de exposição dividido pela massa, volume ou superfície da amostra. (“*Ozone Feed Rate*”) (taxa de alimentação de ozônio) (VAN LEEUWEN, 2015).

O método de ozonização reator de coluna de borbulhamento proposto por Behkish et al., (2002), aplicado neste estudo, possui diversos transdutores de pressão e termopares são fornecidos tanto no reservatório de abastecimento quanto no reator a fim de permitir a construção de um balanço de massa por todo o sistema. O gás é reciclado a partir de um mecanismo de dupla ação de estágio único e compressor a ar. Um reservatório de amortecimento é colocado entre o compressor e o reator para reduzir as flutuações de vazão criadas pelo compressor. Paralelo ao reservatório, um desembaçador é montado entre o reator e o compressor para evitar infiltração de impurezas líquidas e sólidas no interior do compressor. Com duas

células de pressão ultrasensíveis com terminais conectados em diferentes pontos ao longo do reator possibilita a medição de fluxo do gás (BEHKISH et al., 2002; KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005).

O método mais comum para a realização da incorporação de  $O_3$  em óleo é através da coluna de borbulhamento (Figura 2.), que é realizada utilizando cilindro de oxigênio medicinal com uma determinada vazão na entrada do gerador de ozônio produzindo, em sua saída,  $O_2 + O_3$ . Este método é bastante utilizado na prática clínica e na ozonioterapia. De fato, esse processo recebe uma denominação técnica especificada como reator coluna de borbulhamento (“bubble column reactor”, BCR), em que o recipiente que armazena o líquido a ser gaseificado, apresenta uma secção transversal relativamente pequena, resultando numa altura de líquido significativa, dessa maneira, com a injeção de gás no fundo do reservatório utilizando uma peça porosa difusora, as bolhas do gás de pequeno tamanho, tem maior tempo de exposição à fase líquida, aumentando assim a eficiência de transferência do gás. (KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005). Alguns fatores podem influenciar na transferência do gás ozônio para o meio líquido, como: a vazão na qual o gás é injetado, o tamanho das bolhas que irão promover a dispersão, a viscosidade do meio (PANDA; MATHEWS, 2008; LIMA et al., 2018).



**Figura 2.** Ozonização do óleo pelo método Reator de Coluna de Borbulhamento (RCB). (1) Cilindro de Oxigênio  $O_2$ , (2) Válvula reguladora de fluxo e pressão, (3) Tubo de silicone 3/8 de diâmetro externo, (4) Gerador de ozônio, (5) Difusor de aço inoxidável, (6) Óleo de girassol, (7) Reservatório, (8) Exaustor para descartar o excedente de ozônio.

A resistência microbiana é um problema de saúde global porque as infecções

causadas por isolados multirresistentes estão associadas ao aumento de custos, tempo de hospitalização e taxas de morbidade e mortalidade (EVANS et al., 2007). A prescrição excessiva de antibióticos tem sido um grande problema por muitos anos. O surgimento de cepas bacterianas multirresistentes, resistentes a dois ou mais antibióticos, levou pesquisadores a avaliar o potencial de produtos naturais como agentes antimicrobianos (UGAZIO et al., 2020).

O uso da ozonioterapia na área médica tem sido utilizado há muitos anos através de tecnologias inovadoras que surgem para aprimorar novas técnicas a todo o momento. O óleo ozonizado tem sido protagonista por intermédio de estudos que evidenciam sua ação microbicida trazendo um tratamento alternativo para diversas patologias crônicas (VAROL et al., 2020).

O ozônio elimina os microrganismos agindo na parede celular e na membrana semipermeável. Isso leva a mudanças na estrutura química da célula e interfere na troca de produtos do metabolismo celular com o meio ambiente, além disso, causa a desintegração do encapsulamento do microrganismo levando ao extravasamento do conteúdo celular. Os efeitos benéficos do O<sub>3</sub> na cicatrização de feridas podem ser devidos à diminuição da infecção bacteriana, melhora na cicatrização de feridas dérmicas ou aumento da taxa de regressão de ferida devido à exposição ao O<sub>3</sub> na área da ferida. (VALACCHI et al., 2012; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005).

Na última década, a terapia com ozônio foi aprimorada usando óleos insaturados ozonizados para várias aplicações clínicas em dermatologia, ginecologia e oftalmologia. Como o gás ozônio rapidamente se torna instável na atmosfera, a ozonização de óleos vegetais causa o processo de oxidação gerando produção de compostos que apresentam propriedades microbicida e cicatrizante. A ozonização sob condições variadas de óleos vegetais como girassol, oliva, canola e coco tem sido estudada (DÍAZ et al., 2009; OMONOV; KHARRAZ; CUTIS, 2011; SADOWSKA et al. 2008; VALACCHI et al., 2011).

Os óleos vegetais ozonizados têm sido estudados por sua atividade antimicrobiana. No entanto, a pesquisa sobre a atividade antimicrobiana desses produtos tem sido dificultada pela falta de métodos de triagem *in vitro* padronizados e confiáveis. As maiores dificuldades associadas à triagem desses produtos são a viscosidade do óleo, que dificulta a obtenção de uma dispersão estável do óleo em meio aquoso e a difusão dos componentes lipofílicos do óleo através do ágar (GEWEELY, 2006; MONTEVECCHI et al., 2013).

A produção da ozonização em óleos vegetais ocorre pelo processo de oxidação do  $O_3$ , o qual o íon reativo liberado irá reagir com os componentes moleculares que constituem o óleo, neste sentido, há a produção de peróxidos lipídicos e hidroperóxidos, em que estes apresentam propriedades similares ao ozônio como efeitos microbicida e bio-estimulante (SILVA et al., 2011).

Além de sua capacidade de estimular a regeneração tecidual e oxigenar células e tecidos, os produtos derivados da ozonização de compostos insaturados, como terpenos, ácidos graxos, triglicerídeos e óleos vegetais também são conhecidos por terem propriedades germicidas. Compostos altamente oxigenados, como óleos vegetais ozonizados, tornam a pele mais macia, flexível e também são usados para preparar cremes para reparação do tecido epitelial. Isso sugere que o  $O_3$  pode ser usado topicamente para tratar feridas na pele (TRAVAGLI et al., 2010; VALACCHI et al., 2011).

O creme ozonizado possui efeitos antienvhecimento e anti-inflamatório e em contato com a pele, os ozonídeos reagem com as moléculas de água formando hidroxí-hidroperóxidos que estimulam o metabolismo celular e ativação dos captadores de radicais livres, os quais promovem sua inativação, proporcionando efeito antienvhecimento e anti-inflamatório. Outro produto da oxidação, o triaxolano, presente em creme ozonizado, é conhecido por conferir uma atividade antimicrobiana devido a sua capacidade de proteção celular (TRAVAGLI et al., 2010; VALACCHI et al., 2011).

CAMPANATI et al. (2013) demonstraram que o óleo ozonizado apresenta a mesma eficácia que o ácido hialurônico na redução dos sintomas de doenças da pele, como eritema, tensão, coceira e ardor relatados pelos pacientes.

Os índices mais comumente empregados para a caracterização química do óleo após o processo de ozonização são: índices de acidez (IA), índice de potencial de hidrogênio (pH), índice de iodo (II) e índice de peróxido (IP) que são técnicas analíticas de verificação da qualidade de óleo (DÍAZ et al., 2006a; ALMEIDA et al., 2013).

O Índice de Acidez (IA) representa a quantidade de ácidos graxos livres na amostra; o pH está relacionado com a hidrólise de fosfolipídios que ocorre em amostras de óleos e cremes ozonizados, pois ocorre a diminuição do pH devido o aumento do índice de acidez (TIĞLI AYDIN et al., 2018). O índice de iodo (II) é uma técnica que pode quantificar a quantidade de insaturação presente no óleo. Essa

técnica mede a quantidade de iodo consumida em uma amostra de 100 gramas e depende de vários fatores, como quantidade de ligações duplas carbono-carbono, condições de armazenamento e processos de oxidação, pois à medida que o ozônio reage na dupla ligação para formar ozonídeos, a quantidade de insaturação de ácidos graxos diminui, resultando em diminuição do índice de iodo (ALMEIDA et al., 2013).

O índice de peróxido expressa a quantidade de peróxido em miliequivalentes de espécies reativas de oxigênio por quilograma de amostra (ALMEIDA et al., 2013). Assim, a formação desses oxigenados (ou seja, ozônio) leva a um aumento do IP (TIĞLI AYDIN et al., 2018).

Para controle analítico de amostras de óleo, uma das técnicas utilizadas é a espectroscopia no Infravermelho por Transformadas de Fourier (*Fourier Transformed Infrared* - FT-IR) de reflexão total atenuada universal (*Universal Attenuated Total Reflectance* – UATR) que determina a qualidade de produtos ozonizados, pois os produtos de oxidação secundária, como compostos aldeídos, levam a toxicidade de células e informações genéticas (UGAZIO et al., 2020). A análise FT-IR é realizada para investigar alterações nos grupos funcionais em óleo ozonizado, a qual uma alíquota da amostra é depositada em recipiente de polietileno para mensuração através de um espectrômetro. O espectrômetro faz uma varredura na amostra com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  produzindo um conjunto de dados espectrais que apresentam picos distribuídos em uma faixa de número de onda que se estende de 4000 a  $550\text{ cm}^{-1}$  (MOUREU et al., 2016).

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo experimental *in vitro* qualitativo e quantitativo a partir do desenvolvimento de amostras de óleos e emulsões ozonizadas.

### 4.2 Local e período do estudo

O presente estudo foi realizado no Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), utilizando os Laboratórios: Apoio Mecânico, Biotecnologia, Desinfecção e Esterilização do Parque Tecnológico de São José dos Campos/SP.

O período de realização do protocolo experimental foi de março de 2021 a dezembro de 2021.

### 4.3 Ozonização do Óleo de girassol e preparo da emulsão ozonizada

Os experimentos de ozonização dos óleos foram realizados em triplicata a partir de um volume de 1500 ml de óleo de girassol (OG) *in natura* e dividido em 3 grupos: Grupo 1: óleo de girassol *in natura* (OG); Grupo 2: óleo de girassol ozonizado (OGO<sub>3</sub>) e Grupo 3: óleo de girassol ozonizado com adição de 10% de água destilada na ozonização (OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O).

Como a mistura de água destilada e o OG *in natura* é imiscível, foi adicionado um agente emulsificante, e assim, foram criados mais dois grupos experimentais: Grupo 4 (CR): emulsão com óleo de girassol *in natura* e Grupo 5 (CRO<sub>3</sub>): emulsão desenvolvida a partir do óleo de girassol ozonizado, conforme descrito anteriormente (Tabela1).

**Tabela 1:** Distribuição das amostras de óleos e emulsões desenvolvidas por grupos.

Distribuição das amostras por grupos		
Grupo 1	Óleo de girassol <i>in natura</i>	OG
Grupo 2	Óleo de girassol ozonizado	OGO <sub>3</sub>
Grupo 3	Óleo de girassol ozonizado com 10% de água destilada	OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O
Grupo 4	Emulsão com óleo de girassol e água destilada	CR
Grupo 5	Emulsão com óleo de girassol ozonizado	CRO <sub>3</sub>

O volume de 500 mL de óleo de girassol foi colocado em uma proveta de 1 L e o processo de ozonização ocorreu a partir da incorporação de gás ozônio com um difusor de gás constituído de aço inoxidável sinterizado. Foi utilizado um cilindro de oxigênio medicinal com vazão ajustada em 1/4 L.min<sup>-1</sup> na entrada do gerador de ozônio (Fabricante: Ozone & Life, Modelo: O&L1.5RM) produzindo, em sua saída, a concentração de 48 mg.L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub>, as amostras foram ozonizadas durante 4 horas.

A dose de ozônio aplicada (*Applied Ozone Dosage*) fornecida pelo gerador de ozônio nos testes realizados foi quantificada de acordo com as diretrizes apresentadas por Van Leeuwen (2015). O fluxo de oxigênio de entrada do gerador de ozônio foi equivalente a 1/4 L/min, e produziu na saída uma vazão de ozônio de 48 mg.L<sup>-1</sup>, ou seja, a taxa de alimentação de ozônio (*Ozone Feed Rate* - OFR) foi equivalente a OFR = 0,012 g.L<sup>-1</sup>. A dosagem de ozônio aplicada ao óleo de girassol, considerando um tempo de 240 min e o volume específico de 500 mL de óleo foi equivalente a 5,76 g.L<sup>-1</sup>.

#### 4.4 Determinação dos parâmetros físico-químicos

Foi realizada a análise físico-química das amostras consistiu em determinar, o pH e o índice de peróxido (IP).

A verificação do pH foi realizada a partir de um equipamento PHmetro (Fabricante: GEHAKA, modelo PG3000). Primeiramente, o equipamento foi calibrado com soluções padrão e posteriormente a verificação em triplicata de cada amostra de óleo e creme.

Para determinação do Índice de Peróxido, foi feita uma solução concentrada de 40 g de iodeto de potássio (KI) com 25 ml de água destilada, uma solução de amido a 1% com 0,25 g de solução de amido e 25 ml de água destilada. Em uma amostra de 5 g de óleo ou creme foi adicionado 0,5 ml de KI e solução com

proporção 3:2 de ácido acético e clorofórmio. Após conservar em local escuro por um minuto, presseguiu-se com a titulação utilizando tiosulfato de sódio 0,01 N em bureta, adicionado aos poucos à solução até a mesma perder a coloração. Ao final, realizou-se o cálculo e expressão do resultado de cada amostra por meio da fórmula (European Pharmacopoeia, 2007):

$$\text{Índice de Peróxido [(mEq/1000g) = (S-B) X N X 1000]} / PA$$

Onde: S= volume em ml da solução de Tiosulfato de Sódio 0,01N gasto na titulação da amostra;

B= volume em ml da solução de Tiosulfato de Sódio 0,01N gasto na titulação da prova em branco;

N= Normalidade da solução de Tiosulfato de Sódio;

PA= Peso da amostra.

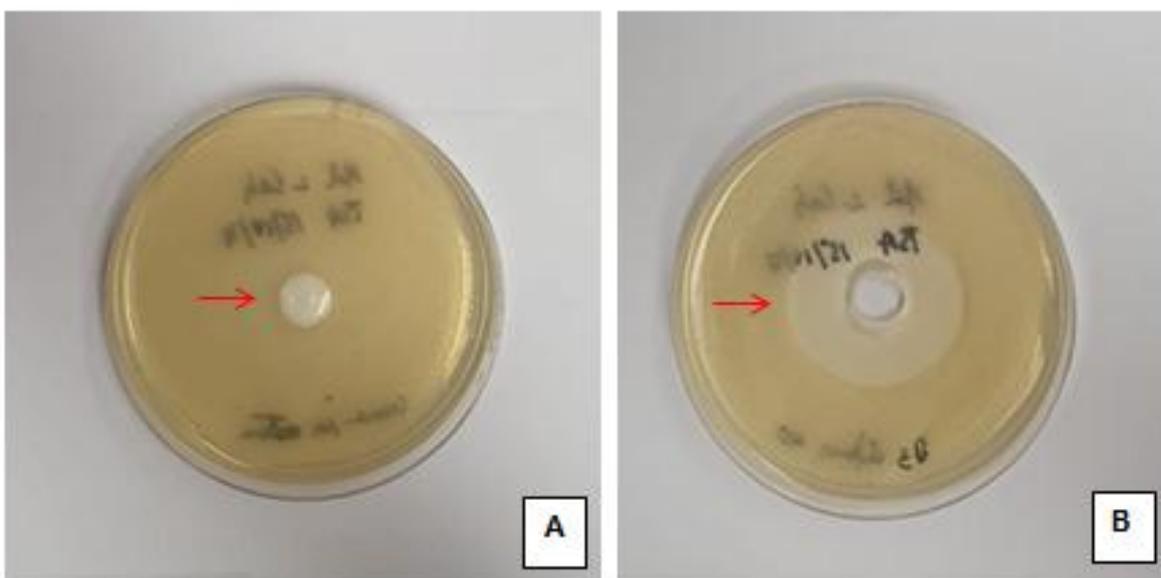
O resultado do índice de peróxido é exposto em (mEq/1000g)

#### 4.5 Análise Microbiológica

Para análise microbiológica foi utilizada cepas microbianas, como *Staphylococcus aureus* (CCCD-S013), *Eschericia coli* (CCCD: E008) e *Candida albicans* (CCCD: CC001) cultivadas em meios sólidos como ágar TSA, para gram positivas e negativas e ágar Sabouraud para levedura. Para o preparo dos meios de cultura seguiram-se as instruções do fabricante. Após o preparo as soluções foram distribuídas em placas de petri dentro de uma capela de fluxo previamente desinfectada, para esfriamento e solidificação. Após esse processo duas placas foram armazenadas em uma estufa à 37 °C e foram analisadas após 24h e 48h e utilizadas como controle. As outras placas foram armazenadas em uma geladeira com temperatura entre 2 °C e 8 °C, onde permaneceram até serem retiradas para utilização em ambiente com temperatura de 25 °C.

Foram preparadas 980 µL de cada amostra de OG, OGO<sub>3</sub> e OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O com adição de 20 µL Tween 80, conforme descrito por Serio et al. (2016). Nas amostras de creme não foi empregado o Tween 80.

As suspensões microbianas foram preparadas com o auxílio de alça metálica estéreis, retirada uma porção das colônias e diluída em 30 mL de solução salina estéril. Foi empregado o turbidímetro (Fabricante AlpHakit, modelo Turmidímetro Plus Microprocessado), que utiliza a escala de turvação de Mc Farland. Na sequência foi determinada a turbidez da suspensão microbiana, sendo preconizada a concentração de  $10^6$  UFC/mL. Em local apropriado, previamente preparado e higienizado foi feita realizada semeadura em superfície no ágar *TSA* e *Sabouraud*, de acordo com o microrganismo analisado. Com auxílio de alça de Drigalski, 1 ml da suspensão microbiana foi distribuída na placa, em seguida, houve a retirada da porção central de ágar de cada placa com auxílio de um *punch* de aço inoxidável de 10 mm (área que equivale a 1 mL de volume), previamente autoclavado, que foi confeccionado especificamene para este experimento, sendo que exatamente 1 mL das amostras foi adicionado no local. Com relação ao creme, por se tratar de um composto semi-sólido, toda a área foi preenchida com a amostra. As placas foram para estufa a 37 °C por um período de 24h a 48h e após retiradas da estufa foi realizada a análise e mensuração dos halos de inibição microbiana formado em cada amostra. O estudo foi feito em triplicata e a atividade microbicida foi medida a partir do halo de inibição formado ao redor de cada amostra usada para a cepa microbiana testada; O halo foi medido em mm com auxílio de régua, conforme demonstrado na figura 3.



**Figura 3.** Mensuração do halo de inibição nas amostras de (A) óleo de girassol *in natura* (OG) e (B) óleo ozonizado com adição de 10% de água destilada na ozonização (OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O).

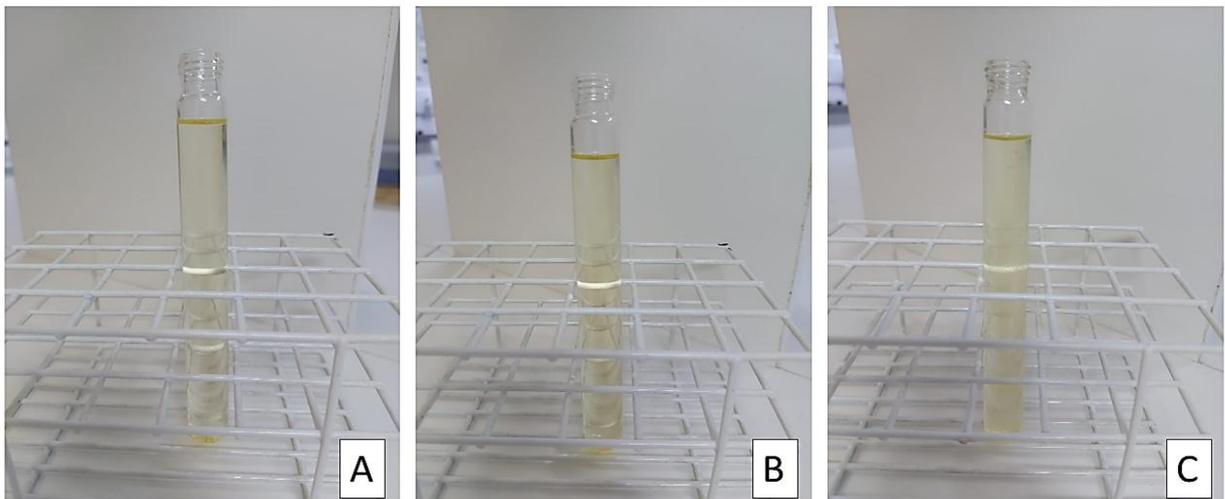
#### **4.6 Caracterização do óleo e do creme por espectroscopia FT-IR**

Para análise química dos óleos ozonizados e da emulsão ozonizada foi utilizada a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de reflexão total atenuada universal (UATR) com o espectrômetro FT-IR (Fabricante: Perkin Elmer, Modelo: Spectrum Frontier) e programa *Spectrum V 5.3.1*. Foram realizadas análises em quintuplicata e varreduras de 20 amostras espectrais para os compostos em temperatura ambiente de 25°C, umidade relativa do ar equivalente a 46%, ganho equivalente a 1 e resolução de 4 cm<sup>-1</sup> resultando no espectro médio para cada amostra.

## 5 RESULTADOS

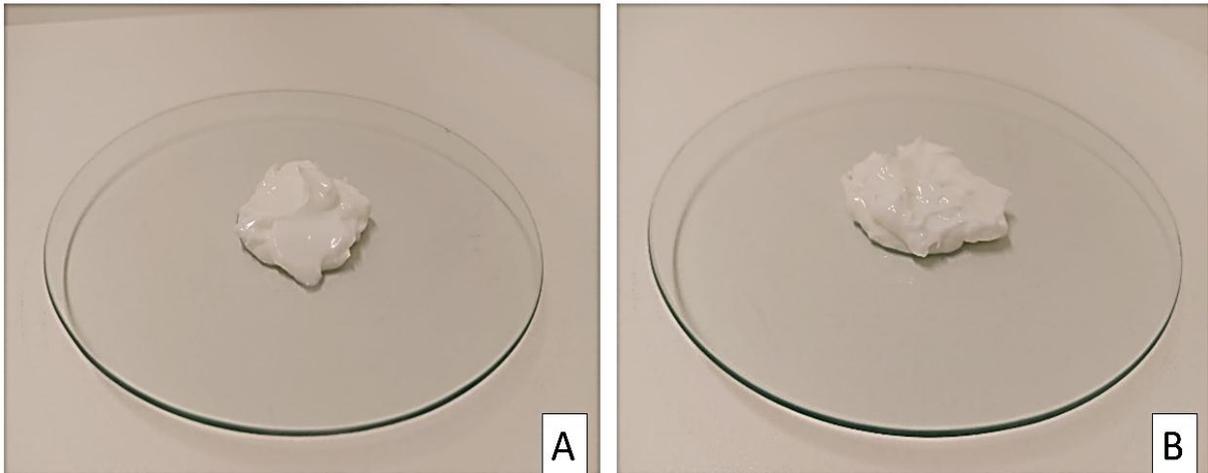
### 5.1 Obtenção das amostras de óleos e emulsões ozonizadas

A partir da ozonização do óleo de girassol, obtiveram-se amostras de óleo girassol ozonizado e óleo de girassol ozonizado com adição de 10% de água no processo de ozonização. Não houve diferença visual nas amostras após adição de água e o procedimento de ozonização quando comparado com o grupo controle (Figura 4).



**Figura 4.** Amostras de (A) óleo de girassol *in natura* (OG), (B) ozonizado ( $\text{OGO}_3$ ) e (C) ozonizado com adição de 10% de água destilada ( $\text{OGO}_3\text{H}_2\text{O}$ ).

A Figura 5 apresenta as imagens das amostras de creme à base de OG e  $\text{OGO}_3$ , visualmente as emulsões obtidas são idênticas, são homogêneas com relação ao aspecto, textura e coloração.

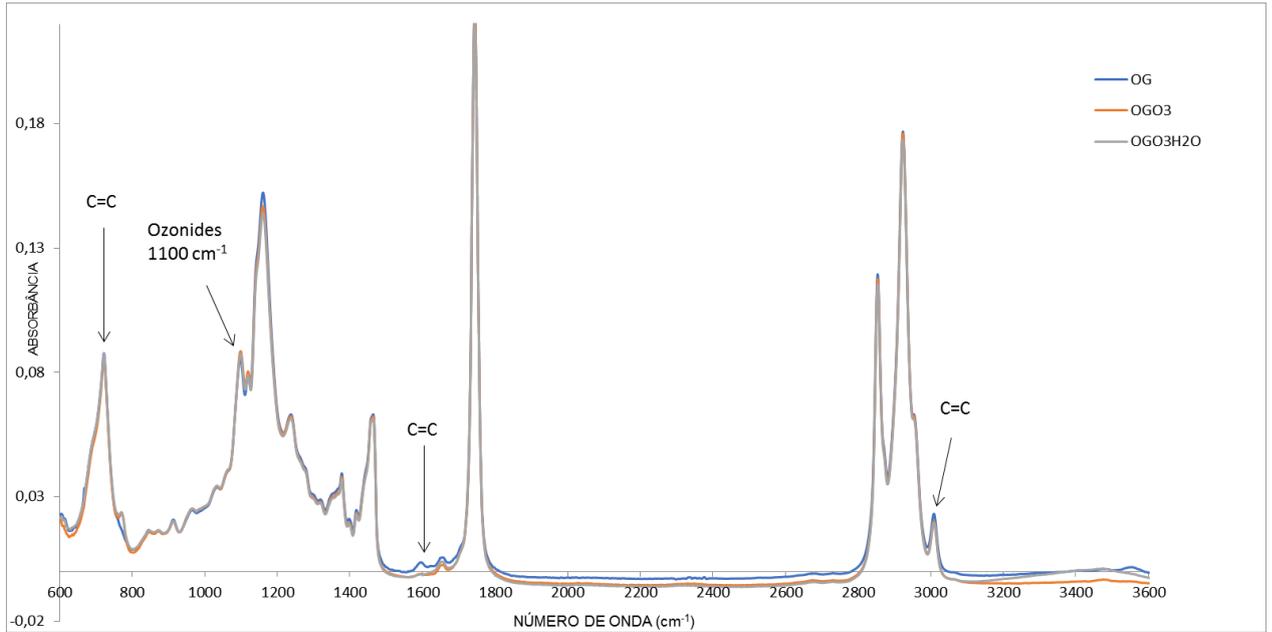


**Figura 5.** Amostras de (A) creme a base de óleo de girassol *in natura* (CR) e (B) creme ozonizado (CRO<sub>3</sub>).

## 5.2 Análise por Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR)

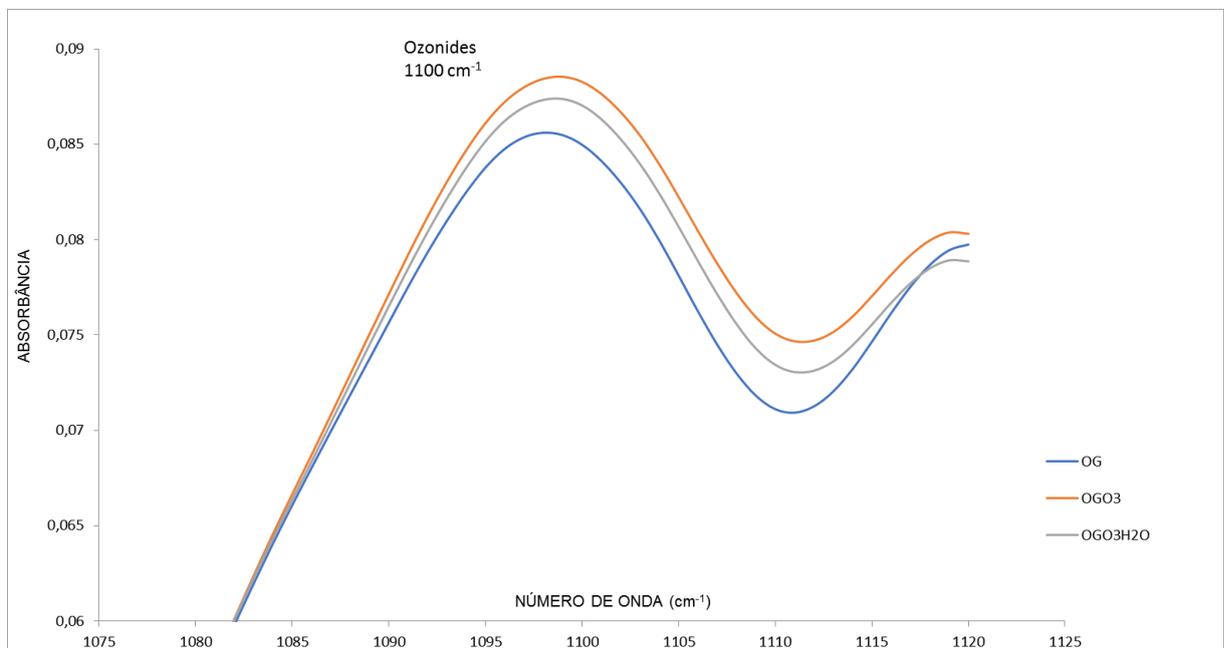
As amostras de OG, OGO<sub>3</sub> e OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O foram analisadas pelo método de FT-IR para determinação dos compostos orgânicos e inorgânicos a partir do efeito vibracional provocado pela ação do infravermelho médio. As bandas na região C=O foram analisadas para observar alterações nas amostras de OGO<sub>3</sub> e OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O ou aumento de intensidade nas absorções em relação ao OG puro, conforme demonstrado na Figura 6.

Os espectros revelaram a presença dos compostos ozonídeos primários, pertinentes à banda espectral localizada em 1100 cm<sup>-1</sup>. Verificou-se também a degradação por oxidação produzida pelo ozônio, dos compostos do óleo de girassol *in natura* localizadas nas bandas 725, 1650 e 3010 cm<sup>-1</sup>, estas substâncias são constituídas de moléculas que apresentam dupla ligação de carbono (C=C).



**Figura 6.** Espectros FT-IR das amostras de óleo de girassol *in natura* (OG), óleo de girassol ozonizado ( $\text{OGO}_3$ ) e óleo de girassol ozonizado com adição de 10% água destilada ( $\text{OGO}_3\text{H}_2\text{O}$ ).

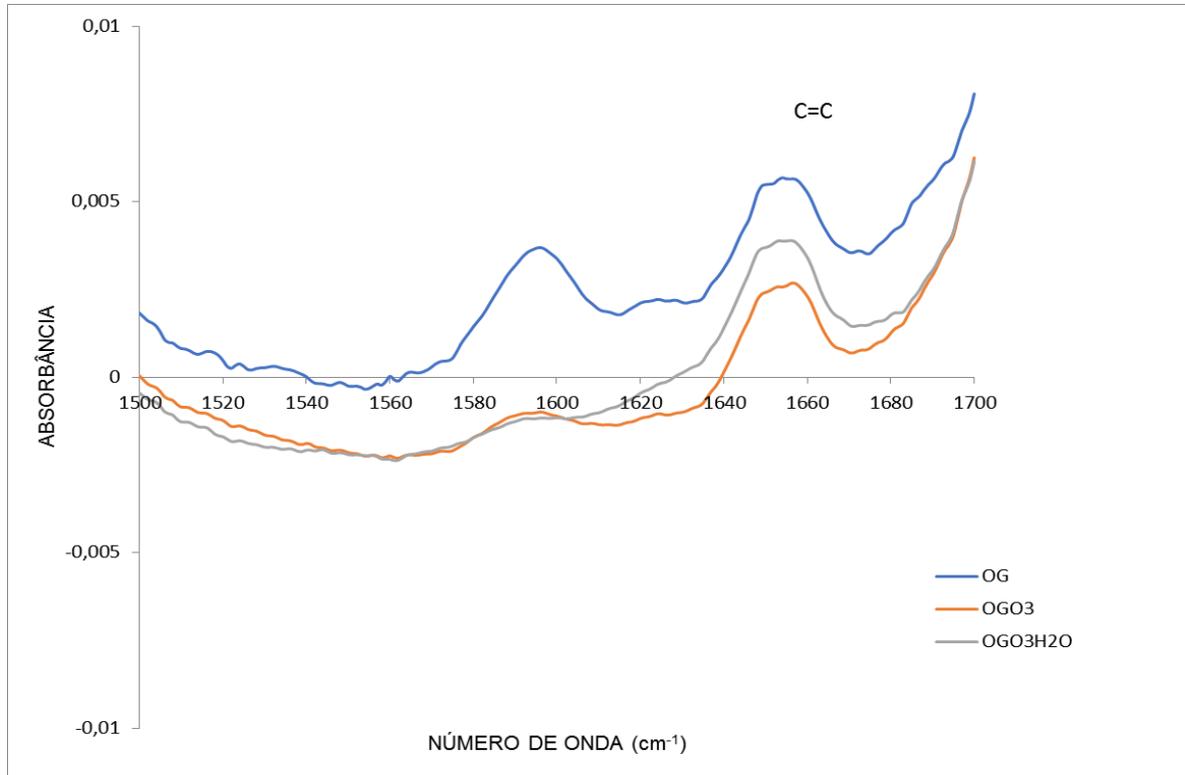
A figura 7 destaca intensidade aumentada da banda em  $1100\text{ cm}^{-1}$ , a qual representa a formação do ozonídeos primários.



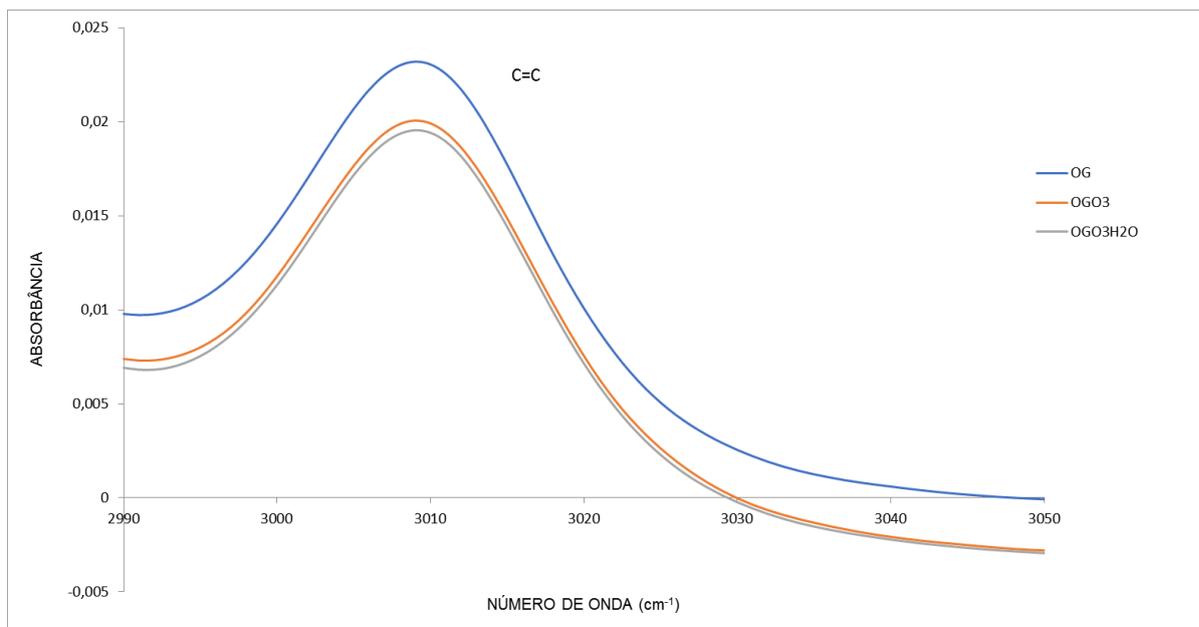
**Figura 7.** Faixa espectral de  $1100\text{ cm}^{-1}$  evidenciando a formação de ozonídeos.

Quando realizada a ampliação dos espectros correspondentes às regiões da das bandas de  $1650\text{ cm}^{-1}$  (Figura 8) e  $3010\text{ cm}^{-1}$  (Figura 9), observou-se diminuição

das intensidades de tais bandas, as quais representam moléculas com dupla ligação de carbono (C=C), nas amostras ozonizadas, estes resultados eram esperados uma vez que ozônio é responsável pela oxidação das duplas ligações de carbono.



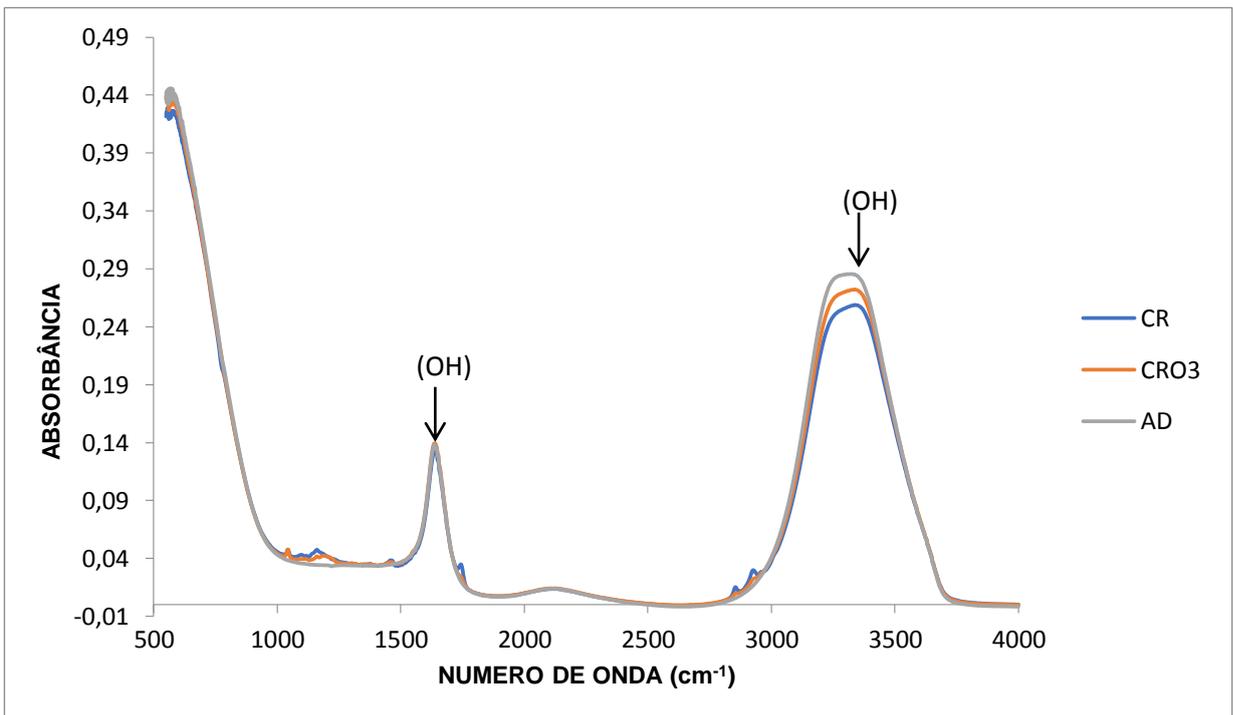
**Figura 8.** Faixa espectral em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$  referente à dupla ligação de carbono (C=C).



**Figura 9.** Faixa espectral em torno de  $3010\text{ cm}^{-1}$  referente à dupla ligação de carbono (C=C).

As amostras de emulsão CR e CRO<sub>3</sub> foram analisadas pelo espectro FT-IR e comparadas com o espectro da água (Figura 10).

A análise comparativa das bandas espectrais revelou extrema semelhança nos picos em torno de 3340 cm<sup>-1</sup> e 1640 cm<sup>-1</sup>, que são identificadas como bandas características de estiramento e deformação de grupos hidroxilas (OH) de água. Neste sentido, no espectro do creme ozonizado ou não, se observou majoritariamente as bandas espectrais referentes a água destilada (AD).



**Figura 10.** Espectros FT-IR das amostras de Creme à base de OG *in natura* (CR) e Creme à base de OG ozonizado (CRO<sub>3</sub>) comparado com o espectro da Água destilada (AD).

### 5.3 Análise Microbiológica

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) dos seguintes microrganismos *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram positiva), *Escherichia coli* (bactéria Gram negativa) e *Candida albicans* (Levedura) frente aos diferentes tipos de óleos (OG, OGO<sub>3</sub>, OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) e emulsões (CR e CRO<sub>3</sub>). Os resultados obtidos demonstraram que o OG e o CR não apresentaram efeito microbicida, uma vez que não houve formação do halo de inibição, conforme esperado uma vez que óleo de girassol não apresenta na sua composição ativa a propriedade microbicida. Na análise comparativa dos óleos,

observou-se que o OGO<sub>3</sub>, apresentou efeito microbicida tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli*, no entanto a adição de 10% de água no óleo potencializou o efeito microbicida ( $p < 0,05$ ). A emulsão ozonizada CRO<sub>3</sub> apresentou efeito microbicida maior que o óleo ozonizado ( $p < 0,05$ ). A análise comparativa do efeito microbicida do CRO<sub>3</sub> e do OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O demonstrou que não houve diferença significativa entre estes grupos ( $p > 0,05$ ). As amostras analisadas não apresentaram efeito fungicida, pois, não foram capazes de eliminar a *C. albicans*.

**Tabela 2:** Diâmetro dos halos de inibição de crescimento em (Média ± DP [mm]) destacando o efeito microbicida das amostras de óleos e cremes em bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e levedura.

Microrganismo	Diâmetro dos halos de inibição (Média ± DP [mm])				
	OG	OGO <sub>3</sub>	OGO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	CR	CRO <sub>3</sub>
<i>S. aureus</i>	A/Hi	17 ± 3	28 ± 10*	A/Hi	24 ± 4*
<i>E. coli</i>	A/Hi	11 ± 1	19 ± 1*	A/Hi	16 ± 1*
<i>C. Albicans</i>	A/Hi	A/Hi	A/Hi	A/Hi	A/Hi

A/Hi = Ausência de halo de inibição.

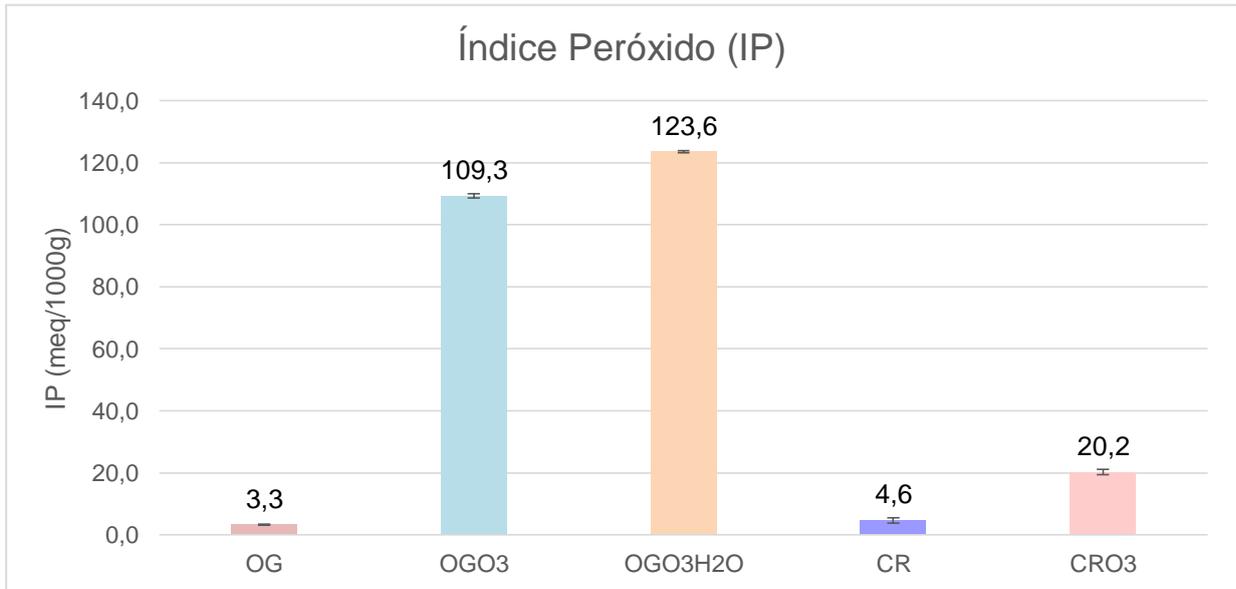
\*Representa valor  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OGO<sub>3</sub>.

## 5.4 Análise dos Parâmetros físico-químicos

### 5.4.1 Índice de Peróxido

A Figura 11 apresenta os dados referentes aos parâmetros físico-químicos das amostras analisadas. A análise comparativa do IP das amostras de OG com o OGO<sub>3</sub>, demonstrou que a ozonização aumentou em cerca de 33 vezes o IP. Ao adicionar água nas amostras (OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O) foi observado um aumento em cerca de 37 vezes no IP, quando comparado ao óleo *in natura*. Ao comparar os grupos OGO<sub>3</sub> e OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O, verificou-se um aumento de cerca de 12% no IP no grupo que recebeu a adição de 10% de água.

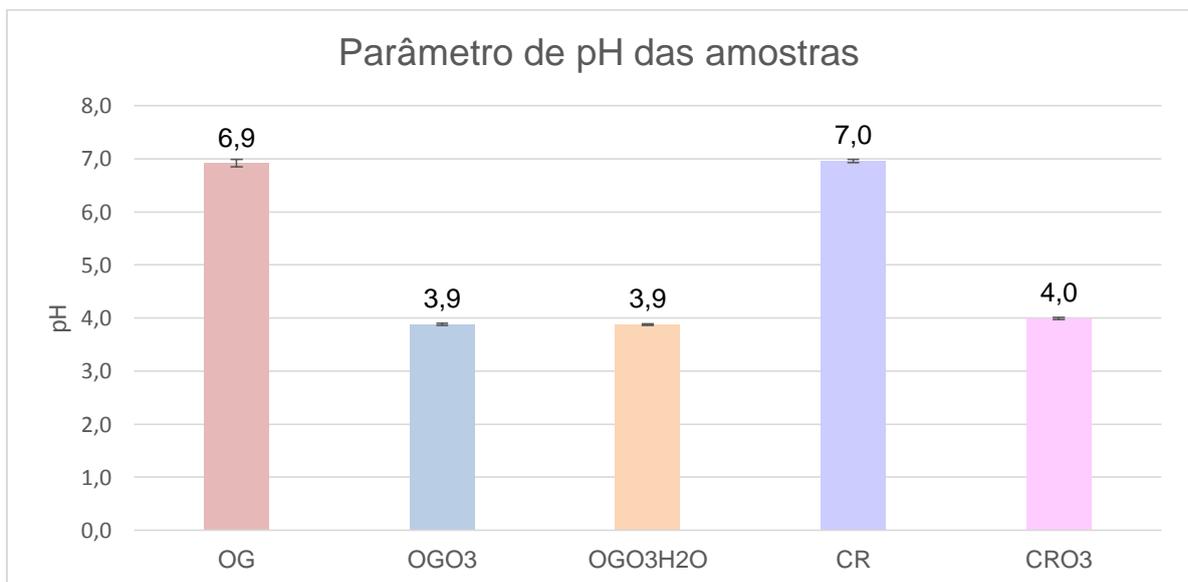
Ao comparar o CRO<sub>3</sub> com OGO<sub>3</sub> e OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O verificou-se que a emulsão apresentou IP bem inferior aos obtidos nas amostras de óleo ozonizado com e sem adição de água, este resultado já era esperado uma vez que a concentração de água no creme é maior. Na análise comparativa das emulsões, houve um aumento no IP de cerca de 4 vezes na amostra ozonizada.



**Figura 11.** Determinação do Índice Peróxido (IP) das amostras das amostras de OG, OGO<sub>3</sub>, OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O, CR e CRO<sub>3</sub>

#### 5.4.2 Parâmetro de pH

A figura 12 apresenta os valores de pH das diferentes amostras analisadas. As análises comparativas dos dados revelam que as amostras que não foram ozonizadas apresentaram pH neutro (~7,0), enquanto que as ozonizadas apresentaram pH ácido (~4,0). A ozonização induziu uma redução no pH das amostras que foram submetidas a este processo.



**Figura 12.** Determinação do pH das amostras de OG, OGO<sub>3</sub>, OGO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O, CR e CRO<sub>3</sub>.

## 6 DISCUSSÃO

A infecção da pele é um dos principais fatores que afetam o processo de cicatrização devido a uma variedade de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, espécies de *Enterococcus* (MANDELBAUM, et al. 2003) e *Escherichia coli* (JEKINS et al. 2010; ZILBERBERG et al. 2009). Devido a resistência microbiana houve aumento de pesquisas sobre a aplicação terapêutica de produtos naturais com efeito microbicida (DAI et al. 2010). Neste sentido, foi proposto neste estudo o desenvolvimento de uma emulsão a base de óleo de girassol ozonizado em água (O/A), com intuito de potencializar o efeito microbicida da mistura, e assim, empregá-la no tratamento de feridas e doenças dermatológicas contaminadas.

Há estudos que demonstraram que o gás ozônio pode inativar bactérias, vírus e esporos em poucos minutos além de ser eficaz clinicamente no tratamento de feridas infectadas (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008; SANCHEZ et al., 2005). Em repetidos modelos experimentais em animais, a terapia com gás ozônio foi confirmada como tendo efeitos benéficos quando usada como adjuvante ao tratamento antibiótico padrão (SILVA et al., 2009). Em estudo realizado por Skalska et al., (2009), os autores identificaram que os óleos de girassol ozonizados podem inibir o desenvolvimento e crescimento de microrganismos como *E. coli*, *C. albicans* e *B. subtilis*. Estes dados corroboram aos obtidos no presente estudo com relação a *E. coli*, porém, não foi observado este efeito com relação a *C. albicans*.

Considerando os aspectos morfológicos da *Candida Albicans*, esse fungo possui cerca de 90% de sua camada celular formada por polissacarídeos de glicose o que conferem rigidez à sua estrutura, o seu crescimento é favorecido pelo pH ácido em torno de 2,5 a 7,5 e os mecanismos responsáveis por sua virulência e resistência antifúngica estão relacionados com limitações difusionais da passagem do agente antimicrobiano pela matriz extracelular (GOW, 2012)

A atividade microbicida dos óleos ozonizados é atribuída principalmente à presença de ozonídeos, aldeídos, peróxidos, além de complexa mistura de compostos durante o processo de ozonização (MENENDEZ et al., 2008). O ozônio (O<sub>3</sub>) ao reagir com óleos vegetais forma óleos ozonizados com propriedades microbicidas que podem ser utilizados em dermatologia, em particular, o óleo de girassol ozonizado é um produto antimicrobiano de amplo espectro com atividade

inibitória e letal contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (incluindo cepas resistentes a antibióticos), micobactérias e leveduras (DÍAZ et al., 2006b).

Em estudo realizado por Sechi et al., (2001), foram observadas alterações no citoplasma microbiano após a exposição a óleos ozonizados. Além disso, segundo Geweely et al., (2006), a aplicação de óleos ozonizados resulta em uma redução significativa nas atividades microbianas de amilase, lipase, queratinase e urease, bem como uma redução no teor de ácido nucleico.

Os nossos resultados demonstraram que o OGO<sub>3</sub> apresentou atividade microbicida contra bactérias de referência Gram positivas e Gram negativas, com zonas de inibição de crescimento variando de 11 a 17 mm de diâmetro, corroborando com os resultados de Serio et al., (2017), que demonstraram a atividade microbicida do óleo de semente de girassol ozonizado contra *S. aureus* e outras cepas Gram-negativas. Do ponto de vista germicida, o mais importante é o Índice de peróxidos, pois, representa a quantidade de peróxidos formados nos óleos vegetais a partir da ozonização (DÍAZ et al., 2005).

Outra vantagem dos óleos ozonizados é que são de baixo custo e apresentam menor resistência do que as preparações antibióticas (ZENG; LU, 2018). Para que a difusão do óleo ozonizado seja potencializada, os pacientes devem limpar a superfície da pele danificada para remover tecido necrótico, pus, deposição frouxa de fibrina e excesso de exsudato de fluido antes da aplicação do óleo (Zanardi et al., 2013). A temperatura do óleo ozonizado é algo que deve ter um cuidado especial para o seu armazenamento, segundo Moureu et al., (2016), os óleos mantidos em temperatura ambiente e alta temperatura (+ 37 °C) apresentaram rápidas mudanças (diminuição de índice de peróxidos e de acidez) em sua composição inicial, por outro lado, amostras armazenadas em baixas temperaturas (- 20 °C e + 4 °C) são estáveis por 1 ano. As melhores condições para preservar os ingredientes originais do óleo de girassol ozonizado são o armazenamento a frio na geladeira ou no freezer.

Conforme mencionado anteriormente o Índice de peróxidos é um parâmetro importante a ser considerado para determinar o efeito germicida do óleo ozonizado. Os valores obtidos por meio deste estudo estão de acordo com o estudo de Moreau et al., (2016) que associam o aumento de peróxidos ao processo de ozonização e consequente formação de compostos secundários, principalmente quando adicionada água ao processo de ozonização onde há a produção de espécies peroxídicas como hidro-peróxidos e carboxiácidos. Também foi realizada medidas

de pH das amostras que evidenciou pH ácido nas amostras ozonizadas, enquanto as não ozonizadas apresentaram pH neutro, corroborando com o estudo de Segal et al., (2010), a presença de peróxidos favorece a acidificação do meio e conseqüentemente há a diminuição do pH, gerado pela elevada formação de ácido carboxílico, mais frequente em óleos ozonizados com água (OMONOV; KHARRAZ; CUTIS, 2011). A análise espectral das amostras pelo FT-IR evidenciou picos alterados após oxidação pelo gás ozônio em amostras de óleo e amostras de óleo com adição de água. A redução de grupos funcionais insaturados é acompanhada da formação de ozonídeos primários, conforme postulado por Criegee, em 1975, seguido de aumento de absorção na banda em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação axial, uma alteração no comprimento da ligação C-O do ozonídeos (GEORGIEV et al, 2015; ZANARDI et al., 2008).

O estudo realizado por Vinet et al., (2021) relatou que o espectro de absorção revelou presença de lipídio insaturado caracterizado pela ligação C=C na banda em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$ . No presente estudo observou-se diminuição das intensidades das bandas de  $725$ ,  $1650$  e  $3010\text{ cm}^{-1}$  nas amostras de óleo ozonizado, indicando um processo oxidativo induzido pelo ozônio. As amostras de óleo de girassol *in natura* apresentaram maior intensidade dessas bandas em comparação com as amostras ozonizadas (SORIANO; MIGO; MATSUMURA, 2003).

As amostras de emulsão CR e  $\text{CRO}_3$  foram analisadas pelo espectro FT-IR e comparadas com o espectro da água. A análise comparativa das bandas espectrais revelou extrema semelhança picos em torno de  $3340\text{ cm}^{-1}$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$ , que são identificadas como bandas características de estiramento e deformação de grupos hidroxilas (OH) de água. Isto se justifica pelo fato de que o creme é uma emulsão formada pela mistura de dois líquidos imiscíveis, no caso o óleo (ozonizado ou *in natura*), água e um emulsificante, sendo considerada uma emulsão O/A, uma vez que a concentração de água adicionada foi maior do que a de óleo. Nesse caso, a fase interna ou dispersa é a do óleo, e encontra-se no interior da fase externa ou contínua que é a água. Neste sentido, no espectro do creme ozonizado ou não, se observou majoritariamente as bandas espectrais referentes à água.

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi feita uma avaliação do efeito microbicida da emulsão ozonizada, a análise dos parâmetros físico-químicos e a análise química através da Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR).

A análise espectral das amostras pelo FT-IR evidenciou picos alterados após oxidação pelo gás ozônio em amostras de óleo e amostras de óleo ozonizado com adição de água. A redução de grupos funcionais insaturados é acompanhada da formação de ozonídeos primários, seguido de aumento de absorção na banda em torno de  $1100\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial, uma alteração no comprimento da ligação C-O do ozonídeos. Houve diminuição das intensidades das bandas  $725$ ,  $1650$  e  $3010\text{ cm}^{-1}$  pertinentes às moléculas constituintes do óleo ozonizado, as quais representam moléculas com dupla ligação de carbono (C=C), estando aumentadas para a amostra de óleo de girassol *in natura*, uma vez que há diminuição dessas bandas com o aumento da ozonização. Na análise química do creme as bandas observadas apresentam picos em torno de  $3340\text{ cm}^{-1}$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  que são identificadas como bandas características de estiramento e deformação de grupos hidroxilas (OH) relacionadas à molécula de água.

Os nossos resultados demonstraram que o  $\text{OGO}_3$  apresentou atividade microbicida contra bactérias de referência Gram positivas e Gram negativas, com zonas de inibição de crescimento variando de 11 a 17 mm de diâmetro contra *S. aureus* e *E. coli*, porém, não foi observado este efeito com relação a *C. albicans*. O creme ozonizado apresentou efeito microbicida comparável ao grupo  $\text{OGO}_3\text{H}_2\text{O}$ , esses resultados são promissores no sentido de uma futura aplicação desta emulsão no tratamento de lesões de pele, uma vez que é estável quimicamente e de fácil aplicação.

## 8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E.; et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 818-24, 2004.

ALMEIDA, N. R. et al. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, v. 4, n. 4, 2013.

AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H. 2008. The Application of Ozone in Dentistry: A Systematic Review of Literature. **Journal of Dentistry**, v.36, n. 2, p.104–16, 2008.

BALAKRISHNAN, P. A.; ARUNAGIRI, A.; RAO, P. G. Ozone generation by silent electric discharge and its application in tertiary treatment of tannery effluent. **Journal of Electrostatics**, v. 56, n. 1, p. 77-86, 2002.

BEHKISH, A. et al. Mass transfer characteristics in a large-scale slurry bubble column reactor with organic liquid mixtures. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 16, p. 3307-3324, 2002.

BICAS, T. C. et al. Uso da Espectroscopia de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (IV-TF) aliada à quimiometria para classificação de vinhos e suco de uva. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 2, p 89-97, 2017.

BOCCI, V. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 425–35, 2006.

BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of inflammation**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2004.

BOUZID, D. et al. Various Antimicrobial Agent of Ozonized Olive Oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 43, n. 6, p. 606-12, 2021.

CAMPANATI, A. et al. Topical Ozonated Oil versus Hyaluronic Gel for the Treatment of Partial-To Full-Thickness Second-Degree Burns: A Prospective, Comparative, Single-Blind, Non-Randomised, Controlled Clinical Trial. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 39, p. 1178–83, 2013.

CARDOSO, L. C. et al. **Azione Dell'olio Ozonizzato (Bioperoxoil®) Nelle Lesioni Chirurgiche Dei Modelli Pre-Clinici**. LC Farm, v. 19, p. 56–60, 2002.

CLAVO, B. et al. Effects of ozone treatment on personal protective equipment contaminated with SARS-CoV-2. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1222, 2020.

CRIEGEE, R. Mechanism of Ozonolysis. **Angewandte Chemie International**. Edition in English, v. 14, n. 11, p. 745–52, 1975.

DAI, T., Y. Y. et al. Topical Antimicrobials for Burn Wound Infections. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 5, n. 2, p. 124–51, 2010.

DE SOUZA, A.; POPPI, R. Teaching experiment of chemometrics for exploratory analysis of edible vegetable oils by mid infrared spectroscopy and principal component analysis: a tutorial, part I. **Química Nova**, V. 35, p. 223-29, 2011.

DIAZ, M. F. et al. Study of three systems of ozonized coconut oil. **Ozone: Science and Engineering**, v. 27, n. 2, p. 153-57, 2005.

DIAZ, M. F. et al. Study of ozonated sunflower oil using 1h NMR and microbiological analysis. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 1, p. 59-63, 2006a.

DIAZ, M. F., et al. Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 403–07, 2006b.

DIAZ, M. F., et al. Estudio Comparativo De La Ozonización De Aceites De Girasol Modificados Genéticamente Y Sin Modificar. **Química Nova**, v. 32, p. 2467– 72, 2009.

European Pharmacopeia, 6<sup>th</sup> edition. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe; 2007.

EVANS, H. L. et al. Cost of Gramnegative Resistance. **Critical Care Medicine**, v. 35, p. 89–95, 2007.

GEORGIEV, V. F. et al. Study of ozonated olive oil: monitoring of the ozone absorption and analysis of the obtained functional groups. **Ozone: Science & Engineering**, v. 37, n. 1, p. 55-61, 2015.

GEWEELY, N. S. I. Antifungal Activity Ozonized Olive Oil (Oleozone). **International Journal Agricultural Biologic**, v. 8, p. 670–75, 2006.

GOW, N. A. R., et al. “Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, 2012.

JENKINS, T. C. et al. Skin and Soft-Tissue Infections Requiring Hospitalization at an Academic Medical Center: Opportunities for Antimicrobial Stewardship. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, p. 895–903, 2010.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column reactors. **Process biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2263-83, 2005.

LIMA, V. N. et al. Tratamento de efluentes gasosos e líquidos em reatores de coluna de bolhas por processos avançados de oxidação: Uma revisão. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 16-18.

MANDELBAUM, S. H. et al. Cicatrização: Conceitos Atuais e Recursos Auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525–42, 2003.

MENENDEZ, S. et al. **El Ozono: Aspectos Básicos y Aplicaciones Clínicas**. Cuba: Editorial CENIC, v.10, p. 320, 2008.

MONTEVECCHI, M. et al. Comparison of the Antibacterial Activity of an Ozonated Oil with Chlorhexidine Digluconate and Povidone-Iodine. A Disk Diffusion Test. **The New Microbiologica**, v. 36, p. 289–302, 2013.

MOUREU, S. et al. Influence of storage temperature on the composition and the antibacterial activity of ozonized sunflower oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 38, n. 2, p. 143-49, 2016.

OMONOV, T. S., KHARRAZ, E., CUTIS, J. M. Ozonolysis of Canola Oil: A Study of Product Yields and Ozonolysis Kinetics in Different Solvent Systems. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 88, p. 689–705, 2011

PANDA, K. K.; MATHEWS, A. P. Mass transfer of ozone in a novel in situ ozone generator and reactor. **Journal of Environmental Engineering**, v. 134, n. 10, p. 860-69, 2008.

PEREZ, A. et al. Ozone dosage effect on C6 cell growth, in vitro and in vivo tests: double bond index for characterization. **Analytical Methods**, v. 6, n. 13, p. 4567-4575, 2014.

RODRIGUES, K. L. et al. Cicatrizing and Antimicrobial Properties of an Ozonised Oil from Sunflower Seeds. **InflammopHarmacology**, v. 12, n. 3, p. 261–70, 2004.

SADOWSKA, J. et al. Characterization of Ozonated Vegetable Oils by Spectroscopic and Chromatographic Methods. **Chemistry and physics of lipids Journal**, v. 151, p.85–91, 2008.

SANCHEZ, G. M. Therapeutic Efficacy of Ozone in Patients with Diabetic Foot. **European Journal of Pharmacology**, v.523, n. 1–3, p.151–61, 2005.

SCHIAVON, G. J.et al. Design and analysis of an ozone generator system operating at high frequency with digital signal controller. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 27, p. 23-35, 2012.

SECHI, L. A., et al. Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil (Oleozone). **Journal of Applied Microbiology** v. 90, n. 2, p. 279–84. , 2001.

SEGA, A. Properties of sesame oil by detailed and NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value, and viscosity measurements. **Chemistry and physics of lipids Journal**, v. 163, p. 148-156, 2010.

SERIO, F., G. et al. A New Formulation Based on Ozonated Sunflower Seed Oil: In Vitro Antibacterial and Safety Evaluation. **Ozone: Science & Engineering**, v. 39, n. 3, p. 139–47, 2017.

SILVA, R. A., et al. Analysis of the Bactericidal Effect of Ozone Pneumoperitoneum. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 124–27, 2009.

SILVA, S. B.; et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

SKALSKA, K., et al. Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 31, p.232–7, 2009.

SORIANO, N.U.; MIGO, V.P.; MATSUMURA, M. Ozonation of sunflower oil: Spectroscopic monitoring of the degree of unsaturation. **J Amer Oil Chem Soc.** v. 80, p. 997–1001, 2003.

TIĞLI AYDIN, et al. Synthesis and characterization of ozonated oil nanoemulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 11, p. 1385-98, 2018.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.;BOCCI, V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A review. **Mediat Inflamm**, 2010.

UGAZIO, E., et al. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 334, 2020.

VALACCHI, G. et al. Emerging Topics in Cutaneous Wound Repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1259, p. 136–44, 2012.

VALACCHI, G. et al. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice: Ozonated sesame oil enhances wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 1, p. 107–115, 2011.

VALACCHI, G.; FORTINO, V.; BOCCI, V. The Dual Action of Ozone on the Skin. **The British Journal of Dermatology**, v. 153, p. 1096–100, 2005.

VAN LEEUWEN, J. Proposed OS&E Requirement: Measuring Ozone Dosage. **Ozone: Science & Engineering**, v. 37, n. 2, p. 191-192, 2015.

VAROL, M. ROS and oxidative stress in cancer: recent advances. **Drug targets in cellular processes of cancer: from nonclinical to preclinical models**, p. 109-138, 2020.

VINET, J, et al. Iodine and Peroxide Index Rapid Determination by Mid- and Near-infrared Spectroscopy in Ozonated Sunflower Oil and Ozonated Fats, **Ozone: Science & Engineering**, 2021.

ZANARDI, I. et al. What Is the Best Strategy for Enhancing the Effects of Topically Applied Ozonated Oils in Cutaneous Infections? **BioMed Research International**, 2013.

ZANARDI, I. et al. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. **Lipids**, v. 43, p. 877–886, 2008.

ZENG, J., LU, J. Mechanisms of Action Involved in Ozone-Therapy in Skin Diseases. **International Immunopharmacology**, v.56, p. 235–41, 2018.

ZILBERBERG, M. D., et al. Epidemiology and Outcomes of Hospitalizations with Complicated Skin and Skin - Structure Infections: Implications of Healthcare-Associated Infection Risk Factors. **Infection Control and Hospital Epidemiology : The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America**, v.30, p. 1203–10, 2009.