



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Padronização, caracterização e potencial
atividade biológica do óleo vegetal de girassol
ozonizado**

Matheus Henrique Vieira

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

**Araraquara - SP
2023**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Padronização, caracterização e potencial
atividade biológica do óleo vegetal de girassol
ozonizado**

Matheus Henrique Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin.

**Araraquara - SP
2023**

V658p Vieira, Matheus Henrique.
Padronização, caracterização e potencial atividade biológica do óleo vegetal de girassol ozonizado / Matheus Henrique Vieira. – Araraquara, 2023.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Chung Man Chin.

1. Óleo vegetal ozonizado. 2. Óleo vegetal girassol. 3. Ozônio. 4. Oleozonioterapia. I. Chung, Man Chin, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Padronização, caracterização e potencial atividade biológica do óleo vegetal de girassol ozonizado

AUTOR: MATHEUS HENRIQUE VIEIRA

ORIENTADORA: CHUNG MAN CHIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. CIBELE ROSANA RIBEIRO DE CASTRO LIMA (Participação Presencial)
Academia Brasileira de Tricologia (ABT)

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 15 de dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades diárias de crescer e evoluir.

A minha esposa Jaqueline e minha filha Alice que sempre me deram forças para seguir estudando.

Aos meus pais, que desde pequeno sempre me orientaram que o estudo seria um caminho importante para vencer na vida.

Ao meu amigo Celso Junior, que foi o grande incentivador para ingressar no mestrado.

A minha orientadora Dra. Chung Man Chin, por seu olhar criterioso e ao mesmo tempo acolhedor, compartilhando seu conhecimento e suas ideias para aprimorar o trabalho de maneira sempre pontual e cirúrgica.

A minha amiga Dra. Cibele Rosana de Castro Lima, um exemplo de profissional e me inspirou muito para chegar ao mestrado.

Ao Grupo Martbel, pelo incentivo e disposição de tempo que tive que me ausentar das atividades de trabalho para realização dos estudos.

Ao Grupo Ipclin, pelos testes todos cedidos do estudo em especial ao Laboratório Atena e Núcleo Vitro.

A empresa Ozon Solution, por fornecer amostras do Óleo Vegetal Girassol.

Ao Dr. Jean Lucas de Oliveira Arias da Universidade Federal do Rio Grande, que muito contribuiu para esse projeto.

Enfim, a todos colaboradores da Melk Cosméticos que sempre estão comigo no dia a dia, me ajudam e me estimulam a sempre crescer como profissional e ser humano.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A molécula de ozônio é formada por três átomos de oxigênio com elevado poder oxidante, sendo amplamente empregada para diversas finalidades, inclusive para tratamento terapêutico que inclui a administração de ozônio medicinal no combate a diversas doenças. Desde 2018, a utilização de ozônio medicinal foi incorporada como uma prática de medicina complementar e integrativa no Sistema Único de Saúde (SUS). Contudo, é crucial destacar que a eficácia do ozônio está intimamente ligada à sua concentração, uma vez que concentrações inadequadas podem resultar em efeitos deletérios ou ineficácia no tratamento. Neste contexto, a padronização do óleo ozonizado se torna indispensável para assegurar a segurança do paciente. O objetivo principal deste trabalho consistiu em desenvolver protocolos para a padronização e caracterização, com isso foram utilizadas técnicas como cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, ensaios microbiológicos e citotóxicos. Os resultados obtidos indicaram que após 480 minutos de ozonização em 100 mL de óleo vegetal de girassol (OG), ocorreu um significativo potencial antimicrobiano, resultando na formação de ozonídeos. Esse processo provocou alterações físico-químicas no aspecto, cor, odor e na produção de subprodutos no óleo, conforme evidenciado pela cromatografia, sendo esta última dependente da atividade citotóxica/antibacteriana. Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica, conduzidos por meio dos métodos de "time kill", difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM), revelaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* e *Malassezia furfur*. Estes resultados demonstram o potencial terapêutico do óleo ozonizado no tratamento de doenças infecciosas. Em síntese, a padronização do processo de ozonização do óleo vegetal de girassol revelou-se promissora, proporcionando um produto com marca da atividade antimicrobiana e potencial terapêutico, abrindo perspectivas para sua aplicação em diversas áreas da medicina.

Palavras-chave: óleo vegetal ozonizado, óleo vegetal girassol, ozônio, oleozonioterapia.

ABSTRACT

The ozone molecule is formed by three oxygen atoms with high oxidizing power, being widely used for various purposes, including therapeutic treatment that includes the administration of medicinal ozone to combat various diseases. Since 2018, the use of medicinal ozone has been incorporated as a complementary and integrative medicine practice in the Unified Health System (SUS). However, it is crucial to highlight that the effectiveness of ozone is closely linked to its concentration, since inadequate concentrations can result in deleterious effects or ineffective treatment. In this context, the standardization of ozonized oil becomes essential to ensure patient safety. The main objective of this work was to develop protocols for standardization and characterization, using techniques such as gas chromatography coupled to mass spectrometry, microbiological and cytotoxic assays. The results obtained indicated that after 480 minutes of ozonization in 100 mL of sunflower vegetable oil (OG), a significant antimicrobial potential occurred, resulting in the formation of ozonides. This process caused physical-chemical changes in the appearance, color, odor and production of by-products in the oil, as evidenced by chromatography, the latter being dependent on cytotoxic/antibacterial activity. Antibacterial and antifungal activity assays, conducted using the "time kill", agar diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) methods, revealed activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis* and *Malassezia furfur*. These results demonstrate the therapeutic potential of ozonized oil in the treatment of infectious diseases. In summary, the standardization of the ozonization process of sunflower vegetable oil proved to be promising, providing a product with antimicrobial activity and therapeutic potential, opening up perspectives for its application in various areas of medicine.

Keywords: ozonized vegetable oil, sunflower vegetable oil, ozone, oleozone therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Gerador de ozônio proposto por Werner Siemens	16
Figura 2 Estrutura Molecular de Óleo Vegetal.....	19
Figura 3 Mecanismo de ozonólise de proposto por Criegee	21
Figura 4 Mecanismo de ozonólise de olefina.....	22
Figura 5 (CG-MS) de uma amostra de azeite refinado.	23
Figura 6 (CG-MS) de uma amostra de azeite refinado ozonizado.	23
Figura 7 Mecanismo de Criegee para reações de ozônio com ligação dupla carbono-carbono.....	24
Figura 8 Cilindro de Oxigênio, Gerador de Ozônio e OG seguido do OGO ...	40
Figura 9 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OG).	42
Figura 10 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OGO 100 minutos).	43
Figura 11 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OGO 240 minutos).	44
Figura 12 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OGO 480 minutos).	45
Figura 13 Cromatograma da matéria insaponificável do óleo de girassol (OG)	48
Figura 14 Cromatograma matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 100 minutos).....	50
Figura 15 Cromatograma matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 240 minutos).....	52
Figura 16 Cromatograma matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado(OGO 480 minutos).....	54
Figura 17 Emulsão com diferentes tipos de Óleo vegetal de oliva.....	57
Figura 18 Difusão em ágar OGO vs controle com a cepa Staphylococcus aureus ATCC 6538	64
Figura 19 Plaqueamento de cepa para o ensaio time-kill (tempo de morte). ..	65
Figura 20 Microdiluição com microplaca de 96 poços.	66
Figura 21 Controle versus concentração de OGO 480 minutos.....	68

LISTAS DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 Suscetibilidade bacteriana ao gás ozônio.	17
Tabela 2 Agentes oxidantes e seu potencial de oxidação.....	18
Tabela 3 Perfil graxo óleo girassol (OG).	42
Tabela 4 Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 100 minutos).	43
Tabela 5 Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 240 minutos).	44
Tabela 6 Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 480 minutos).	45
Tabela 7 Percentagem de insaturação de ácidos graxos vs tempo de ozonização.....	47
Tabela 8 Matéria insaponificável do óleo de girassol (OG).	48
Tabela 9 Matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 100 minutos).	51
Tabela 10 Matéria insaponificável do óleo girassol ozonizado (OGO 240 minutos).	53
Tabela 11 Matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 480 minutos).	55
Tabela 12 Comparativo dos 5 componentes majoritarios perfil graxo.	57
Tabela 13 Comparativo dos 5 componentes majoritarios da matéria insaponificável.	58
Tabela 14 Índice de acidez OG e OGO	59
Tabela 15 Comparativo tempo, dosagem vs índice de peróxido.	60
Tabela 16 Índice de iodo das amostras de OG e OGO.....	61
Tabela 17 Parâmetros físico-químicos do óleo de girassol ozonizado obtido por (DIAZ et al., 2012) com oxigênio como fonte de ozônio.	61
Tabela 18 Estabilidade acelerada OGO 100 minutos.	62
Tabela 19 Estabilidade acelerada OGO 240 minutos.	63
Tabela 20 Estabilidade acelerada OGO 480 minutos.	63
Tabela 21 Contagem de bactérias e leveduras (tempo de contato e fator de redução).....	65
Tabela 22 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OGO 480 minutos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OGO	Óleo vegetal de girassol ozonizado
OG	Óleo vegetal de girassol
CIM	<i>Minimum inhibitory concentration</i> (Concentração Mínima Inibitória)
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa)
kPa	Kilo pascal
NaOH	Hidróxido de Sódio
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
<i>S.choleraesuis</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 16404
<i>A. brasiliensis</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404
<i>M.furfur</i>	<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521
PG	Perfil graxo
MI	Matéria insaponificável
mEq O ₂ /kg	miliequivalente de oxigênio por quilograma
Na ₂ S ₂ O ₃	Tiosulfato de Sódio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Eagle modificado Dulbecco)
TSB	Caldo Seletivo Tradicionalmente
UFC	Unidade Formadora de Colônia / g ou mL após exposição
% RF	Fator de redução (% redução a partir contagem inicial da linha de base)
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i> (Sociedade Americana Química Óleo)

ASTME *Standard Guide For Assessment Of Antimicrobial Activity Using A Time-Kill Procedure* ((Guia padrão para avaliação da atividade antimicrobiana usando um procedimento *time-kill*)).

LESS Lauril éter sulfato sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Ozônio	16
2.2 Reação Química do Ozônio e Óleo Vegetal	18
2.OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivo Específico	27
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	28
3.1. Reagentes	28
3.2. Equipamentos	28
3.3. Preparação do Óleo Vegetal de girassol ozonizado (OGO).....	29
3.4. Cromatografia Gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS)..	29
3.5. Análise físico-química.....	30
3.6. Ensaio microbiológicos	32
3.6.1. Cepas	32
3.6.2. Difusão em ágar (Pour-Plate).....	33
3.6.3. <i>Time-kill</i> (tempo de morte)	33
3.6.4. Concentração inibitória mínima (CIM)	36
3.7. Estudo <i>in vitro</i> de citotoxicidade	38
4. RESULTADOS e DISCUSSÕES	39
4.1. Preparação do óleo de girassol ozonizado	40
4.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)....	42
4.2.1. Perfil graxo óleo girassol (OG) e óleo girassol ozonizado (OGO).....	42
4.2.2. Perfil cromatográfico da matéria insaponificável da amostra de óleo de girassol (OG) e óleo girassol ozonizado (OGO)	47
4.3. Análise Físico-química.....	58
4.3.1. Índice de acidez	58
4.3.2. Índice de Peróxido	59
4.3.3. Índice de Iodo	60
4.3.4. Estabilidade Físico-química	62
4.4. Eficácia Microbiológica	64
4.4.1. Difusão em ágar (Pour-Plate).....	64

4.4.2. <i>Time-Kill</i> (tempo de morte)	64
4.4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	66
4.5. Estudo <i>in vitro</i> de citotoxicidade	68
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

O ozônio (O₃), embora tenha sido produzido em laboratório pela primeira vez em 1839 por Christian Friedrich Schönbein, é uma substância natural. Sua descoberta foi um resultado do interesse de Schönbein em compreender o odor produzido por certos processos químicos e elétricos. (McELROY; FOGAL, 2008).

Durante a primeira guerra mundial (1914-1918) médicos familiarizados com o O₃ e com poucos outros recursos médicos disponíveis na época, aplicaram topicamente em feridas infectadas e descobriram que o ozônio não apenas curava a infecção, mas também tinha propriedades hemodinâmicas e antiinflamatórias. (SERRA *et al.*, 2023). O ozônio tem sido utilizado com sucesso na medicina há mais de 100 anos devido ao seu potencial microbiológico.

A crescente preocupação com a resistência aos microrganismos e aos antimicrobianos convencionais tem direcionado a atenção para alternativas como ozônio. O seu uso na desinfecção de ambientes (hospitais, hotéis entre outros) foi alvo de estudo por Sharma e Hudson (2008) que demonstraram a eficácia antimicrobiana com este gás. Rangel, Cabral, Lechuga, Carvalho, Villas-Boas, Midley e De-Simone (2021) determinaram as concentrações mínimas de ozônio necessárias para controlar e eliminar tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas. (SHARMA; HUDZON, 2008; RANGEL *et al.*, 2021).

Conforme Brito Júnior, Carneiro, Reis, Oliveira e Dantas (2022) a ozonioterapia tem sido explorada em várias áreas terapêuticas devido às suas propriedades antimicrobianas e potencial de regeneração tecidual.

No Brasil, o sistema de saúde público é robusto e, desde a década de 1980 foram introduzidas as práticas de medicina tradicional, complementar e integrativa. Em 2018, a ozonioterapia foi incluída como prática integrativa complementar apresentando diversos benefícios. (SERRA *et al.*, 2023).

Na ozonioterapia, tem utilizado os óleos vegetais ozonizados devido ser um método de baixo custo e com resultados eficientes, incluindo a fácil aplicação do óleo ozonizado na pele. (UEBELE *et al.*, 2022).

Os óleos ozonizados tem despertado um grande interesse nas esferas científica e clínica devido aos seus potenciais aplicações terapêuticas. A

transformação de óleos vegetais pelo ozônio resulta na formação de ozonídeos e outros compostos que demonstram liberar lentamente o ozônio retido como ozonídeos (MOULYDIA *et al.*, 2018; UGAZIO *et al.*, 2020).

Entretanto, a padronização e caracterização dos óleos vegetais ozonizados, é de extrema importância, tendo em vista que a concentração de ozônio pode tornar o óleo ineficaz pela baixa concentração, ou torna-lo tóxico, devido ao excesso de ozônio aplicado, formando componentes como formaldeído, tóxico para microrganismos e também ao ser humano (UGAZIO *et al.*, 2020).

Assim, esta pesquisa visa a padronização do óleo vegetal ozonizado e suas potencialidades antimicrobianas o qual trará avanços significativos no campo da ozonioterapia, com segurança para uso medicinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ozônio

Na história da descoberta da molécula do ozônio, com contribuições de vários estudos, sempre foi referência o químico alemão Christian Friedrich Schonbein, porém, o primeiro químico a detectar sensorialmente o gás de ozônio foi Van Marum em meados de 1785. (RUBIN, 2001).

O ozônio é uma forma alotrópica triatômica de oxigênio (O_3) e possui odor único, com característica oxidante e instável, sendo até 10 vezes mais solúvel em água comparado ao oxigênio (O_2). Sendo uma molécula que se decompõe naturalmente devido à sua alta reatividade e instabilidade, seu armazenamento é dificultado. (BRITO JUNIOR *et al.*, 2022).

O físico Werner Von Siemens propôs o primeiro sistema de geração de ozônio por descarga elétrica em 1857. Ele demonstrou que o ozônio poderia ser produzido através de oxigênio passando através de um espaço anular entre dois cabos coaxiais cilíndricos de vidro, conforme mostra na (Figura 1). (PEKAREK, 2008).

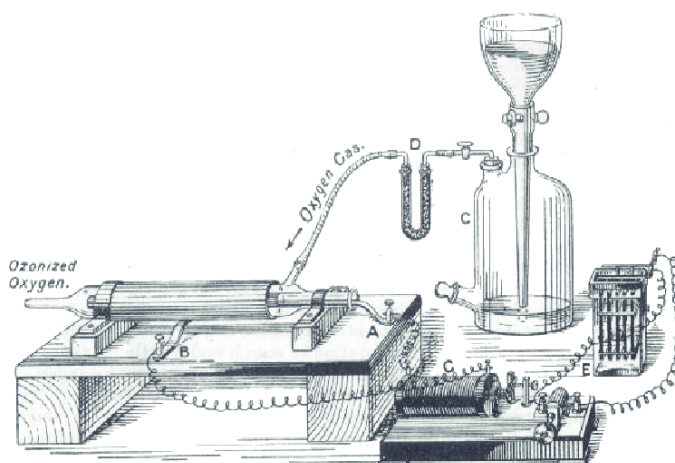


Figura 1 Gerador de ozônio proposto por Werner Slemens

Fonte: PEKAREK;2008

O uso do ozônio na medicina tem uma história interessante. Inicialmente utilizado pelos médicos alemães durante a Primeira Guerra Mundial para

desinfetar feridas, o ozônio foi gradualmente explorado em diversas aplicações médicas. (ROWEN, 2018).

Nos últimos anos, tem houve interesse crescente na literatura científica sobre as propriedades, a fim de compreender melhor os mecanismos básicos de ação que sustentam seus efeitos sistêmicos no sangue e tecidos humanos (DE SIRE *et al.*, 2021).

A terapia com ozônio tem sido utilizada e fortemente estudada por mais de um século (ROSA *et al.*, 2023). As infecções bacterianas continuam a representar uma ameaça à saúde em muitos ambientes institucionais e comunitários, e edifícios danificados, sendo frequentemente relatadas epidemias. (ROSA *et al.*, 2023).

Segundo Sharma e Hudson (2008) estudaram a atividade antimicrobiana do ozônio em diversos microrganismos (Tabela 1), sugerindo a substituição de métodos convencionais de vaporização de formaldeído, ácido peracético, clorexidina, formulações com peróxido de hidrogênio, os quais possuem desvantagens inerentes incluindo alto custo por gás ozônio. (SHARMA; HUDSON, 2008).

Tabela 1 Suscetibilidade bacteriana ao gás ozônio.

Fonte: (SHARMA; HUDSON, 2008).

Suscetibilidade bacteriana ao gás ozônio			
Bactérias Gram-positiva	ATCC	Redução Log10 em UFC*	
		Amostra úmida	Amostra seca
<i>Bacillus cereus</i>	11778	> 3.1	> 3.1
<i>Bacillus spizizenii</i>	6633	> 3.2	> 3.2
<i>Clostridium difficile</i>	43593	> 4.0	> 4.0
MRSA	Isolados clínicos	> 3.0	> 3.0
<i>Methicillin-sensitive</i>	Isolados clínicos	> 2.5	> 2.5
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Propionibacterium acnes</i>	11827	≥ 4	≥ 4
<i>Streptococcus pyogenes</i>	12384	≥ 4	≥ 4
Bactérias Gram-negativa			
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	≥ 4	≥ 4
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	> 3	> 3
<i>Escherichia coli</i>	25922	> 3.1	> 3.1
<i>Haemophilus influenzae</i>	19418	≥ 4	≥ 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	≥ 4	≥ 4
<i>Legionella pneumophila</i>	33152	≥ 4	≥ 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	≥ 4	≥ 4
Bactérias ácido resistente			
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	14468	> 2.7	> 2.7

*Unidade formadora de colônias.

De acordo com (ELVIS *et al.*, 2011) e seus colaboradores a ação antibacteriana ocorre por inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários, estimulação do metabolismo do oxigênio e ativação do sistema imunológico. Segundo (ABELAN *et al.*, 2020) o ozônio ataca diretamente os microrganismos, resultando em uma esterilização segura, rápida e econômica.

O ozônio tem um potencial oxidante significativamente alto em comparação com outros agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio, cloro gasoso e oxigênio conforme (Tabela 2). Esse alto potencial oxidante torna-se o ozônio eficaz na reação com várias substâncias, o que o torna útil na inativação de microrganismos e na remoção de contaminantes. (XUE *et al.*, 2023).

Tabela 2 Agentes oxidantes e seu potencial de oxidação.

Fonte: (XUE *et al.*, 2023).

Agente Oxidante	Potencial Oxidante (V)
Flúor	3.06
Ozônio	2.07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,5
Ácido Hipocloroso	1,49
Gás cloro	1,36
Oxigênio	1.23

A ozonioterapia é a técnica que se utiliza do gás ozônio e seu potencial antioxidante para fins terapêuticos no organismo. O ozônio terapêutico é uma mistura de no máximo 95% de oxigênio e 5% de ozônio de acordo com (REZENDE *et al.*, 2023). Auxilia na cicatrização, aumenta a capacidade bactericida, reduz o edema, diminui a lesão isquêmica e o tempo de consolidação das fraturas. (ANZOLIN *et al.*, 2018).

2.2 Reação Química do Ozônio e Óleo Vegetal

Os óleos vegetais são, em sua maioria, compostos por triglicerídeos (SARKAR *et al.*, 2017), que são ésteres de glicerol com ácidos graxos. Esses ácidos graxos podem ser classificados como saturados ou insaturados, dependendo da presença ou ausência de ligações duplas entre os átomos de carbono na cadeia, conforme demonstrado na (Figura 2). (DUPAIN *et al.*, 2007).

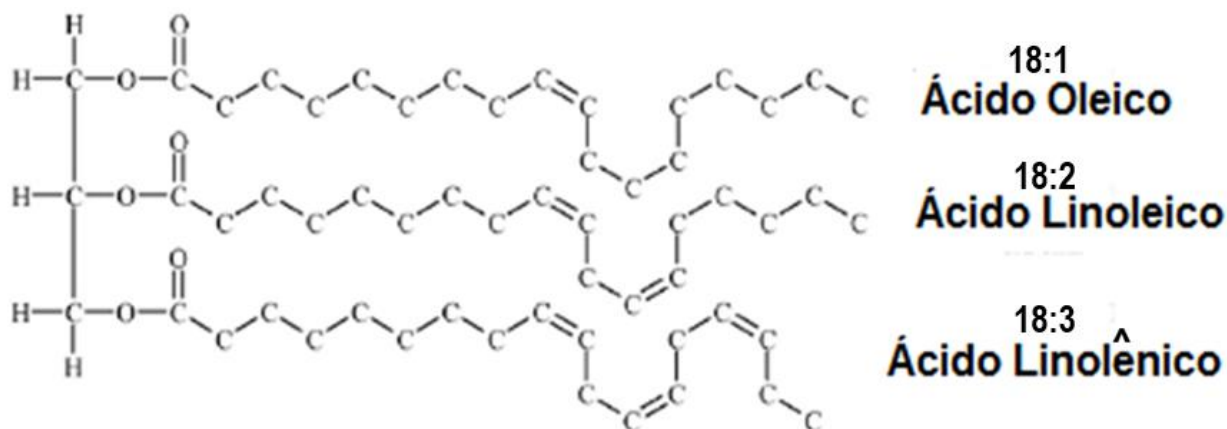


Figura 2 Estrutura Molecular de Óleo Vegetal.

Fonte: DUPAIN *et al.*, 2007

Os ácidos graxos derivados desses óleos vegetais, podem oferecer benefícios funcionais no tratamento da inflamação da dermatite, seja irritante ou alérgica. Os mesmos ácidos graxos possuem ligações simples estáveis e menos fáceis de oxidar, que conferem firmeza às paredes celulares. (POLJSK *et al.*, 2022).

As propriedades antimicrobianas dos ácidos graxos insaturados, saturados, e seus monoglicerídeos previnem e tratam o crescimento microbiano da pele, inflamação e ruptura da barreira. (VERALLO-ROWELL *et al.*, 2016).

A água e óleo ozonizado têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas da pele, pois podem aliviar rapidamente sintomas como prurido e edema, mitigando a gravidade da doença. (ZENG *et al.*, 2020).

Além disso, o óleo ozonizado, derivado desse conhecimento, tem sido empregado desde a década de 1930 para tratar infecções bacterianas da pele e

é ainda amplamente utilizado em áreas como dermatologia e odontologia para o tratamento de lesões infectadas. (GRANDI *et al.*, 2022).

Os óleos vegetais como o óleo de jojoba, são amplamente utilizados em tratamento como: distúrbios de pele e couro cabeludo, feridas superficiais, crescimento do cabelo (GAD *et al.*, 2021) como nos casos das terapias capilares. São produzidos pelas plantas como fonte de energia, sendo a maior concentração presente em sementes e frutos. (YARA *et al.*, 2017).

Já óleos vegetais ozonizados têm despertado interesse significativo na aplicação clínica, especialmente no tratamento de distúrbios dermatológicos, como infecções de úlceras na pele e feridas crônicas. Eles demonstraram resultados promissores, principalmente no tratamento de feridas refratárias, ou seja, aquelas que não respondem bem a tratamentos convencionais ou medicamentos disponíveis. (ALMEIDA *et al.*, 2016).

O uso terapêutico do ozônio é reconhecido em vários países, sendo Cuba um dos pioneiros na implementação dessa terapia nos serviços de saúde públicos há mais de duas décadas, conforme estudo de (OLIVEIRA, 2007). A OLEOZON® é um medicamento terapêutico desenvolvido a partir de a reação do ozônio com óleo vegetal de girassol. O processo foi desenvolvido na Ozone Centro de Pesquisa – Centro Nacional de Pesquisa Científica de Cuba (SKALSKA *et al.*, 2009).

Os óleos vegetais ozonizados apresentam uma vantagem significativa sobre o ozônio gasoso e a água ozonizada, pois são fáceis de serem preservados, aplicados e com vários estudos que demonstram a eficácia antimicrobiana. (SARKAR *et al.*, 2017).

As primeiras evidências sobre o uso clínico de óleos ozonizados apareceram pela primeira vez na literatura científica em 1859. Os produtos de oxidação gerados após a reação do ozônio com ácidos graxos e outros substratos podem atuar como germicida, imunoestimulante e agente de restauração tecidual. Estima-se que a eficácia e segurança esteja intimamente ligada ao controle de qualidade. (MARTINEZ-SANCHES, 2021).

A reação do ozônio com óleos vegetais ocorre quase que exclusivamente com a dupla ligação entre o carbono-carbono presentes nos ácidos graxos insaturados conforme (OLIVEIRA; WOSCH, 2012) e seus colaboradores. Essa

reação do ozônio com óleos vegetais, conhecida como ozonólise, pode resultar na formação de vários compostos oxigenados, incluindo hidroperóxidos, ozonídeos, aldeídos, peróxidos e dipoliperóxidos. (SADOWSKA *et al.*, 2008).

Em meados de 1904, Carl D. Harries (1866–1923) introduziu o ozônio para a clivagem oxidativa de múltiplas ligações duplas em hidrocarbonetos. Onde estabeleceu aspectos mecanísticos para determinar as estruturas de compostos orgânicos utilizando a ozonólise, resultando no mecanismo unificado de ozonólise de Criegee. (HASSAN *et al.*, 2021).

A reação do ozônio com as ligações duplas em hidrocarbonetos produz intermediários-chave, instáveis, mas significativos, denominados intermediários de Criegee, birradicais ou zwitterions de Criegee (referidos também como peróxidos zwitteriônicos ou óxidos carbonílicos), conforme mostra a (Figura 3). (HASSAN *et al.*, 2021)

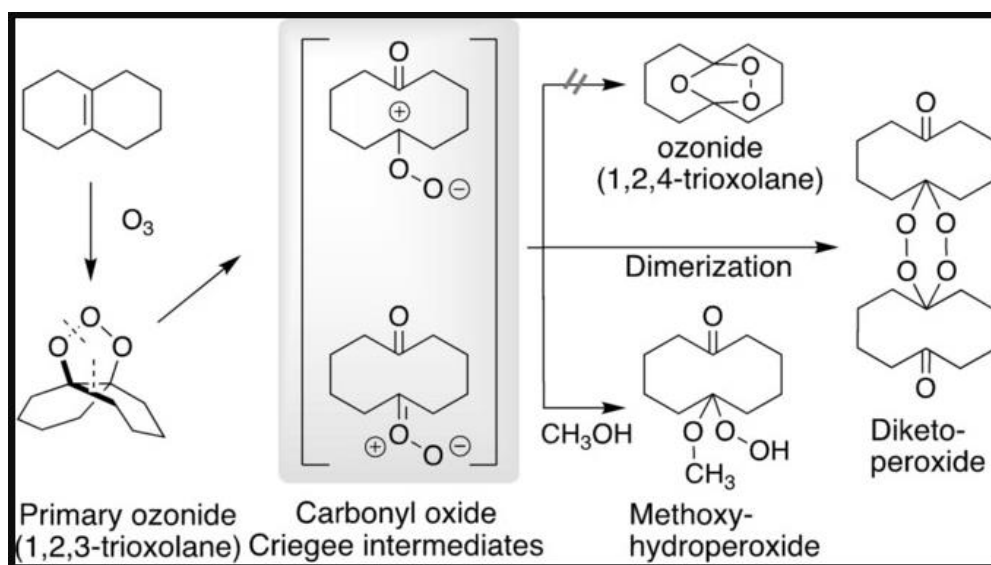


Figura 3 Mecanismo de ozonólise de proposto por Criegee

Fonte: (HASSAN *et al.*, 2021).

O mecanismo proposto por Criegee é um processo de reação sequencial que envolve três etapas. Primeiramente, ocorre a adição de ozônio à ligação dupla, resultando na formação de um ozonídeo primário. Em seguida, ocorre a dissociação desse ozonídeo em um composto carbonílico e um óxido carbonílico, essas duas espécies então se recombinam com uma orientação

invertida para formar o ozonídeo secundário, que é termodinamicamente relativamente estável e isolável. (HASSAN *et al.*, 2021).

A presença do óxido carbonílico, formado na fragmentação do ozonídeo, foi comprovada por aprisionamento com álcoois, que prontamente reagem como nucleófilos para formar hidroperóxidos. A clivagem oxidativa ou redutiva dos ozonídeos resultantes produz aldeídos, cetonas, álcoois ou ácidos carboxílicos correspondentes. (HASSAN *et al.*, 2021).

Exemplo de mecanismo de ozonólise de olefinas pode ser observada pela (Figura 4), em que a molécula eletrofílica de ozônio reage com a dupla carbono-carbono, resultando na formação de um intermediário cíclico instável chamado ozonídeo inicial. Na ausência de qualquer solvente participante, esse intermediário conduz à formação de 1,2,4-trioxolano e um oligômero de peróxido. (SORIANO *et al.*, 2003)

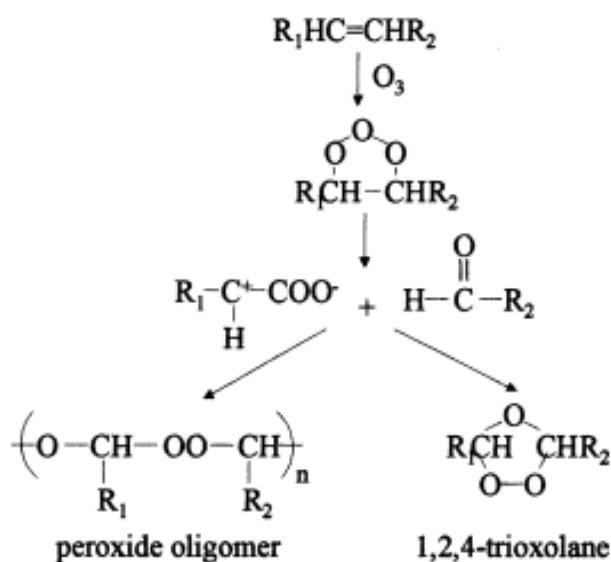


Figura 4 Mecanismo de ozonólise de olefina

Fonte: (SORIANO *et al.*, 2003)

Entretanto, antes da reação, segundo Radzierska-Kazmierczak, Smigielski, Sikora, Nowak, Plucinska, Kunicka-Styczynska e Czarnecka-Chrebelska (2021), observaram que os principais compostos do óleo vegetal eram os ácidos graxos (Figura 5), enquanto após a passagem do ozônio pelo óleo, novos compostos foram formados (Figura 6). (RADZIMIERSKA-KAZMIERCZAK *et al.*, 2021).

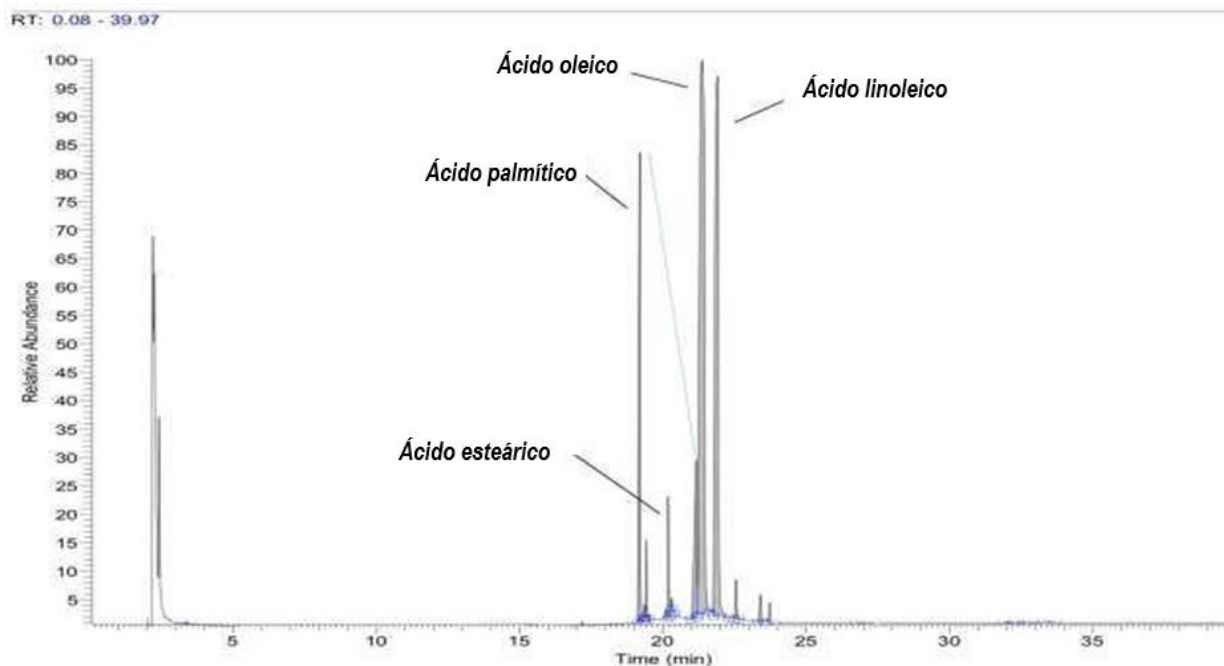


Figura 5 (CG-MS) de uma amostra de azeite refinado.

Fonte: (RADZIMIERSKA-KAZMIERCZAK *et al.*, 2021)

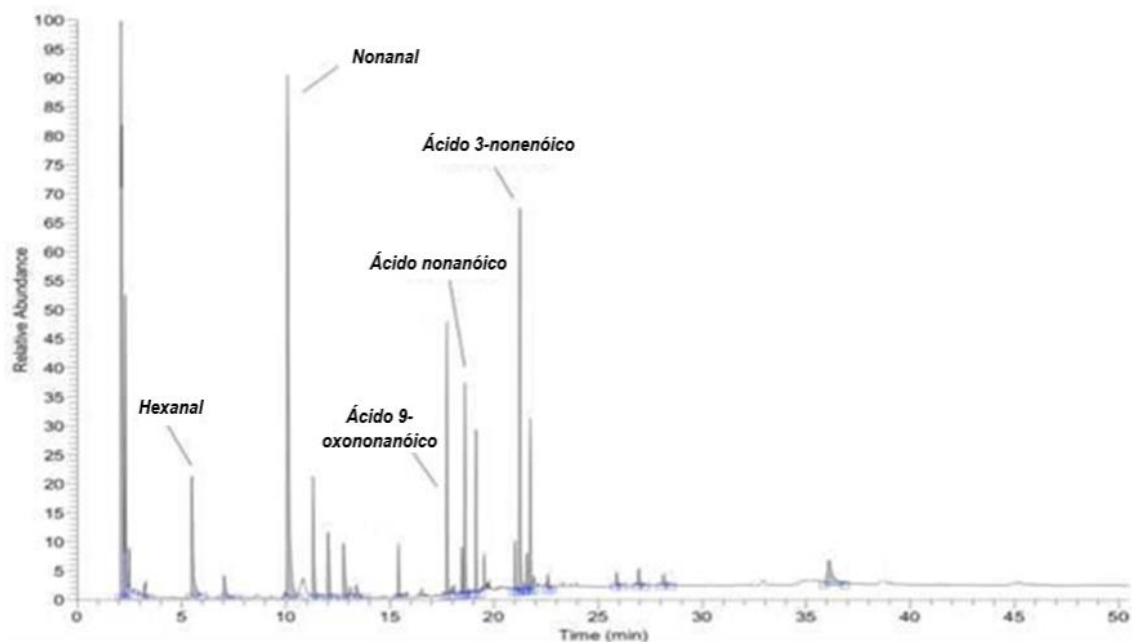


Figura 6 (CG-MS) de uma amostra de azeite refinado ozonizado.

Fonte: (RADZIMIERSKA-KAZMIERCZAK *et al.*, 2021).

Assim, na presença de óleos o ozônio quebra as ligações duplas entre os átomos de carbono das moléculas lipídicas, resultando em novas moléculas

estáveis, como cetonas e aldeídos e espécies instáveis, como peróxido de hidrogênio e radicais conforme (Figura 7). (GUINESI *et al.*, 2011).

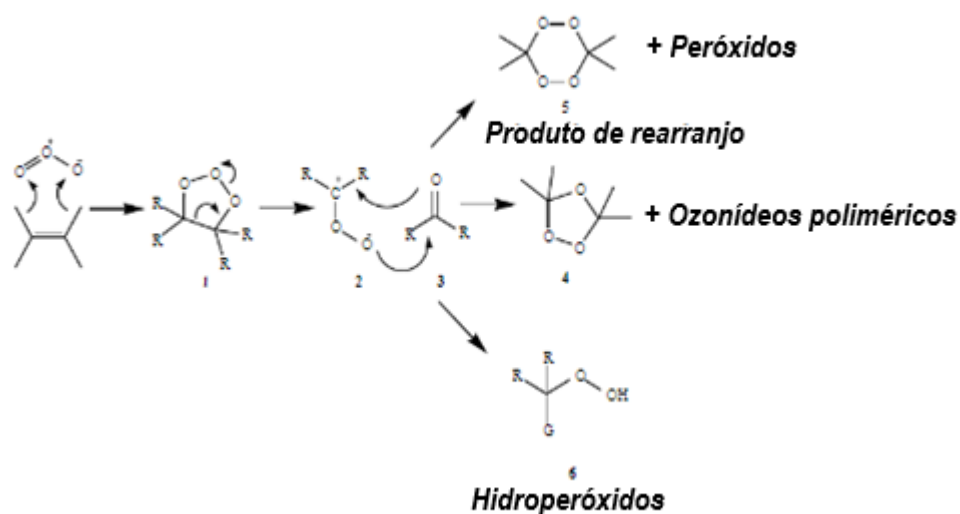


Figura 7 Mecanismo de Criegee para reações de ozônio com ligação dupla carbono-carbono.

Fonte: Adaptado (ALMEIDA *et al.*, 2013)

Os óleos vegetais com ozônio conduzem à criação de um reservatório no qual os compostos gerados pela reação do ozônio/óleo são liberados lentamente na pele, o qual diminui os efeitos tóxicos do gás ozônio. (UGAZIO *et al.*, 2020).

Entretanto, os hidroperóxidos podem ser instáveis e propensos a se decompor em fragmentos carbonílicos, resultando na formação de cetonas, epóxidos, ácidos carboxílicos ou éteres, por isso a importância do controle na ozonização. Onde essa oxidação secundária pode alterar as propriedades sensoriais e a qualidade dos óleos e gorduras, muitas vezes levando à produção de sabores e odores indesejados. (LEDEA-LOZANO *et al.*, 2019).

O presente trabalho padronização e caracterização do ozônio em óleo vegetal de girassol, sendo de grande importância terapêutica que pode favorecer a toda classe médica, terapeutas capilares, tricologistas, veterinários entre outros profissionais. Sendo uma alternativa interessante para uso tópico de origem vegetal, livre de conservantes, fragrâncias que podem ocorrer incidências alérgicas agravando ainda mais o tratamento de várias doenças de pele. Desta

forma, os achados nesta pesquisa servirão como uma nova opção de tratamento para vários tipos de doenças de pele e direcionamento para o couro cabelo, onicomicose, psoríase, rosácea, acne entre outras.

O estudo envolveu a atividade dos microrganismos a seguir:

a) *Staphylococcus aureus*

É uma bactéria do grupo dos cocos Gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, até as mais graves, como pneumonia, meningite entre outras. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos. (SANTOS *et al.*, 2007).

As infecções cutâneas causadas por *S. aureus* podem ser primárias ou secundárias. Sendo primária impetigo, foliculite, furúnculos e abscessos primários. E as secundárias são aquelas que ocorrem como consequência de uma lesão cutânea pré-existentes incluem impetiginização, abscessos secundários, linfangite, celulite e infecção secundária de feridas. (DEL, 2020).

b) *Escherichia coli*

É um bacilo Gram-negativo comumente parte da flora intestinal saudável. No entanto, algumas cepas patogênicas de *E. coli* podem causar uma variedade de doenças, tanto no trato intestinal quanto fora dele. (MUELLER; TAINTER, 2023).

É considerada o agente causador de onfalite neonatal, celulite localizada em membros inferiores e superiores, fascíte necrosante, infecções de sítio cirúrgico, infecções após queimaduras e outras. Mostra-se um importante agente causador, uma vez que foi a terceira espécie isolada mais prevalente, precedida apenas por *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. (PETKOVSEK *et al.*, 2009).

c) *Salmonella choleraesuis*

É um bacilo Gram-negativo flagelado responsável pela febre tifóide, uma doença sistêmica bacteriêmica que pode resultar em uma infecção prolongada, frequentemente acompanhada por diarreia leve. No entanto, a localização da *salmonella* na pele apresenta-se como ulceração cutânea é considerada um evento raro. (MARZANO *et al.*, 2003).

A dermatite pustulosa causada por *Salmonella Stanley* desenvolveu-se no braço de um veterinário após o parto de um bezerro bovino morto. O veterinário não desenvolveu nenhum sintoma sistêmico e se recuperou totalmente. Este é

o único relato de infecção cutânea causada por esse organismo. (LAZARUS *et al.*, 2007).

d) *Pseudomonas aeruginosa*

É um bacilo Gram-negativo que está mais frequentemente associado a infecções oportunistas, mas que também pode se apresentar em pacientes saudáveis. A gama de infecções varia desde, localizadas na pele até doenças sistêmicas potencialmente fatais. Muitas infecções por *P. aeruginosa* são marcadas por manifestações cutâneas características. (WU *et al.*, 2011).

As infecções cutâneas que ela desencadeia, como a síndrome da unha verde, foliculite, otite externa e outras, são notáveis por sua ocorrência em ambientes específicos, muitas vezes associados a umidade ou água parada. (SPERNOVASILIS *et al.*, 2021)

e) *Candida albicans*

É um fungo comensal comum que coloniza a cavidade orofaríngea, o trato gastrointestinal e vaginal e a pele de indivíduos saudáveis. Em 50% da população, *C. albicans* faz parte da flora normal da microbiota. (TALAPKO *et al.*, 2021).

Embora a maioria das pesquisas sobre a patogênese da *C. albicans* tenha sido focada nas mucosas oral e vaginal, onde pode causar infecções como candidíase oral ou vaginite por cândida, há menos conhecimento sobre a invasão da pele por esse fungo. (KUHBAKER *et al.*, 2017).

f) *Aspergillus brasiliensis*

As espécies de *Aspergillus*, como *brasiliensis*, *niger* e *tubingensis*, são fungos comuns encontrados no solo, ar e materiais vegetais. Eles têm a capacidade de produzir vários compostos, como nafto-gama-pironas, tensidol A e B, e pirofeno. (VARGA *et al.*, 2007).

Algumas espécies de *Aspergillus* podem causar infecções cutâneas, resultando em condições como onicomicose, incluindo tipos específicos como onicomicose subungueal lateral distal e proximal, otomicose e aspergilose cutânea. (MERAD *et al.*, 2021)

g) *Malassezia furfur*

São leveduras basidiomicéticas que dependem de lipídios e são comuns na pele e mucosas de seres humanos e outros animais de sangue quente,

desempenhando um papel fundamental no microbioma da pele. (BART *et al.*, 2018).

É o agente causador da pitiríase versicolor. Também parece estar associada à dermatite seborreica e à formação de caspa, foliculite, papilomatose confluyente e reticulada, inclusive há evidências que sugerem uma possível relação com a provocação de lesões psoriásicas. (SCHMIDT *et al.*, 1997).

Uma variedade de métodos laboratoriais pode ser utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de composto, sendo o mais conhecido e básico o método de difusão em ágar. Entre outros métodos para estudar profundamente o efeito microbiano são recomendados métodos como *time kill* e CIM (Concentração inibitória mínima). (BALOUIRI *et al.*, 2016).

O uso de animais em testes laboratoriais tem sido objeto de preocupação ética e regulatória, resultando em um aumento na busca por métodos alternativos, como ensaios *in vitro*, para avaliar a segurança. O ensaio de citotoxicidade *in vitro*, é frequentemente o primeiro teste realizado. Esse teste avalia o impacto do produto a ser testado sobre as células em cultura, proporcionando informações valiosas sobre a toxicidade potencial. (ROGERO *et al.*, 2003).

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Padronizar e caracterizar a potencial atividade antimicrobiana do óleo vegetal de girassol ozonizado

2.2. Objetivo Específico

- Preparar o óleo vegetal de girassol ozonizado a partir do óleo vegetal de girassol preservado em tempos de 100, 240 e 480 minutos.
- Caracterizar o óleo vegetal girassol ozonizado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas.
- Avaliar as propriedades físico-químicos do óleo vegetal de girassol ozonizado como: índice de acidez, índice de peróxido e índice de iodo.

- Avaliar a eficácia microbiológica por meio dos ensaios: difusão em ágar, *time-kill* e CIM frente diferentes microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 e *Malassezia furfur* ATCC 14521.
- Avaliar a citotoxicidade celular.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Reagentes

- Oxigênio Medicinal – (Oxítab)
- Hidróxido de Potássio 0,1 mol/L (Synth)
- Acido Sulfúrico 1 mol/L (Synth)
- Hexano (Synth)
- Hidróxido de Potássio 2 mol/L (Synth)
- Etanol Etilico Refinado Neutro Hidratado 96°GL (D.A Álcool)
- Acido Acético Glacial (Synth)
- Clorofórmio (Synth)
- Iodeto de Potássio (Synth)
- Tiosulfato de Sódio 0,1 N (Synth)
- Amido (Casa Americana)
- Solução Wijs (Iodo + Ácido Acético) – Synth
- Lauril Éter Sulfato Sodio (Volp)
- Vermelho Neutro (Synth)
- Caldo Sabouraud (Hexis)
- Solução Salina (Plastlabor)
- Meio triptona de soja (TSA)
- Caldo Neutralizante (Hexis)

3.2. Equipamentos

- PHILOZON® MEDPLUS modelo ONE

- GC-2010, equipado com amostrador automático modelo Combipal AOC 6000 e detector espectrômetro de massa com um analisador do tipo triplo quadrupolo modelo TQ 8050
- Agitador Magnético Vortex
- Centrifuga Fanem Baby® 206
- Balança analítica modelo AY220 Shimadzu®
- Capela de fluxo laminar
- Estufa Fanem
- Banho maria

3.3. Preparação do Óleo Vegetal de girassol ozonizado (OGO)

O OGO foi produzido através de um gerador de ozônio PHILOZON® MEDPLUS modelo ONE, na concentração de 60 µg/mL a partir do oxigênio medicinal fornecido pela empresa Oxitab®. A pressão de trabalho foi empregada 2 kgf/cm², com fluxo de gás de 1L/min. O ozônio gerado ficou imergindo através de uma mangueira de silicone acoplada a uma pedra porosa Acquap® e imerso em 100mL de óleo vegetal de girassol (OG) armazenado em um kitassato de 250mL. O processo de imersão de ozônio foi padronizado em três tempos distintos, sendo 100 minutos, 240 minutos e 480 minutos.

3.4. Cromatografia Gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS)

Para análise das amostras do óleo, foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em Série GC-MS/MS, (*Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry* modelo GC-2010), equipado com amostrador automático modelo Combipal AOC 6000 e detector espectrômetro de massa com um analisador do tipo triplo quadrupolo modelo TQ 8050 Shimadzu.

O gás de arraste usado foi o hélio (99,999% pureza) a uma taxa de fluxo constante de 1,30 mL min⁻¹. A temperatura do injetor de 250 °C e 1 µL da foram injetados a uma pressão de 300 kPa no modo *split*, com uma taxa de divisão da amostra de 1:10. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna capilar Rtx®-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Restek, Bellefonte, PA, EUA),

empregando uma rampa de temperatura iniciando em 80°C e permanecendo nesta temperatura por 1 min, seguido por uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 180°C.

Por fim, o forno foi aquecido até 330°C à 7 °C min⁻¹, com tempo total de análise de 32,43 min. A ionização dos compostos foi realizada por impacto de elétrons (EI) com energia de 70 eV. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram 280°C e 230°C, respectivamente. As determinações foram realizadas no modo varredura, na faixa entre 50 a 500 m/z. A manipulação do equipamento, coleta e tratamento de dados foram realizados pelo software GCMS solution, versão 4.45 SP1 (Shimadzu).

Para determinação do perfil graxo, foi realizado a pesagem em uma balança analítica a alíquota de 30 mg de óleo, seguido de adição de 500 mL de hidróxido de potássio 0,1 mol/L. A solução ficou por 1h30m em banho maria a 60°C, seguido da adição de 1,5 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L em banho maria a 60°C. Em seguida foi realizado o resfriamento ambiente e adicionou-se 2 mL de hexano, agitou e esperou a separação das fases. Após o procedimento, a alíquota de hexano foi injetada no GC-MS/MS.

Para análise de perfil insaponificável foi realizado uma derivatização, para transformar os ácidos graxos em ésteres, com melhores propriedades cromatográficas. Uma pesagem de ambos os óleos de 500 mg em uma balança analítica, adicionou 5 mL de hidróxido de potássio 2 mol/L em etanol, mantendo em banho maria durante 60 minutos a 80°C. Após resfriar foi adicionado 2mL de água e 8 mL hexano, mantido sob agitação por 2 minutos em agitador vortex e mais 5 minutos em centrifuga. Após todo o procedimento a alíquota de hexano foi injetada no GC-MS/MS para análise.

3.5. Análise físico-química

Índice de acidez

Foi realizada uma pesagem na balança analítica Shimadzu® modelo AUY220 de uma alíquota de 2 g da amostra em um Erlenmeyer de 250 mL. Após foi adicionado 25 mL de álcool etílico hidratado refinado neutro 96°GL e homogeneizado durante 1 minuto. Em seguida foi adicionado 2 gotas do

indicador fenolftaleína a 1%. Foi realizado a titulação com a solução hidróxido de sódio 0,1 mol/L até o aparecimento da coloração rósea, até a mesma persistir por 30 minutos. O índice de acidez foi calculado baseado na fórmula:

$$\text{índice de acidez} = \frac{v \times f \times 5,61}{P}$$

v = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 M titulado (mL).

f = fator da solução de hidróxido de sódio

P = peso da amostra (g)

Índice de peróxido

Em um erlenmeyer com rolha foi adicionado 0,5 g da amostra, adicionado 10 mL da solução ácido acético/clorofórmio (3:2), homogeneizado durante 1 minuto. Após foi adicionado 1 mL de solução de iodeto de potássio (14 gramas de iodeto de potássio e 8 mL de água desmineralizada), agitando por 1 minuto à temperatura ambiente e depois por mais 30 min a 60°C. Após o qual foi adicionado 25 mL de água desmineralizada e homogeneizado durante 1 minuto. A solução foi titulada com a solução de tiossulfato de sódio 0,1 N até que a coloração amarela tenha desaparecida sob constante agitação.

Em seguida foi adicionado 1mL de solução de amido indicadora a 1% (1 parte de amido e 99 partes de água desmineralizada aquecida a 60°C) e continuou a titulação até que o desaparecimento da coloração azul. Preparou-se uma prova em branco nas mesmas condições de titulação. O índice de peróxido foi calculado baseado na fórmula:

$$\text{índice de peróxido} \quad =. \quad \frac{(A-B) \times N \times f \times 1000}{P}$$

(mEq /1000g da amostra)

A = volume de solução tiossulfato de sódio 0,1 N gasto na titulação da amostra (mL)

B = volume de solução tiossulfato de sódio 0,1 N gasto na titulação do branco (mL)

N = normalidade da solução tiosulfato de sódio f = fator da solução
Tiosulfato de Sódio

P = peso da amostra (g)

Índice de Iodo

Foi realizada uma pesagem na balança analítica Shimatzu® modelo AUYY220 de uma alíquota de 0,25 g em um frasco erlenmeyer de 500 mL com tampa e adicionado 10 mL de tetracloreto de carbono. Após, foi adicionado 25 mL de solução wijs (1,3% Iodo + 75% ácido acético + água desmineralizada q.s.p). O frasco foi tampado e agitado cuidadosamente em movimentos de rotação, após o qual permaneceu em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 10 mL de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água desmineralizada. Após foi realizado a titulação com tiosulfato de sódio 0,1 mol/L até o aparecimento de uma fraca coloração amarela. Foi adicionado 2mL de solução indicadora de amido 1% e continuou a titulação até o completo desaparecimento da cor azul. O índice de iodo foi calculado baseado na fórmula:

$$\text{índice de Iodo} = \frac{(VB - VA) \times M \times 12,68}{P} =$$

M = molaridade da solução tiosulfato de sódio

VB = volume na titulação do branco (mL)

VA = volume na titulação da amostra (mL)

P = peso da amostra (g)

3.6. Ensaio microbiológicos

3.6.1. Cepas

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 e *Malassezia furfur* ATCC 14521.

3.6.2. Difusão em ágar (Pour-Plate)

É um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado. (PINTO *et al.*, 2003).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi baseada no método do Instituto Nacional de Controle de Qualidade a Saúde, Fiocruz, INCQS 65.3210.006.

Cepas avaliadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 e *Malassezia furfur* ATCC 14521.

Preparo do Inóculo

Foram realizados o repique de cada uma das culturas em placas de Petri estéreis contendo o meio adequado com o auxílio de alça de platina. Em seguida as placas de Petri foram incubadas na temperatura de (35+/-2) °C a 24 horas para bactérias e (25+/-2) °C por 5 dias para leveduras. Após o período de incubação cada microrganismo foi suspenso em caldo TSB com auxílio de uma alça de platina, com exceção as leveduras que foram suspensos em caldo Sabouraud dextrose.

Diluiu-se 1,0 mL da suspensão até a diluição 10^{-7} , utilizando frascos com 9 mL de solução salina estéril. Pipetou-se 1,0 mL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} em placas de Petri estéreis. Utilizou o meio de cultura adequado previamente fundido e mantido em banho-maria à temperatura de (45+/-2) °C nas placas contendo as diluições. Após a solidificação as placas foram incubadas invertidas por 48 horas em estufa de acordo com as temperaturas sendo (35+/-2) °C para bactérias e (25+/-2) °C para leveduras.

3.6.3. Time-kill (tempo de morte)

O ensaio mostra uma concentração ou efeito de teste dependente do tempo de agentes antimicrobianos em cepas de microrganismos. Determina os agentes

antimicrobianos como bacteriostáticos / fungistáticos ou bactericidas / fungicidas. (ADUSEI *et al.*, 2019).

O método de avaliação que utilizado foi seguindo ASTM International E2315-16 (Guia padrão para avaliação da atividade antimicrobiana usando um procedimento *time-kill*) e Guia ABIHPEC de Microbiologia – Controle Microbiológico na Indústria de Higiene Pessoal, Perfume e Cosméticos. 2015.

Cepas avaliadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Preparo do Inóculo

As cepas foram repicadas sobre a superfície de Ágar TSA e incubadas a (35 +/-2) °C por 24 horas e foi denominado R1. A partir do crescimento obtido na R1, foram novamente repicadas e incubados a (35 +/-2) °C por 24 horas e foi denominado R2. A partir do crescimento obtido na R2 foram utilizadas para os testes, incluindo os controles de toxicidade do neutralizante e eficácia da neutralização.

Foi utilizada a suspensão de cada microrganismo na concentração 10^8 UFC/mL, para bactérias e de 10^6 UFC/mL para as leveduras. Em seguida o inóculo de cada microrganismo foi adicionado ao neutralizante nas mesmas condições usadas no teste da amostra, substituindo-se a quantidade de amostra por água.

Avaliação de Toxicidade do Caldo Neutralizante

Em um tubo de ensaio contendo 8 mL de caldo neutralizante e 1 mL de água estéril, adicionou-se 1 mL da suspensão de inóculo contendo 10^4 a 10^5 UFC/mL.

Em outro tubo de ensaio, foi adicionado 9 mL de água estéril e 1 mL do inóculo, como o controle, foram homogeneizadas e mantidas a (35 +/-2) °C por

5 minutos. Após incubação 0,1 mL de cada mistura foi diluída em 9,9 mL de caldo neutralizante e homogeneizadas.

Em seguida foi realizado o plaqueamento 1 mL do conteúdo de cada tubo pela técnica de *pour plate* em ágar TSA para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras. As placas foram incubadas à (35 +/-2) °C por 48 horas bactérias e (25 +/-2) °C por 5 dias leveduras. Após a incubação foram realizados a contagem. O experimento foi realizado em duplicata.

Eficácia da Neutralização

Em 4,9 mL do produto OGO foi adicionado 0,1 mL de água estéril. Essa mistura foi homogeneizada e incubada em banho-maria à (35+/-2)°C por 2 minutos. Após a incubação foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e colocado em um tubo contendo 9,8 mL de caldo neutralizante.

O tubo foi homogeneizado e mantido à (35+/-2) °C por 5 minutos. Em seguida é adicionado 0,1 mL do inóculo contendo 10^4 a 10^5 UFC/mL. O tubo foi homogeneizado e mantido a à (35+/-2) °C por 30 minutos. Após esse tempo 0,1 mL desta mistura foi adicionado em 9,9 mL de água estéril. O plaqueamento foi realizado com 1 mL do conteúdo de cada tubo pela técnica de *pour plate* em ágar TSA para bactérias e em ágar Sabouraud para leveduras. Em seguida as placas foram incubadas à (35+/-2) °C por 48 horas para bactérias e (25+/-2) °C 5 dias para leveduras. Após a incubação realizou-se as contagens.

Avaliação da atividade antimicrobiana da amostra

Foram inoculados 1 mL da suspensão padrão de bactérias contendo 10^8 a 10^9 UFC/mL e leveduras 10^6 a 10^7 em 49 mL de amostra. Para controle do inóculo foi realizado a mesma quantidade e transferida para 49 mL de água estéril. Realizou as diluições decimais seriadas e plaqueou em as diluições -3, -4, -5 e -6. A contagem desta amostra fornece a população inicial do teste (tempo zero).

As amostras foram coletadas no tempo de contato 30 e 60 segundos, homogeneizados vigorosamente e retidas imediatamente uma alíquota de 0,1

mL da amostra inoculada, transferindo para um tubo contendo 8,8 mL de caldo neutralizante + 1,1 mL de água.

No final da coleta do último tempo, os tubos são incubados a $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Após esse período de incubação, realizou as diluições seriadas para cada uma das amostras, em seguida as placas foram incubadas à $(35\pm 2)^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 5 dias para leveduras. Após a incubação realizou-se as contagens.

Análise dos resultados

As contagens foram:

Cálculo 1:

$$\text{RD} = \log N_0/N_t$$

RD é a redução decimal; N_0 é a contagem inicial do inóculo; e N_t a contagem obtida no tempo de contato T com a amostra.

Cálculo 2:

$$\text{PR} = (1 - 1/10^{\text{RD}}) \times 100$$

PR é a percentagem de redução da população microbiana; e RD é a redução decimal obtida calculada pelo cálculo 2.

Critério de Conversão

RD = 1 equivale a 90% de redução

RD = 2 equivale a 99% de redução

RD = 3 equivale a 99,9% de redução

RD = 4 equivale a 99,99% de redução

RD = 5 equivale a 99,999% de redução

Critério de aprovação: redução pelo menos 3 logs (10^7) para (10^4) em todos os *times points* analisados.

3.6.4. Concentração inibitória mínima (CIM)

É a concentração mais baixa de um agente antibacteriano que sob condições *in vitro* estritamente controladas, impede completamente o crescimento visível da cepa de teste de um organismo. (KOWALSKA-KROCHMAL *et al.*, 2021).

O método de avaliação utilizado foi ISO 20776-1:2006 – Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices e Controle biológico de qualidade de produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2003.

Cepas avaliadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Cultivo dos microrganismos

Preparo Suspensão *bactérias*

Foi repicado as cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com auxílio de loop esterilizado em placa de Petri contendo TSA. Após a placa foi incubada a (35 ± 2) °C por 24 horas. Após a incubação, com auxílio de um loop esterilizado, foi adicionado em um frasco contendo 9 mL de solução salina identificado com o nome do microrganismo de modo a se obter aproximadamente 10^8 UFC/mL. Agitou bem a suspensão de modo a eliminar a presença de grumos.

Preparo Suspensão *leveduras*

Foi repicado as cepas *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* com auxílio de loop esterilizado em placa de Petri contendo Ágar Sabouraud, com auxílio de loop esterilizado. Após a placa foi incubada a (25 ± 2) °C por 75 horas. Após a incubação, com auxílio de um loop esterilizado, foi adicionado em um frasco contendo 9 mL de solução salina identificado com o nome do microrganismo de modo a se obter aproximadamente 10^8 UFC/mL. Agitou bem a suspensão de modo a eliminar a presença de grumos.

Quantificação do Inóculo

A partir das suspensões preparadas, foi realizado a inoculação de 1 mL de cada suspensão em 10 mL de solução salina à 0,85% e realizou as diluições decimais seriadas em 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Em seguida foi transferido 1 mL de cada diluição para placas de Petri estéreis, onde foram inoculados 25 mL de Ágar TSA previamente fundido e mantido em banho-maria para as cepas bactérias e 25 mL de Ágar Dextrose Sabouraud para as cepas leveduras.

Após a solidificação do meio de cultura, incubou-se as placas contendo TSA a (35 ± 2) °C por 48 horas e as placas contendo Ágar Dextrose Sabouraud a (25 ± 2) °C. Realizou-se a contagens das colônias.

Preparo de Amostra

Por se tratar de OGO, utilizamos o veículo OG, porém antes de utiliza-lo como veículo foi realizado CIM para verificar se não há inibição. Após o resultado negativo seguimos com as diluições do óleo vegetal de girassol ozonizado em óleo vegetal de girassol preservado nas seguintes concentrações 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5625%, 0,78125%, 0,390625%, 0,1953125%.

Procedimento da Análise

Com o auxílio da pipeta foi adicionado 0,1 mL em cada poço de TSA. Na coluna 1 foi inoculado 0,2 mL da amostra a ser testada previamente preparada e solubilizada. Realizou as diluições transferindo 0,1 mL da coluna 1 para a coluna 2, 0,1 mL para coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 10. Reservou a coluna 11 e 12 para os controles dos inóculos e do meio de cultura conforme Figura 8.

Após realizado as diluições, foi inoculado 0,02 mL de bactéria e levedura e foi testado em todos os poços da microplaca, com exceção do poço da coluna 12. Em seguida as microplacas foram incubadas à (35 ± 2) por 48 horas para bactéria e (25 ± 2) °C por 5 dias para levedura.

Após o tempo de incubação foi realizado as leituras, observando a turvação dos poços.

3.7. Estudo *in vitro* de citotoxicidade

Primeiramente, as células Balb.c 3T3 clone 31 (Banco de Células do Rio de Janeiro, lote 001242) foram mantidas em cultivo com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com adição de suplementos, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após descongelamento, as células foram distribuídas em placas de 96 poços mantidas em cultivo nas mesmas condições descritas.

O OGO foi diluído em meio de cultivo celular nas seguintes concentrações 10, 1, 0,1, 0,001, 0,0001, mg/mL. Foi utilizado como grupo controle negativo o meio de cultivo celular suplementado e grupo controle positivo o laurel sulfato sódico diluído em meio de cultivo celular suplementado.

Para a análise 0,1 mL de amostra foram aplicadas na cultura de células, por poço, seguindo-se uma incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após lavadas com água desmineralizada foram analisadas a viabilidade celular com o indicador vermelho neutro, 0,1 mL por poço. Após incubação, a reação foi revelada e absorbância foi determinada a 540 nm. O procedimento foi realizado em quadriplicata.

4. RESULTADOS e DISCUSSÕES

Os estudos de óleos vegetais ozonizados utilizam o óleo vegetal de girassol e oliva (DIAZ *et al.*, 2006) devido ao maior número de insaturações presentes nesses óleos. As pesquisas já realizadas foram padronizadas utilizando reatores e diferentes tempos e na sua maioria, os ensaios envolveram caracterização de propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana restrito as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *P.aeruginosa*. (DIAZ *et al.*, 2012), *C. albicans*, *S.typhimurium* (RODRIGUES *et al.*, 2004), *C.parapsiloses*, *C.tropicalis*, *Tichosporum asaii* (GERRER *et al.*, 2012).

A escolha do óleo vegetal de girassol neste trabalho foi buscar padronizar o método de ozonização, ampliar as informações de caracterização e identificação dos compostos gerados, ensaiar a atividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonela choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 e *Malassezia furfur*

ATCC 14521, comparando com os dados da literatura para posterior estudo envolvendo outros óleos com menor índice de insaturação.

4.1. Preparação do óleo de girassol ozonizado

O OGO foi preparado a partir de oxigênio medicinal e gerador de ozônio, resultando na produção de ozônio conforme (Figura 8). A utilização de equipamento certificado é de suma importância para quantificação de ozônio no óleo vegetal. A imersão foi realizada através de uma mangueira de silicone para que não ocorra incompatibilidade. Para melhor eficiência do método, utilizou-se uma pedra porosa ao final desta mangueira, o qual favorece a formação de microbolhas. Segundo (JOHN *et al.*, 2022) e seus colaboradores em comparação com as bolhas convencionais o ozônio na fase gasosa pode ser transferido de forma mais eficiente para o meio líquido, obtendo maior tempo de contato.

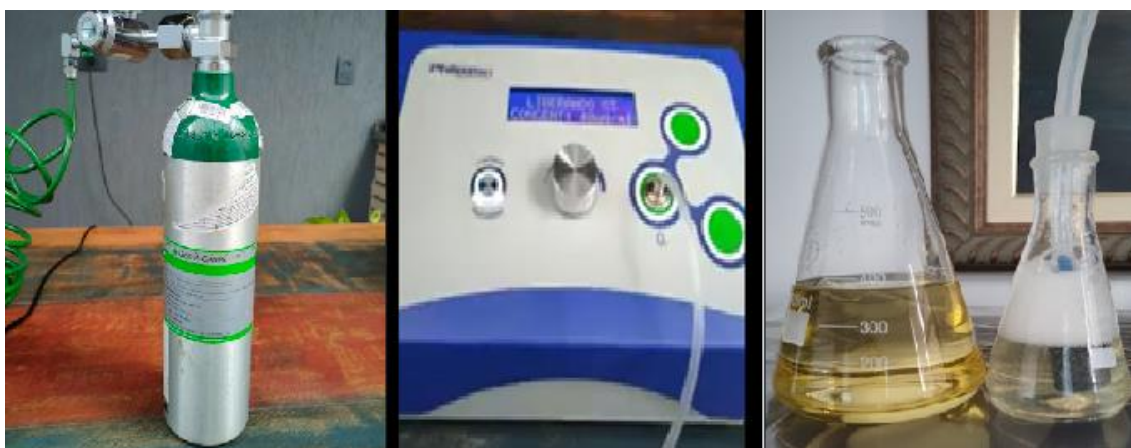


Figura 8 Cilindro de Oxigênio, Gerador de Ozônio e OG seguido do OGO

Foram preparadas três amostras em tempos diferentes de ozonização, na mesma dosagem de ozônio 60 $\mu\text{g/mL}$, sendo 100 minutos, 240 minutos e 480 minutos. Para definir a padronização da amostra que seguiríamos com os estudos propostos determinou-se, que a amostra precisaria ter atividade microbiana frente ao ensaio microbiológico da técnica difusão em ágar.

A amostra ozonizada a 100 minutos não houve êxito nos testes propostos, a amostra 240 minutos houve um pequeno halo, enquanto a amostra de 480 minutos houve um halo maior comparado a de 240 minutos e mais próximo do

controle positivo. A partir dos resultados prévios foi definido seguir os estudos propostos com a amostra padrão de OGO a 480 minutos de ozonização.

4.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

4.2.1. Perfil graxo óleo girassol (OG) e óleo girassol ozonizado (OGO)

Perfil graxo óleo girassol (OG)

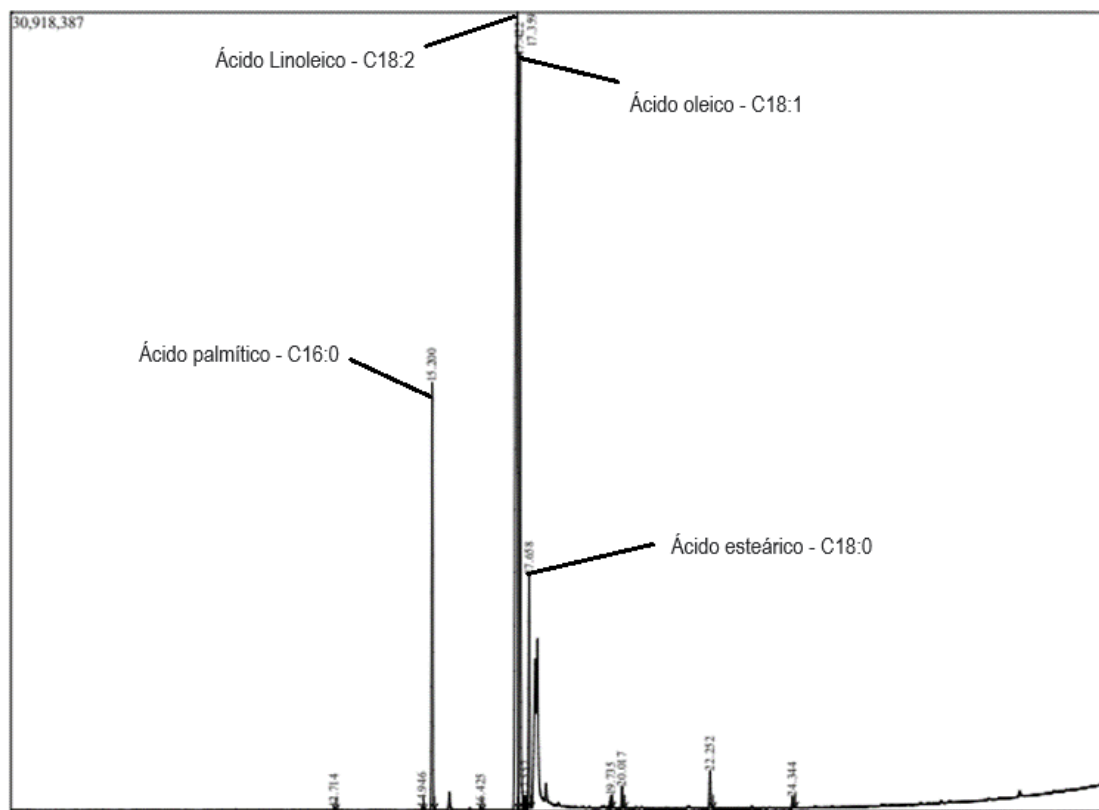


Figura 9 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OG).

Tabela 3 Perfil graxo óleo girassol (OG).

Picos	%	Componentes
1	0,06%	Ácido Mirístico - C14:0
2	0,07%	Ácido palmitoléico - C16:1
3	10,81%	Ácido palmítico - C16:0
4	0,07%	Ácido margárico - C17:0
5	47,13%	Ácido Linoleico - C18:2
6	33,10%	Ácido oleico - C18:1
7	0,41%	Ácido linolênico - C18:3
8	6,12%	Ácido esteárico - C18:0
9	0,26%	Ácido eicosenóico - C20:1
10	0,59%	Ácido araquídico - C20:0
11	1,06%	Ácido beénico - C22:0
12	0,32%	Ácido lignocérico - C24:0

Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 100 minutos)

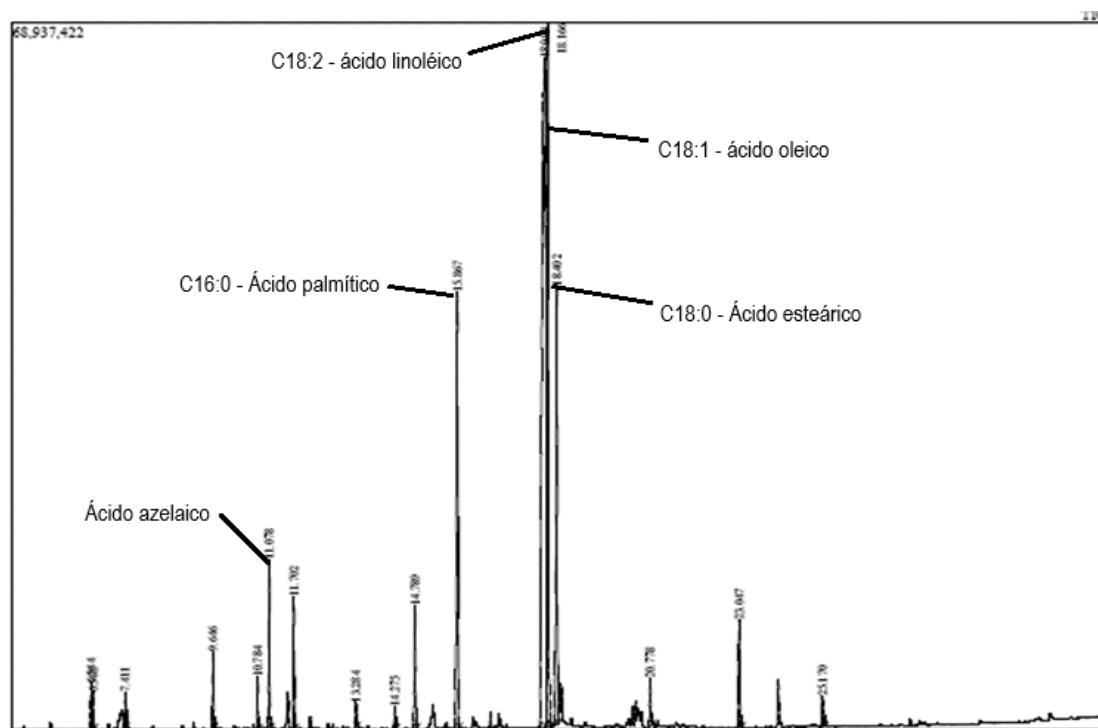


Figura 10 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OGO 100 minutos).

Tabela 4 Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 100 minutos).

Picos	%	Componentes
1	0,90%	Ácido 3-nonenóico
2	0,67%	Ácido nonanóico, éster metílico
3	0,80%	Dimetil acetal nonanal
4	1,27%	Ácido nonanóico, 9-oxo-
5	0,83%	C12:0 - Ácido láurico
6	2,67%	Ácido azelaico
7	2,11%	Dimetil acetal decanal
8	0,40%	Ácido Mirístico
9	0,36%	12-oxo-9-dodecenoato de metila
10	2,23%	5,13-docosadienoato de metila
11	9,77%	C16:0 - Ácido palmítico
12	40,53%	C18:2 - ácido linoléico
13	23,69%	C18:1 - ácido oleico
14	10,01%	C18:0 - Ácido esteárico
15	0,99%	C20:0 - Ácido araquídico
16	2,19%	C22:0 - Ácido Beênico
17	0,58%	C24:0 - Ácido lignocérico

Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO) 240 minutos

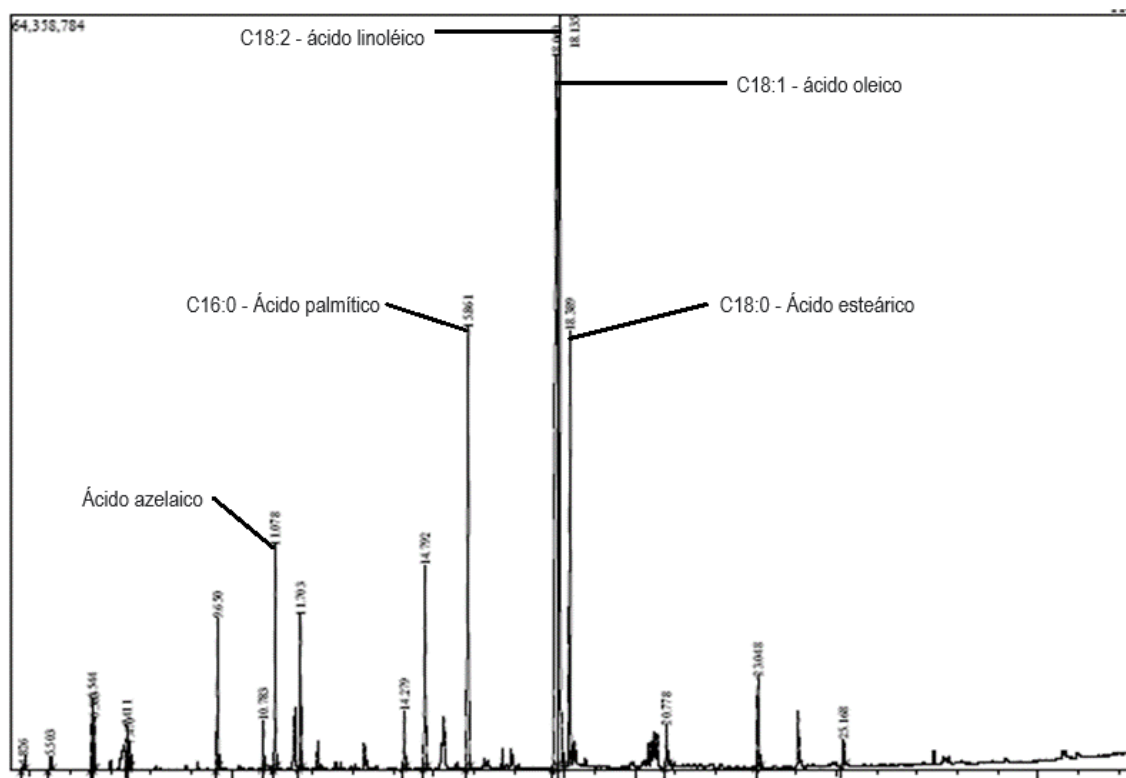


Figura 11 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OGO 240 minutos).

Tabela 5 Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 240 minutos).

Picos	%	Componentes
1	0,12%	Ácido octanóico
2	0,30%	2-Nonenal, (E)-
3	1,62%	Ácido 3-nonenóico
4	0,93%	Ácido nonanóico, éster metílico
5	0,98%	Dimetil acetal nonanal
6	0,49%	Ácido 3-nonenóico
7	2,72%	Ácido nonanóico, 9-oxo-
8	0,81%	Ácido láurico
9	3,85%	Ácido azelaico
10	2,61%	Dimetil acetal decanal
11	1,06%	2-oxo-9-dodecenoato de metila
12	4,02%	5,13-docosadienoato de metila
13	9,84%	C16:0 - Ácido palmítico
14	31,15%	C18:2 - ácido linoléico
15	25,92%	C18:1 - ácido oleico
16	9,90%	C18:0 - Ácido esteárico
17	1,01%	C20:0 - Ácido araquídico
18	2,10%	C22:0 - Ácido Beênico
19	0,57%	C24:0 - Ácido lignocérico

Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO) 480 minutos

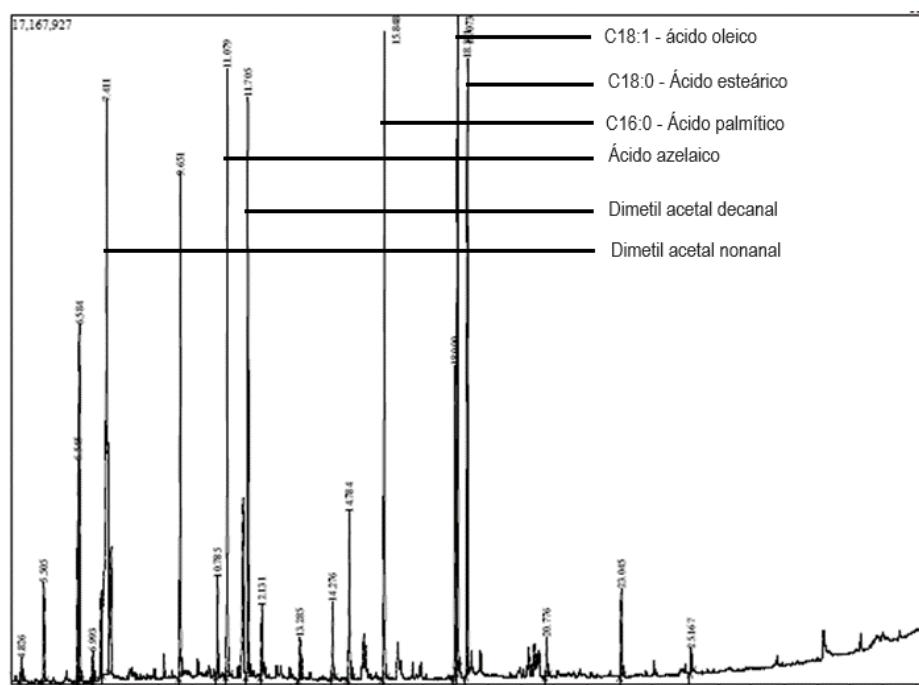


Figura 12 Cromatograma perfil graxo óleo girassol (OGO 480 minutos).

Tabela 6 Perfil graxo óleo girassol ozonizado (OGO 480 minutos).

Picos	%	Componentes
1	0,46%	C8:0 - Ácido caprílico
2	1,77%	2-Nonenal, (E)-
3	3,65%	9-Decen-2-ol
4	5,70%	Ácido nonanóico, éster metílico
5	0,45%	2-Octanol, acetato
6	19,64%	Dimetil acetal nonanal
7	7,31%	Ácido nonanóico, 9-oxo-
8	1,40%	C12:0 - Ácido láurico
9	8,19%	Ácido azelaico
10	7,92%	Dimetil acetal decanal
11	1,11%	Ácido octanóico, 6,6-dimetoxi-
12	0,63%	C14:0 - Ácido Mirístico
13	1,10%	12-oxo-9-dodecenoato de metila
14	2,60%	5,13-docosadienoato de metila
15	9,91%	C16:0 - Ácido palmítico
16	5,12%	C18:2 - ácido linoléico
17	10,84%	C18:1 - ácido oleico
18	9,52%	C18:0 - Ácido esteárico
19	0,68%	C20:0 - Ácido araquídico
20	1,57%	C22:0 - Ácido Beênico
21	0,43%	C24:0 - Ácido lignocérico

Os resultados da caracterização do OGO por (GC-MS), corroboram as literaturas mencionadas no decorrer do presente estudo (DUPAIN *et al.*, 2007;

SARKAR *et al.*, 2017; OLIVEIRA; WOSCH, 2012; HASSAN *et al.*, 2021; SORIANO *et al.*, 2003; RADZIMIERSKA-KAZMIERCZAK *et al.*, 2021). Como esperado a redução das cadeias duplas, e também a geração de novos subprodutos que são mencionados como ozonídeos, peróxidos, hidroperóxidos, carboxílicos, aldeídos, entre outros.

Os resultados do OGO de 480 minutos mostraram a presença dos componentes majoritários de grande importância na ozonização que são as cadeias de insaturação. O perfil graxo do óleo controle (OG) obteve as seguintes concentrações 33,10% ácido oleico C18:1, 47,13% ácido linoleico C18:2 e 0,41% ácido linolênico C18:3 (Tabela 3) e (Figura 9). Dados que corroboram com os estudos de (AKKAYA *et al.*, 2018) e seus colaboradores, o qual descreve que o OG contém aproximadamente 15% de ácidos graxos saturados, 85% de ácidos graxos insaturados, sendo 14 a 43% de ácido oleico e 44 a 75% de ácido linoleico em seu conteúdo de ácidos graxos insaturados.

Após a ozonização, foi observado uma redução considerável no teor de ácido oleico C18, de 33,10% para 10,84%, ácido linoleico C18:2, de 47,13% para 5,12% para 480 minutos, e de ácido linolênico C18:3 de 0,41%, no primeiro tempo de ozonização 100 minutos até seu total consumo.

Os valores foram reduzidos para 10,84% do ácido oleico C18:1, 5,12% do ácido linoleico C18:2 e redução total do ácido linolênico C18:3, que não apareceu na cromatografia após a ozonização, ou seja, foi consumida na reação conforme a Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6 e Figura 10, Figura 11 e Figura 12 em tempos de ozonização diferentes.

Com a redução de alguns componentes é gerado após a ozonização e inclusive nas três amostras que foram preparadas foi o componente ácido azelaico, esta substância é eficaz no tratamento de rosácea, acne e melasma. Segundo estudo King, Campbell, Rowe, Daly, Moncrieff e Maybury (2023), o ácido azelaico e outros tratamentos foram frequentemente equivalentes. (KING *et al.*, 2023).

O ácido láurico foi outro componente gerado após a ozonização, porém somente na amostra OGO 480 minutos conforme Tabela 6 na concentração de 1,40% sendo maior que em outras amostras. De acordo com estudo de Hung, Tsai T, Chuang, Li, Zouboulis e Tsai P (2014), o ácido láurico (C12:0) possui

propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias contra *Propionibacterium acnes*. (HUANG *et al.*, 2014).

O número de ligações duplas pode diferenciar um tipo de óleo vegetal para o outro, devido as ligações duplas carbono-carbono, isso pode influenciar a atividade antimicrobiana do produto ozonizado devido à geração de ozonídeos. (UGAZIO *et al.*, 2020).

De acordo com Diaz, Veloso, Pereira Sánches, Fernández e Andrade (2021) a composição lipídica do OG, em específico o ácido oleico C18:1 o ácido linoleico C18:2 ambos sendo os componentes majoritários, confirmam que quanto maior o tempo de ozonização menor serão essas concentrações após a ozonização conforme apresentado Tabela 7. (Diaz *et al.*, 2021).

Tabela 7 Percentagem de insaturação de ácidos graxos vs tempo de ozonização

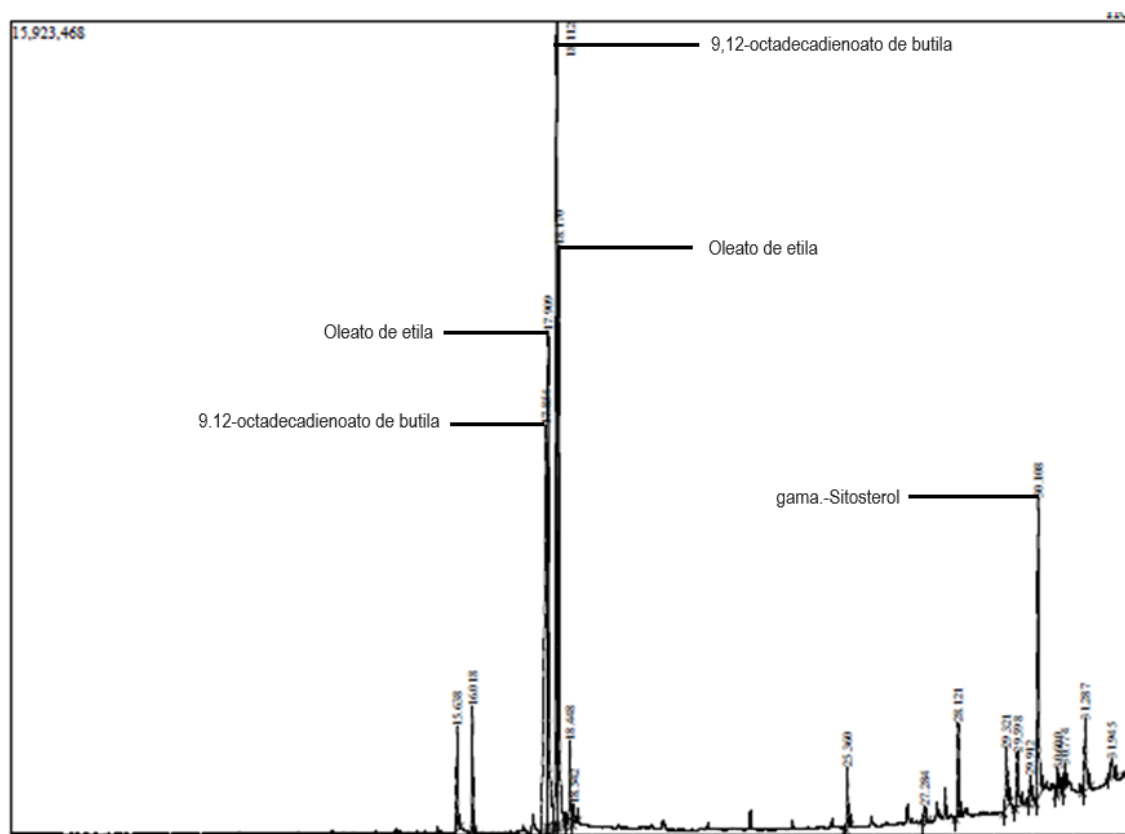
.Fonte: Adaptado (DIAZ *et al.*, 2021).

	Composição	Tempo de Ozonização			
		0	32	65	97
Óleo vegetal de girassol	C18:1	28,52	27,12	26,27	24,43
	C18:2	61,62	53,82	42,38	25,35

Os ácidos graxos são necessários para a manutenção da integridade epidérmica e da barreira hídrica da pele (GUIDONI *et al.*, 2019). Assim, de acordo com a redução de lipídios, em especial o ácido oleico C18:1 e ácido linoleico C18:2, observada pela ozonização.

Os óleos vegetais contemplam em sua composição componentes insaponificáveis que são substâncias dissolvidas no óleo e gordura que não são saponificáveis, ou seja, não são convertidos em sais de ácidos graxos pela ação de bases fortes, sendo insolúveis em solução aquosa, mas solúveis em solventes comuns de gorduras conforme (KOBORI *et al.*, 2005).

4.2.2. Perfil cromatográfico da matéria insaponificável da amostra de óleo de girassol (OG) e óleo girassol ozonizado (OGO)

Matéria insaponificável do óleo de girassol (OG)**Figura 13** Cromatograma da matéria insaponificável do óleo de girassol (OG)**Tabela 8** Matéria insaponificável do óleo de girassol (OG).

Picos	%	Componente
1	2,49	Ácido n-hexadecanóico
2	2,52	Ácido hexadecanóico, éster etílico
3	19,65	Ácido 9,12-octadecadienóico (Z,Z)-
4	16,19	Ácido Oleico
5	20,00	9,12-octadecadienoato de butila
6	13,74	Oleato de etila
7	2,20	Ácido octadecanóico, éster etílico
8	0,57	trans-geranilgeraniol
9	1,40	Esqualeno
10	0,54	Ergost-5-en-3-ol, acetato, (3.beta.,24R)-
11	2,42	.beta.-acetato de sitosterol
12	2,00	Campesterol
13	1,81	Estigmasterol
14	0,75	Obtusifoliol
15	8,79	.gama.-Sitosterol
16	0,87	Estigmast-7-en-3-ol, (3.beta.,5.alfa.,24S)-
17	0,69	9,19-Ciclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)-
18	2,47	17.beta.-Metil-18-nor-17-isopregna-4,13-dien-16.beta.-ol-3,20-diona
19	0,90	2-(octanoiloxi)propano-1,3-diil bis(decanoato)

**Perfil cromatográfico da matéria insaponificável do óleo de girassol
ozonizado (OGO 100 minutos)**

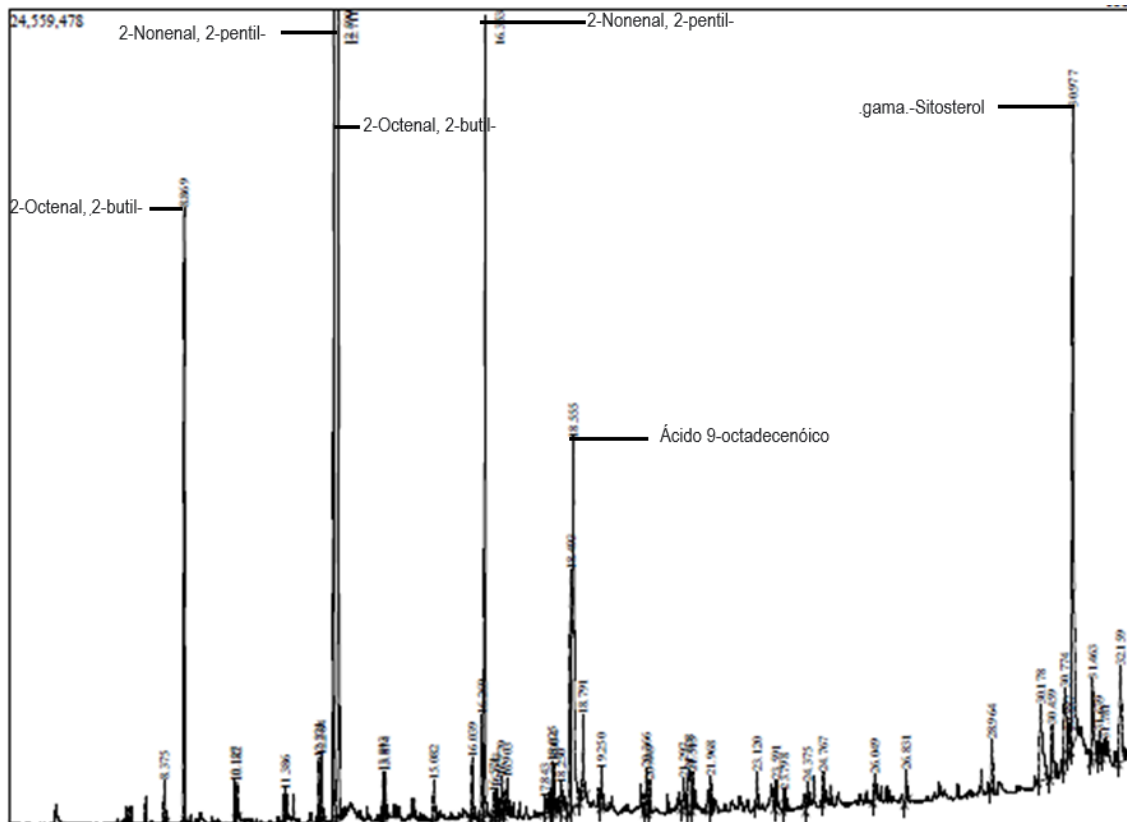


Figura 14 Cromatograma matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 100 minutos)

Tabela 9 Matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 100 minutos).

Picos	%	Componente
1	0,57	Álcool ciclooctílico
2	7,58	2-Octenal, 2-butil-
3	0,47	2-Nonenal, 2-pentil-
4	0,41	2-Octenal, 2-butil-
5	0,39	2-Nonenal, 2-pentil-
6	0,73	2-Propilciclohexanol
7	0,74	2-Propilciclohexanol
8	10,39	2-Nonenal, 2-pentil-
9	9,91	2-Octenal, 2-butil-
10	0,51	2-Nonenal, 2-pentil-
11	0,52	2-Nonenal, 2-pentil-
12	0,73	2-Nonenal, 2-pentil-
13	0,88	Pentadecanal-
14	1,51	ácido n-hexadecanóico
15	11,16	2-Nonenal, 2-pentil-
16	0,58	Ciclodecasíloxano, eicosametil-
17	0,57	Ácido octanóico, éster undec-2-enílico
18	0,59	Heneicosano
19	0,62	7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona
20	0,42	b-Dodecahidrociclopenta[def]fenantreno
21	0,79	2-Metilhexacosano
22	0,72	2,4,6-Triisopropilfenetol
23	0,63	Fitol
24	6,09	Ácido 9,12-octadecadienóico (Z,Z)-
25	7,41	Ácido 9-octadecenóico, (E)-
26	1,36	Ácido octadecanóico
27	0,61	Eicosano
28	0,71	2H-1-benzopiran-6-ol,
29	0,55	Silano, triclorodecil-
30	0,58	Tetraciclo[6.1.0.0(2,4).0(5,7)]nonano
31	1,00	2,4-Di-t-butiladamantano-2,4-diol
32	0,54	2H-1-benzopiran-6-ol
33	0,47	Ácido benzóico, éster 4-(4-pentilciclohexil)-, 4'-ciano[1,1'-bifenil]-4-il
34	0,51	4(1H)-Fenantrenona
35	0,47	2H-1-benzopiran-6-ol
36	0,42	Pentacosano
37	0,38	(6aS,10aS)-9-(Hidroximetil)-6,6-dimetil-3-(2-metiloctan-2-il)-6a
38	0,41	Silano, metilvinil(hept-4-iloxi)deciloxi-
39	0,51	Podocarpa-8,11,13-trieno-1,3-diona
40	0,46	Dotriacontano
41	0,84	Estigmasta-3,5-dieno
42	2,72	Campesterol
43	1,25	Estigmasterol
44	2,49	Obtusifoliol
45	0,45	Ácido dodecanóico, éster 1,2,3-propanotriílico
46	12,62	.gama.-Sitosterol
47	2,15	Estigmast-7-en-3-ol, (3.beta.,5.alfa.,24S)-
48	0,63	9,19-Ciclolanost-24-en-3-ol, (3.beta.)-
49	0,49	24-Norursa-3,12-dieno
50	2,46	17.beta.-Metil-18-nor-17-isopregna-4,13-dien-16.beta.-ol-3,20-diona

Perfil cromatográfico da matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 240 minutos)

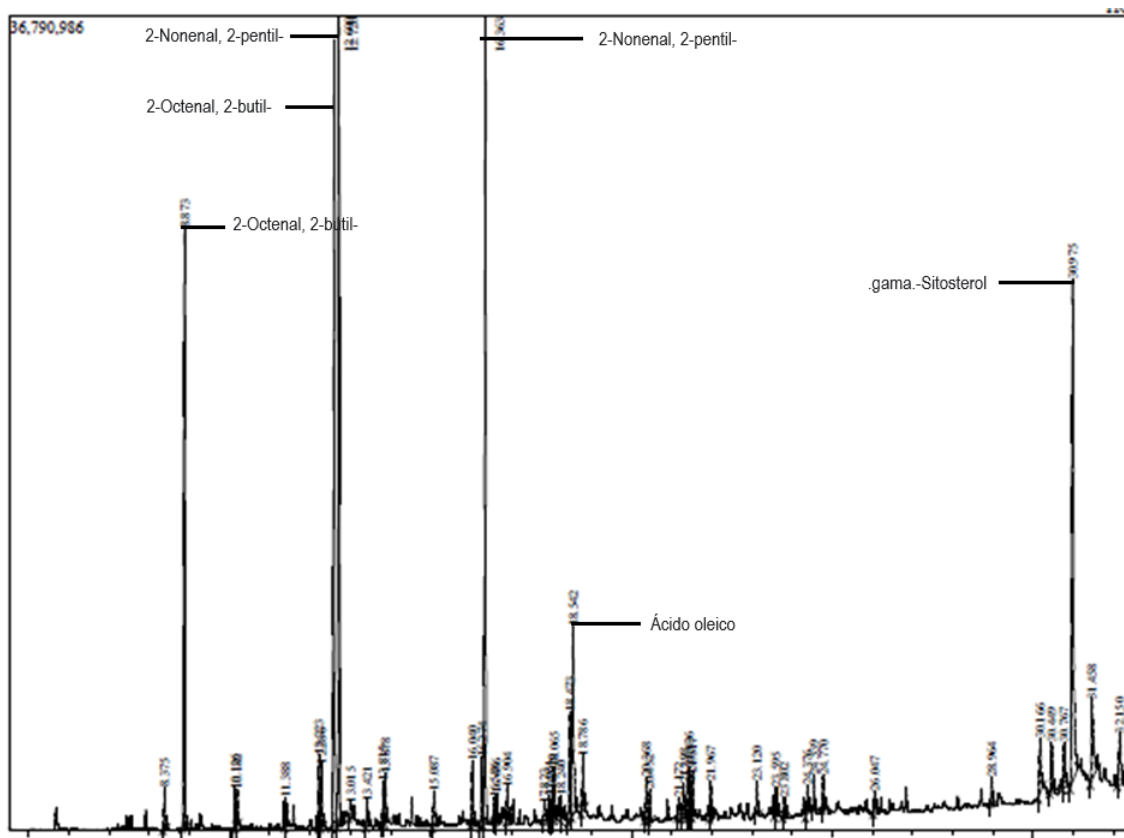


Figura 15 Cromatograma matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 240 minutos)

Tabela 10 Matéria insaponificável do óleo girassol ozonizado (OGO 240 minutos).

Picos	%	Componente
1	0,62	Álcool ciclooctílico
2	9,35	2-Octenal, 2-butil-
3	0,54	2-Nonenal, 2-pentil-
4	0,51	2-Octenal, 2-butil-
5	0,44	2-Nonenal, 2-pentil-
6	1,01	2-Propilciclohexanol
7	0,87	2-Propilciclohexanol
8	12,94	2-Nonenal, 2-pentil-
9	12,45	2-Octenal, 2-butil-
10	0,43	Tetrapentacontano, 1,54-dibromo-
11	0,46	Éter de endro
12	0,57	2-Nonenal, 2-pentil-
13	0,74	2-Nonenal, 2-pentil-
14	0,75	2-Nonenal, 2-pentil-
15	1,11	Pentadecanal-
16	1,16	ácido n-hexadecanóico
17	14,26	2-Nonenal, 2-pentil-
18	0,43	Anidrido 2-dodecen-1-il(-)succínico
19	0,62	10-Undecen-1-ol, 2-metoxi-
20	0,58	7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona
21	0,5	2,3-naftalenodicarboxaldeído
22	0,4	Anidrido 2-dodecen-1-il(-)succínico
23	0,55	Anidrido n-nonenilsuccínico
24	0,94	Etanona
25	0,59	Fitol
26	2,62	Ácido 9,12-octadecadienóico (Z,Z)-
27	4,37	Ácido oleico
28	0,95	Ácido octadecanóico
29	0,83	2H-1-benzopiran-6-ol
30	0,57	Silano, triclorodecil-
31	0,46	14,15,16-Trinor-8.xi.-labdan-6.beta.-ol
32	0,71	Tetraciclo[6.1.0.0(2,4).0(5,7)]nonano
33	0,92	1,4-benzenodiamina, 2-metil-N4,N4-dioctil-
34	0,48	Ciclohexano
35	0,71	2H-1-benzopiran-6-ol
36	0,61	Ácido benzóico
37	0,56	4(1H)-Fenantrenona
38	0,73	2H-1-benzopiran-6-ol
39	0,46	Ácido succínico
40	0,47	(6aS,10aS)-9-(Hidroximetil)-6,6-dimetil-3-(2-metiloctan-2-il)-6a
41	0,56	2H-1-benzopiran-6-ol
42	0,54	Silano, metilvinil(hept-4-iloxi)deciloxi-
43	0,47	Ácido 2,3-hexadienóico
44	0,56	.beta.-Sitosterol
45	1,26	Campesterol
46	1,2	Estigmasterol
47	1,1	Obtusifoliol
48	12,17	.gama.-Sitosterol
49	2,47	Estigmast-7-en-3-ol
50	1,4	Pregnan-17,21-diol-9,11-epoxi-3,20-diona

**Perfil cromatográfico da matéria insaponificável do óleo de girassol
ozonizado (OGO 480 minutos)**

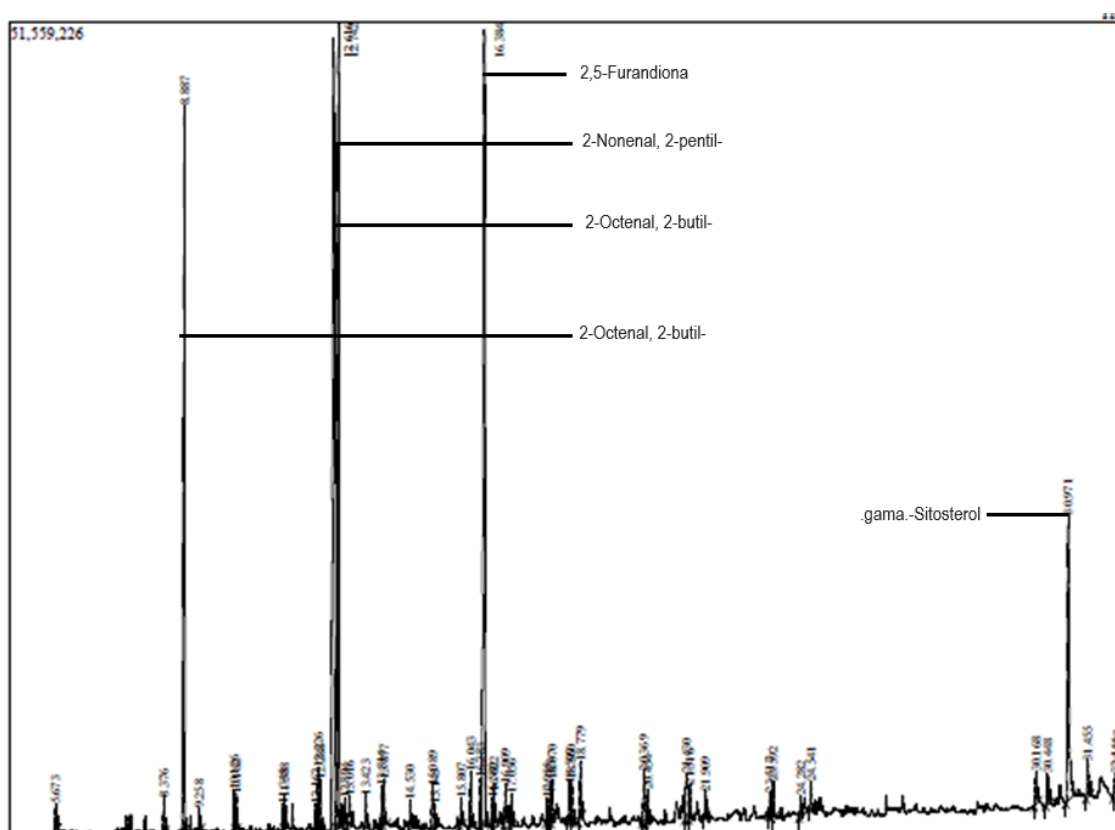


Figura 16 Cromatograma matéria insaponificável do óleo de girassol
ozonizado(OGO 480 minutos)

Tabela 11 Matéria insaponificável do óleo de girassol ozonizado (OGO 480 minutos).

Picos	%	Componente
1	0,43	1-Nonanol
2	0,52	Álcool ciclooctílico
3	12,93	2-Octenal, 2-butil-
4	0,37	Octadecanal, 2-bromo-
5	0,58	2-Nonenal, 2-pentil-
6	0,49	2-Octenal, 2-butil-
7	0,38	2-Octenal, 2-butil-
8	0,52	2-Nonenal, 2-pentil-
9	0,45	4,5-Heptadien-2-ona, 3,3,6-trimetil-
10	0,91	2-Propilciclohexanol
11	0,74	2-Propilciclohexanol
12	17,02	2-Nonenal, 2-pentil-
13	16,45	2-Octenal, 2-butil-
14	0,48	Oxirano, hexadecil-
15	0,74	Oxirano, hexadecil-
16	0,60	Éter de endro
17	0,51	2-Nonenal, 2-pentil-
18	0,69	2-Nonenal, 2-pentil-
19	0,41	2-Pentanona
20	0,81	2-Nonenal, 2-pentil-
21	0,36	2-Amino-4-benziltiometil-6-piperidino-1,3,5-triazina
22	0,42	2H-1-Benzopirano
23	1,04	Pentadecanal-
24	0,81	ácido n-hexadecanóico
25	18,80	2,5-Furandiona
26	0,48	2,5-Furandiona
27	0,56	Oxirano, hexadecil-
28	0,62	2,4,5-Trimetilnilina
29	0,50	2H-1-Benzopirano
30	0,40	Silano, clorodietilnoniloxi-
31	0,51	Ciclohexadecadieno-1,6-diona
32	0,77	Etanona
33	0,64	Ácido 9-octadecenóico, (E)-
34	0,77	Ácido benzóico
35	0,92	Ácido octadecanóico
36	1,04	2H-1-benzopiran-6-ol
37	0,65	2,4,5-Trimetilnilina, N-trimetilacetil-
38	1,21	9-t-Butil-4-iodo-2,2-dimetiladamantano
39	0,56	7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona
40	0,45	Ácido benzóico
41	0,36	7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona
42	0,74	2H-1-benzopiran-6-ol
43	0,37	i-Propil 11,12-metileno-octadecanoato
44	0,52	2H-1-benzopiran-6-ol
45	0,71	Campesterol
46	0,69	Estigmasterol
47	6,86	.gama.-Sitosterol
48	0,85	Estigmast-7-en-3-ol
49	0,64	9,19-Ciclolano-3-ol
50	0,72	1.alfa.-Metil-5.alfa.-androstano-3.alfa., 17.beta.-diol

Segundo Poljsak e Glavac (2022), matéria insaponificável demonstra várias atividades biológicas, dentre elas, cicatrizantes, antiacne e antidermatite, bem como atividades regenerativas, hidratantes, fotoprotetoras e antirrugas. (POLJSAK *et al.*, 2022).

Na (Tabela 8) e (Figura 13) verificou-se picos relacionados a componentes diferentes do OG para o OGO 480 minutos conforme mostra a (Tabela 11) e (Figura 16). Um fato interessante, foi o surgimento de um componente na amostra de OGO 480 minutos, o qual se notou presença em nenhuma das outras amostras, o componente 2,5 furandiona conforme mostra na (Tabela 11).

De acordo com estudo de Silva, Fernandes, Barros, Ferreira, Pereira e Gonçalves (2018) e seus colaboradores, esse componente foi encontrado no extrato *Osmundea pinnatifida*, que é o uma alga marinha mais conhecida como pimenta dulce, onde o mesmo obteve atividade antifúngica. (SILVA *et al.*, 2018).

O componente de caráter terapêutico que foi gerado na ozonização perfil insaponificável nas três amostras de OGO é o pentadecanal. Segundo Ricciardelli, Casillo, Corsaro, Tutino, Parrili e Van Der Mei (2020), este componente é um potente aldeído contra *S.epidermidis* sendo um anti-biofilme. (SILVA *et al.*; 2020), sendo dos componentes do óleo essencial de plantas como *Cassia siamea* com propriedades antimicrobianas (OGUNWANDE *et al.*, 2013; RICCIARDELLI *et al.*, 2020).

Outro componente presente foi o ácido benzoico, o qual possui propriedades superiores aos parabenos, muito utilizados como conservantes por suas atividades antimicrobianas. (SCHIMIRR *et al.*, 2022).

Em relação os resultados do cromatograma na Figura 16, é possível observar do OGO 480 minutos, uma diferença nos picos da matéria insaponificável do OGO.

De acordo com estudo realizado por Radzierska-Kazmierczak, Smigielski, Sikora, Nowak, Plucinska, Kunicka-Styczynska e Czarnecka-Chrebelska (2021) a utilização de óleo vegetal ozonizado em emulsão favorece a necessidade de se utilizar uma menor concentração de conservantes sintéticos e adicionar uma opção mais vegetal. Na (Figura 17) podemos observar a ação antimicrobiana do óleo vegetal de oliva ozonizado.



Figura 17 Emulsão com diferentes tipos de Óleo vegetal de oliva.

Fonte: (RAZMIERCZAK-RADZIMIERSKA *et al.*, 2021).

De acordo com as análises cromatográficas do perfil graxo apresentado na (Tabela 12) e matéria insaponificável (Tabela 13) podemos observar os cinco componentes em concentração maior de cada amostra e ter uma visão ampla, dos componentes gerados e também consumidos.

Podemos verificar na (Tabela 12) o perfil graxo das quatro amostras, observa-se que o ácido linoleico e do ácido oleico há um consumo na ozonização, enquanto a amostra OGO 480 minutos apresentou um aumento considerável na concentração de ácido azelaico.

Tabela 12 Comparativo dos 5 componentes majoritarios perfil graxo.

OG		OGO 100 minutos	
%	Componentes	%	Componentes
47,13%	Ácido Linoleico - C18:2	40,53%	C18:2 - ácido linoléico
33,10%	Ácido oleico - C18:1	23,69%	C18:1 - ácido oleico
10,81%	Ácido palmítico - C16:0	10,01%	C18:0 - Ácido esteárico
6,12%	Ácido esteárico - C18:0	9,77%	C16:0 - Ácido palmítico
1,06%	Ácido beénico - C22:0	2,67%	Ácido azelaico
OGO 240 minutos		OGO 480 minutos	
%	Componentes	%	Componentes
31,15%	C18:2 - ácido linoléico	19,64%	Dimetil acetal nonanal
25,92%	C18:1 - ácido oleico	10,84%	C18:1 - ácido oleico
9,90%	C18:0 - Ácido esteárico	9,91%	C16:0 - Ácido palmítico
9,84%	C16:0 - Ácido palmítico	9,52%	C18:0 - Ácido esteárico
4,02%	5,13-docosadienoato de metila	8,19%	Ácido azelaico

É possível observar que o perfil cromatográfico da matéria insaponificável, apresentou-se totalmente diferente do perfil graxo, houve surgimento de novos

compostos, sendo que somente o componente gama-sitosterol esteve presente nas quatro amostras.

O componente 2-nonenal, 2-pentil- está presente nas três amostras ozonizadas, porém em concentração maior na amostra OGO 480 minutos. Destaca-se o surgimento do componente 2,5 furandiona presente somente na amostra OGO 480 minutos conforme mostra a Tabela 13.

Tabela 13 Comparativo dos 5 componentes majoritarios da matéria insaponificável.

OG		OGO 100 minutos	
%	Componente	%	Componente
20,00	9,12-octadecadienoato de butila	24,17	2-Nonenal, 2-pentil-
19,65	Ácido 9,12-octadecadienóico (Z,Z)-	17,90	2-Octenal, 2-butil-
16,19	Ácido Oleico	12,62	.gama.-Sitosterol
13,74	Oleato de etila	7,41	Ácido 9-octadecenóico, (E)-
8,79	.gama.-Sitosterol	6,09	Ácido 9,12-octadecadienóico (Z,Z)-

OGO 240 minutos		OGO 480 minutos	
%	Componente	%	Componente
30,2	2-Nonenal, 2-pentil-	30,25	2-Octenal, 2-butil-
22,3	2-Octenal, 2-butil-	20,13	2-Nonenal, 2-pentil-
12,2	.gama.-Sitosterol	19,28	2,5-Furandiona
4,37	Ácido oleico	6,86	.gama.-Sitosterol
2,83	2H-1-benzopiran-6-ol	2,30	2H-1-benzopiran-6-ol

4.3. Análise Físico-química

4.3.1. Índice de acidez

Os resultados mostraram um aumento no índice de acidez em consonância com resultados da literatura (DIAZ *et al.*, 2012) devido ao aumento de subprodutos de caráter ácido como os aldeídos, peróxidos e ácidos carboxílicos gerados durante o processo de ozonização. (CARDOZO *et al.*, 2021). A (Tabela 14) apresenta os resultados dos índices de acidez de acordo com o tempo de ozonização. Observa-se um aumento na formação de ácidos, com aumento do tempo de ozonização.

Tabela 14 Índice de acidez OG e OGO

Amostra	Índice de acidez	mL utilizado NaOH Titulado
OG	0,50	0,18
OGO 100 minutos	0,80	0,29
OGO 240 minutos	1,15	0,42
OGO 480 minutos	2,15	0,78

4.3.2. Índice de Peróxido

O índice de peróxido é um parâmetro muito questionado no meio profissional, onde se pressupõe que quanto maior o mEq (miliequivalente de O₂) maior a efetividade e mais poderoso seria o produto. A metodologia de doseamento para índice de peróxido é muito relevante para os valores. Neste trabalho, a metodologia utilizada é a do (ISCO3) Comitê Internacional Científico de Ozonioterapia.

Estudos apontam para a importância da determinação de limites na ozonização, devido a reações em cadeia, o qual há formação de subprodutos de ozonídeos, os quais podem gerar problemas como alergias, irritações, destruição tecidual, entre outros. (UGAZIO *et al.*, 2020).

Amostra	Dosagem O3	Tempo de ozonização/100 mL	Índice de peróxido
OG	0	0	120
OGO 100	60 µg/mL	100 minutos	1300
OGO 240	60 µg/mL	240 minutos	1660
OGO 480	60 µg/mL	480 minutos	3170

Conforme mencionado por Martínez-Sanchez (2021), estima-se que óleos ozonizados contendo baixos índices de peróxidos (80 mEq O₂/kg a 120 mEq O₂/kg) são os mais usados principalmente em cosméticos. Índices mais altos entre 200 mEq O₂/kg a 400 mEq O₂/kg, têm um efeito mais importante nos processos de cicatrização. Efeitos germicidas dos óleos contém valores

superiores a 400 mEq O₂/kg. É importante avaliar a presença ou não de formaldeído, pois este componente pode ser eficácia e segurança do óleo ozonizado e estão intimamente ligadas ao seu controle de qualidade. (MARTINEZ-SANCHEZ, 2021).

Na pesquisa realizado por Zanardi e seus colaboradores (2008) observa-se uma comparação de valores de índice de peróxido na mesma metodologia utilizada nesse trabalho (Tabela 15). (ZANARDI *et al.*, 2008).

Tabela 15 Comparativo tempo, dosagem vs índice de peróxido.

Fonte: Adaptado (ZANARDI *et al.*, 2008)

Amostra (40 mL)	Tempo de ozonização	Dosagem Ozônio (mg)	Índice de peróxido
Óleo girassol	0	0	104
Óleo ozonizado 15	15 minutos	1,24	1480
Óleo ozonizado 30	30 minutos	2,48	2503
Óleo ozonizado 60	60 minutos	4,95	3100
Óleo ozonizado 90	90 minutos	7,42	3440
Óleo ozonizado 120	120 minutos	9,9	3800

4.3.3. Índice de Iodo

O iodo reage com duplas ligações e assim, de acordo com Díaz, Hernández, Martínez, Vidal, Gómez, Fernandez e Garcés (2006), este parâmetro dos óleos pode indicar o teor de duplas ligações presentes nestes. Os resultados mostraram uma queda considerável do índice de iodo com o aumento do tempo de ozonização, sugerindo que este processo promove a diminuição de compostos insaturados do óleo conforme apresentado na (Tabela 16) e gráfico a seguir. (DIAZ *et al.*, 2006).

Tabela 16 Índice de iodo das amostras de OG e OGO.

Amostra	Índice de iodo	ml gasto $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
OG	145	28,58
OGO 100 minutos	81	15,98
OGO 240 minutos	71	14
OGO 480 minutos	53	10,45



Conforme Díaz, Sánchez, Gómez, Hernández, Veloso, Pereira, Mangrich e De Andrade (2012) realizaram a ozonização de óleo vegetal de girassol, utilizando 200 mL deste óleo em um reator de borbulhamento, à temperatura ambiente (25°C) por 5 e 8 horas, aplicando oxigênio medicinal e ar como fontes de ozônio, respectivamente. Diferentes dosagens de ozônio foram utilizadas por meio de tempos de borbulhamento variados. As dosagens escolhidas visavam obter valores de peróxido entre 100 e 700 mEq/kg. Após 24 horas de armazenamento a 2-8°C, as amostras foram analisadas. Os resultados dos índices de acidez, peróxido e iodo obtidos no presente trabalho corroboram ao estudo realizado por (DIAZ *et al.*, 2012) como pode ser observado pela (Tabela 17).

Tabela 17 Parâmetros físico-químicos do óleo de girassol ozonizado obtido por (DIAZ *et al.*, 2012) com oxigênio como fonte de ozônio.

Dosagem Ozônio (mg/g)	Tempo (h)	Índice de peróxido	Índice de acidez	Índice de iodo
0	0	7,9	0,12	119
12	1	125	0,15	117
23	2	256	0,22	109
35	3	376	0,34	104
47	4	566	0,60	101
59	5	658	0,88	97

4.3.4. Estabilidade Físico-química

A estabilidade do OGO na faixa de temperatura (40 – 45°C) promoveu degradação próxima de 55% na amostra OGO 480 minutos (Tabela 20). Observa-se que em temperaturas a 5°C, ocorreu uma degradação menor. Segundo Jbara, Shehadeh, Trefi e Bitar (2022), o óleo ozonizado é instável durante o armazenamento em prateleira e pode ser mais estável quando armazenado em temperaturas inferiores. (JBARA *et al.*, 2022).

Porém, mesmo com esta instabilidade nos valores de mEq do OGO, possui, ou seja, seu benefício antimicrobiano segundo (MOUREU *et al.*, 2015) Uma possível explicação para este fato é que os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo de girassol ozonizado são ozonídeos, ácidos nonanóico e azelaico que possuem efeitos antimicrobianos.

Nas Tabela 18, Tabela 19 e Tabela 20 são apresentados os resultados de estabilidade físico-química obtida seguindo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (2004), incluindo os valores dos índices de peróxidos obtidos.

Tabela 18 Estabilidade acelerada OGO 100 minutos.

		Geladeira 5°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 100 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	levemente incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	1300	1250	1210	1100	
		Ambiente 25°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 100 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	levemente incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	1300	1150	1090	980	
		Estufa 45°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 100 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	levemente incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	1300	1050	1000	910	

Tabela 19 Estabilidade acelerada OGO 240 minutos.

		Geladeira 5°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 240 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido levemente viscoso	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	Incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	1660	1590	1420	1380	
		Ambiente 25°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 240 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido levemente viscoso	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	Incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	1660	1390	1260	1180	
		Estufa 45°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 240 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido levemente viscoso	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	Incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	1660	1180	1030	915	

Tabela 20 Estabilidade acelerada OGO 480 minutos.

		Geladeira 5°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 480 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido viscoso	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	Incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	3170	3050	2950	2900	
		Ambiente 25°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 480 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido viscoso	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	Incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	3170	2950	2480	1950	
		Estufa 45°C			
Organoléptica e Físico-química	OGO 480 minutos	30 dias	60 dias	90 dias	
Aspecto	Líquido viscoso	de acordo	de acordo	de acordo	
Cor	Incolor	de acordo	de acordo	de acordo	
Odor	Característico	de acordo	de acordo	de acordo	
Índice de peróxido	3170	2600	1890	1430	

4.4. Eficácia Microbiológica

Foram utilizadas três metodologias para comprovação da atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Os estudos envolvendo *M. furfur* foram desafiadores, sendo o método difusão em ágar, o único que promoveu resultado, pois não foi possível o crescimento do fungo no ensaio *time-kill* e CIM.

4.4.1. Difusão em ágar (Pour-Plate)

A amostra OGO 480 minutos mostrou-se eficaz no ensaio difusão em ágar para as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Na figura 18 é possível observar a diferença de halo da amostra OGO 240 minutos para a amostra de 480 minutos, enquanto a amostra OGO 100 minutos não houve presença de halo.

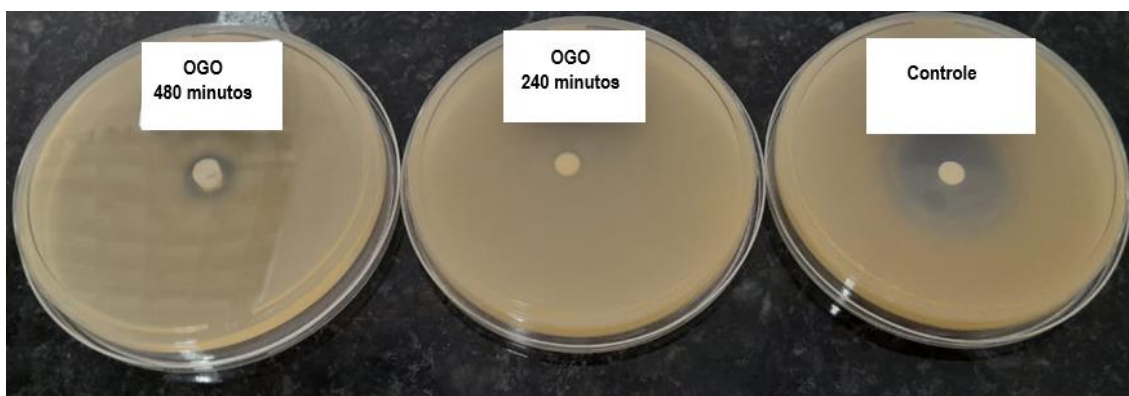


Figura 18 Difusão em ágar OGO vs controle com a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

4.4.2. Time-Kill (tempo de morte)

A Figura 19 mostra o plaqueamento de uma das cepas avaliadas. O OGO 480 minutos apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 conforme tabela 18.

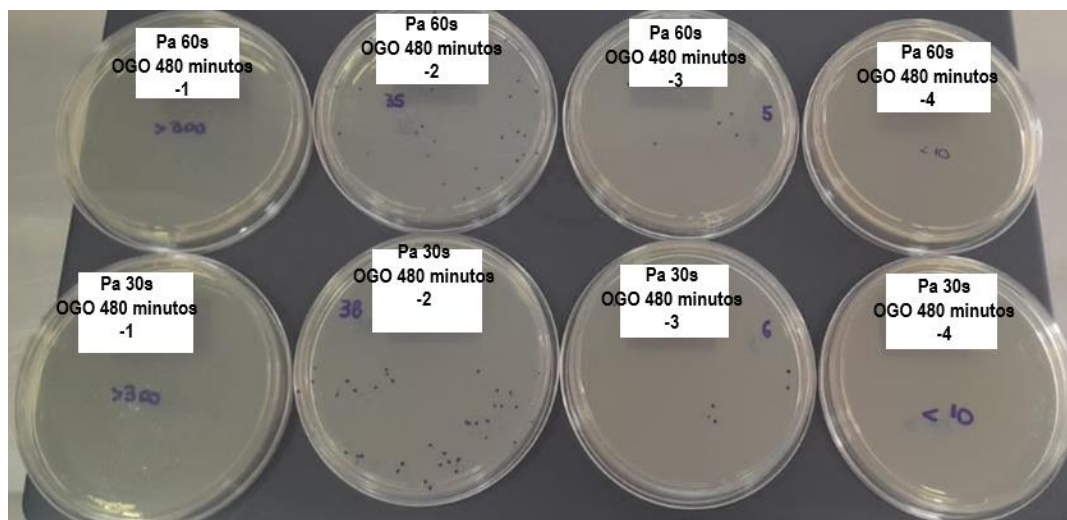


Figura 19 Plaqueamento de cepa para o ensaio time-kill (tempo de morte).

Tabela 21 Contagem de bactérias e leveduras (tempo de contato e fator de redução).

Microrganismo	Contagem de bactérias (UFC/g ou mL)						
	T ₀	Tempo de contato			%RF (Fator de redução)		
		T-30 seg.	T-1 min.	T-2 min.	T-30 seg.	T-1 min.	T-2 min.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1,2x10 ⁷	3,2x10 ³	1,5x10 ³	9,5x10 ²	>99,9	>99,9	>99,9
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1,9x10 ⁷	1,1x10 ⁵	8,5x10 ⁴	5,5x10 ³	>99	>99	>99,9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1,5x10 ⁷	2,4x10 ⁴	1,6x10 ⁴	3,5x10 ³	>99	>99	>99,9
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10718	6,0x10 ⁷	3,5x10 ⁴	9,5x10 ²	1,4x10 ²	>99,9	>99,99	>99,999
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	5,0x10 ⁵	<10	<10	-	>99,9	>99,99	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,7x10 ⁵	4,2x10 ²	<10	-	>99	>99	-

Em um estudo realizado por Song, Zeng, Xiang, Gao, Huang L, Huang J, Wu e Lu (2017) utilizando a mesma técnica com a técnica ensaio microbiológico *time-kill*, mostrou quase 100% de morte em 5 min da cepa *Staphylococcus aureus*. Observa-se que o óleo ozonizado de estudo tinha um índice de peróxido 2000 a 2200 mEq. Enquanto o OGO 480 minutos do nosso trabalho observa-se 3170 mEq, onde mostra > 99,9% de morte em 2 minutos da cepa *Staphylococcus aureus*. (SONG *et al.*, 2017).

4.4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da concentração inibitória mínima estão apresentados na tabela 20.

A amostra de OGO promoveu inibição nas cepas testadas, sendo que a bactéria *Escherichia coli* obteve a menor inibição no ensaio microbiológico CIM e a levedura *Candida albicans* houve a maior inibição na diluição 6,25% de OGO e 93,75% OGO

Na Figura A observa-se a inibição em torno de 50% da bactéria *Escherichia coli* em meio TTC1% (cloreto de trifeniltetrazólio) e Figura B inibição de *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.



Figura 20 Microdiluição com microplaca de 96 poços.

Tabela 22 Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OGO 480 minutos.

Concentração Mínima Inibitória									
100% da concentração inicial									
Amostra	OGO	OGO 50% :OG 50%	OGO 25% OG 75%	OGO 12,5% :OG 37,5%	OGO 6,25% OG 93,75%	OGO 3,125% OG 96,875%	OGO 1,5625% :OG 98,4375%	Controle positivo Antimicrobi- ano	Controle negativo (meio de cultura)
Diluição	AMOSTRA	50%	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	C+	CB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	NA	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	NA	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	NA	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	NA	-	-	-	-	+	+	+	-

+ crescimento do microrganismo

- Inibição do crescimento do microrganismo

Inóculo Padrão: Bactérias e Leveduras: 10^6 a 10^7 UFC/mL e Bolores: 10^4 a 10^5 UFC/mL.

Os resultados demonstram que a mistura de 50% de OGO 480 minutos no OG inibiu todos os microrganismos estudados. Com 25% de OGO 480 minutos, ainda inibiu *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*, mas não *E. coli*. Diminuindo mais a concentração de OGO 480 minutos para 12,5%, a inibição ocorreu para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, enquanto que na diluição de 6,25% de OGO 480 minutos inibiu somente a *Candida albicans*.

Segundo Moreu, Violleau, Leakhal-Haimoud e Calmon (2015) testaram os óleos de girassol ozonizados contra *S. aureus*, *E. coli* e *Streptococcus uberis*. Os resultados mostram atividade antimicrobiana a inibição, onde o óleo ozonizado testado o índice de peróxido foi de 2600 mEq O₂/kg. (MOUREU *et al.*, 2015).

A partir dos resultados, é possível inferir a possibilidade de se ampliar o uso de OGO em tratamento de feridas diabéticas (altamente suscetíveis a infecções), pústulas, candidíase vulvovaginal, doença infecciosas tópicas causadas por fungos, principalmente pseudomonas, de difícil tratamento. De acordo com Liu, Zeng L, Gao, Zeng J e Lu (2023) também sugerem que o OGO pode ser utilizado também para de auxiliar na cicatrização de feridas , tratar topicamente dermatite atópica, psoríase etc. (LIU *et al.*, 2023).

De acordo com Silva, Peirone, Amaral, Capita, Alonso-Calleja, Marques-Magallanes, Martins, Carvalho, Maltez, Pereira e Capelo (2020), o OGO poderia ser usado como uma alternativa para antibióticos no tratamento de infecções cutâneas causadas por bactérias multirresistentes. (SILVA *et al.*, 2020).

4.5. Estudo *in vitro* de citotoxicidade

De acordo com a Figura nas concentrações de 1 a 10 mg/ml a amostra OGO 480 minutos apresentou-se citotóxica, porém em concentrações abaixo de 0,1 ug/ml a amostra não foi citotóxica. O controle utilizado foi o Lauril éter sulfato sódio sendo um componente citotóxico. (BABICH *et al.*, 1997).

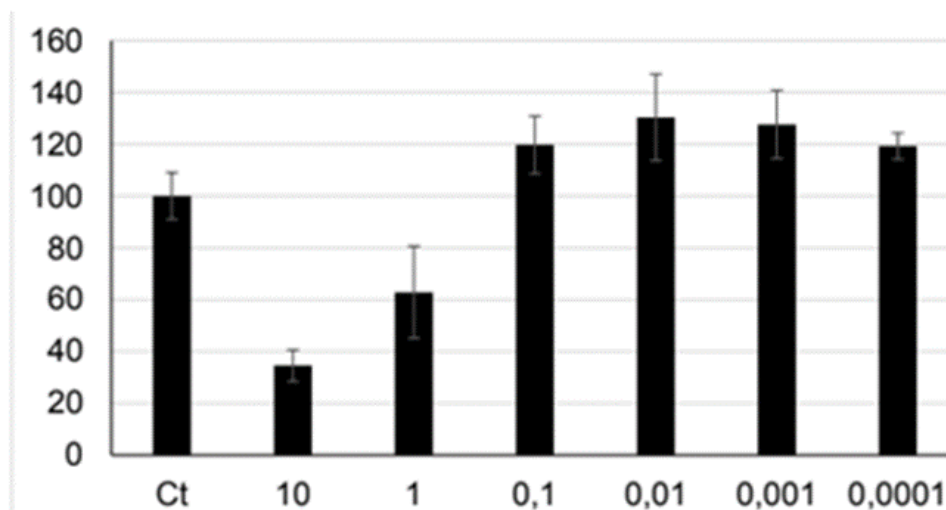


Figura 21 Controle versus concentração de OGO 480 minutos.

Os resultados foram avaliados com auxílio do *software Microsoft Excell*. O grupo controle Lauril éter sulfato sódio foi normalizado a 100% e a percentual viabilidade celular na amostra e no controle positivo foi calculado em relação ao

controle. A amostra OGO 480 minutos foi considerada citotóxica quando apresentou 30% ou mais de redução de viabilidade celular ao controle, estudos serão necessários além do estudo em *in vitro*.

De acordo com Günaydin, Sevim, Tanyolaç e Gürpınar (2017) estudaram a citotoxicidade com óleo vegetal de azeite ozonizado associado ao óleo vegetal de azeite e observou-se que o óleo de vegetal de azeite ozonizado com índice de peróxido entre 2700 e 2900 mEq O₂/kg, a amostra apresentou-se citotóxica. Porém quando os pesquisadores (GUANAYDIN *et al.*, 2017) realizaram a mistura com óleo vegetal de azeite, observou-se que não foi citotóxica.

5. CONCLUSÃO

A padronização e caracterização do OGO de 120, 240 e 480 minutos na concentração 60 µg/ml de ozônio, as propriedades físico-química se modificaram com o aumento do tempo de ozonização. A coloração alterou, apresentando-se mais clara, a densidade aumentou, o odor alterou, os índices de peróxido, acidez aumentaram e índice de iodo reduziu.

Na ozonização foi caracterizado a formação de novos compostos ozonídeos, os dados de CG-MS apontaram para o aparecimento de ácido benzoico, 2,5 furandione, fitosteróis, entre outros.

Referente a atividade biológica, o OGO 480 minutos se mostrou efetivo nas cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 entre os ensaios microbiológicos como difusão em ágar, *time-kill* (tempo de morte) e CIM. No ensaio CIM notou-se que a levedura *Candida albicans* ATCC 16404 apresentou a maior inibição na diluição 6,25% de OGO 480 minutos e 93,75% OG, enquanto a bactéria *Escherichia coli* ATCC 8739 apresentou inibição na diluição de 50% de OGO e 50% OG.

O parâmetro físico-químico índice de peróxido um assunto muito comentado quando se trata de óleo vegetal ozonizado, estudos corroboram que não é apenas esse índice determinante para a qualidade do produto, porém percebe-se que quanto maior o tempo de ozonização, maior será esse índice. Um parâmetro predominante é a cromatografia, pois é nessa análise que vamos identificar os componentes que terão de fato a eficácia e também a segurança do produto.

Quanto ao resultado citotóxico em célula Balb/c 3T3 clone 31 *in vitro* o OGO 480 minutos mostrou-se citotóxico nas dosagens de 1 a 10 µg/mL, estudos adicionais são necessários para segurança.

Esse trabalho corrobora para a utilização terapêutica de OGO: 480min 60 µg/ml O₃ padronizado, em doenças bacterianas e fúngicas. É uma opção viável de tratamento sendo de origem vegetal, livre de conservantes e fragrâncias.

PERSPECTIVAS:

- Estudo de ozonização e caracterização com outros óleos vegetais como óleo de rosa mosqueta, óleo de arnica e óleo de calêndula.
- Estudo de atividade de cicatrização em animais diabéticos com OGO 480 minutos.
- Estudo da potencialidade da utilização de OGO 480 minutos em câncer basocelular e melanomas (*in vitro*).
- Estudo de tratamento de pele tais como: acne, rosácea e melasma.

6. REFERÊNCIAS

ABELAN, U.S.; CANADA, M.L.M.; KOZUSNY-ANDREANI, D.; ZÂNGARO, R.A.; RAMOS, R.R. Ozone Therapy with Ozonized Water: An Alternative Process for the Sterilization of Manicure Pliers In Vitro. **Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering**, v. 8, p. 29-35, 2020. Disponível em: Doi:<https://doi.org/10.12970/2311-1755.2020.08.05>.

ADUSEI, E.B.A.; ADOSRAKU, R.K.; OPPONG-KYEKYEKU, J.; AMENGOR, C.D.K.; JIBIRA, Y. Resistance Modulation Action, Time-Kill Kinetics Assay, and Inhibition of Biofilm Formation Effects of Plumbagin from *Plumbago zeylanica* Linn. **J Trop Med.** v. 2019, 1250645, 2019. doi: 10.1155/2019/1250645.

AKKAYA, M.R. Fatty acid compositions of sunflowers (*Helianthus annuus* L.) grown in east Mediterranean region. **Revista Italiana Delle Sostanze Grasse.** v. 95, p. 239-247, 2018.

ALMEIDA, N.R.; BEATRIZ, A.; MICHELETTI, A.C.; ARRUDA, E.J. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 313-326, 2013. <https://doi.org/10.17807/orbital.v4i4.467>.

ALMEIDA, N.R.; BEATRIZ, A.; ARRUDA, E.J.; LIMA, D. Ozonized vegetable oils: Production, chemical characterization and therapeutic potential. In: HOLT, B. (Editor). **Vegetable oil Properties, Uses and Benefits**. New York: Nova Science Publishers, 2016. Chapter 5, p. 129-160. (Chemistry Research and Applications). <https://www.researchgate.net/publication/318585294> acesso 20 de janeiro de 2024. ISBN: 978-1634851282.

ANZOLIN, A.P.; BERTOL, C.D. A ozonioterapia como terapêutica integradora no tratamento da osteoartrose: uma revisão sistemática. **Brjp** v.1, n. 2, p. 171–175, 2018. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180033>.

BABICH, H.; BABICH, J.P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: in vitro cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicol Lett.** v. 91, n. 3, p. 189-96, 1997. doi: 10.1016/s0378-4274(97)00022-2.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **J Pharm Anal.** v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.

BRITO JÚNIOR, A.A.; CARNEIRO, J.K.M.P. REIS, J.V.N.A.; OLIVEIRA, T.J.S.; DANTAS, J.B.L. Application of ozonized oils in human body and oral cavity systems. **RGO, Rev Gaúch Odontol.** v. 70, e20220027, 2022. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-86372022002720200152>.

CARDOSO, I.C.C.; SANTOS, A.C.; CARDOSO, L.C.C.; ALMEIDA, M. B. Antimicrobial potential of ozonized vegetable oils against bacterial species: an

integrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e22410212451, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12451.

DE SIRE, A.; AGOSTINI, F.; LIPPI, L.; MANGONE, M.; MARCHESE, S.; CISARI, C.; BERNETTI, A.; INVERNIZZI, M. Oxygen-Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders. **Biomolecules**. v. 11, n. 3, p. 356, 2021. doi: 10.3390/biom11030356.

DEL, G.P. Skin Infections Caused by Staphylococcus aureus. **Acta Derm Venereol**. v. 100, n. 9, adv00110, 2020. doi: 10.2340/00015555-3466.

DÍAZ, M.F.; HERNÁNDEZ, R.; MARTÍNEZ, G.; VIDAL, G.; GÓMEZ, M.; FERNÁNDEZ, H.; GARCÉS, R. Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 403–407, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000200026>.

DÍAZ, M.F.; SÁNCHEZ, Y.; GÓMEZ, M.; HERNÁNDEZ, F.C.; VELOSO, M.C.P.; PEREIRA, P.A.; MANGRICH, A.S.; ANDRADE, J.B. Physicochemical characteristics of ozonated sunflower oils obtained by different procedures. **Grasas y Aceites** [Internet]. v. 63, n. 4, p. 466-474, 2012. Available from: <https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1399>.

DIAZ, M.F.; VELOSO, M.C.C.; PEREIRA, P.A.P.; SÁNCHEZ, Y.; FERNÁNDEZ, I.; ANDRADE, I.F. Assesment of the Physicochemical Quality Indicators and Microbiological Effects of Brazilian Ozonized Vegetable Oils. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 32, n. 1, p. 2016-224, 2021. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200170>.

DUPAIN, X.; COSTA, D.J.; SCHAUVERIEN, C.J.; MAKKEE, M.; MOULIJN, J.A. Cracking of a rapeseed vegetable oil under realistic FCC conditions. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 72, n. 1-2, p. 44-61, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2006.10.005>.

ELVIS, A.M.; EKTA, J.S. Ozone therapy: A clinical review. **J Nat Sci Biol Med**. v. 2, n.1, p. 66-70, 2011. doi: 10.4103/0976-9668.82319.

GAD, H.A.; ROBERTS, A.; HAMZI, S.H.; TOUISS, I.; ALTYAR, A.E.; KENSARA, O.A.; ASHOUR, M.L. Jojoba Oil: An Updated Comprehensive Review on Chemistry, Pharmaceutical Uses, and Toxicity. **Polymers** (Basel). v. 13, n. 11, 1711, 2021. doi: 10.3390/polym13111711.

GERRER, L.V.; CUNHA, K.C.; NOGUEIRA, M.C.L.; CARDOSO, C.C.; SOARES, M.M.C.N.; ALMEIDA, M.T.G. “In vitro” antifungal activity of ozonized sunflower oil on yeasts from onychomycosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p. 1315-1318, 2012.

GRANDI, G.; CAVALLO, R.; ZANOTTO, E.; CIPRIANI, R.; PANICO, C.; PROTTI, R.; SCAPAGNINI, G.; DAVINELLI, S.; COSTAGLIOLA, C. " Atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo ozonizado em colírio lipossômico contra bactérias multirresistentes" **Open Medicine**, v. 17, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1515/med-2022-0495>.

GUIA de Estabilidade de Produtos Cosméticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004. 52 p. (Série Qualidade em Cosméticos; v. 1). ISBN 85-88233-15-0.

GUIA de Microbiologia ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos). 1. ed. <http://abihpec.org.br/guia-microbiologia/files/assets/basic-html/index.html#1> acesso 22 de novembro de 2023.

GUIDONI, M.; SCHERER, M.M.C.; FIGUEIRA, M.M.; SCHMITT, E.F.P.; ALMEIDA, L.C.; SCHERER, R.; BOGUSZ, S.; FRONZA, M. Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 52, n. 2, e8209, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20188209>.

GUINESI, A.S.; ANDOLFATTO, C.; FILHO, I.B.; CARDOSO, A.A.; FILHO J.P.; FARAC, R.V. Ozonized oils: a qualitative and quantitative analysis. **Braz Dent J.** v. 22, n. 1, p. 37-40, 2011. doi: 10.1590/s0103-64402011000100006.

GÜNAYDIN, Y.; SEVİM, H.; TANYOLAÇ, D.; GÜRPINAR, O.A. Ozonated Olive Oil with a High Peroxide Value for Topical Applications: In-Vitro Cytotoxicity Analysis with L929 Cells. **Ozone: Science & Engineering**, v. 40, n. 1, p. 37-43, 2017. DOI: 10.1080/01919512.2017.1341832.

HASSAN, Z.; STAHLBERGER, M.; ROSENBAUM, N.; BRÄSE, S. Criegee Intermediates Beyond Ozonolysis: Synthetic and Mechanistic Insights. **Angewandte Chemie - International Edition** v. 60, n. 28, p. 15138–15152, 2021. <https://doi.org/10.1002/anie.202014974>

HUANG, W.C.; TSAI, T.H.; CHUANG, L.T.; LI, Y.Y.; ZOUBOULIS, C.C.; TSAI, P.J. Anti-bacterial and anti-inflammatory properties of capric acid against *Propionibacterium acnes*: a comparative study with lauric acid. **J Dermatol Sci.** v. 73, n. 3, p. 232-240, 2014. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.10.010.

JBARA, S.; SHEHADEH, A.; TREFI, S.; BITAR, Y. assessing the quantity and quality of ozonated olive oil and studying its shelf-life stability. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University**, v. 45, n. 1, p. 249-268, 2022. doi: 10.21608/bfsa.2022.239446.

JOHN, A.; BROOKES, A.; CARRA, I.; JEFFERSON, B.; JARVIS P. Microbubbles and their application to ozonation in water treatment: A critical review exploring their benefit and future application. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 1561-1603, 2022. DOI: 10.1080/10643389.2020.1860406.

KING, S.; CAMPBELL, J.; ROWE, R.; DALY, M.L.; MONCRIEFF, G.; MAYBURY, C. A systematic review to evaluate the efficacy of azelaic acid in the management of acne, rosacea, melasma and skin aging. **J Cosmet Dermatol**. v. 22, n. 10, p. 2650-2662, 2023. doi: 10.1111/jocd.15923.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência E Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000500014>

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens**. v.10, n. 2, 165, 2021. doi: 10.3390/pathogens10020165.

KÜHBACHER, A.; BURGER-KENTISCHER, A.; RUPP, S. Interaction of Candida Species with the Skin. **Microorganisms**. v. 5, n. 2, 32, 2017. doi: 10.3390/microorganisms5020032.

LAZARUS, R.; WAGHORN, D.; NASH, C. Cutaneous salmonella infection. **scand j infect dis**. v. 39, n. 3, p. 257-258, 2007. doi: 10.1080/00365540600818037.

LEDEA-LOZANO, O. E.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, L. A.; GIL-IBARRA, D.; TENA, N.; GARCÉS, R.; MARTÍNEZ-FORCE, E.; SALAS, J. J. Characterization of different ozonized sunflower oils I. Chemical changes during ozonization. **Grasas y Aceites**, v. 70, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.3989/gya.1166182>.

LIU, L.; ZENG, L.; GAO, L.; ZENG, J.; LU, J. Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. **Int Wound J**. v. 20, n. 6, p. 2376-2385, 2023. doi: 10.1111/iwj.14060

MARTINELLI, M.; GIOVANNANGELI, F.; ROTUNNO, S.; TROMBETTA, C.M.; MONTOMOLI, E. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. **J Prev Med Hyg**. v. 58, n. 1, E48-E52, 2017.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, G. Scientific rational for the medical application of ozonized oils, an up-date. **Official Journal of Aepromo** (Spanish Association of Medical Professionals in Ozone Therapy), v.11, n. 1, p. 239–272, 2021.

MARZANO, A.V.; MERCOGLIANO, M.; BORGHI, A.; FACCHETTI, M.; CAPUTO, R. Cutaneous infection caused by Salmonella typhi. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. v.17, n. 5, p. 575-577, 2003. doi: 10.1046/j.1468-3083.2003.00797.x.

MCELROY, C.T.; FOGAL, P.F. Ozone: From discovery to protection, **Atmosphere-Ocean**, v. 46, n. 1, p. 1-13, 2008. DOI: 10.3137/ao.460101.

MERAD, Y.; DERRAR, H.; BELMOKHTAR, Z.; BELKACEMI, M. Gênero *Aspergillus* e suas várias características superficiais e cutâneas

humanas. **Patógenos**. v. 10, n. 6, 643, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060643>

MOULYDIA, F.; SALSABILA, N.; DEWI, R. K.; NIRMALA, A.; BISMO, S. Burn drug made from ozonated vegetable oil mixture with white tumeric and cassava leaves extract. **MATEC Web of Conferences**, v. 154, 2018. <https://doi.org/10.1051/matecconf/201815404002>

MOUREU, S.; VIOLLEAU, F.; LEKHAL-HAIMOUD, D.A.; CALMON, A. Influence of Storage Temperature on the Composition and the Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 38, n. 2, p. 143-149, 2016. <https://doi.org/10.1080/01919512.2015.1128319>.

MUELLER, M.; TAINTER, C.R. Escherichia coli Infection. [Updated 2023 Jul 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>

OGUNWANDE, I.A.; AVOSEH, N.O.; FLAMINI, G.; HASSAN, A.S.; OGUNMOYE, A.O.; OGUNSANWO, A.O.; YUSUF, K.O.; KELECHI, A.O.; TIAMIYU, Z.A.; TABOWEI, G.O. Essential oils from the leaves of six medicinal plants of Nigeria. **Nat Prod Commun**. v. 8, n. 2, p. 243-248, 2013.

OLIVEIRA, J. T. C. **Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em férias**. 2007. Dissertação (Mestrado em Enfermagem na Saúde do Adulto) – Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. doi: 10.11606/D.7.2007.tde-20122007-094050. Acesso em: 2023-10-15.

OLIVEIRA, A.R.M.; WOSCH, C.L. Ozonólise: a busca por um mecanismo. **Quim Nova [Internet]**. v. 35, n. 7, p. 1482–1485, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700034>

PEKÁREK, S. DC corona ozone generation enhanced by TiO₂ photocatalyst. **The European Physical Journal D**. v. 50, p. 171-175, 2008. [10.1140/epjd/e2008-00216-x](https://doi.org/10.1140/epjd/e2008-00216-x).

PEREIRA, J.E.; CAPELO, J.L.; IGREJAS, G.; POETA, P. High Efficacy of Ozonated Oils on the Removal of Biofilms Produced by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from Infected Diabetic Foot Ulcers. **Molecules**. v. 25, n. 16, 3601, 2020. doi: 10.3390/molecules25163601.

PETKOVSEK, Z.; ELERSIC, K.; GUBINA, M.; ZGUR-BERTOK, D.; ERJAVEC, M.S. Virulence potential of Escherichia coli isolates from skin and soft tissue infections. **J Clin Microbiol**. v. 47, n. 6, p. 1811-1817, 2009. doi: 10.1128/JCM.01421-08. Epub 2009 Apr 8. Erratum in: **J Clin Microbiol**. v. 48, n. 9, p. 3462-3463, 2010.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 p.

POLJSAK, N.; GLAVAC, N.K. Vegetable Butters and Oils as Therapeutically and Cosmetically Active Ingredients for Dermal Use: A Review of Clinical Studies. **Frontiers in pharmacology**. v. 13, 868461, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868461>.

RADZIMIERSKA-KAZMIERCZAK, M.; SMIGIELSKI, K.; SIKORA, M.; NOWAK, A.; PLUCINSKA, A.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A.; CZARNECKA-CHREBELSKA, K. H. Olive oil with ozone-modified properties and its application. **Molecules**, v. 26, n. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26113074>.

RANGEL, K.; CABRAL, F.O.; LECHUGA, G.C.; CARVALHO, J.P.R.S.; VILLAS-BÔAS, M.H.S.; MIDDLEJ, V.; DE-SIMONE, S.G. Detrimental Effect of Ozone on Pathogenic Bacteria. **Microorganisms**. v. 10, n. 1, 40, 2021. doi: 10.3390/microorganisms10010040.

REZENDE, P.T.; MELO, V.A.P.; ANDRADE, C.M.O.; REIS, T. A.; DIETRICH, L. Ozone therapy as adjuvant treatment in patients with COVID-19. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e125101421662, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i14.21662. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21662>. Acesso em: 18 nov. 2023.

RICCIARDELLI, A.; CASILLO, A.; CORSARO, M.M.; TUTINO, M.L.; PARRILLI, E.; VAN DER MEI, H.C. Pentadecanal and pentadecanoic acid coatings reduce biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* on PDMS. **Pathog Dis**. v. 78, n. 3, ftaa012, 2020. doi: 10.1093/femspd/ftaa012. PMID: 32105313.

RODRIGUES, K. R.; CARDOSO, C.C.; CAPUTO, L.R.; CARVALHO, J.C. T.; FIORINI, J.E.; SCHNEEDORF, M. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. **Inflammopharmacology**, v. 12, p. 261-267, 2004.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, Á.S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>.

ROSA, L.R.O.; ARAUJO, J.B.; AGUIAR, L.F.; COSTA, M.M.L.; FERREIRA, V. A.; MARQUES, D.M.C.; CASANOVAS, R.C. Benefits of Ozone Therapy in Oral and Maxillofacial Pathologies. **Arch Health Invest** v. 12, n. 7, p. 1488-1494, 2023. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v12i7.6135>.

ROWEN, R.J. Ozone therapy as a primary and sole treatment for acute bacterial infection: case report. **Med Gas Res**. v. 8, n. 3, p. 121-124, 2018. doi: 10.4103/2045-9912.241078.

RUBIN, M.B. The history of ozone. The Schönbein period, 1839–1868. **Bull. Hist. Chem**, v. 26, n. 1, p. 40-56, 2001. Disponível em: http://acshist.scs.illinois.edu/bulletin_open_access/v26-1/v26-1%20p40-56.pdf.

SADOWSKA, J.; JOHANSSON, B.; JOHANNESSEN, E.; FRIMAN, R.; BRONIARZ-PRESS, L.; ROSENHOLM, J.B. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. **Chem Phys Lipids**. v. 151, n. 2, p. 85-91, 2008. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.10.004.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Medicina Laboratorial*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 43, n. 6, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>.

SANTOS, G.M.; BRITO, M.M.; SOUSA, P.V.L.; BARROS, N.V.A. determinação do índice de acidez em óleos de soja comercializados em supermercados varejistas. **Revista Ciência e Saúde on-line**, v.2, n. 2, p. 11-14, 2017. <https://www.revistaeletronicafunvic.org/index.php/c14ffd10/article/download/74/64> acesso 22 de novembro de 2023.

SARKAR, R.; PODDER, I.; GOKHALE, N.; JAGADEESAN, S.; GARG, V. K. Use of vegetable oils in dermatology: an overview. **International Journal of Dermatology**, v. 56, n. 11, p. 1080–1086, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijd.13623>.

SCHMIDT, A. Malassezia furfur: a fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders. **Cutis**. v. 59, n. 1, p. 21-24, 1997.

SCHMITT, P.O.; FISCHER, A.F.; SILVA, R.M.L.; CRUZ, A.B. Compatibility and efficiency of preservatives in emulsive cosmetics containing high surfactant content. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, e191088, 2022. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e191088>.

SERRA, M.E.G.; BAEZA-NOCI, J.; ABDALA, C.V.M.; LUVISOTTO, M.M.; BERTOL, C.D.; ANZOLIN, A.P. The role of ozone treatment as integrative medicine. An evidence and gap map. **Front Public Health**. v. 10, 1112296, 2023. doi: 10.3389/fpubh.2022.1112296.

SHARMA, M.; HUDSON, J.B. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. **Am J Infect Control**. v. 36, n. 8, p. 559-563, 2008. doi: 10.1016/j.ajic.2007.10.021.

SILVA, P.; FERNANDES, C.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R.; PEREIRA, L.; GONÇALVES, T. The antifungal activity of extracts of Osmundea pinnatifida, an edible seaweed, indicates its usage as a safe environmental fungicide or as a food additive preventing post-harvest fungal food contamination. **Food Funct.** v. 9, n. 12, p. 6187-6195, 2018. doi: 10.1039/c8fo01797b.

SILVA, V.; PEIRONE, C.; AMARAL, J.S.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; MARQUES-MAGALLANES, J.A.; MARTINS, Â.; CARVALHO, Á.; MALTEZ, L.; PEKAREK, S. Ozone production by a dc corona discharge in air contaminated by *n*-heptane. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 41, n. 2, 2008. DOI 10.1088/0022-3727/41/2/025204.

SKALSKA, K.; LEDAKOWICZ, S.; PERKOWSKI, J.; SENCIO, B. Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil, **Ozone: Science & Engineering**, v. 31, n. 3, p. 232-237, 2009. DOI: 10.1080/01919510902838669.

SONG, M.; ZENG, Q.; XIANG, Y.; GAO, L.; HUANG, L.; HUANG, J.; WU, K.; LU, J. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Mol Med Rep.** v. 17, n. 2, p. 2449-2455, 2018. doi: 10.3892/mmr.2017.8148.

SORIANO, N.U.J.R.; MIGO, V.P.; MATSUMURA, M. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. **Chem Phys Lipids.** v. 126, n. 2, p. 133-140, 2003. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2003.07.001.

SPERNOVASILIS, N.; PSICHOGIOU, M.; POULAKOU, G. Skin manifestations of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Curr Opin Infect Dis.** v. 34, n. 2, p. 72-79, 2021. doi: 10.1097/QCO.0000000000000717.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **J Fungi (Basel).** v. 7, n. 2, p. 79, 2021. doi: 10.3390/jof7020079.

TEIXEIRA, G.; ONDINA, S.; CRUZ, A.B.; BRESOLIN, T.M.B. Ozonized oils: a review of its quality control, stability and effectiveness in the treatment of *Acne vulgaris*. **Drug Analytical Research.** v. 5, n. 1, p. 3-13, 2021. doi: 10.22456/2527-2616.113278.

THEELEN, B.; CAFARCHIA, C.; GAITANIS, G.; BASSUKAS, I.B.; BOEKHOUT, T.; DAWSON, T.L. Ecologia, fisiopatologia e tratamento de *Malassezia*. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S10-S25, April de 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx134>.

UEBELE, D.T.R.; SOTO, C.A.T.; GALVÃO, N.K.A.M.; TIM, C.R.; SOBRINHO, A.S.S.; PESSOA, R.S.; SANTOS, L. Ozonizing sunflower oil using Fourier-transform infrared spectroscopy for product characterization, **Vibrational Spectroscopy**, v. 123, p. 103460, November, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103460>.

UGAZIO, E.; TULLIO, V.; BINELLO, A.; TAGLIAPIETRA, S.; DOSIO, F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. **Molecules** v. 25, n. 2, p. 334, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25020334>

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; TÓTH, B.; FRISVAD, J.C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R.A. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 57, Pt 8, p. 1925-1932, 2007. doi:10.1099/ijs.0.65021-0.

VERALLO-ROWELL, V.M.; KATALBAS, S.S.; PANGASINAN, J.P. (2016). Natural (Mineral, Vegetable, Coconut, Essential) Oils and Contact Dermatitis. **Current Allergy and Asthma Reports** v. 16, n. 7, 51, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0630-9>

XUE, W.; MACLEOD, J.; BLAXLAND, J. The Use of Ozone Technology to Control Microorganism Growth, Enhance Food Safety and Extend Shelf Life: A Promising Food Decontamination Technology. **Foods** v. 12, n. 4, 814, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12040814>.

WU, D.C.; CHAN, W.W.; METELITSA, A.I.; FIORILLO, L.; LIN, A.N. Pseudomonas skin infection: clinical features, epidemiology, and management. **Am J Clin Dermatol**. v. 12, n. 3, p. 157-169, 2011. doi:10.2165/11539770-000000000-00000.

YARA-VARÓN, E.; LI, Y.; BALCELLS, M.; CANELA-GARAYOA, R.; FABIANO-TIXIER, A.S.; CHEMAT, F. Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and Formulation of Food and Natural Products. **Molecules**. v. 22, n. 9, p. 1474, 2017. doi: 10.3390/molecules22091474.

ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V.; GABBRIELLI, A.; CHIASSERINI, L.; BOCCI, V. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. **Lipids**. v. 43, n. 9, p. 877-886, 2008. doi: 10.1007/s11745-008-3218-x.

ZENG, J.; DOU, J.; GAO, L.; XIANG, Y.; HUANG, J.; DING, S.; CHEN, J.; ZENG, Q.; LUO, Z.; TAN, W.; LU, J. Topical ozone therapy restores microbiome diversity in atopic dermatitis. **International Immunopharmacology**, v. 80, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106191>.