



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-graduação – Mestrado em Química



**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE OZONÍDEOS A PARTIR DE ÓLEOS
VEGETAIS**

Nathália Rodrigues de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz
Co-orientador: Eduardo José de Arruda (UFGD)

Campo Grande – 2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-graduação – Mestrado em Química



SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE OZONIDEOS A PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS

Nathália Rodrigues de Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química – Nivel de Mestrado da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz
Co-orientador: Eduardo José de Arruda (UFGD)

Campo Grande - 2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



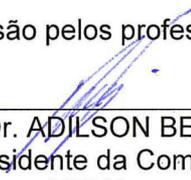
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE
NATHÁLIA RODRIGUES DE ALMEIDA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE OZONÍDEOS A PARTIR DE ÓLEOS
VEGETAIS**

Dissertação de Mestrado em Química submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado/PPGQ, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (**Resolução nº 4/2013**), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovada com revisão pelos professores doutores:



Prof. Dr. ADILSON BEATRIZ
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora
UFMS



Prof^ª. Dr^ª. ROSANGELA DA SILVA LAURENTIZ
UNESP



Prof^ª. Dr^ª. FELÍCIA MEGUMI ITO
UFMS

Campo Grande, 11 de março de 2013

Unidade XI – Curso de Química - CCET
Cidade Universitária, s/n - Caixa Postal 549 - Fone: 067xx 3345-7009 - Fax 067xx 3345-3552
79070-900 - Campo Grande (MS)
<http://www.ufms.br> - <http://www.pgquimica.dqi.ufms.br>
e-mail: mstrquim@nin.ufms.br

“Um dia descobri que voar alto não é apenas importante, é fundamental !!!”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À Deus, por caminhar sempre ao meu lado.

Ao meu filho Arthur, pelo amor, carinho e pelos momentos alegres e à minha mãe Dora, por todo amor, companheirismo e dedicação.

Aos meus familiares, especialmente ao meu pai Paulo, a minha avó Maria, aos meus tios Doli e Jane, e as primas Andressa, Daliana, Maria José e Camila pelo carinho e presença constante em minha vida.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Adilson Beatriz, pela paciência, apoio, dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Eduardo José de Arruda, pela co-orientação, incentivo e conhecimentos transmitidos desde a graduação.

À todos os professores da UFMS que colaboraram para minha formação, Dr. Denis Pires de Lima, Dra. Fernanda Rodrigues Garcez e Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni.

Aos professores da banca examinadora, que gentilmente aceitaram o convite contribuindo com este trabalho.

Aos pesquisadores, do Sintmol Lp4 pelo companheirismo.

À Paola, aluna de iniciação científica, por todo o empenho e dedicação durante a realização do trabalho.

Às amigas, Tatiana, Suély, Ozildéia, Felícia e Ana Camila, pelo companheirismo, pelas horas de estudo e por todos os momentos alegres compartilhados... Com vocês, tudo ficou melhor!!!!

Ao prof. Dr. Lincoln C. S. de Oliveira pelas análises de TG e DSC.

À farmacêutica Nádia C. P. Carvalho (NHU/ UFMS) pela colaboração durante a realização dos ensaios biológicos.

Um agradecimento especial à médica Daliana Santos, que foi fundamental para o início deste trabalho e à Biomédica Eliana B. Borges pelo auxílio e informações repassadas.

Aos técnicos Edilene, Luciana e Luiz Leonardo pelos espectros de RMN e IV.

Aos Secretários da Pós Graduação, Celestino e Ademar por estarem sempre disposto a ajudar.

À PROPP – UFMS, À FUNDECT pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa concedida.

Muito Obrigado a todos que colaboraram para a realização deste trabalho!!!

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Feridas crônicas e úlceras de pele	2
1.2. Os ácidos graxos e os óleos vegetais	5
1.3. Ozônio	11
1.4. Óleos ozonizados	14
2. Objetivos	19
3. Discussão de Resultados	20
3.1. Reações de ozonólise em óleos vegetais	20
3.1.1. Óleo de girassol	21
3.1.2. Óleos de linhaça e baru	28
3.2. Caracterização dos óleos ozonizados	31
3.2.1. Índice de Acidez (IA)	31
3.2.2. Índice de Iodo (II)	32
3.2.3. Índice de Peróxido (IP)	33
3.3. Reação de Ozonólise em óleos vegetais e água - formação de Óleogel (INPI: BR1020130001937)	39
3.3.1. Análise térmica	43
3.4. Atividade Antimicrobiana	46
4. Procedimento Experimental	49
4.1. Materiais e Equipamentos utilizados	49
4.2. Reações de ozonólise	50
4.2.1. Reação de ozonólise em óleos vegetais para obtenção de óleos ozonizados	50
4.2.2. Reação de ozonólise em óleo vegetal e água para obtenção de oleogel	51
4.3. Técnicas Analíticas	52
4.3.1. Índice de acidez	52
4.3.2. Índice de iodo	52
4.3.3. Índice de peróxido – óleos ozonizados	53
4.3.4. Índice de peróxido – oleogel	54
4.4. Ensaio de atividade biológica	55

4.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana	55
4.4.2. Cepas bacterianas	55
4.4.3. Preparação dos inóculos	55
4.4.4. Determinação do MIC – Método de diluição em Agar	55
5. Considerações Finais	57
6. Referências	59
7. Anexos	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Fórmula molecular e nomenclatura de alguns ácidos graxos	7
Tabela 2: Composição (%) de ácidos graxos em diferentes óleos vegetais	8
Tabela 3: Valores de Índice de Acidez (mg KOH g^{-1}) para os óleos puros e após diferentes tempos de reação	31
Tabela 4: Valores de Índice de Iodo ($\text{g de iodeto } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) para os óleos puros e após diferentes tempos de reação	33
Tabela 5: Valores de Índice de peróxido em (mEq Kg^{-1}), para os óleos puros	35
Tabela 6: Valores de Índice de peróxido em (mEq Kg^{-1}), para os óleos ozonizados.	36
Tabela 7: Valores índices de iodo, acidez e peróxido expressos em média da triplicata \pm desvio padrão para o produto gelificado	42
Tabela 8: Valores de MIC para os óleos ozonizados e oleogel frente a 6 cepas bacterianas	48
Tabela 9: Determinação do índice de peróxido.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sítios para modificação química na molécula de triaciglicerol - grupos carbonila (C=O) e das cadeias insaturadas (C=C)	1
Figura 2: Estrutura química do ozônio	11
Figura 3: Formação do ozônio	12
Figura 4: Mecanismo de ação do ozônio em bactérias	14
Figura 5: Mecanismo da reação de ozonólise proposto por Criegee	15
Figura 6: Produtos da reação de ozonólise	20
Figura 7: Espectro de RMN de ^1H do óleo de girassol	21
Figura 8: Espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 do óleo de girassol	22
Figura 9: Ozonídeos formados na reação de ozonólise e deslocamentos químicos dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H .	23
Figura 10: Espectro de RMN de ^1H do óleo de girassol ozonizado por 24 h	24
Figura 11: Aldeídos: nonanal 7 , hexanal 8 e 1,3 propanodial 9	24
Figura 12: Expansões dos espectros das regiões entre 1,5 - 6,0 ppm para óleo de girassol ozonizado em diferentes tempos	26
Figura 13: Estrutura química do ozonídeo formado na reação de 1 equivalente de ozônio com o linoleato de glicerila	27
Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de girassol ozonizado por 24 h	27
Figura 15: Ozonídeos formados a partir do grupo acila linolênico	28
Figura 16: Espectros de RMN ^1H para óleos vegetais ozonizados por 12 h	29
Figura 17: Espectro de RMN ^1H e ^{13}C do óleo de linhaça ozonizado por 24 h	30
Figura 18: Mecanismo da reação de oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos (SANTROCK <i>et al</i> , 1992).	32
Figura 19: Reações químicas para determinação do índice de peróxido	34
Figura 20: Liberação de iodo a partir de moléculas de oxigênio do ar	38
Figura 21: Formação de α -hidroxi-hidroperóxidos e aldeídos	39
Figura 22: Espectro de IV do óleo de girassol ozonizado por 24 h	40
Figura 23: Espectro de IV do óleo de girassol ozonizado em presença de	40

água por 24 h

Figura 24: Espectro de RMN de ^1H óleo de girassol ozonizado em presença de água por 24 h 41

Figura 25: Curvas TG/DTG do óleo de girassol ozonizado por 24 h, em atmosfera de N_2 . 43

Figura 26: Curvas TG/DTG do produto gelificado, em atmosfera de N_2 . 44

Figura 27: Curvas TG/DTG do produto gelificado, em atmosfera de ar sintético. 44

Figura 28: Curva DSC do produto gelificado entre - 80 a 100 °C 45

Figura 29: Produção ozônio para reação de ozonólise em óleos vegetais 46

Figura 30: Dispersão de bolhas da mistura de gases oxigênio/ozônio em óleos vegetais 48

ÍNDICE DE ESPECTROS

ANEXO 1

E1- Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol, em CDCl_3 .	69
E2- Espectro de RMN ^{13}C do óleo de girassol, em CDCl_3 .	69
E3: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 6 em CDCl_3 .	70
E4: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 12 h, em CDCl_3 .	70
E5: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 24 h, em CDCl_3 .	71
E6: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de girassol ozonizado por 24 h, em CDCl_3 .	71
E7: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 36 h, em CDCl_3 .	72
E8: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça em CDCl_3 .	72
E9: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de linhaça, em CDCl_3 .	73
E10: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 6 h, em CDCl_3 .	73
E11: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 12 h, em CDCl_3 .	74
E12: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 24 h, em CDCl_3 .	74
E13: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de linhaça ozonizado por 24 h, em CDCl_3 .	75
E14: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru, em CDCl_3 .	75
E15: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de baru, em CDCl_3 .	76
E16: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru ozonizado por 6 h, em CDCl_3 .	76
E17: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru ozonizado por 12 h, em CDCl_3 .	77
E18: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru ozonizado por 24 h, em CDCl_3 .	77
E19: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de baru ozonizado por 24 h, em CDCl_3 .	78

E20: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru ozonizado por 36 h, em CDCl_3 .	78
E21: Espectro de IV do óleo de girassol	79
E22: Espectro de IV do óleo de girassol ozonizado por 24 h	79
E23: Espectro de IV do produto gelificado	80
E24: Espectro de RMN ^1H do produto gelificado, em CDCl_3	80
E25: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 12 h após 24 h de reação com iodeto de potássio	81
E26: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 6 h após 24 h de reação com iodeto de potássio	81
E27: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru ozonizado por 6 h após 24 h de reação com iodeto de potássio.	82
E28: Espectro de RMN ^1H do oleogel após índice de peróxido.	82

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau celsius
AA	Ácido Araquidônico
AGE	Ácidos graxos essenciais
A.O.C.S	American Oil Chemists' Society
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
CFU	Unidade Formadoras de Colônia
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
DHA	Ácido decosapentanóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
EPA	Ácido eicosapentanóico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Índice de Acidez
II	Índice de Iodo
IP	Índice de Peróxido
IV	Infra Vermelho
KI	Iodeto de Potássio
KOH	Hidróxido de potássio
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mEq	Miliequivalentes
MHz	Megahertz
MIC	Concentração Mínima Inibitória
N ₂	Gás Nitrogênio
O ₃	Gás Ozônio
ppm	Partes por milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RNA	Ácido Ribonucléico
TGs	Triacilgliceróis

TGA	Termogravimetria
TMS	Tetrametilsilano

RESUMO

Os óleos de girassol, linhaça e baru foram escolhidos como material de partida para a obtenção de ozonídeos, através de reações de ozonólise. Os ozonídeos e os compostos peróxidicos formados nas reações de ozonólise em óleos vegetais são responsáveis pela atividade antimicrobiana e propriedades de regeneração e reparo do tecido, apresentando um grande interesse farmacêutico para o tratamento de patologias dermatológicas, como infecções de pele, úlceras e feridas crônicas. Na reação de ozonólise realizada em presença de água, pode-se obter um oleogel, transparente e viscoso (BR1020130001937, patente depositada em 28/12/2012). Os óleos vegetais ozonizados e o oleogel foram caracterizados através de técnicas analíticas como índices de acidez (IA), iodo (II) e peróxido (IP), incluindo estudos de análise térmica. Os produtos foram testados sobre 6 cepas bacterianas, incluindo cepas clínicas resistentes isoladas no Hospital Universitário - UFMS. O oleogel em especial, mostrou atividade sobre os microorganismos testados, incluindo as cepas clínicas resistentes, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

Palavras chaves: Ozonídeos, óleos ozonizados, reação de ozonólise e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The oils of sunflower, linseed and baru were chosen as starting material to obtain ozonides via ozonolysis reactions. The ozonides and the compounds peroxidic formed in the ozonolysis reactions of vegetable oils are responsible for antimicrobial activity and properties of regeneration and tissue repair, with a great pharmaceutical interest for the treatment of dermatological diseases such as skin infections, ulcers and chronic wounds. In the ozonolysis reaction carried out in the presence of water, was obtained an oleogel, transparent and viscous (BR1020130001937, patent filed on 28/12/2012). The ozonized vegetable oil and oleogel were characterized by analytic techniques such as acidity (AI), iodine (II) and peroxide (IP) values, including thermal analysis studies. The products were tested on six strains of bacteria, including resistant clinical strains isolated at the University Hospital - UFMS. The oleogel in particular, has shown activity against microorganisms tested, including clinical strains resistant *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*.

KeyWords: Ozonides, ozonated oils, ozonolysis reaction and antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos são moléculas encontradas naturalmente na forma esterificada com o glicerol. Estas moléculas são os principais constituintes dos óleos e gorduras. A exploração industrial dos óleos e gorduras, tanto para os alimentos e produtos oleoquímicos, baseia-se na modificação química dos grupos carbonila (C=O) e das cadeias insaturadas (C=C) presentes nos ácidos graxos (**Figura 1**). A cadeia alquílica do ácido graxo é susceptível a oxidação nas ligações duplas carbono-carbono. A oxidação dessas ligações é utilizada para clivar cadeias alquílicas ou para introduzir funcionalidade adicional ao longo da cadeia (SHARIDI, 2005).

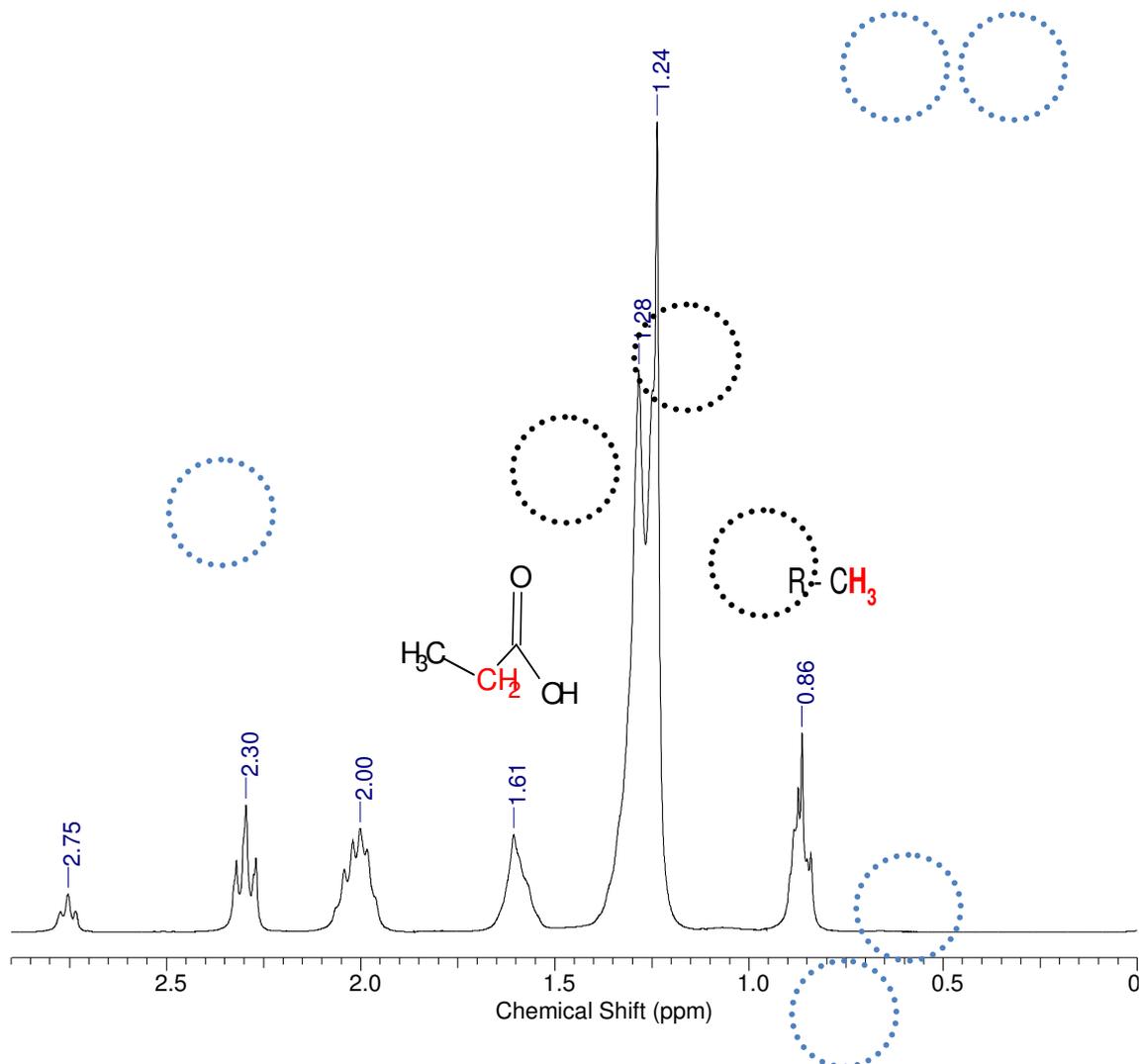


Figura 1: Sítios para modificação química na molécula de triacilglicerol - grupos carbonila (C=O) e das cadeias insaturadas (C=C).

Um importante exemplo que tem sido descrito na literatura envolve oxidação de ligações duplas utilizando reações de ozonólise, um método muito efetivo, no qual o ozônio reage completamente com o material de partida (PRYDE, 1960).

Os produtos da reação de ozonólise podem ou não conter oxigênio ativo, ou seja, grupos funcionais peroxídicos no qual são capazes de oxidar o íon iodeto a iodo (BAILEY, 1978). O ozônio reage com as ligações duplas dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, formando ozonídeos e compostos peroxídicos responsáveis pela atividade antimicrobiana e propriedades estimulantes de regeneração e reparo do tecido (ZANARDI *et al.*, 2008).

As propriedades antimicrobianas de derivados do ozônio como os óleos vegetais ozonizados representam grande interesse farmacêutico para o tratamento de patologias dermatológicas, como infecções de pele, úlceras, feridas crônicas, entre outras (VALACCHI *et al.*, 2005).

A pele é o maior órgão do corpo, indispensável para a vida humana e fundamental para o perfeito funcionamento fisiológico do organismo. Como qualquer outro órgão, fatores patológicos podem causar o desenvolvimento de alterações na sua constituição como, por exemplo, as úlceras de pele, podendo levar à sua incapacidade funcional (MORAIS *et al.*, 2008).

1.1. Feridas crônicas e úlceras de pele

Acredita-se que cerca de 3% da população brasileira é portadora de feridas crônicas nos membros inferiores e que aproximadamente 4 milhões de pessoas sejam portadoras de lesões crônicas ou tenham algum tipo de complicação no processo de cicatrização (OLIVEIRA, 2007; MANDELBAUM *et al.*, 2003 b). No Brasil, as feridas acometem grande parte da população, constituindo assim, um sério problema de saúde pública. Embora sejam escassos os registros de atendimentos a pacientes portadores de feridas, o elevado número de portadores contribui para onerar o gasto público, além de interferir na qualidade de vida da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

As feridas comprometem a qualidade de vida de seus portadores, podendo ocasionar dor, inclusive severa e contínua, odor, dificuldade ou

incapacidade de locomoção, baixa autoestima, nervosismo, medo, depressão, isolamento social, dependência física, alteração da autoimagem, entre outras (OLIVEIRA, 2007).

De acordo com a sua duração, podem ser classificadas em crônicas, agudas e pós-operatórias. As feridas crônicas são de longa duração ou de recorrência frequente, como úlceras por pressão e úlceras venosas e arteriais. As feridas agudas são as do tipo traumáticas, como cortes, abrasões, queimaduras, entre outras. Essas lesões geralmente respondem rápido ao tratamento e cicatrizam sem complicações. As feridas pós-operatórias são causadas intencionalmente, podendo cicatrizar por primeira intenção, caso as bordas sejam mantidas próximas, ou por segunda intenção caso necessitem, por exemplo, de drenagem de material (OLIVEIRA, 2007).

As feridas podem ter diversas causas, como trauma (mecânico, físico e químico), intencional (cirurgias), isquemia (úlceras arterial de membros inferiores) e pressão (úlceras de decúbito) (MANDELBAUM *et al.*, 2003 a).

Entre os diversos tipos de lesões, as mais freqüentemente encontradas nos serviços da rede básica de saúde são as úlceras venosas, as arteriais, as hipertensivas, as de pressão e as neurotróficas, comuns em algumas patologias que acometem o sistema nervoso periférico, como a hanseníase, o alcoolismo e o diabetes *Mellitus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Cerca de 6% das internações hospitalares relacionadas aos diabéticos são em consequência de úlceras nos membros inferiores. A úlcera é uma das complicações mais devastadoras do Diabetes *Mellitus*, sendo responsável por 50 a 70% das amputações não traumáticas, além de concorrer por 50% das internações hospitalares (TOSCANO & MENGUE, 2004).

Os custos dos tratamentos de patologias relacionadas à deficiência no processo de cicatrização aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo de cicatrização (MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009).

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido lesado (MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009). Diferentes

classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento do processo. Alguns autores discorrem sobre cinco fases: coagulação, inflamação, reconstrução ou proliferação, epitelização e maturação ou remodelação (MANDELBAUM *et al.*, 2003 a).

A fase de coagulação inicia imediatamente após o surgimento da ferida, depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores decrescimento e proteases (MANDELBAUM *et al.*, 2003a).

Intimamente ligada à fase anterior, a fase inflamatória depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) responsáveis pela fagocitose das bactérias e os macrófagos (MANDELBAUM *et al.*, 2003 a). O macrófago é a principal célula do processo de reparo tecidual, responsável pela degradação e remoção de componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas (MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009). Além dessas funções, as células inflamatórias produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a fase proliferativa, fase em que os fibroblastos e células endoteliais também serão recrutados (SINGER & CLARK, 1999).

Dividida em três subfases, a proliferação é responsável pelo "fechamento" da lesão propriamente dita. A primeira das subfases da proliferação é a re-epitelização, onde ocorre a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009; SINGER & CLARK, 1999). Segundo Hinman & Maibach (1963) as feridas superficiais abertas e ressecadas re-epitelizam mais lentamente do que as ocluídas e, portanto, aumentam ou dificultam o processo de cicatrização.

A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação (elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as

glicosaminoglicanos e o colágeno). A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula produtora de colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (MANDELBAUM *et al.*, 2003a).

A última fase da proliferação é a angiogênese, etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes. Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e supre de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (FOLKMAN & SHING, 1992; MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009).

A epitelização constitui a etapa que levará ao fechamento superficial da ferida, por meio da multiplicação das células epiteliais da borda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A última das fases da cicatrização, a remodelação, dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema (MANDELBAUM *et al.*, 2003 a). Nessa fase do processo de cicatrização ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Essa fase é marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno (MENDONCA & COUTINHO-NETTO, 2009).

O surgimento de infecção é um dos principais fatores que influenciam o processo de cicatrização. A infecção prolonga o estágio inflamatório da cicatrização, pois as células precisam combater grande número de bactérias, além de inibir também a capacidade dos fibroblastos de produzir colágeno (MANDELBAUM *et al.*, 2003a).

1.2. Os ácidos graxos e os óleos vegetais

Os ácidos graxos podem ocorrer na natureza como substâncias livres ou esterificadas. A maior parte dos ácidos graxos naturais encontra-se esterificada no glicerol formando os triacilgliceróis (TGs), componentes dos óleos e gorduras. Os óleos são misturas relativamente complexas de TGs e,

são os lipídios mais amplamente distribuídos na natureza (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996).

Os óleos são insolúveis em água, solúveis em solventes orgânicos e líquidos à temperatura ambiente (20 °C), enquanto as gorduras são sólidas a mesma temperatura (GIOIELLE, 1996). Essa diferença entre óleos (líquidos) e gorduras (sólidas), à temperatura ambiente, reside na proporção de grupos acila saturados e insaturados presentes nas cadeias graxas dos TGs (SHARIDI, 2005).

Com raras exceções, os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos de cadeia alifática com número par de átomos de carbono. A maioria possui cadeias de 4 a 22 carbonos, sendo a cadeia de 18 carbonos a mais comum. Os que ocorrem naturalmente partilham uma biossíntese em comum, onde a cadeia é construída a partir de unidade de acetato (2 átomos de carbono) e as ligações duplas *cis* são inseridas pela enzima *dessaturase* em posições específicas em relação ao grupo carbonila (SHARIDI, 2005).

Os ácidos graxos representam cerca de 95% da massa molecular dos TGs. As propriedades físicas, químicas e nutricionais dos óleos dependem da natureza, do número de átomos de carbono e posição dos grupos acila saturados e insaturados presentes na molécula do TGs (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996).

Nos ácidos graxos saturados, os átomos de carbono estão ligados entre si por ligações simples (ligações σ) e nos ácidos graxos insaturados por ligações simples e duplas (ligações π). Na maioria dos ácidos graxos insaturados, as ligações duplas estão localizadas na cadeia de forma não conjugada (sistema 1,4 diênico), frequentemente separadas por um grupo metileno (α -CH₂), apresentando configuração espacial do tipo *cis* = Z (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996).

A configuração *cis* pode ser convertida no isômero *trans* durante o processo de rancidez oxidativa e nas reações de hidrogenação catalítica na presença de níquel ou outro metal catalítico, geralmente empregada em processos de hidrogenação parcial. O aquecimento prolongado de óleos vegetais em temperaturas elevadas também induz a formação de isômeros dos

ácidos graxos polinsaturados (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1995; MOREIRA *et al.*, 2002).

No sistema de nomenclatura oficial da IUPAC, o número de átomos de carbono é indicado por um prefixo grego. Os ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico e behênico, possuem 12, 14, 16, 18, 20 e 22 átomos de carbonos, respectivamente e são designados pelos prefixos dodeca-, tetradeca-, hexadeca-, octadeca-, eicosa- e docosa-. Os ácidos graxos saturados têm sufixo *anóico*, e os insaturados tem sufixo *enóico*. A posição da ligação dupla na cadeia carbônica é definida por número arábico, atribuindo-se 1 ao carbono da carbonila. O ácido linoléico, é denominado oficialmente por ácido 9 (Z),12 (Z) -octadecadienóico (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996). A tabela 1 apresenta a fórmula molecular e a nomenclatura de alguns ácidos graxos saturados e insaturados.

Tabela 1: Fórmula molecular e nomenclatura de alguns ácidos graxos.

Símbolo ^(a)	Formula Molecular	Nome sistemático / comum
Ácidos Graxos Saturados		
12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	dodecanóico / Láurico
14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	tetradecanóico / Mirístico
16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	hexadecanóico / Palmítico
18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	octadecanóico / Esteárico
20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	eicosanóico / Araquídico
22:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	docosanóico / Behênico
Ácidos Graxos Insaturados		
18:1	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9(Z)-octadecenóico / Oléico
18:2	CH ₃ (CH ₂) ₇ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH	9(Z),12(Z)-octadecanodienóico / Linoléico
18:3	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH	9(Z),12(Z),15(Z)- octadecatrienóico/ Linolênico
20:4	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COOH	5(Z),8(Z),11(Z),14(Z) - icosatetraenóico / Araquidônico

(a) Número de átomos de carbono: número de ligações duplas

A estrutura de um ácido graxo pode também ser indicada mediante uma notação simplificada, na qual se escreve o número de átomos de carbono seguido de dois pontos e depois um número que indica quantas ligações duplas estão presentes na molécula. O linoléico, nesse caso, seria representado por 18:2 ou C18:2 (SHARIDI, 2005; VIANNI e BRAZ-FILHO, 1996).

A posição das ligações duplas pode ser indicada de várias formas: definindo a posição e a configuração, ou localizando as posições das ligações duplas relativas aos grupos metila e carbonila nas extremidades da cadeia. A posição da ligação dupla relativa ao grupo metila terminal pode ser representada por n-x ou ω -x, onde x é o número de átomos de carbono a partir do grupo metila. A posição da primeira ligação dupla a partir do grupo carbonila é designada Δ x (SHARIDI, 2005).

Os ácidos graxos mais abundantes na natureza possuem 16 ou 18 átomos de carbono, estão entre eles os ácidos palmítico, esteárico, linoléico e oléico. O ácido oléico constitui em alguns casos mais da metade da composição total de muitos óleos e gorduras (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1996). A tabela 2 apresenta a composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.

Tabela 2: Composição (%) de ácidos graxos em diferentes óleos vegetais.

	Composição em ácidos graxos (%)				
	Palmítico C16:0	Esteárico C18:0	Oléico C18:1	Linoléico C18:2	Linolênico C18:3
Oliva ^a	10	2	78	7	1
Baru ^d	7,6	5,4	50,4	28,0	---
Soja ^a	11	4	22	53	8
Milho ^a	13	3	31	52	1
Algodão ^a	27	2	18	51	< 1
Girassol ^b	5 - 8	2,5 – 7,0	13 - 40	40 - 74	< 0,3
Gergelim ^a	9	6	41	43	---
Linhaça ^c	6	6	18	15	53

(a) SHARIDI, 2005 (b) AOCS, 1997 (c) SHARMA & KUNDU, 2006 (d) TAKEMOTO *et al*, 2001.

Girassol (*Helianthus annuus* L.), uma das espécies de sementes oleaginosas mais antigas na América do Norte, pertence à família Asteraceae e ao gênero *Helianthus*. O óleo de girassol é caracterizado pela alta concentração de ácido linoléico (48-74%), seguida por ácido oléico (14-39%), sendo que a concentração de ácido linolênico é sempre baixa, em torno de 0,3 %. De acordo com o esperado para óleos com alta concentração de ácido linoléico, o principal triacilglicerol é a trilinoleína (36,3%), seguida pela dilinoleína (29,1%) e a trioleína praticamente inexistente (0,6%) (GUNSTONE, 1994)

De origem asiática, a linhaça (*Linum usitatissimum* L.), que pertence à família das Lináceas, é uma das herbáceas mais antigas da história da humanidade. Das sementes é extraído o óleo, que é muito utilizado nas indústrias alimentícias, de tinta e vernizes, além da indústria cosmética. Esse óleo constitui uma das maiores fontes de ácido linolênico (18:3) (35 – 60%) e linoléico (18:2) (14 - 29%) (GUNSTONE, 1994).

O óleo de linhaça possui uma baixa estabilidade oxidativa, tornando imprópria sua utilização como óleo comestível. No entanto a semente de linhaça é utilizada para melhorar o valor nutricional dos alimentos como fonte de ácido linolênico (ômega 3). Os ácidos linolênico e linoléico são precursores dos demais ácidos graxos da família ômega 3 (ω -3) e ômega 6 (ω -6), respectivamente, e conhecidos como essências, pelo fato do organismo humano não sintetiza-los, tornando-os indispensáveis, principalmente, pela ingestão de alimentos que os contém. O óleo possui coloração amarelo-dourado, marrom ou âmbar, e deve ser prensado a frio, pois a temperatura é uma variável determinante para acelerar o processo de oxidação (LOPES, 2009).

O baru (*Dipteryx alata* Vog.) é uma árvore do cerrado brasileiro pertencente à família Leguminosae. Sua distribuição é ampla no Brasil, abrangendo os estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso estendendo-se até a costa atlântica do Maranhão (SANO *et al*, 2004) Esta espécie produz frutos que contém uma amêndoa com sabor semelhante ao amendoim. O óleo extraído desta amêndoa possui em sua composição 50,4% de ácido oléico e 28,9% de ácido linoléico, sendo

assim, importante matéria-prima para as indústrias farmacêuticas e oleoquímicas (TAKEMOTO, 2001).

Os ácidos graxos apresentam três funções principais: são componentes estruturais das membranas biológicas; atuam como precursores de mensageiros intracelulares e são oxidados gerando energia, na forma de adenosina trifosfato (ATP). Existem diversos tipos de ácidos graxos, mas se tratando de tratamento de feridas, o ácido linoléico e o ácido linolênico são os mais importantes, pois não são sintetizados pelos mamíferos, sendo assim chamados de ácidos graxos essenciais (AGE) (FERREIRA *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos essenciais, o linoléico (ω -6 ou n-6) e linolênico (ω -3 ou n-3) são de extrema importância para funções celulares normais, e atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa como os ácidos araquidônicos (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA), que fazem parte de numerosas funções celulares como a manutenção da integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana e síntese de eicosanóides como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (MOREIRA *et al.*, 2002). Essas moléculas são importantes no processo de cicatrização de feridas, eles possuem capacidade de modificar reações inflamatórias e imunológicas, alterando funções leucocitárias e acelerando o processo de granulação tecidual (MANHEZI *et al.*, 2008).

O ácido linoléico exerce um importante papel quimiotático para macrófagos, sendo fundamental na expressão de componentes do sistema fibrinolítico (regulação da produção de collagenase); favorece o desbridamento autolítico no leito da ferida por contribuir com a produção de metaloproteínas, induzindo a granulação e podendo acelerar o processo de cicatrização. Estudos demonstram que o ácido linoléico é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, alterando as sínteses de proteínas, parede celular, ácidos nucléicos e membranas celulares durante a divisão (GREENWAY & DIKE, 1979; MANDELBAUM *et al.*, 2003 b).

O ácido linolênico é importante no transporte de gorduras, favorece a manutenção da integridade da barreira de permeabilidade epidérmica e acelera os processos cicatriciais. Age como importante agente restaurador tecidual por

promover quimiotaxia e angiogênese, pela manutenção do meio úmido e aceleração do processo de granulação tecidual, ainda, protege a pele contra infecções por *Staphylococcus aureus* e proporciona a nutrição celular local (MANDELBAUM *et al.*, 2003 b; FERREIRA *et al.*, 2012)

1.3. Ozônio

O ozônio é uma molécula simétrica, possui um átomo de oxigênio na posição central com carga parcial positiva e dois átomos de oxigênio terminais com cargas parciais negativas (CLAYDEN, 2007). A Figura 2 apresenta as estruturas de ressonância da molécula do ozônio.

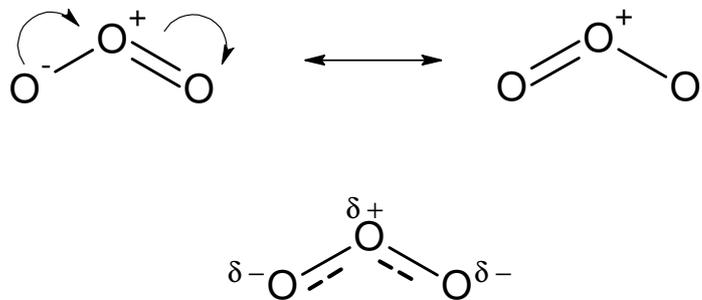


Figura 2: Estrutura química do ozônio.

O ozônio é cerca de cinquenta por cento mais denso que o oxigênio, apresenta-se como um gás incolor e de odor pungente, tem massa molecular igual a 48 u.m.a, liquefaz-se a -112°C e possui ponto de congelamento de $-251,4^{\circ}\text{C}$ (CHIATONNE *et al.*, 2008). O ozônio possui um alto poder de oxidação, ($E^{\circ}=2,08\text{ V}$) quando comparado a outros agentes oxidantes como, por exemplo, H_2O_2 ($E^{\circ}= 1,78\text{V}$), permitindo que a molécula possa reagir com uma numerosa classe de compostos (KUNZ *et al.*, 2002).

A molécula do ozônio age como um dipolo, com propriedades eletrofílica e nucleofílica. O ozônio pode reagir com compostos orgânicos via oxidação direta ou com compostos inorgânicos em solução aquosa, onde o ozônio se decompõe em água a radical hidroxila (KUNZ *et al.*, 2002; KHADRE *et al.*, 2001). As reações via oxidação direta com ozônio molecular são

seletivas reagindo apenas com compostos alifáticos insaturados e anéis aromáticos (KHADRE & YOUSEF, 2001).

Sua armazenagem é impedida pela sua baixa estabilidade, tornando necessária sua geração *in situ*. Através de descargas elétricas o oxigênio é dissociado, sendo a formação do ozônio (Figura 3) consequência da recombinação de espécies radicalares de oxigênio com moléculas de oxigênio presentes no sistema (KUNZ *et al.*, 1998).

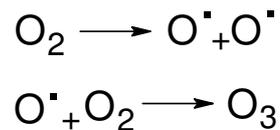


Figura 3: Formação do ozônio

Desde a sua descoberta, esse gás despertou grande interesse, sendo atualmente empregado para as mais diversas finalidades. O ozônio (O₃) é um poderoso agente antimicrobiano, com grande potencial de aplicação na indústria, principalmente alimentícia. A alta reatividade, penetrabilidade, decomposição espontânea em produtos não tóxicos, como o oxigênio molecular (O₂), por exemplo, faz do ozônio um desinfetante viável (KIM *et al.*, 2009). O ozônio está sendo utilizado no tratamento de água residual para reuso, no tratamento de efluentes, como agente branqueador de compostos orgânicos, na desodorização de ambientes, em lavanderias hospitalares reduzindo os custos em energia para esterilização, na odontologia e na medicina, sendo sua prática conhecida como Ozonioterapia (CHIATONNE *et al.*, 2008; BOCCI *et al.*, 2009).

A Ozonioterapia é uma técnica médica, reconhecida em vários países do mundo (Alemanha, Itália, França, Portugal, Espanha, Cuba, Estados Unidos, Rússia, China e Japão) que utiliza o ozônio diluído em corrente de oxigênio puro (O₃/O₂) como agente terapêutico em grande número de patologias. É considerada uma terapia natural, com poucas contra indicações e de efeitos secundários mínimos, se for corretamente realizada (BOCCI, 2005).

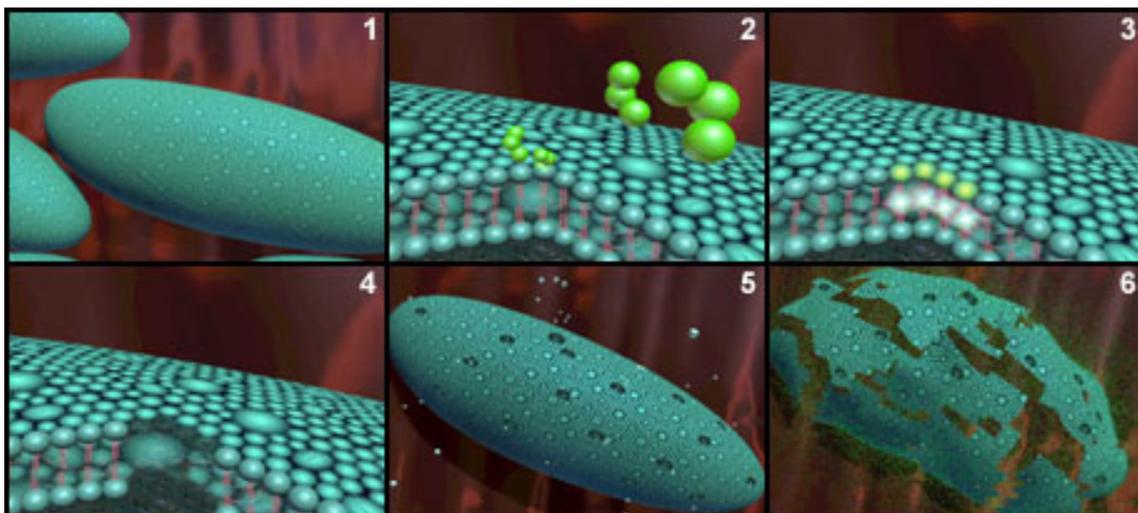
O médico alemão Christian Friedrich Schönbein, durante a Primeira Guerra Mundial, difundiu o ozônio no tratamento de feridas em soldados

alemães, obtendo excelentes resultados no controle de infecções, gangrenas e cicatrizações de feridas infectadas por *Clostridium* (BOCCI *et al.*, 2009).

O efeito antimicrobiano do ozônio tem sido estudado com uma ampla variedade de microorganismos, como bactérias gram-positivas e negativas, esporos e células vegetativas (FETNER& INGOLS, 1956; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004; CHIATONNE *et al.*, 2008). Sendo mais efetivo contra células vegetativas de bactérias do que em esporos ou fungos. Entre as bactérias, as gram negativas são mais sensíveis ao ozônio do que as gram positivas (KHADRI *et al.*, 2001). A parede celular das bactérias gram positivas é constituída por muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida, em contraste, as paredes celulares de gram negativas contêm somente uma camada fina de peptidoglicana (TORTORA *et al.*, 2005). Segundo Perez *et al.*, 1995, a N-acetil glucosamina, presente na peptidoglicana, foi resistente à ação do ozônio, em solução aquosa a pH 3 a 7. O que pode explicar, pelo menos em parte, a maior resistência de bactérias gram-positivas em relação às gram-negativas.

O mecanismo de ação do ozônio para inativação das bactérias é um processo complexo, pois o ozônio oxida vários constituintes celulares como proteínas, lipídios insaturados e enzimas da membrana celular; peptoglicanos da parede celular, enzima e ácidos nucleicos do citoplasma; além de proteínas e peptoglicanos da capa dos esporos bacterianos e capsídeos virais (KHADRE & YOUSEF, 2001).

O que diferencia o ozônio de outros agentes biocidas é seu mecanismo de destruição dos microorganismos (Figura 4). Especificamente, o cloro, atua por difusão através da parede celular, agindo sobre os elementos vitais localizados no interior da célula, como enzimas, proteínas, DNA e RNA. O ozônio, por sua vez, age diretamente na parede da célula, causando sua ruptura e morte em menor tempo de contato, inviabilizando a recuperação dos microrganismos após oxidação (SNATURAL TECNOLOGIAS AMBIENTAIS LTDA, 2011).



Fonte: <http://www.snatural.com.br/Tratamento-Agua-Ozonio.html>

Figura 4: Mecanismo de ação do ozônio em bactérias. **1-** Bactéria; **2-** Parede celular da bactéria sendo atacada pelo Ozônio; **3-** Oxidação da parede celular; **4, 5 e 6-** Ruptura e destruição da bactéria.

O gás ozônio pode afetar o sistema respiratório e causar sintomas de toxicidade, como dor de cabeça, tontura, sensação de queimação na região dos olhos, irritação da garganta e tosse. No entanto, o ozônio é tóxico para o sistema pulmonar durante inalação prolongada na concentração de 0.0002 $\mu\text{g/mL}$ (0.2 ppm) (BOCCI *et al.*, 2009; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2004). Um indivíduo pode detectar o cheiro característico do ozônio em concentrações 0,01 a 0,05ppm (CHIATONNE *et al.*, 2008).

1.4. Óleos ozonizados

O ozônio reage com as ligações duplas dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais formando em especial os ozonídeos (anéis 1,2,4-trioxolanos) e espécies peroxídicas como hidroperóxidos, peróxidos de hidrogênio, peróxidos poliméricos e outros peróxidos orgânicos (BAILEY, 1978; ZANARDI *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2012).

A reação de ozonólise é uma das reações mais limpas e reprodutíveis e tem sido muito utilizada na academia e na indústria. Isto se deve à facilidade com que o ozônio oxida as ligações insaturadas (duplas e triplas). Criegee dedicou sua atenção ao estudo dos produtos oxigenados provenientes da

reação da ozonólise e em 1975 propôs o mecanismo da reação (Figura 5) (CRIEGEE, 1975).

A etapa inicial da reação ocorre via cicloadição 1,3 dipolar do ozônio ($4s + 2s$) à olefina, formando o malozonídeo, chamado também de intermediário de Criegee **1**. O malozonídeo **1** é muito instável, possui duas ligações simples O-O, fraca e fácil de ser quebrada, pois possui energia de ligação 140 KJ mol^{-1} (CLAYDEN, 2007).

O intermediário **1** se decompõe por uma cicloadição 1,3 dipolar *reversa*, formando o *zwitterion* **2** e um composto carbonílico **3**. Na presença de um solvente reativo, o *zwitterion* interage com o solvente para formar hidroperóxidos **4** em alto rendimento, desde que a concentração do solvente exceda qualquer outra substância na qual o *zwitterion* possa reagir. Na presença de um solvente inerte, o *zwitterion* **2** reage com o composto carbonílico **3** para formar anéis 1,2,4 trioxolanos ou ozonídeos **5** como produto principal e ozonídeos poliméricos, se o composto carbonílico for um aldeído. Se o composto carbonílico for uma cetona, menos susceptível ao ataque nucleofílico, o *zwitterion* **2** pode dimerizar-se formando o composto **6** ou polimerizar-se, levando a peróxidos poliméricos (CRIEGEE, 1975; BAILEY, 1978).

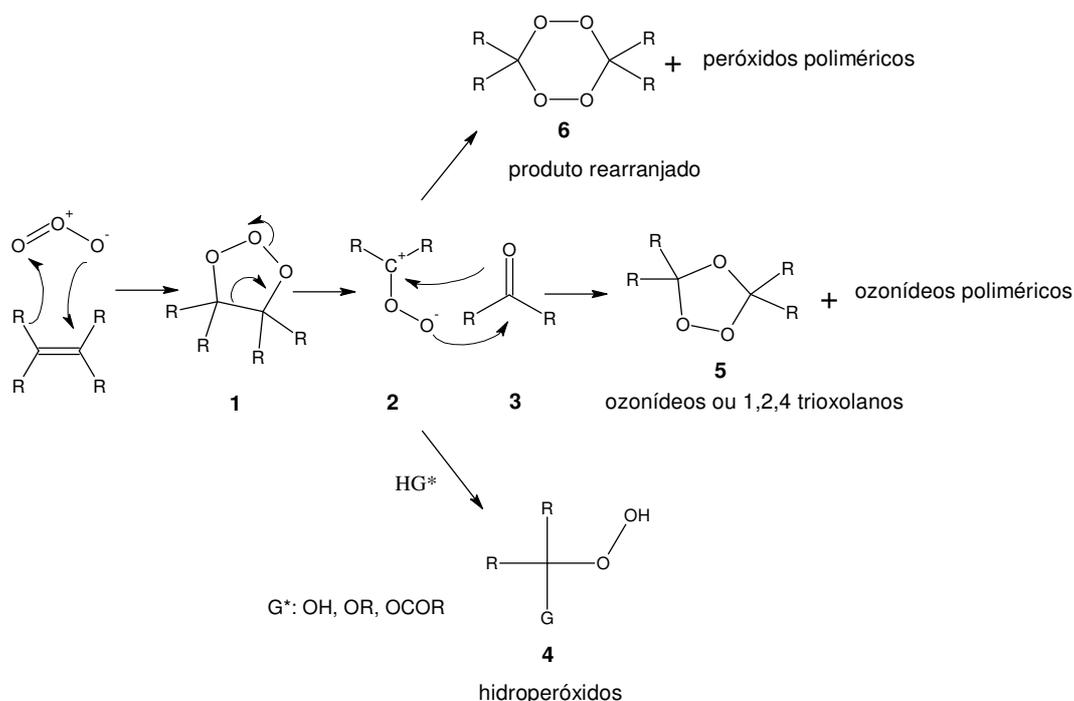


Figura 5: Mecanismo da reação de ozonólise proposto por Criegee.

As reações químicas do ozônio quando borbulhado em um óleo são muito complexas. As análises dessas reações informam as mudanças nos grupos funcionais que ocorrem no óleo durante a ozonização, bem como a identificação dos produtos sem anteriores técnicas de separação (ZANARDI *et al.*, 2008).

O entendimento das propriedades físico-químicas dos óleos ozonizados é muito importante para sua caracterização. Técnicas analíticas, como os índices de peróxido iodo e acidez, são geralmente utilizados para determinar a qualidade dos óleos vegetais e dos produtos ozonizados (ZANARDI *et al.*, 2008; BOCCI, 2006; MIRABAL *et al.*, 2003).

Ao contrario de sua instabilidade, a molécula do ozônio pode ser estabilizada como ozonideo após a reação na cadeia de ácidos graxos insaturados, se mostrando ideal para o tratamento de feridas crônicas infectadas (BOCCI, 2002). Os óleos ozonizados, com concentração de peróxido bem definida são utilizados topicamente para o tratamento de feridas, infecções anaeróbias, herpes, úlceras, queimaduras, infecções causadas por fungos e úlceras de decúbito (BOCCI, 2005; VELACCHI *et al.*, 2005).

A literatura científica relata que os óleos ozonizados e o ozônio são produtos eficazes no tratamento de feridas e na cicatrização de lesões de difícil tratamento em pacientes que não tiveram sucesso por utilização de tratamentos tradicionais e medicamentos convencionais que estão disponíveis no mercado (MARTINEZ - SANCHEZ *et al.*, 2012).

O óleo de girassol ozonizado (OLEOZON[®]), desenvolvido pelo Centro Nacional de Investigações Científicas em Cuba foi o primeiro óleo vegetal ozonizado registrado como medicamento com finalidades terapêuticas para uso tópico e oral. Ensaio toxicológicos *in vivo* mostraram que o OLEOZON[®], com índice de peróxido de 506 mg/ml apresentou IC₅₀ > 2000 mg/kg de peso corporal e a aplicação dérmica com dose única de 2000 mg/kg em ratas, não produziu letalidade e os resultados dos testes bioquímicos indicaram que não ocorrem eventos tóxicos a nível sistêmico (SANCHEZ *et al.*, 1997; PÉREZ *et al.*, 2000).

Estudos em modelos de animais mostraram que após sete dias de tratamento com azeite de oliva ozonizado foi possível observar uma diminuição

significativa na área da ferida. As lâminas histológicas, coradas com corante tricromo de Masson, após sete dias revelaram aumento na intensidade da coloração das fibras de colágeno e fibroblastos nas bordas e no leito da ferida, em comparação com o grupo óleo. Os resultados indicaram que o óleo ozonizado age na síntese de colágeno e na proliferação de fibroblastos durante a formação do tecido de granulação, no recrutamento de células inflamatórias durante a fase da inflamação e remodelação precoce do tecido de cicatrização de feridas (KIM *et al.*, 2009).

As atividades biológicas dos produtos da reação de ozonólise são conhecidas há muito tempo. Patentes publicadas há aproximadamente 100 anos relatam o emprego terapêutico dos compostos oxigenados obtidos a partir da reação do ozônio com moléculas orgânicas. A patente US Pat. N.º.925,509, aceita em 1909, relata a produção de um novo medicamento para doenças do sangue e do trato respiratório, a invenção consiste no contato de um agente oxidante, o ozônio, com o hidrocarboneto de um grupo terpênico na ausência de água, o produto resultante é administrado na forma de inalação (NEEL, 1909).

A primeira patente que relata o processo de ozonização de um óleo vegetal foi aceita em 1911 (TWOMBLY, 1911), de acordo com a invenção o óleo de coco foi ozonizado sem uso de solventes, a uma temperatura superior a 28 °C, até a saturação. O composto pode ser aplicado em tecido humano com finalidade terapêutica e profilática, principalmente no tratamento de infecções nasais.

O óleo de girassol ozonizado possui um amplo espectro antimicrobiano, com atividade inibitória e letal em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Fungos do gênero *Cândida* e protozoários como *Giardia lamblia* (DÍAZ *et al.*, 2006).

Considerando as propriedades antimicrobianas dos óleos vegetais ozonizados, a literatura de patentes relata a sua utilização para o tratamento de doenças infecciosas como: dermatites, acne, úlceras, escaras, queimaduras e outras lesões de pele (DEVILLEZ, 1984; DEVILLEZ, 1986; TWOMBLY, 1911; MOLAREDA, 2001); além do tratamento da asma (NEEL, 1909), uso como laxante e no tratamento infecções intestinais, contra microrganismos patógenos

do intestino (KNOX, 1917), úlceras gastroduodenais (MOLAREDA, 2001) e no tratamento da infecção por *Giardia lamblia* (MIRABAL, 2002). Recentemente foi descrito sua utilização para o tratamento de infecções provocadas por oxiúros, herpes simples genital, vírus do papiloma humano (HPV) e fungos, como exemplo encontra-se microrganismos do gênero *Cândida* (MIRABAL, 2003).

Devido à eficácia no tratamento de feridas, úlceras e lesões de pele, os óleos vegetais ozonizados despertaram interesse no grupo de pesquisadores do Laboratório de Síntese e Transformações de Moléculas Orgânicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Sintmol-UFMS).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Sintetizar ozonídeos a partir de óleos vegetais de diferentes composições de ácidos graxos insaturados, com aproveitamento do potencial em produção de óleos do Estado de Mato Grosso do Sul;
- Caracterizar os produtos obtidos a partir das reações de ozonólise, incluindo estudos de estabilidade térmica.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos ozonizados produzidos frente a diversos patógenos.

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Reações de ozonólise em óleos vegetais

Dentre os óleos vegetais, os óleos de girassol, linhaça e baru foram escolhidos como material de partida para as reações de ozonólise neste trabalho, visando à obtenção de ozonídeos a partir de diferentes cadeias graxas insaturadas. Esses óleos podem ser caracterizados pela alta concentração de ácido linoléico, linolênico e oléico (Tabela 2, página 8) (GUNSTONE *et al*, 1994; TAKEMOTO *et al*, 2001).

A ozonólise do óleo de girassol é bem descrita na literatura (DÍAZ *et al*, 2006 a; DÍAZ *et al* 2006 b; DÍAZ *et al*, 2005; SORIANO *et al*, 2003 a e b; TELLEZ *et al*, 2006) e alguns produtos obtidos já foram patenteados (MIRABAL, 2003), sendo importante ressaltar que não foram encontrados trabalhos na literatura referente à ozonólise de óleos de linhaça e baru.

As reações de ozonólise foram realizadas em óleos de girassol refinado e óleos de linhaça e baru obtidos por prensagem a frio com diferentes tempos reacionais; 6, 12, 24 e 36 horas. Os óleos ozonizados foram caracterizados através de análise espectroscópica de IV e RMN de ^1H e ^{13}C .

De acordo com o mecanismo proposto por Criegee (Figura 6), o ozônio reage com as ligações duplas presentes nos grupos acila insaturados formando compostos oxigenados, como ozonídeos (1,2,4-trioxolanos) ou α -hidróxi-hidroperóxidos, para as reações realizadas em presença de solvente como a água.

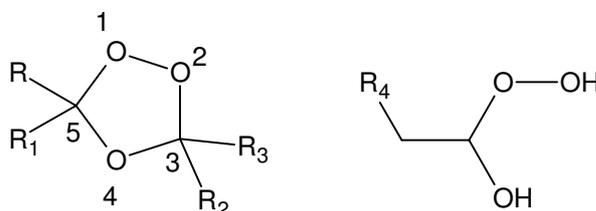


Figura 6: Produtos da reação de ozonólise

3.1.1. Óleo de girassol

No espectro de RMN de ^1H obtido do óleo de girassol antes da reação de ozonólise (Figura 7), os sinais dos prótons olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) foram observados na região entre 5,20 – 5,39 ppm. Os sinais em 2,00 ppm e 2,74 ppm correspondem aos prótons dos grupo metileno α a ligação dupla ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) e do grupo metileno entre as ligações duplas ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$), respectivamente. Os duplos dubletos em 4,10 e 4,26 ppm são atribuídos aos hidrogênios do grupos metileno nas posições *sn*-1 e 3 da porção glicerol, esses sinais permanecem nos espectros do óleo ozonizado, indicando que não ocorrem mudanças na porção glicerol durante a reação de ozonólise

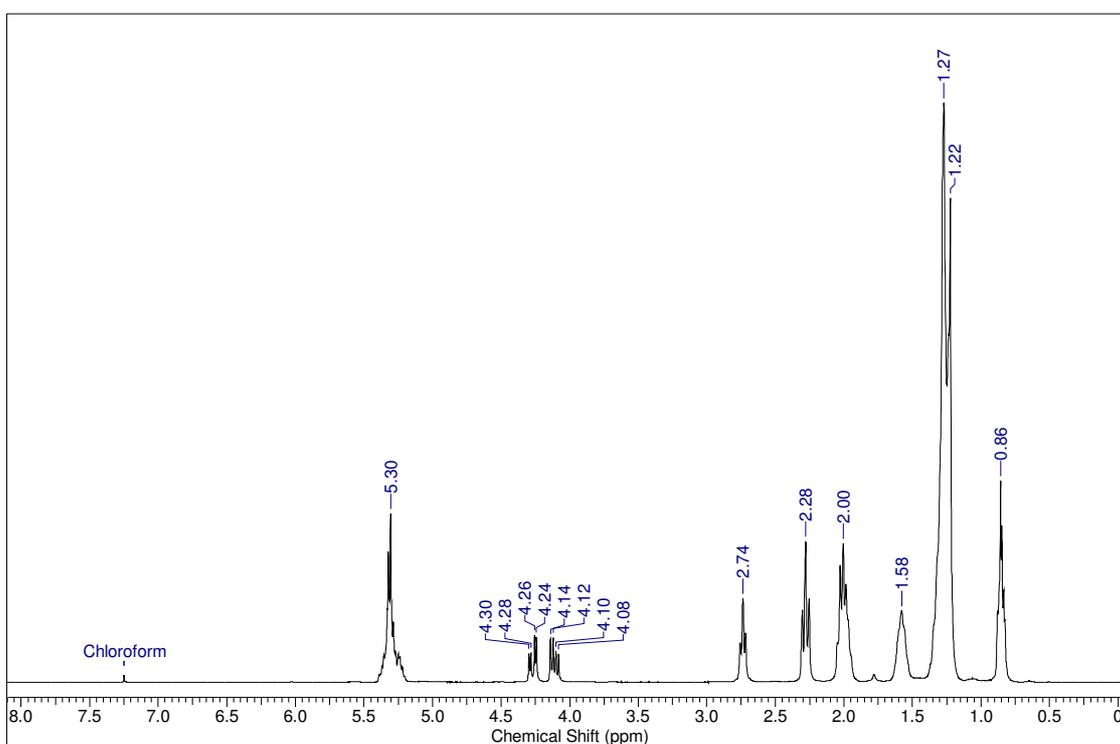


Figura 7: Espectro de RMN de ^1H do óleo de girassol.

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 8) apresenta dois sinais ($\delta = 172$ ppm e $\delta = 173$ ppm) referentes a carbonos carbonílicos de ésteres; já os carbonos sp^2 correspondentes às insaturações dos ácidos graxos foram identificados como sendo os sinais entre 127 e 130 ppm. Os sinais em 62 e 68 ppm referem-se aos carbonos ligados ao oxigênio da porção glicerol, CH_2 e CH

respectivamente, e os sinais entre 34 e 22 ppm referem-se aos demais carbonos presentes na estrutura.

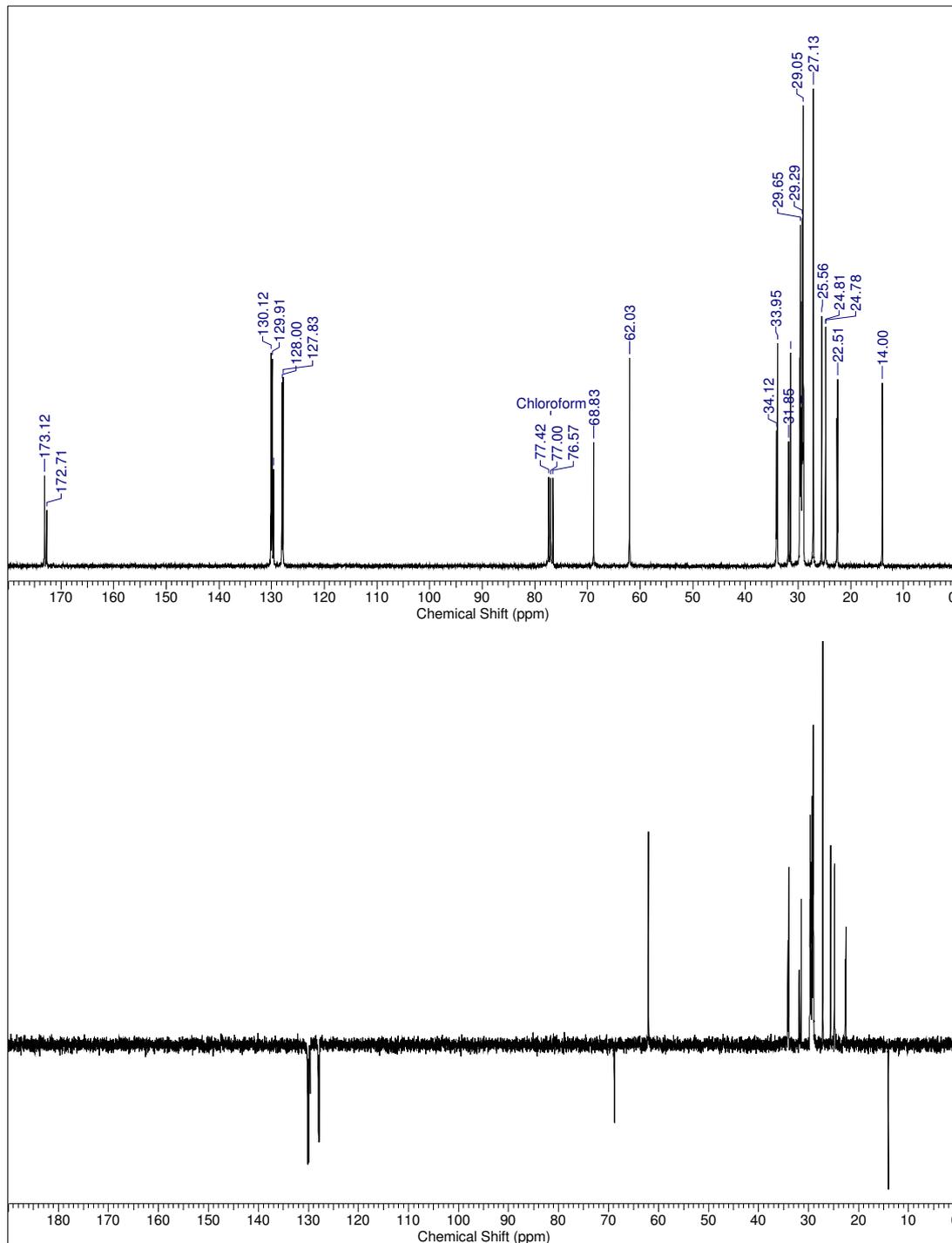


Figura 8: Espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 do óleo de girassol

Pelo espectro de RMN de ^1H do óleo de girassol ozonizado por 24 horas (Figura 10) é possível constatar o desaparecimento dos sinais dos prótons olefinicos entre 5,39–5,20 ppm, quando comparados ao sinal no espectro do óleo de girassol antes da reação de ozonólise (Figura 7), além do aparecimento de novos sinais correspondentes aos produtos formados na reação. Os ozonídeos, ou anéis 1,2,4 trioxolanos, são os principais produtos formados durante a reação e mostram sinais com deslocamento químico próximo a 5,14 ppm, que podem ser atribuídos aos hidrogênios do anel (Figura 10) e ao aparecimento de sinais em 104 ppm no espectro de ^{13}C . Alguns autores identificaram a formação dos ozonídeos a partir de óleo de girassol, relatando sinais em torno de 5,15 ppm (DÍAZ *et al.*, 2006) e 5,17 ppm (SORIANO *et al.*, 2003 b) no espectro de RMN de ^1H . Portanto, o sinal A da Figura 10, multipletto em 5,14 - 5,10 pertence aos hidrogênios do ozonídeo isolado, como mostrado na Figura 9.

O multipletto em 5,35 - 5,45 ppm (sinal C da Figura 10) pode ser atribuído aos hidrogênios dos ozonídeos formados a partir da reação com o linoleato (cadeia com duas insaturações), levando a formação de dois ozonídeos (Figura 9) ligados por um grupo metileno (2.12 ppm). Segal *et al* (2011), também observou multiplettos em 5,25 – 5,30 e 5,35 – 5,42 ppm atribuindo-os aos anéis ozonídeos formados durante a reação de ozonólise com o linoleato presente no óleo de gergelim.

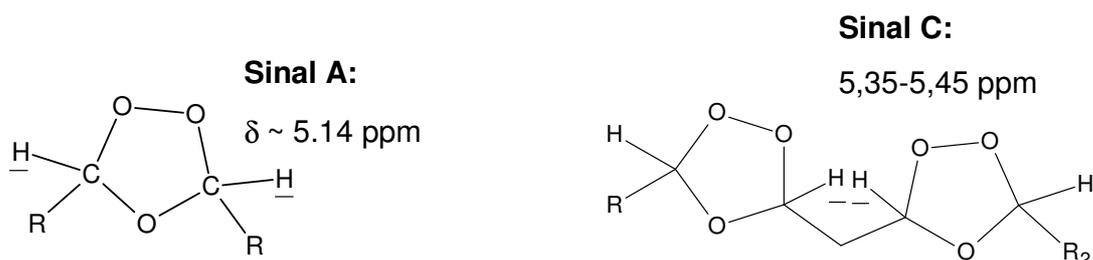


Figura 9: Ozonídeos formados na reação de ozonólise e deslocamentos químicos dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H .

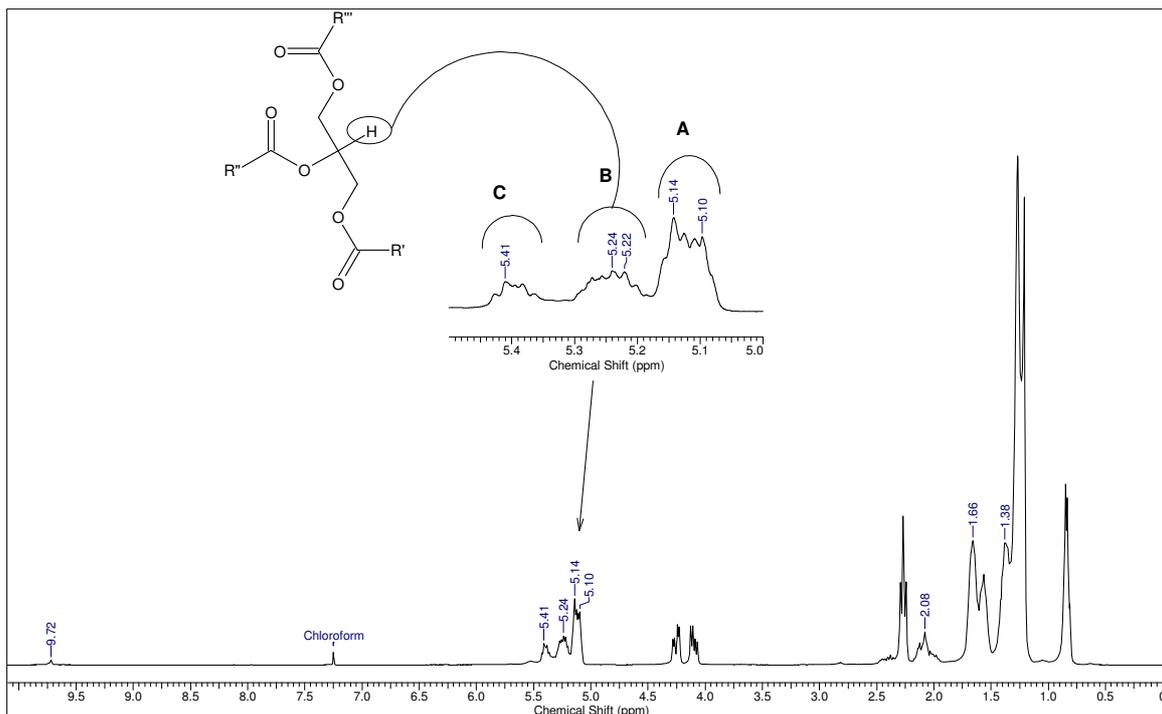


Figura 10: Espectro de RMN de ^1H do óleo de girassol ozonizado por 24 h.

O sinal B, Figura 10 (5,21-5,30 ppm) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono do grupo glicerila (GUILLÉN & RUIZ, 2001).

Na reação com o oleato de glicerila, o ozônio cliva a ligação dupla da posição 9, podendo levar a formação de aldeído de 9 carbonos, o nonanal **7**. De forma similar, na reação no linoleato de glicerila, as posições 9 e 12 podem ser clivadas levando a formação de hexanal **8** e 1,3 propanodial **9**, como mostrado na Figura 11.

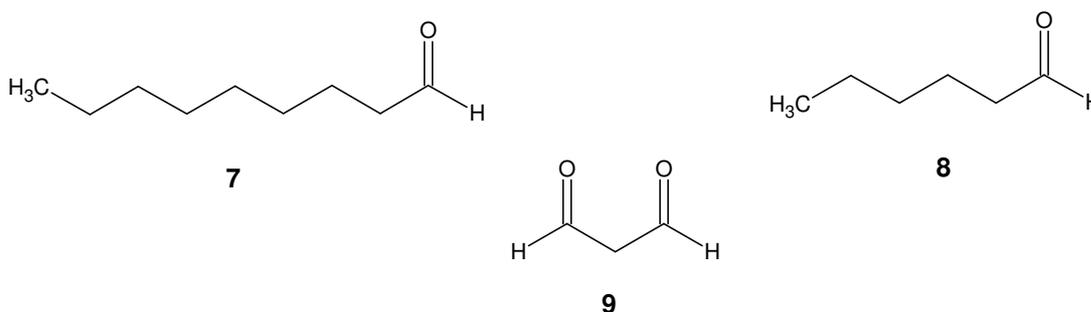


Figura 11: Aldeídos: nonanal **7**, hexanal **8** e 1,3 propanodial **9**.

Os aldeídos, com sinal correspondente em 9,72 ppm (Figura 10), são formados em baixa concentração como produto secundário da reação de ozonólise. De acordo com o mecanismo da reação (Figura 5, página 15), o *zwitterion* reage com os aldeídos para formar anéis 1,2,4 trioxolanos ou ozonídeos, como produto principal.

A Figura 12 mostra o progresso da reação de ozonólise com o óleo de girassol. Observando as expansões dos espectros das regiões entre 1,4 – 6,0 ppm, vemos que o multiplete em 2,00, o tripleto em 2,74 e o multiplete em 5,30 ppm, presentes no óleo de girassol antes da reação, decrescem sua intensidade com o aumento do tempo reacional até a ausência dos sinais nos espectros do óleo ozonizado por 24 e 36 h.

Após a formação dos ozonídeos, novos sinais aparecem em 1,66 e 2,08 ppm, correspondentes aos hidrogênios dos grupos metileno na posição α e entre os anéis.

Na análise dos espectros dos óleos de girassol em diferentes tempos de reação (Figura 12), observa-se a presença de um multiplete em 5,5 ppm nos espectros dos óleos ozonizados por 6 e 12 h e a ausência do sinal nos espectros de 24 e 36 h. Na reação com o linoleato, cadeias com duas ligações duplas não conjugadas, o ozônio reage primeiramente com uma das ligações duplas levando a formação do ozonídeo (Figura 13), deslocando assim o sinal correspondente aos prótons da dupla ligação de 5,3 para 5,5 ppm.

Sega *et al* (2011), observou no experimento de gHMQC que os prótons que aparecem em 5,50 e 5,35 - 5,28 ppm estão correlacionados com os carbonos em 133-134 e 120-121 ppm, atribuindo assim o sinal em 5,50 ppm aos compostos derivados da reação do ozônio com apenas uma das ligações duplas presentes na cadeia.

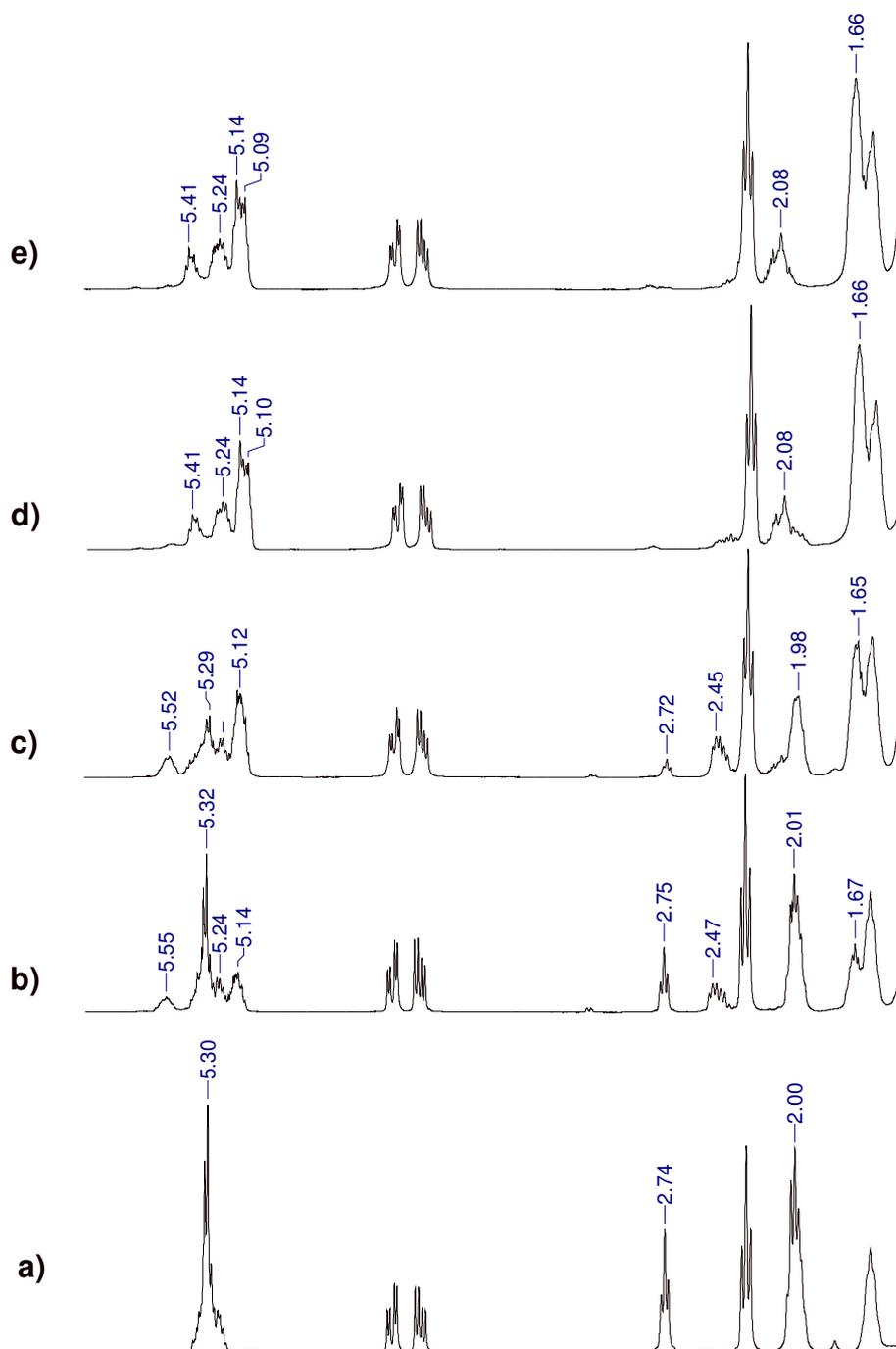


Figura 12: Expansões dos espectros das regiões entre 1,5 - 6,0 ppm para óleo de girassol ozonizado em diferentes tempos; a) 0 h, b) 6 h, c) 12 h, d) 24 h, e) 36 h.

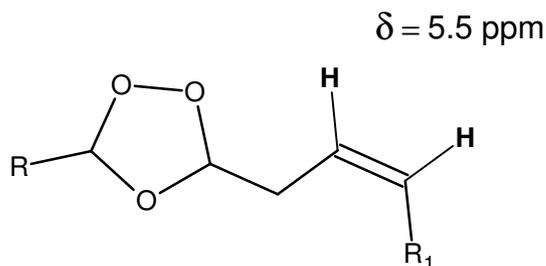


Figura 13: Estrutura química do ozonídeo formado na reação de 1 equivalente de ozônio com o linoleato de glicerila.

A ausência dos sinais na região entre 130-127 ppm e os novos sinais entre 104 -100 ppm, referentes aos carbonos dos ozonídeos, no espectro de ^{13}C do óleo ozonizado por 24 h (Figura 14), indicam a reação completa do ozônio com as ligações duplas carbono-carbono, tornando a cadeia carbônica do grupo acila totalmente saturada.

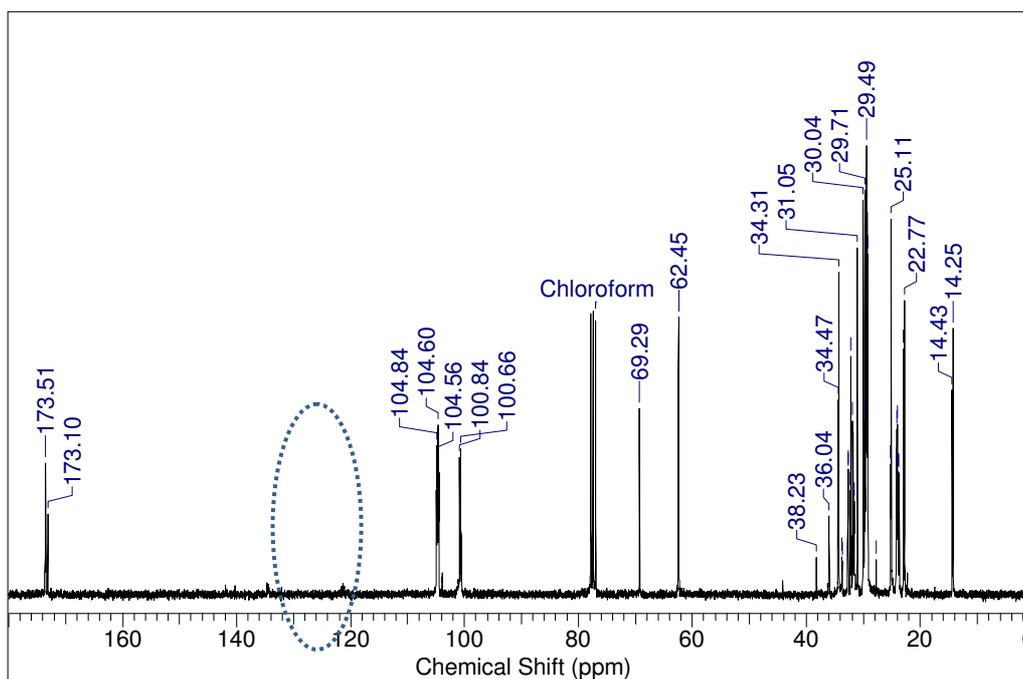


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de girassol ozonizado por 24 h.

3.1.2. Óleos de linhaça e baru

A reação de ozonólise do óleo de linhaça obtido por prensagem a frio foi realizada por 6, 12 e 24 horas. Na tentativa de se obter o óleo de linhaça ozonizado por 36 horas, após 25 horas de reação, o produto obtido se torna altamente viscoso, impedindo que o gás ozônio borbulhasse na amostra. É possível observar a formação de produtos com maior viscosidade conforme o aumento do tempo de reação, porém nos óleos de girassol e baru, as reações foram realizadas sem dificuldade até 36 horas.

Com o desaparecimento das ligações duplas, pode ocorrer um aumento nas interações de van der Waals e a formação de moléculas mais impedidas. Especialmente no óleo de linhaça, onde pode ocorrer a formação de 3 anéis trioxolanos ligados entre si por grupos metileno (Figura 15), a partir dos grupos acila linolênico, abundantes no óleo de linhaça (53%).

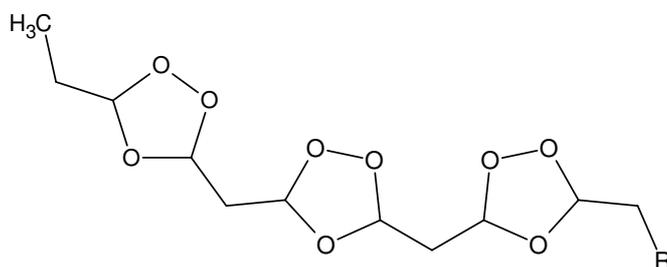


Figura 15: Ozonídeos formados a partir do grupo acila linolênico.

Os espectros de RMN ^1H obtido do óleo de linhaça (E 8, página 72) e baru (E 14, página 75) apresentaram o mesmo padrão para os espectros de óleos vegetais. Com uma diferença no deslocamento químico do grupo metila terminal do grupo acila linolênico em 0,95 ppm e grupo metila terminal dos demais grupos acila em 0,85 ppm (GUILLÉN & RUIZ, 2001).

Os espectros dos óleos de linhaça e baru ozonizados por 12 horas (Figura 16) seguem o mesmo padrão de sinais obtidos no óleo de girassol com o mesmo tempo reacional, indicando a formação dos ozonídeos a partir dos diferentes óleos.

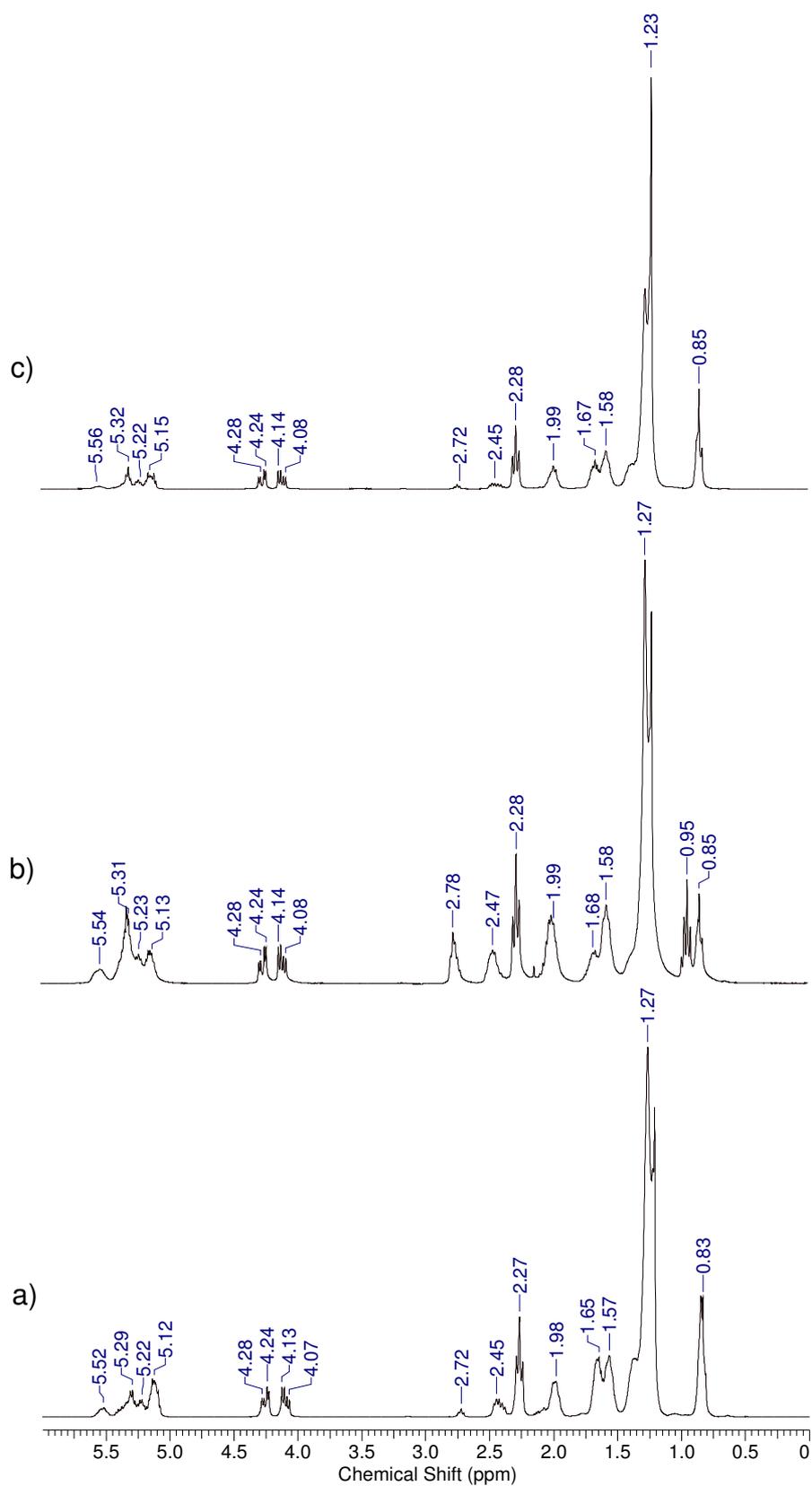


Figura 16: Espectros de RMN ^1H para óleos vegetais ozonizados por 12 h; a) girassol, b) linhaça, c) baru.

O sinal em 5,5 ppm atribuídos aos prótons olefinicos, foi observado no espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 24 horas (Figura 17). No entanto, os sinais são ausentes nos espectros dos óleos de girassol e baru ozonizados por 24 h. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais correspondentes a carbono sp^2 , quando comparado aos espectros dos óleos de girassol e baru, onde os sinais foram ausentes.

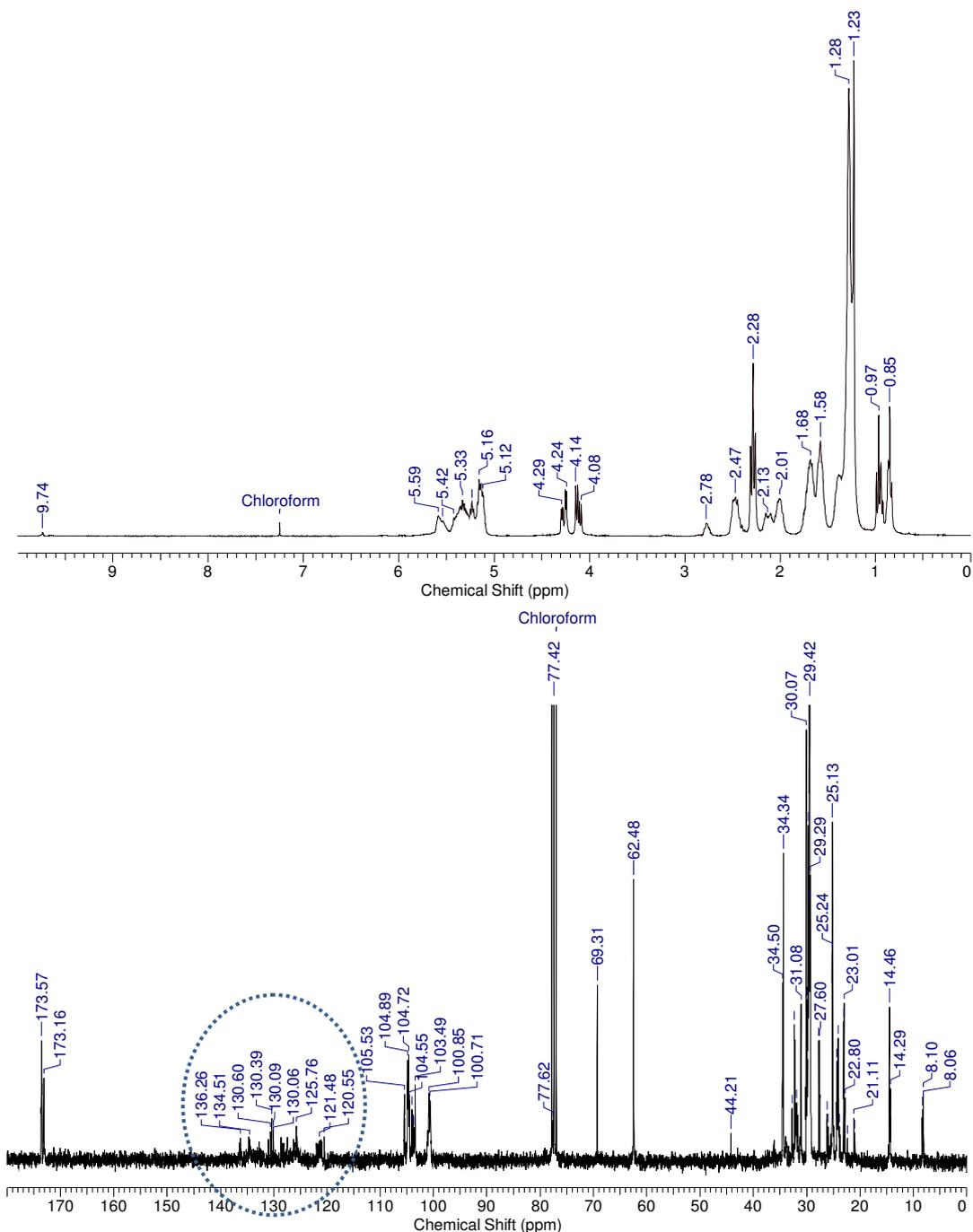


Figura 17: Espectro de RMN ^1H e ^{13}C do óleo de linhaça ozonizado por 24 h.

3.2. Caracterização dos óleos ozonizados

Os estudos das propriedades físico-químicas dos óleos vegetais ozonizados possuem grande importância para sua caracterização. Técnicas analíticas como índice de acidez, iodo e peróxido são largamente utilizados para determinação da qualidade dos produtos (VALACCHI, *et al*, 2005, ZANARDI *et al*, 2008, MIRABAL *et al*, 2003)

3.2.1. Índice de Acidez (IA) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004a).

De acordo com o Regulamento Técnico para Óleos, Gorduras e Cremes Vegetais, emitido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o valor máximo de acidez permitido para óleos prensados a frio e não refinados é de 4,0 mg KOH g⁻¹. Para os óleos refinados o máximo é de 0,6 mg/KOH g⁻¹ amostra (ANVISA, 2005).

O óleo de girassol refinado apresentou IA de 0,20 e os valores obtidos para os óleos prensados a frio de linhaça e baru foram 0,88 e 0,32, respectivamente. Pode-se observar um aumento no IA, conforme o tempo de reação para todos os óleos testados (Tabelas 3).

Tabela 3: Valores de Índice de Acidez (mg KOH g⁻¹) para os óleos puros e após diferentes tempos de reação.

	Óleo de girassol refinado	Óleo de Linhaça prensado a frio	Óleo de Baru prensado a frio
Óleo puro	0,20 ± 0,02	0,88 ± 0,04	0,32 ± 0,03
6 h	2,37 ± 0,06	1,72 ± 0,04	1,21 ± 0,09
12 h	1,70 ± 0,05	2,13 ± 0,08	1,27 ± 0,03
24 h	2,50 ± 0,06	4,25 ± 0,09	2,47 ± 0,09
36 h	10,66 ± 0,02	_____	8,00 ± 0,01

média ± desvio padrão

Como descrito anteriormente, a reação do óleo de linhaça foi realizada até 24 horas de reação. Entre as amostras ozonizadas por 24 h, o óleo de linhaça apresentou maior valor, 4,25 mg KOH g⁻¹. O IA mostrou um aumento

significante após 24 de reação, os valores encontrados para as amostras ozonizadas por 36 h foram 10,66 para óleo de girassol e 8,00 para o óleo de baru.

Os óleos possuem alta proporção de ácidos graxos insaturados, levando a um sistema ozonizado complexo. Ácidos podem ser formados através da decomposição dos ozonídeos ou formados diretamente durante a reação.

Após 24 horas de reação, os espectros de RMN ^1H dos óleos de girassol (E 5, página 71) e baru (E 18, página 77), não apresentaram sinais de ligações duplas, desde que não existam mais duplas, o ozônio pode reagir com aldeídos formando ácidos carboxílicos (Figura 18).

A formação de ácidos carboxílicos pode explicar o aumento do índice de acidez nos óleos ozonizados, no entanto, não foram observados sinais de ácidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

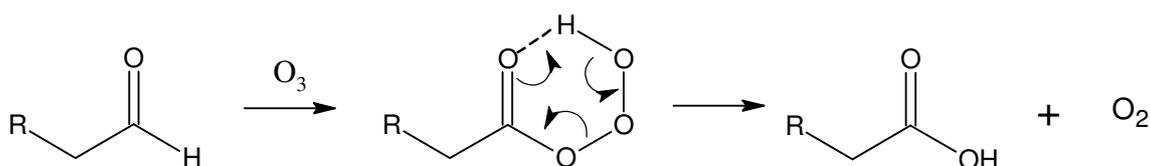


Figura 18: Mecanismo da reação de oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos (SANTROCK *et al*, 1992).

3.2.2. Índice de Iodo (II) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004b).

O índice de iodo é a medida do número total de ligações duplas presentes nas amostras de óleo (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004b). O ozônio reage com as ligações duplas presentes nos óleos vegetais, levando a um rápido decréscimo no índice de iodo dos óleos vegetais ozonizados.

Como esperado, os óleos de linhaça apresentaram maior índice de iodo (II), $175,14 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$, seguido pelos óleos de girassol ($114,15 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) e baru ($89,47 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$).

Os valores para os óleos antes e após a reação de ozonólise são mostrados na Tabela 4. Pode-se observar um decréscimo no Índice de Iodo para as amostras analisadas, conforme o aumento do tempo de reação.

O óleo de baru puro e ozonizado em diferentes tempos apresentaram valores menores, quando comparado aos obtidos para os outros óleos, devido à sua diferença na composição de ácidos graxos. O óleo de baru possui em sua composição alto teor de ácido oléico monoinsaturado e a partir de 24 horas de reação, todas as ligações duplas presentes no óleo reagiram com o ozônio, não havendo a necessidade de determinação do índice para a amostra do óleo de baru ozonizado por 36 h. No entanto, de acordo com os valores apresentados e com análise dos espectros de RMN ^{13}C (E 13, página 75), foi confirmado a presença de ligações duplas restantes após a reação no óleo de linhaça ozonizado por 24 h.

Tabela 4: Valores de Índice de Iodo (g de iodeto 100g^{-1} de amostra) para os óleos puros e após diferentes tempos de reação.

	Óleo de girassol refinado	Óleo de Linhaça prensado a frio	Óleo de Baru prensado a frio
Óleo puro	114,15 ± 1,53	175,14 ± 2,24	89,47 ± 0,49
6 hs	86,81 ± 1,76	147,19 ± 0,50	61,07 ± 2,36
12 hs	39,24 ± 0,83	114,33 ± 3,18	37,78 ± 2,52
24 hs	4,46 ± 1,32	44,61 ± 3,18	0,71 ± 1,00
36 hs	0,49 ± 0,50	-----	-----

média ± desvio padrão

3.2.3. Índice de Peróxido (IP)

A determinação da quantidade de peróxido presentes nos óleos ozonizados é de fundamental importância, pois os ozonídeos formados são responsáveis pela atividade biológica dessas substâncias (DÍAZ *et al*, 2001).

O índice de peróxido é o número que expressa em miliequivalentes (mEq) de oxigênio ativo, a quantidade de peróxido presente em 1000 g de

amostra, sendo comumente determinado através de técnicas iodométricas, devido à habilidade desses compostos em oxidar iodeto a iodo.

Os peróxidos reagem com o iodeto de potássio em presença de ácido acético liberando iodo. O iodo é titulado com solução de tiosulfato de sódio de acordo com a reação 3 (Figura 19) (A.O.C.S., 1998).



Figura 19: Reações químicas para determinação do índice de peróxido.

A literatura não descreve como os ozonídeos presentes no óleo ozonizado reagem com o iodeto de potássio, para serem quantificados através do índice de peróxido. Um possível mecanismo seria a decomposição do ozonídeo, em hidroperóxido, que podem ser reduzidos de acordo com a reação 2 (Figura 19) levando a liberação de iodo.

No procedimento experimental descrito pela American Oil Chemists' Society (A.O.C.S.), após a adição de iodeto de potássio a amostra é deixada em repouso por um minuto para a formação de iodo (A.O.C.S., 1998). Segundo a literatura, para amostras com alta concentração de peróxidos, o tempo de um minuto é insuficiente para que os peróxidos presentes na amostra oxidem o iodeto a iodo (reação 2, Figura 19). Os dialquilperóxidos e os peróxidos com alto peso molecular reagem lentamente com o iodeto. Modificações como temperatura e tempo de reação podem ser realizadas com o objetivo de se obter melhores resultados (TELLEZ *et al*, 2006; RICHAUD *et al*, 2006).

O índice de peróxido dos óleos antes do processo de ozonização foi determinado de acordo com a A.O.C.S. e os valores obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Valores de Índice de peróxido em (mEq Kg^{-1}), para os óleos puros.

Óleos	Índice de peroxido (mEq Kg^{-1})
Girassol	$20,06 \pm 0,02$
Linhaça	$44,47 \pm 3,76$
Baru	$15,58 \pm 0,04$

Média \pm desvio padrão

Para melhor determinação dos compostos peroxídicos nos óleos ozonizados, após a adição de iodeto de potássio (KI), as amostras foram deixadas em repouso ao abrigo da luz por 4, 8, 16, 24, 30 e 36 horas.

Os valores de IP obtidos de acordo com os métodos oficiais de análise foram inferiores aos valores obtidos com maior tempo de reação com o iodeto. Evidenciando que um minuto não é suficiente para que todo peróxido presente na amostra possam reagir, liberando iodo. Para os óleos com diferentes tempos de ozonização, é possível obter um valor máximo para quantificação em 24 horas de reação. Para os óleos de baru ozonizados por 6 horas, o valor máximo obtido foi em 16 horas de reação (Tabela 6).

Esperava-se, um alto índice de peróxido para os óleos de girassol e linhaça ozonizados, uma vez que esses óleos são altamente insaturados, com altos valores de índice de iodo (Tabela 4). O óleo de baru apresentou um menor índice, quando comparado aos outros óleos.

Levando em consideração, a lenta reação do iodeto com peróxidos como descrito na literatura, a reação de ozonólise no óleo de baru leva a formação de apenas um anel ozonideo a partir do ácido oléico (C18:1), enquanto nos óleos de girassol e linhaça, levam a formação de até 3 anéis por cadeia graxa, a partir dos ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Os ozonideos formados a partir do ácido oleico podem reagir mais rapidamente do que os ozonídeos formados a partir dos ácidos linoleico e linolênico.

Após a titulação, as amostras foram submetidas a análise por RMN ^1H e os sinais referentes aos ozonideos foram presentes nos espectros (E 25 e 26, página 81 e E 27, página 82), indicando que apenas parte dos compostos peroxídicos presente no óleo ozonizado foram quantificados.

Tabela 6: Valores de Índice de peróxido em (mEq Kg⁻¹), para os óleos ozonizados.

Óleo	Tempo de reação	Índice de peróxido						
		Métodos oficiais de análise	4 h	8 h	16 h	24 h	30 h	36 h
Girassol	6 hs	43,17	836,92 ±	921,78 ±	1261,59 ±	1794,32 ±	1600,0 ±	1466,3 ±
		±1517,956,7	24,0	67,6	43,64	28,1	13,1	18,7
Girassol	12 hs	166,3 ±	846,27 ±	1365,60 ±	1622,42 ±	2147,83 ±	1761,87 ±	1672,54 ±
		21,69	55,1	43,9	14,2	43,8	55,2	86,3
Girassol	24 hs	174,10 ±	877,16 ±6,5	870,58 ±	2067,7 ±	2078,08 ±	2065,63 ±	2002,54 ±
		18,8		33,8	25,2	44,35	11,63	20,09
Girassol	36 hs	195,49 ± 7,6	1490,81 ±	1821,70±	2047,50 ±	2123,47 ±	2151,49 ±	2026,86 ±
			48,9	18,7	25,54	21,5	77,5	12,81
Linhaça	6 hs	239,62 ±	937,85 ±	931,82 ±	1373,08 ±	1629,8 ±	1517,95 ±	1406,11 ±
		7,26	12,7	20,3	4,6	49,5	31,15	12,87
Linhaça	12 hs	295,63 ±	1202,33 ±	1242,91 ±	1633,30 ±	1768,96 ±	1617,5 ±	1509,67 ±
		25,61	20,2	57,0	41,9	16,39	2,01	15,56
Linhaça	24 hs	553,15 ±	1929,76 ±	2128,07 ±	2082,05 ±	2016,52 ±	1558,64 ±	1600,01 ±
		6,93	68,9	66,9	34,8	58,3	44,3	62,1

Baru	6 hs	99,56 ± 0,39	732,41 ± 2,9	1056,44 ± 17,8	1968,09 ± 30,8	1948,26 ± 36,2	1483,47 ± 3,4	1426,28 ± 39,2
Baru	12 hs	112,29 ± 3,5	1182,48 ± 10,7	1550,83 ± 49,2	2278,03 ± 16,1	2324,41 ± 28,9	1603,34 ± 42,1	1726,78 ± 28,1
Baru	24 hs	157,13 ± 0,7	1935,26 ± 20,7	2311,93 ± 48,6	2465,87 ± 31,7	2619,82 ± 11,4	1782,58 ± 5,2	1784,88 ± 1,7
Baru	36 hs	240,55 ± 3,1	1526,13 ± 17,5	1727,61 ± 11,7	1774,51 ± 15,2	1988,95 ± 18,6	1776,84 ± 23,8	1754,7 ± 26,8

As duas principais fontes de erros nos ensaios iodometricos são: (i) reação do iodo com as insaturações dos ácidos graxos e (ii) liberação de iodo a partir do iodeto de potássio pela presença de oxigênio na solução a ser titulada. O oxigênio na solução da amostra causa a liberação de iodo a partir do iodeto de potássio de acordo com a seguinte reação (Figura 20) (CROWE & WHITE, 2001).



Figura 20: Liberação de iodo a partir de moléculas de oxigênio do ar.

A determinação da quantidade de peróxido presente nos óleos ozonizados é de extrema importância, no entanto os métodos iodometricos utilizados possuem algumas limitações. Os resultados obtidos nas análises não foram satisfatórios, pois além de não quantificar adequadamente todo o peróxido, as análises apresentaram altos valores de desvio padrão. Novas metodologias para determinação desse índice serão testadas, incluindo novas condições como tempo e refluxo das amostras.

3.3. Reação de Ozonólise em óleos vegetais e água - formação de Óleogel (INPI: BR1020130001937).

Segundo o mecanismo proposto por Criegee (CRIEGEE, 1975), a ozonólise em presença de água leva a formação de α -hidroxi-hidroperóxidos e aldeídos, devido ao ataque nucleofílico da água ao intermediário de Criegee (Figura 21).

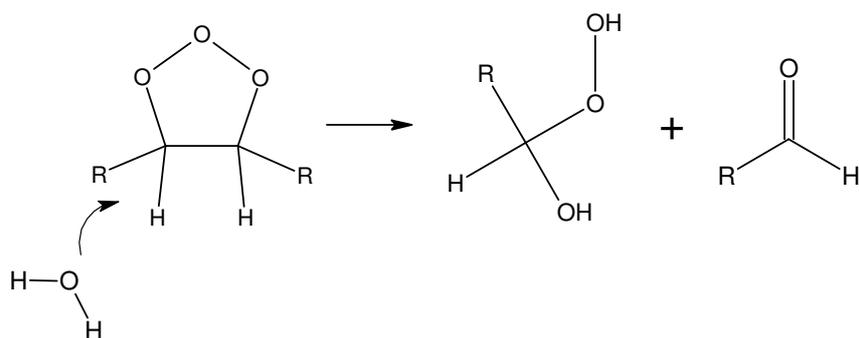


Figura 21: Formação de α -hidroxi-hidroperóxidos e aldeídos.

A reação de ozonólise do óleo de girassol em presença de água foi realizada, e o produto obtido a partir dessa reação apresentou característica oleosa, é transparente e possui alta viscosidade, com o aspecto físico semelhante a um gel. O produto encontra-se em processo de patenteamento, com o título “Processo para obtenção de um gel a partir da ozonização de óleos vegetais”, depositado em 28/12/2012 (INPI: BR1020130001937).

As modificações químicas que ocorreram nos óleos vegetais antes e após o processo de ozonização, na presença ou ausência de água foram analisadas pelos grupos funcionais presentes nas amostras de óleo através dos espectros de infravermelho (IV). O espectro do óleo de girassol antes de ser submetido ao processo de ozonização apresenta bandas características das ligações duplas carbono-carbono em 3006, 1652 cm^{-1} e de carbonila de éster em 1745 cm^{-1} (E 21, página 79). O espectro de IV do óleo de girassol ozonizado por 24 horas sem a presença de água (Figura 22) apresenta uma banda característica de deformação C-O do ozonídeo em 1105 cm^{-1} e ausência

das bandas correspondentes à ligação dupla C=C. O espectro do óleo de girassol ozonizado por 24 horas em presença de água (Figura 23) possui uma banda adicional em 3446 cm^{-1} , evidenciando a presença de grupos hidroxila, provavelmente devido aos α -hidroxi-hidroperóxidos, bem como a água livre no meio reacional.

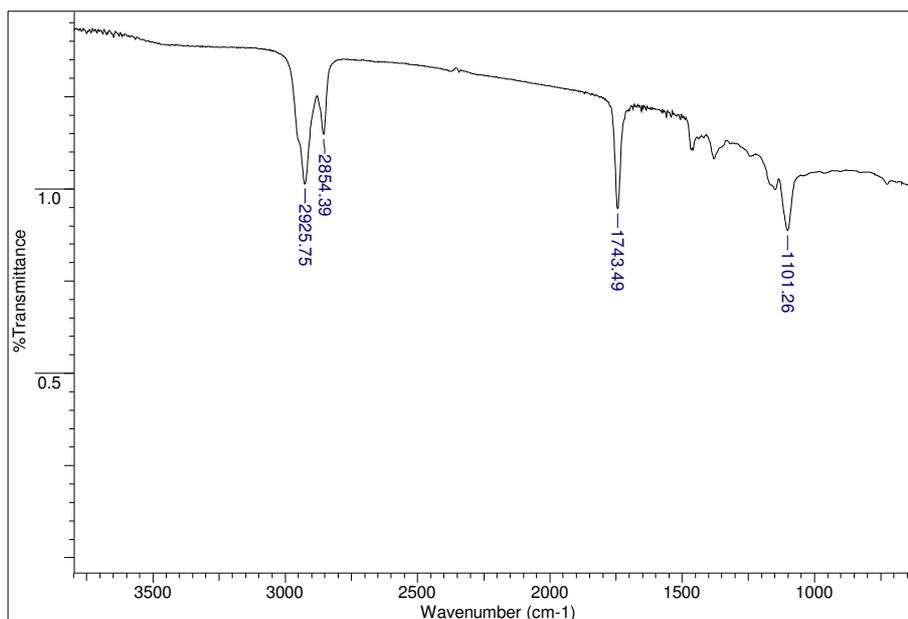


Figura 22: Espectro de IV do óleo de girassol ozonizado por 24 h.

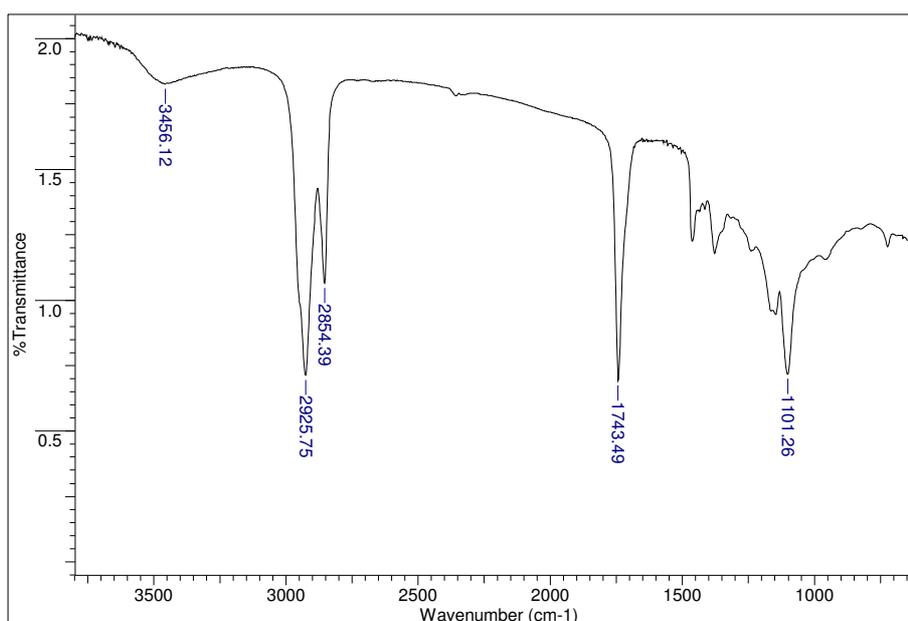


Figura 23: Espectro de IV do óleo de girassol ozonizado em presença de água por 24 h.

Através da análise do espectro de RMN ^1H (Figura 24), foi possível confirmar a formação de α -hidroxi-hidroperóxidos com um singlete em 7.99 ppm (-OOH), formação de aldeídos com multipletos em 9.73 ppm (R-COH) e multipletos em 5,12 e 5,39 ppm pertencentes aos hidrogênios do anel 1,2,4-trioxolano ou ozonídeos. Não foram observadas bandas correspondentes a aldeídos no espectro de Infravermelho, mas os espectros de RMN ^1H indicaram a presença de aldeído em concentração muito baixa.

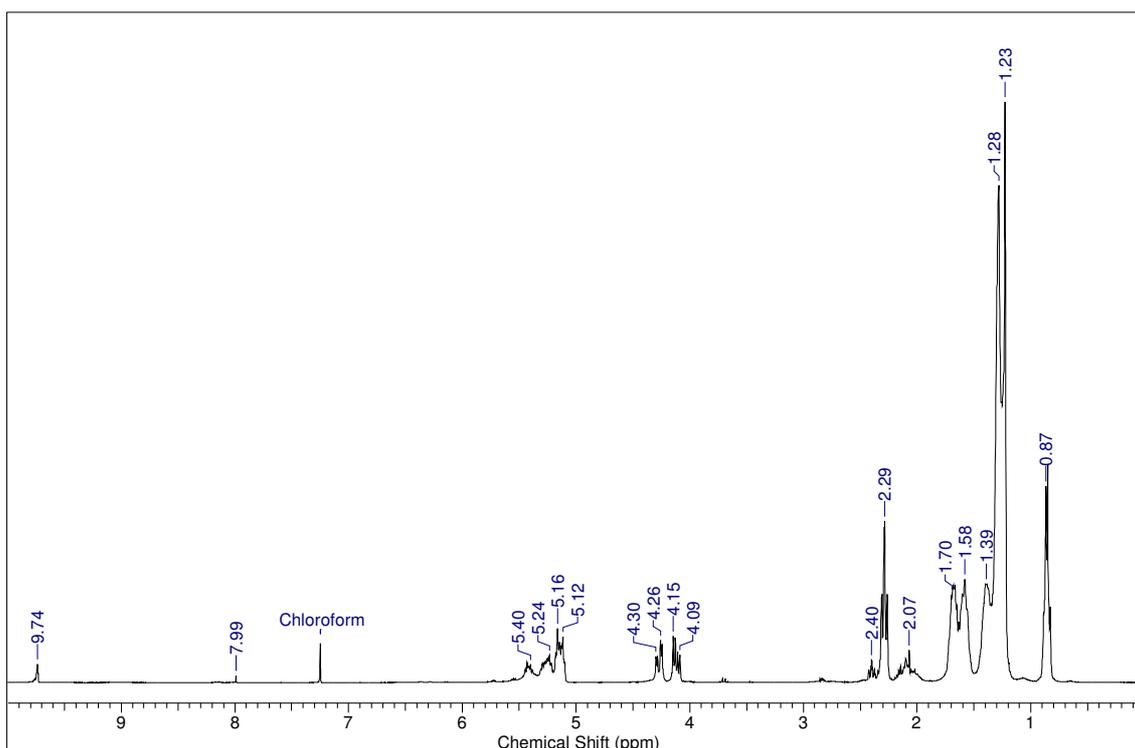


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H óleo de girassol ozonizado em presença de água por 24 h.

Os valores obtidos para índices de iodo, acidez e peróxido para o produto gelificado encontram-se na Tabela 7.

O índice de iodo para o óleo de girassol antes o processo de ozonização é de 114,15 (de acordo com certificado limite de análise 103-116) e após o processo de ozonização o índice diminui para 7,50. Como o índice de iodo é a medida do número total de ligações duplas presentes na amostra, ele indica que aproximadamente todos os grupos insaturados reagiram com o ozônio, de acordo com o desaparecimento das ligações duplas.

Foi observado aumento dos valores de acidez e peróxido após o processo de ozonização. O índice de acidez aumentou de $0,25 \text{ mg KOH g}^{-1}$ para $39,06 \text{ mg KOH g}^{-1}$, o que pode ser explicado pela decomposição dos compostos peroxidicos à ácidos carboxílicos.

Devido a evidências na literatura a respeito da caracterização de amostras com alto índice de peróxido e da baixa reatividade dos dialquilperóxidos com o iodeto de potássio, o índice de peróxido foi determinado utilizando-se dois métodos; o método oficial de análise (Métodos Oficiais e Práticas Recomendadas pela A.O.C.S.) e através de mudanças introduzidas no método oficial, onde após a adição da solução de iodeto de potássio a amostra de óleo foi mantida sobre refluxo a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas para que todo o peróxido pudesse reagir com o iodeto de potássio e ser quantificado. Após a titulação, as amostras foram extraídas e secas para serem analisadas por RMN ^1H .

O índice de peróxido determinado pelo método oficial de análise foi de $1.093,39 \text{ mEq Kg}^{-1}$ amostra, mas o espectro de RMN ^1H da mistura titulada apresentou sinais correspondentes aos hidroxí-hidroperóxidos em 7.99 ppm (-OOH) e ozonídeos em 5.12 e 5.39 ppm , indicando que apenas parte dos compostos peroxidicos presentes na amostra foram quantificados. Após as duas horas de refluxo, o índice de peróxido determinado foi de $1.933,11 \text{ mEq Kg}^{-1}$ e o espectro de RMN ^1H obtido não apresentou sinais correspondentes aos compostos peroxidicos (E 28, página 82).

Tabela 7: Valores índices de iodo, acidez e peróxido expressos em média da triplicata \pm desvio padrão para o produto gelificado.

Amostras	Índice de iodo $\text{g } 100\text{g}^{-1}$	Índice de Acidez mg KOH g^{-1}	Índice de peróxido (método oficial) mEq Kg^{-1}	Índice de peróxido (método adaptado) mEq Kg^{-1}
Óleo de girassol	$114,15 \pm 1,53$	$0,25 \pm 0,02$	$39,68 \pm 2,60$	$127,28 \pm 10,38$
Óleo ozonizado	$7,50 \pm 2,99$	$39,06 \pm 0,94$	$1.093,39 \pm 7,24$	$1.933,11 \pm 9,12$

3.3.1. Análise térmica

Foram realizadas análises térmicas por Termogravimetria (TG) e Calorimetria Diferencial de Varredura, do inglês: DSC. As amostras do produto gelificado e do óleo ozonizado por 24 horas sem adição de água foram avaliadas em atmosferas de nitrogênio e ar sintético, com razão de aquecimento de 10 °C/min. A curva TG do óleo ozonizado (Figura 25) e produto gelificado (Figura 26) em atmosfera de nitrogênio mostram perdas de massa em 3 etapas principais. Na curva TG do produto gelificado, a primeira perda de massa inicia em 70 °C e está subdividida em mais duas etapas, a primeira provavelmente é correspondente ao processo de desidratação, o que não ocorre com o óleo ozonizado. Após 182 °C, houve duas perdas principais com reações consecutivas, até 475 °C.

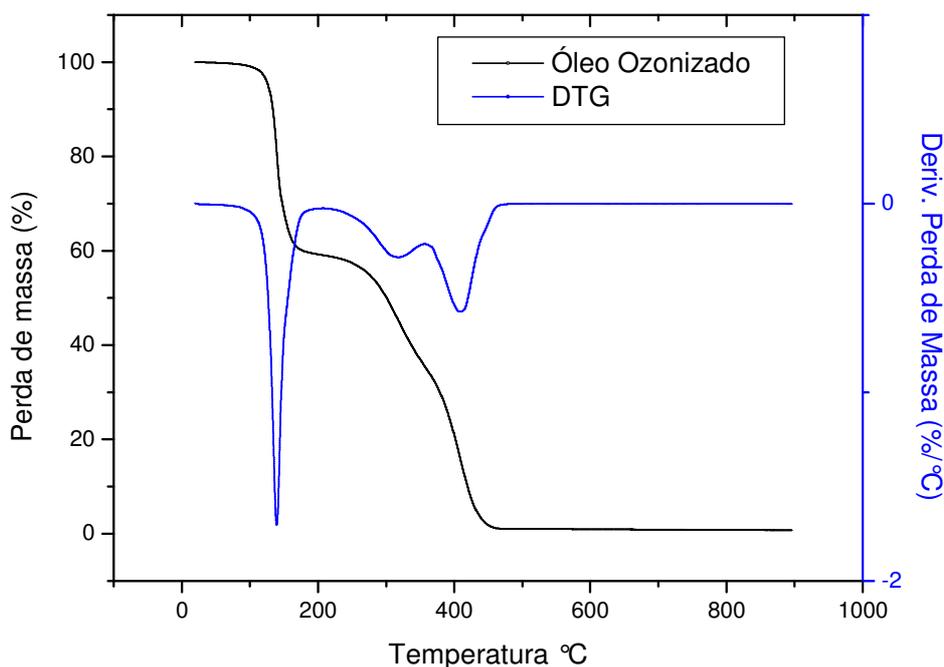


Figura 25: Curvas TG/DTG do óleo de girassol ozonizado por 24 h, em atmosfera de N₂.

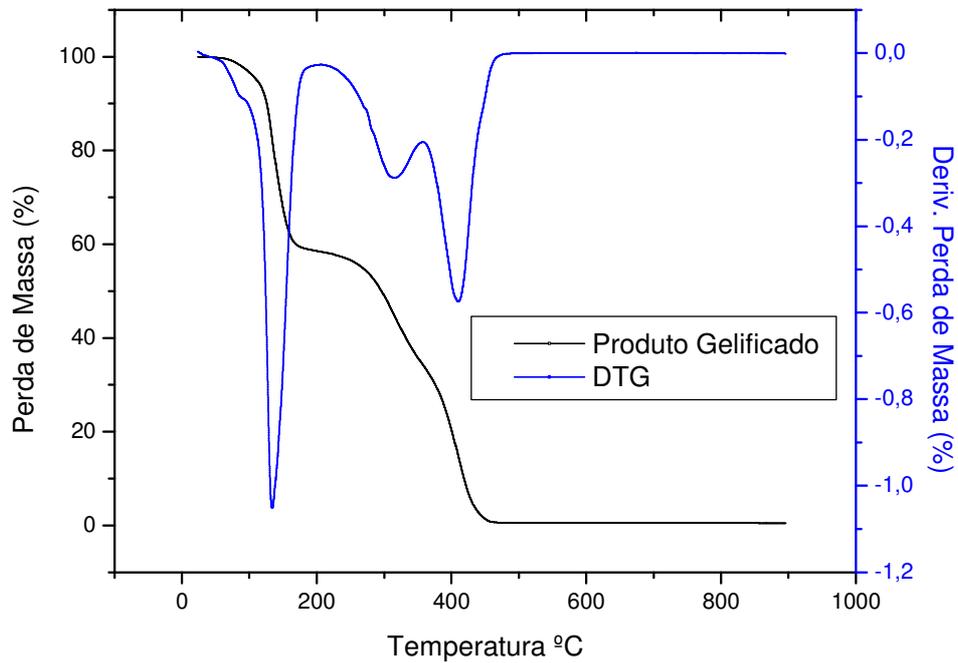


Figura 26: Curvas TG/DTG do produto gelificado, em atmosfera de N₂.

A curva de análise térmica do produto gelificado em atmosfera de oxigênio mostra decomposição em quatro etapas. O produto gelificado apresentou estabilidade até 67°C (Figura 27).

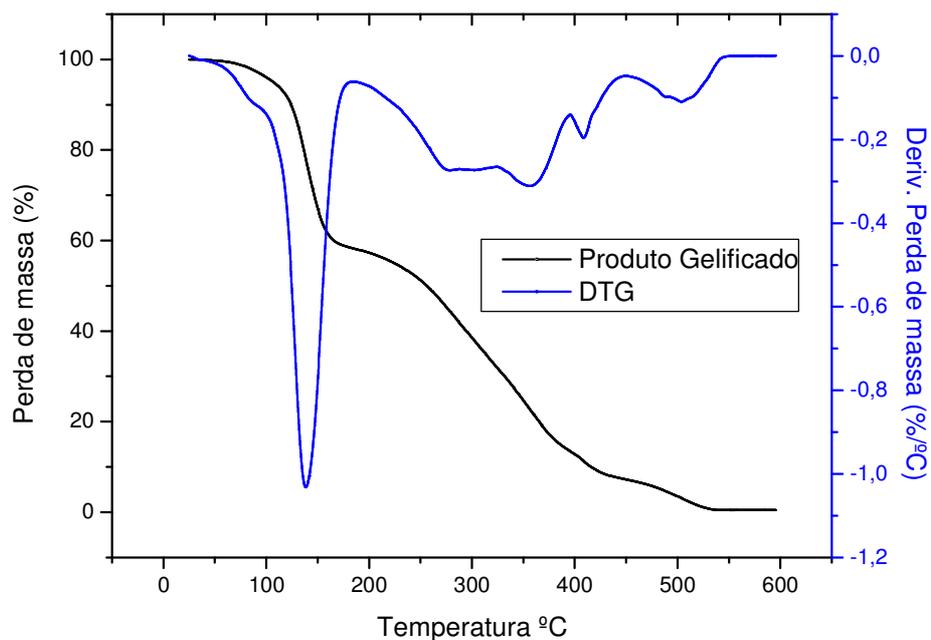


Figura 27: Curvas TG/DTG do produto gelificado, em atmosfera de ar sintético.

As análises por DSC foram realizadas com razão de aquecimento de 10 °C/min, entre -80 a 100 °C. A curva do produto gelificado (figura 28) apresentou uma transição vítrea, característica de materiais poliméricos ou de substâncias com interações intermoleculares fortes do tipo ligações de hidrogênio. A transição vítrea foi seguida por um pico endotérmico, correspondente a temperatura de fusão, com temperatura inicial de -30 °C e temperatura final de 12 °C e calor de fusão (ΔH) de 19,78 J/g.

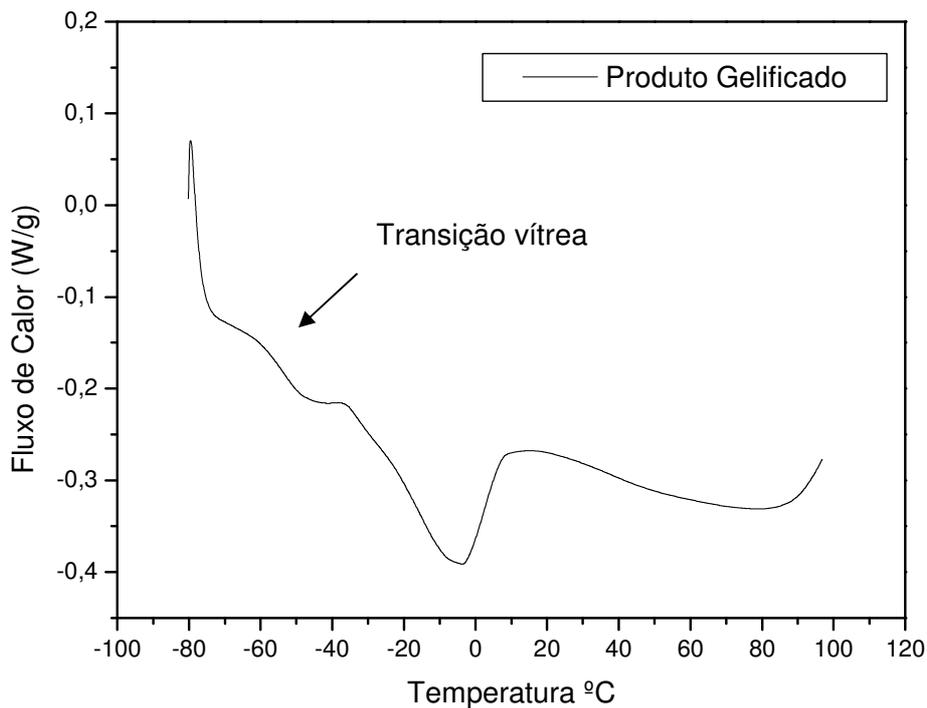


Figura 28: Curva DSC do produto gelificado entre - 80 a 100 °C.

3.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Em 90% dos casos, as infecções da pele são causadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. A *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* podem participar como agentes secundários (ALVAREZ *et al*, 1997; SECHI *et al* 2001). De acordo com a literatura os óleos de girassol ozonizados possuem um amplo espectro antimicrobiano com atividade inibitória e letal sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas clínicas resistentes aos antibióticos (DÍAZ *et al* 2001; SECHI *et al*, 2001)

Sechi e colaboradores, avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de girassol ozonizado (Oleozon[®]) frente a diversas espécies bacterianas, o Oleozon[®] mostrou atividades sobre espécies de *Mycobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Com valores de MIC de 9,5 mg. mL⁻¹ para o *E. feacalis* ATCC 35038 e *S. aureus* ATCC 29213 e 4,75 para *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

O Oleozon[®], apresentou efeito bactericida sobre as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, a uma concentração de 89 mg mL⁻¹. O medicamento afetou a permeabilidade celular bacteriana, devido à perda do conteúdo intracelular de íons K⁺ e induziu a redução do conteúdo citoplasmático das células de *S. aureus* (CURTIELLAS, 2008).

Os óleos de girassol, linhaça, baru e o oleogel obtido das reações de ozonólise foram testados quanto a sua atividade antibacteriana, pelo método de diluição em ágar (NCCLS, 1993), sobre as bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e clínica, resistente a benzilpenicilina, ampicilina, ciprofloxacina, maxifloxacina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, teicoplanina e vancomicina) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e clínica, resistente a benzilpenicilina, oxacilina, gentamicina, ciprofloxacina, maxifloxacina, norfloxacina, eritromicina, clindamicina, rifampicina e sulfametoxazol/trimetropin). Os valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) encontram-se na Tabela 8.

Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de ozonídeos a partir de óleos vegetais

Os óleos de girassol e baru com 12 horas ozonização não foram ativos nas concentrações testadas. No entanto, o óleo de linhaça de 12 h, apresentou MIC igual 10 mg mL^{-1} para o *S. aureus* ATCC, clínico resistente e *E. coli* ATCC.

Em geral, os óleos ozonizados se mostraram mais ativos frente a bactérias Gram-positivas *E. faecalis* (ATCC 29212 e clínica) e *S. aureus* (ATCC 25923 e clínica). O óleo de linhaça de 24 h foi ativo para todos os microrganismos Gram-positivos testados com MIC de 5 mg mL^{-1} para o *E. faecalis* clínico e $\leq 3 \text{ mg mL}^{-1}$ para o *S. aureus* clínico.

É importante observar que os óleos de girassol e linhaça foram mais ativos que os óleos de baru ozonizados, o que pode ser relacionado com a alta quantidade de compostos peroxidicos.

O oleogel foi ativo sobre todos os microrganismos testados, incluindo a *P. aeruginosa* com MIC igual a 7 mg mL^{-1} e apresentando atividade sobre as cepas clínicas resistentes, com MIC igual a 7 e $\leq 3 \text{ mg mL}^{-1}$ para o *E. faecalis* e *S. aureus*, respectivamente.

Os óleos vegetais constituem uma matriz para liberação de oxigênio ativo a partir dos ozonídeos, composto responsável pela atividade antimicrobiana. Conhecendo-se a natureza química dos óleos vegetais, formados por uma mistura de ácidos graxos de cadeias longas esterificadas nos triacilglicerol, os valores de MIC obtidos para os óleos ozonizados e o oleogel, apresentam excelentes resultados quando comparados a pureza química dos agentes antimicrobianos conhecidos.

Tabela 8: Valores de MIC para os óleos ozonizados e oleogel frente a 6 cepas bacterianas.

Óleo	Tempo de Reação	Concentração Inibitória Mínima – MIC mg ml ⁻¹					
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		ATCC	ATCC	Cepa clínica	ATCC	Cepa clínica	ATCC
Girassol	12 hs	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Girassol	24 hs	n.a.	10	10	n.a.	10	n.a.
Girassol	36 hs	n.a.	n.a.	n.a.	7	7	7
Linhaça	12 hs	n.a.	n.a.	n.a.	10	10	10
Linhaça	24 hs	n.a.	5	5	5	≤ 3	10
Baru	12 hs	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Baru	24 hs	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7	7
Baru	36 hs	n.a.	n.a.	n.a.	10	10	10
Girassol - Oleogel	24 hs	7	7	7	≤ 3	≤ 3	≤ 3

n.a.: não ativo nas concentrações testada

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e Equipamentos utilizados

Nas reações de ozonólise foram utilizados óleo de girassol refinado da marca Salada, adquirido em supermercados; óleos de linhaça e baru extraídos por prensagem a frio, da Veris Óleos Vegetais (Vinhedos – SP).

Em todas as reações de ozonólise foram utilizados gás oxigênio medicinal e nitrogênio da White Martins.

O ozônio foi produzido a partir de oxigênio medicinal através de um gerador de bancada da marca Philozon, com fluxo de entrada de oxigênio de 1L/min, com concentração de ozônio de 60 µg/mL, selecionada no display do equipamento (Figura 29).



Figura 29: Produção ozônio para reação de ozonólise em óleos vegetais.

Os solventes utilizados foram de grau P.A, das marcas Vetec, Dinâmica, Merck, Quimex e Synth. Os reagentes utilizados foram das marcas Sigma-Aldrich, Merk e Vetec.

As massas de todos reagentes e amostras de óleo foram devidamente determinados em balanças analíticas da Bell Engineering.

Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro da marca BRUKER, com campo magnético de 7,05 Tesla, modelo DPX300 de 300 MHz para a frequência do hidrogênio e 75 MHz para o carbono, utilizando o sinal dos hidrogênios residuais do solvente deuterado ou sinal do TMS como referência. Os parâmetros utilizados para aquisição e processamento estão relacionados nos espectros de RMN em anexo.

Os espectros de Infravermelho foram adquiridos em Espectrômetro Bomem FT-IR-MB100, em filme.

As análises térmicas de TGA foram realizadas em equipamento da TA Instruments, com rampa de aquecimento de 10 °C/min. em atmosferas de nitrogênio (N₂) e Ar sintético e cadinhos de platina. As análises de DSC foram realizadas em equipamento TA Instruments, em atmosfera de nitrogênio (N₂) de - 80 °C a 100 °C em cadinho hermético.

4.2. Reações de ozonólise

4.2.1. Reação de ozonólise em óleos vegetais para obtenção de óleos ozonizados

Em um reator de vidro contendo 200 mL de óleo vegetal foi borbulhado a mistura de gases oxigênio/ozônio, com concentração de ozônio de 60 µg mL⁻¹. A reação foi mantida em banho de água a temperatura de 30 – 40 °C, por várias horas (6, 12, 24 e 36 horas). A mistura de gases oxigênio-ozônio atravessou o óleo em todo o seu volume de forma contínua durante todo o processo, sendo dispersas por um difusor cerâmico em pequenas bolhas de gás (Figura 30). Após a reação o óleo foi borbulhado com gás nitrogênio por 5 minutos para remoção do excesso de ozônio.

As amostras foram submetidas à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C em CDCl_3 e armazenadas a 5°C para análises posteriores.



Figura 30: Dispersão de bolhas da mistura de gases oxigênio/ozônio em óleos vegetais.

4.2.1. Reação de ozonólise em óleo vegetal e água para obtenção de oleogel

Em um reator de vidro contendo óleo vegetal e 9% de água, foi borbulhada a mistura de gases oxigênio/ozônio através de um distribuidor de gás cerâmico, com concentração de ozônio de $60\ \mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Após a reação o óleo foi borbulhado com gás nitrogênio por 5 minutos para remoção do excesso de ozônio. As amostras foram submetidas a análise por RMN de ^1H e de ^{13}C em CDCl_3 e armazenadas em geladeira para análises posteriores.

4.3. Técnicas Analíticas

4.3.1. Índice de acidez (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004 a).

Em um erlenmeyer contendo 2 gramas de amostra, foi adicionado 25 mL da solução éter:álcool (2:1). Após agitação foi adicionado 2 gotas do indicador fenolftaleína e titulado com solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,1M padronizada até coloração rósea.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

O índice de acidez foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IA = \frac{n1 \times M \times f \times 56,1}{m}$$

Onde, $n1$: o volume em mL da solução de KOH gasto na titulação da amostra, M : molaridade da solução de KOH, f : fator de correção da solução de KOH e m : quantidade em gramas da amostra.

4.3.2. Índice de iodo (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004 b).

Em um erlenmeyer contendo 0,25 gramas de amostra, foi adicionado com uma pipeta volumétrica 10 mL de ciclo-hexano, e 20 mL de solução de iodo cloro (Reagente de Wijjs), com auxílio uma bureta. Após agitação, foi mantido em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 minutos. Foram adicionados 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água destilada, recentemente fervida e resfriada até atingir a temperatura ambiente. Procedeu-se titulando com solução de tiosulfato de sódio 0,1M padronizada, sob agitação moderada, até uma fraca coloração amarela. Neste ponto adicionou-se de 1 mL de solução de amido indicador continuando a titulação até o desaparecimento da coloração azul escura. O branco foi preparado com água destilada e realizado simultaneamente com as amostras.

Devido à toxicidade do tetracloreto de carbono, foi utilizado ciclohexano para as análises (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985)

As análises de índice de iodo foram realizadas em triplicata, a fim de reduzir o volume de solvente utilizado e os resíduos após a titulação, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ($m \pm dp$).

O índice de iodo foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$II = \frac{1,269 \times (n1 - n2)}{m}$$

Onde, $n1$: o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra, $n2$: o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco e m : quantidade em gramas da amostra.

4.3.3. Índice de Peróxido - Óleos Ozonizados

Em um erlenmeyer com boca esmerilhada contendo 2 gramas da amostra de óleo, foram adicionados 30 mL de solução de ácido acético clorofórmio (3:2), 3 mL de solução saturada de iodeto de potássio. A mistura foi agitada e deixada ao abrigo da luz por diferentes tempos de reação 4, 8, 16, 24, 30 e 36 h (TELLEZ *et al*, 2006). Após a reação foram adicionados 25 mL de água destilada recentemente fervida. Procedeu-se titulando com solução de tiosulfato de sódio 0,1M padronizada, até uma fraca coloração amarela. Neste ponto adicionou-se 1 mL de solução de amido indicador continuando a titulação até o desaparecimento da coloração azul escura (AOCS, 1998).

As análises de índice de iodo foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ($m \pm dp$).

O índice de iodo foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IP = \frac{1000 \times (n1 - n2) \times M}{m}$$

Onde, n_1 : o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra, n_2 : o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco, M : molaridade da solução do tiosulfato e m : quantidade em gramas da amostra.

4.3.4. Índice de Peróxido - Oleogel

O procedimento foi adaptado da A.O.C.S (1998), como descrito na literatura no caso de materiais com alto índice de peróxido e baixa reatividade do iodo com dialquilperóxidos. Foram modificados a temperatura e o tempo de reação (Tabela 9).

Tabela 9: Determinação do índice de peróxido.

Procedimento	Temperatura Reação	Tempo Reação
Oficial – A.O.C.S.	Ambiente	1 minuto
Adaptado	Refluxo a 60°C	180 minutos

Em um erlenmeyer com boca esmerilhada contendo 2 gramas da amostra de óleo, foram adicionados 30 mL de solução de ácido acético clorofórmio (3:2), 3 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após a reação em refluxo do peróxido presente com o iodeto de potássio, as amostras foram resfriadas até atingir a temperatura ambiente e adicionados 25 mL de água destilada recentemente fervida. Procedeu-se titulando com solução de tiosulfato de sódio 0,1M padronizada, até uma fraca coloração amarela. Neste ponto adicionou-se 1-2 mL de solução de amido indicador continuando a titulação até o desaparecimento da coloração azul escura (AOCS, 1998).

As análises de índice de iodo foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ($m \pm dp$) e o cálculo foi realizado de acordo com a equação do item anterior (4.3.3.).

4.4. Ensaio de Atividade Biológica

4.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos ozonizados foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia do Núcleo de Análises Clínicas/ Hospital Universitário – UFMS, sob a supervisão da farmacêutica Nádia C. P. Carvalho e Dra. Ana Camila Micheletti.

4.4.2. Cepas Bacterianas

Quatro espécies de bactérias patogênicas foram testadas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e cepa clínica, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e cepa clínica. As cepas clínicas foram isoladas de pacientes do Hospital Universitário – UFMS.

4.4.3. Preparação dos inóculos

Todas as cepas foram cultivadas em ágar Mueller Hinton. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril a 0.85%. Para a obtenção da concentração final do inóculo foi realizado a leitura do inóculo no aparelho DensiChek Plus – Biomérieux com valor de 0.5 na escala de McFarland, equivalente a 10^4 cfu mol⁻¹.

4.4.4. Determinação do MIC – Método de diluição em Agar.

O MIC foi determinado através do método de diluição em ágar de acordo com NCCLS (1993). Os óleos ozonizados foram solubilizados em ágar Müeller Hinton com 2% de Tween -80 para aumentar a solubilidade do óleo. As placas foram preparadas em diferentes concentrações de óleo ozonizado 10, 7, 5 e 3 mg/ml.

Placas controle contendo ágar e Tween 80 também foram preparadas. Alíquotas de 5 μ L de inóculo de cada bactéria foram gotejadas nas placas. As placas foram incubadas a 30° C e as leituras foram realizadas após 24 h.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reação de ozonólise foi realizada em óleos vegetais de girassol, linhaça e baru em diferentes tempos de reação (6, 12, 24 e 36 h) e os produtos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H , ^{13}C e IV.

Técnicas analíticas como índices de acidez (IA), iodo (II) e peróxido (IP) foram empregados para caracterização dos óleos vegetais ozonizados. As análises mostraram que ocorreu um aumento no índice de acidez das amostras, sendo que os maiores valores obtidos foram para os óleos com maior tempo de reação, como os óleos ozonizados por 24 e 36 h. As análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e dos valores de índice de iodo obtido confirmaram que o ozônio reagiu com as insaturações presentes nos óleos provocando um rápido decréscimo no índice de iodo e a ausência de insaturações a partir de 24 horas de reação para os óleos de girassol e baru. Os resultados obtidos no índice de peróxido não foram satisfatórios, pois não foi possível quantificar todo o peróxido presente nas amostras ozonizadas e outras metodologias para sua determinação serão empregadas.

Na reação de ozonólise realizada em presença de água, sem a formação de emulsão, pode-se obter um produto com característica oleosa, transparente e viscoso, com o aspecto físico semelhante a um gel. As análises térmicas do produto gelificado foram realizadas e o produto foi estável até 67 °C.

Os óleos de girassol, linhaça, baru e o oleogel obtido das reações de ozonólise foram testados sobre as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922) e Gram-positivas, *E. faecalis* (ATCC 29212 e clínica) e *S. aureus* (ATCC 25923 e clínica). Os óleos de linhaça de 24 horas e oleogel gel se mostraram mais ativos. O oleogel em especial, foi ativo sobre todos os microorganismos testados, sendo o único óleo ativo sobre a *P. aeruginosa* com MIC de 7 mg ml⁻¹, e apresentando atividade sobre as cepas clínicas resistentes, com MIC de 7 mg ml⁻¹ e ≤ 3 mg ml⁻¹ para o *E. faecalis* e *S. aureus*, respectivamente.

O trabalho permitiu o registro de patente no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), com o título “Processo para obtenção de um gel a partir da ozonização de óleos vegetais”, depositado em 28/12/2012 (INPI: BR1020130001937) e a participação na etapa final do Prêmio Santander Universidades de Empreendedorismo 2012, na categoria de Biotecnologia e Saúde, como único trabalho finalista da categoria nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste, proporcionando-nos, á convite da Incubadora de Empresas Pantanal UFMS, a oportunidade de incubação de empresa baseada em Pesquisa & Desenvolvimento, com produção de óleos ozonizados e oleogel.

6. Referências

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de diretoria colegiada - RDC N^o. 270, de 22 de SETEMBRO DE 2005. http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC_n_270.pdf?MOD=AJPERES, acessado em 16 de janeiro de 2013.

ALMEIDA, N. A., BEATRIZ, A., MICHELETTI, A. C., ARRUDA, E. J. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. *Orbital Elec. J. Chem* **4** (4): 313-326, 2012.

ALVAREZ, R., MENENDEZ, S., PEGUERA, M., TURRENT, J. Treatment of primary pioderma with ozonized sunflower oil. In: Second International Symposium on Ozone Applications, Havana. Cuba, 24 – 26 Março, p. 76, 1997.

AOCS. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, in Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, *AOCS Press*, Champaign, Illinois, 1997.

AOCS. Peroxide value. AOCS official method. In: Firestone, D. (Ed.), Official Methods and Recommended Practices of AOCS, 5th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, p. 8–87 , 1998.

BAILEY, P. S. Ozonation in Organic Chemistry, Volume I, Olefinic Compounds. New York: Academic Press, p. 220, 1978.

BOCCI, V. A. *Oxygen-Ozone Therapy. A Critical Evaluation*, Kluwer Academia Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2002.

BOCCI, V. *Ozone: A New Medical Drug*. Springer, 2005.

- BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* **37**:425–435, 2006.
- BOCCI, V., BORRELLI, E., TRAVAGLI, V., ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med. Res. Rev.* **29**: 646–682, 2009.
- CHIATTONE, P.V.; TORRES, L.M.; ZAMBIAZI, R.C. Application of ozone in industry of food. *Alim. Nutr.* **19** (3): 341-349, 2008.
- CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S., WOTHERS, P. *Advanced Organic Chemistry*, Oxford: New York, 2007.
- CRIEGEE, R. Mechanism of ozonolysis. *Angew. Chem. Int. Edit.* **14**:745–752, 1975.
- CROWE, T. D. & WHITE, P. J. Adaptation of the AOCS official method for measuring hydroperoxides from small-scale oil samples. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**: 12, 2001.
- CURTIELLAS, V., LEDEA, O., RODRÍGUEZ, S., ANCHETA, O., ECHEVARRÍA, M., SÁNCHEZ, E., FERNÁNDEZ, I. EI OLEOZON® sobre la viabilidad, la permeabilidad celular y la ultraestructura de *Staphylococcus aureus*. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* **39**: 2, 2008.
- DÍAZ, M., LEZCANO, I., MOLERO, J., HERNÁNDEZ, F. Spectroscopy of Ozonides with Biological Activity. *Ozone Sci. Eng.*, **23**:35–40, 2001.
- DÍAZ, M., GAVIN, J. A., LEDEA, O., HERNÁNDEZ, F., ALAIZ, M., GARCÉS, R. Spectroscopic characterization of ozonated sunflower oil. *Ozone Sci. Eng.* **27**: 247, 2005.

DÍAZ, M. F., GAVÍN, J. A., GÓMEZ, M., CURTIELLES, V., HERNÁNDEZ, F. Study of ozonated sunflower oil using ^1H NMR and Microbiological Analysis. *Ozone Sci. Eng.* **28**:59-63, 2006.

DEVILLEZ, R. L. Method of treating acne using ozonized materials. US 4451480A, 1984.

DEVILLEZ, R. L. Ozonide esters and topical compositions containing same. US 4591602 A, 1986.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Acid value. Council of Europe, 5th edn. Strasbourg Cedex, France, 127, 2004 a.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Iodine value. Council of Europe, 5th edn. Strasbourg Cedex, France, 127–128, 2004 b.

FERREIRA, A. M., SOUZA, B. M. V., RIGOTTI, M. A., LOUREIRO, M. R. D. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. *Rev. esc. enferm. USP*, São Paulo, **46**: 3, 2012.

FETNER, R. H., INGOLS, R. S. A comparison of the activity of ozone and chlorine against *E. coli* at 1°C. *Journal of General Microbiology*, **15**: 381-385, 1956.

FOLKMAN, J., SHING, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* **267** (16): 10931-10934, 1992.

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. *Rev. bras. farmacogn.* São Paulo. **5**: 2, 1996.

GREENWAY, D.L.A., DYKE, K.G.H. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J Gen. Microbiol.* **115** (1): 233-45, 1979.

GUNSTONE, F.D., HARWOOD, J.L., PADLEY, F.B. *The Lipid Handbook. Occurrence and Characteristics of Oils and Fats*, 2nd ed., Chapman & Hall: London, 1994.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge. **12**: 328-338, 2001.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in food industry. *Lebensm-Wiss. Technol.* **37**, 453-460, 2004.

HINMAN, C.D., MAIBACH, H. Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. *Nature.* **200**:377, 1963.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 3. ed. Sao Paulo: IMESP. p. 245-246, 1985.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *Int. J. Food Microbiol.* **71**:131-138, 2001.

KHADRE, M. A., YOUSEF, A. E., KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *J. Food Sci.* **66**: 1242–1252, 2001.

KIM, H. S., NOH, S. U., HAN, Y. W., KIM, K. M., KANG, H., KIM, H. O., PARK, Y. M. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J. Korean Med. Sci.* **24**(3): 368 –374, 2009.

KUNZ, A.; FREIRE, R.S.; ROWEDLER, J.J.R.; MANSILLA, H.; RODRIGUEZ, J.; DURAN, N. Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. *Quim. Nova* **22**: 425, 1999.

KUNZ, A., PERALTA-ZAMORA, P., MORAES, S. G., DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Quím. Nova*, São Paulo, **25**: 1, 2002.

KNOX, W. J. Medicinal compound. US 1210949 A, 1917.

LOPES, R. V. V. Poliuretanas obtidas a partir dos óleos de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) – Preparação e caracterização. [Tese de Doutorado] Brasília, Brasil: Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2009.

MANDELBAUM, S. H., DI SANTIS, E. P., MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An bras Dermatol*, **78** (4):393-410, 2003 a.

MANDELBAUM, S. H., DI SANTIS, E. P., MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An bras Dermatol*. **78** (5):525-542, 2003 b.

MANHEZI, A. C., BACHION, M. M., PEREIRA, A. L.. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. *Rev. bras. enferm.* Brasília. **61**: 5, 2008.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G., PEREZ-DAVISON, L.R.G., DELAPORTE, R.H. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. *Revista Española de Ozonoterapia*, **2** (1):121-139, 2012.

MENDONÇA, R. J., COUTINHO NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*. **84** (3):257-62. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. Brasília: MS; 2002.

MIRABAL, J. M., MENENDEZ CEPERO, S. A., DIAZ RUBI, V.F., GARCIA L. A. F., LEDEA LOZANO, O. E., DIAZ GOMEZ, M. F., LEZCANO LASTRE, I. D. Method for obtaining ozonized oils and vegetable fats and use of said products for pharmaceutical and cosmetic purposes. WO 03/085072 A1, 2003.

MIRABAL, J. M.; CEPERO, S. A. M.; MENÉNDEZ, L. E.; RUBI, W. F. D.; GARCIA, L. A. F.; REGUEIFEROS, M. C. G. Aceite de girassol ozonizado para uso terapêutico. CU 22749 A1, 2002.

MORAIS, G. F. C., OLIVEIRA, S. H. S., SOARES, M. J. G. O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. *Texto Contexto Enferm. Florianópolis*, **17**(1): 98-105, 2008.

MOREIRA, N. X., CURI, R., MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. **24**: 105-123, 2002.

MOLAREDA, M. A. G.; DALL'AGLIO, R.; MELEGARI, P. Composition comprising ozonized oils and synthetic products and their use in pharmaceutical compositions in human and veterinary medicine. WO 0137829 A1, 2001.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, M7-A3. 3rd ed. Villanova, p: 13–7. 1993.

NEEL, W. D. Processo of producing a medicament. US 925590 A, 1909.

NOUROOZ-ZADEH, J., TAJADDINI-SARMADI, J., BIRLOUEZ-ARAGON, I., WOLFF, S. Measurement of Hydroperoxides in Edible Oils Using the Ferrous Oxidation in Xilenol Orange Assay. *J. Agri. Food Chem.*, **43**(1):17–21,1995.

OLIVEIRA, J. T. C.; Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em feridas. [Dissertação de Mestrado] São Paulo, Brasil: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, 2007.

PEREZ, R. R., NUNEZ, S. A., BALUJA, C., OTERO, M. L. Ozonation kinetics of glucosamine and N-acetyl glucosamine in aqueous medium. *Ozone Sci. Eng.* **17**(4):463-467, 1995.

PRYDE E.H., ANDERS D. E., TEETER H. M., COWAN J. C. The ozonization of methyl oleate. *J Org Chem.* **25**:618–621, 1960.

RICHAUD, E., FARCAS, F., FAYOLLE, B., AUDOUIN, L., VERDU, J. Hydroperoxide titration by DSC in thermally oxidized polypropylene. *Polymer Testing.* **25**: 829 – 838, 2006.

SANO, S. M., RIBEIRO, J. F., BRITO, M. A., *Baru: biologia e uso*. Embrapa CPAC: Platina, 2004. (Documentos, 116)

SANTROCK, J., GORSKI, R. A., O'GARA, J. F. Products and mechanism of reaction of ozone with phospholipids in unilamellarphospholipvisicles. *Chem. Res. Toxicol.* **5**: 134-141, 1992.

SECHI, L. A., LEZCANO, I., NUÑEZ, N., ESPIM, M., DUPRE, I., PINNA, A. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J. Appl. Microbiol.* **90** (2): 279, 2001.

SINGER A. J., CLARK R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **341**: 738-746. 1999.

SEGA, A., ZANARDI, I., CHIASSERINI, L., GABBRIELLI, A., BOCCI, V., TRAVAGLI, V., Properties of sesame oil by detailed ¹H and ¹³C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value,

peroxide value and viscosity measurements. *Chem. Phys. Lipid.* **163**: 148-156, 2011.

SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Volume 2, 6th Edition. John Wiley & Sons, 2005.

SHARMA, V., KUNDU, P.P. Addition polymers from natural oils – A review. *Prog. Polym. Sci.* **31**: 11, 983, 2006.

SNATURAL TECNOLOGIAS AMBIENTAIS LTDA, 2011. <http://www.snatural.com.br/Tratamento-Agua-Ozonio.html>, acessado em 17 de janeiro de 2013.

SORIANO, N. U., MIGO, V. P., MATSUMURA, M. Ozonation of sunflower oil: Spectroscopic Monitoring of the Degree of unsaturation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**:12, 997, 2003 a.

SORIANO, N. U., MIGO, V. P., MATSUMURA, M. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. *Chem. Phys. Lipid.* **126**: 133-140, 2003 b.

TAKEMOTO, E., OKADA, I. A., GARBELOTTI, M. L., TAVARES, M., AUED-PIMENTEL, S. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **60**(2): 113-117, 2001.

TELLEZ, G. M., LOZANO, O. L., GÓMEZ, M. F. D. Measurement of peroxide species in ozonized sunflower oil. *Ozone Sci. Eng.* **28**: 181-185, 2006.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. *Microbiologia*. Artmed, 8. Ed, 2005.

TOSCANO, M. C., MENGUE, S. S. Avaliação do plano de reorganização da atenção a hipertensão arterial e ao *diabete mellitus* no Brasil *Ministerio da Saude - Organizacao Pan-Americana da Saude Brasilia*; ed MS. p.13 , 2004.

TWOMBLY, A. H. Composition yielding ozone. US 984722 A, 1911.

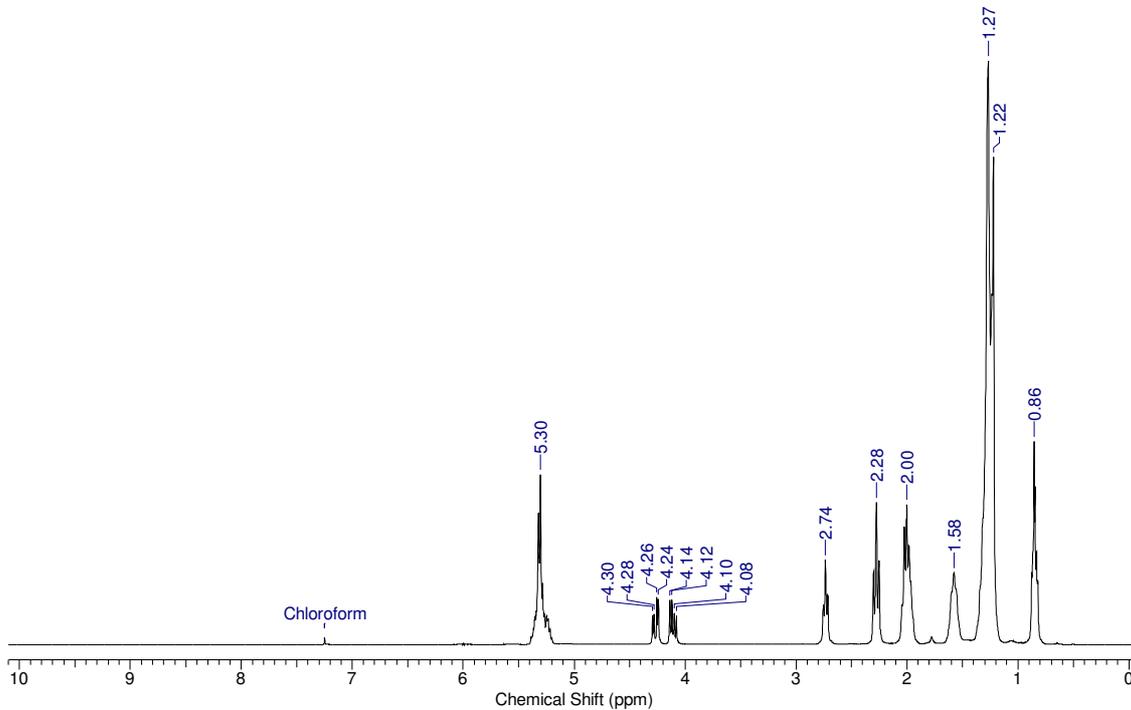
VALACCHI, G, FORTINO, V, BOCCI V. The dual action of ozone on the skin. *Br. J. Dermatol.* **153**: 1096–1100, 2005.

VIANNI, R., BRAZ-FILHO, R., Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. *Quim. Nova*, **19**:4, 400, 1995.

ZANARDI, I., TRAVAGLI, V., GABBRIELLI, A., CHIASSERINE, L., BOCCI, V. Physico-Chemical Characterization of Sesame Oil Derivatives. *Lipids.* **43**: 877, 2008.

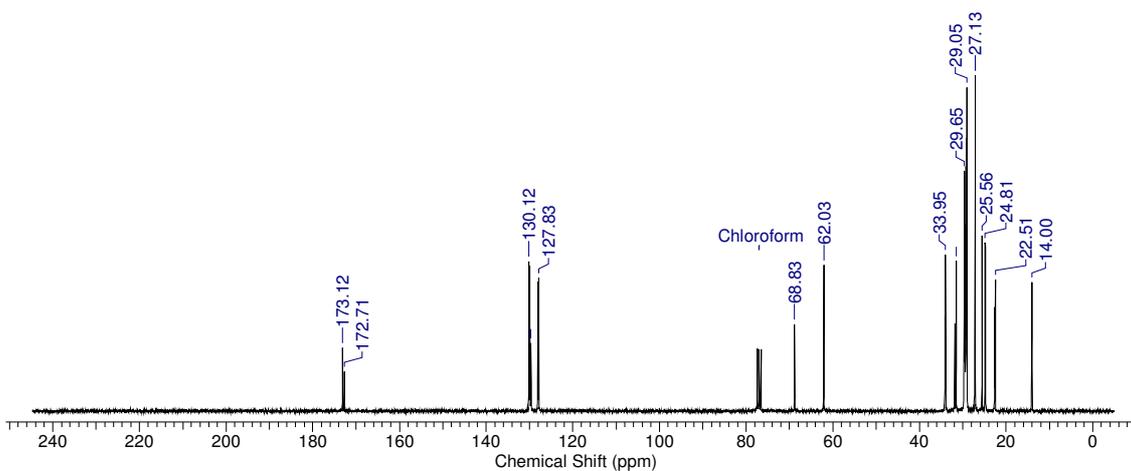
ANEXOS

Acquisition Time (sec)	4.3778	Date	05 Apr 2011 11:40:50		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	7485.03		
Temperature (degree C)	27.000				



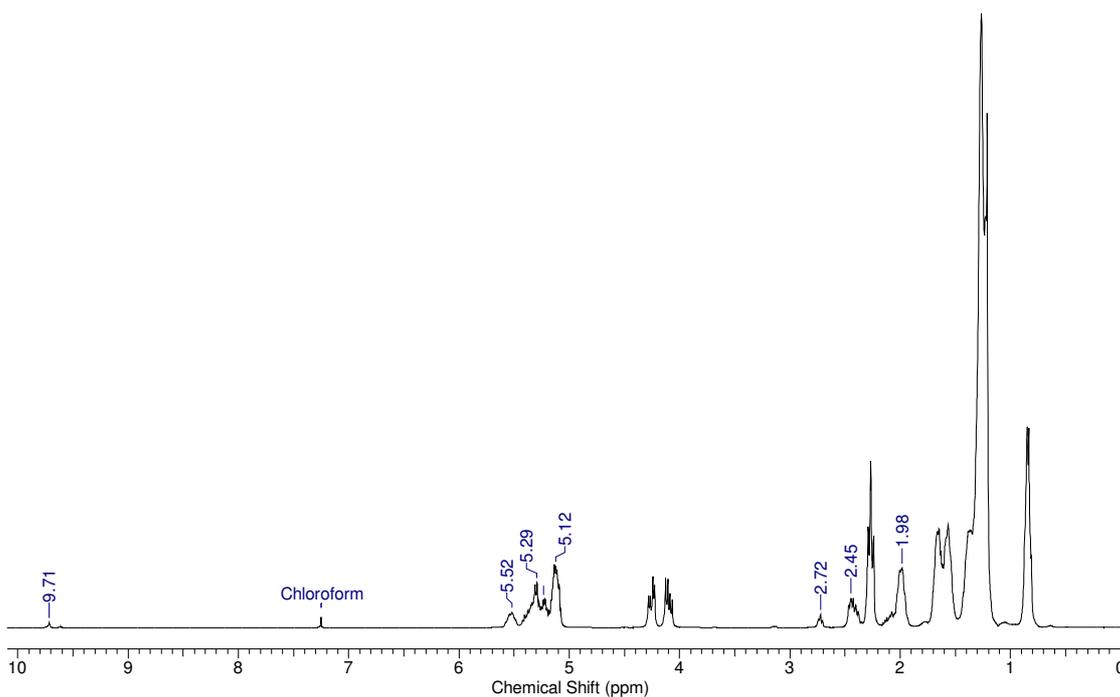
E1- Espectro de RMN ¹H do óleo de girassol, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	26 Jul 2011 11:10:56		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA08_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	3737
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39		
Temperature (degree C)	27.000				



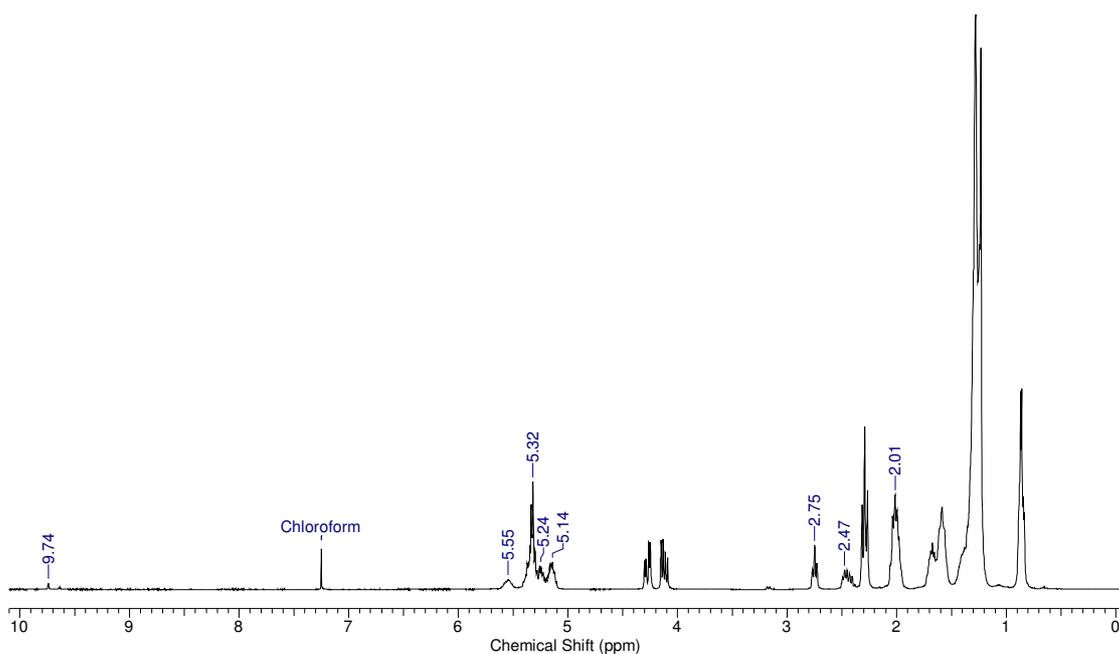
E2- Espectro de RMN ¹³C do óleo de girassol, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Date	25 Apr 2011 17:06:32		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA05_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27		
Temperature (degree C)	27.000				



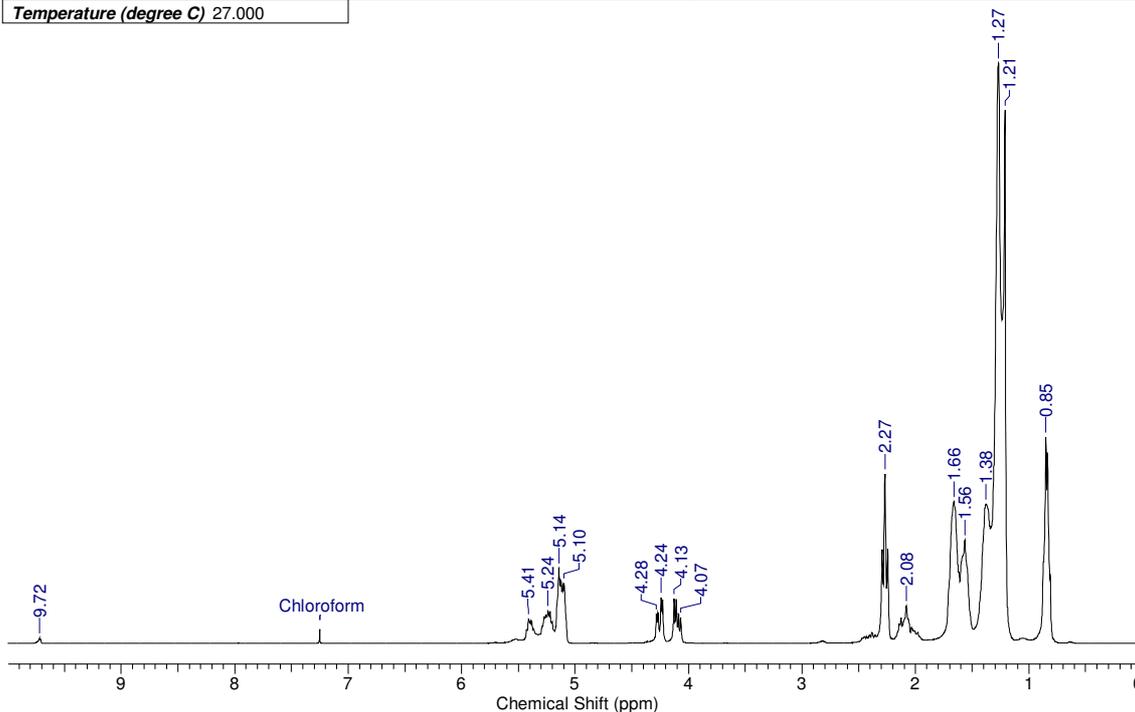
E3: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 6 h, em CDCl_3 .

Acquisition Time (sec)	6.8420	Date	07 Apr 2011 11:49:20		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA-04_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27		
Temperature (degree C)	27.000				



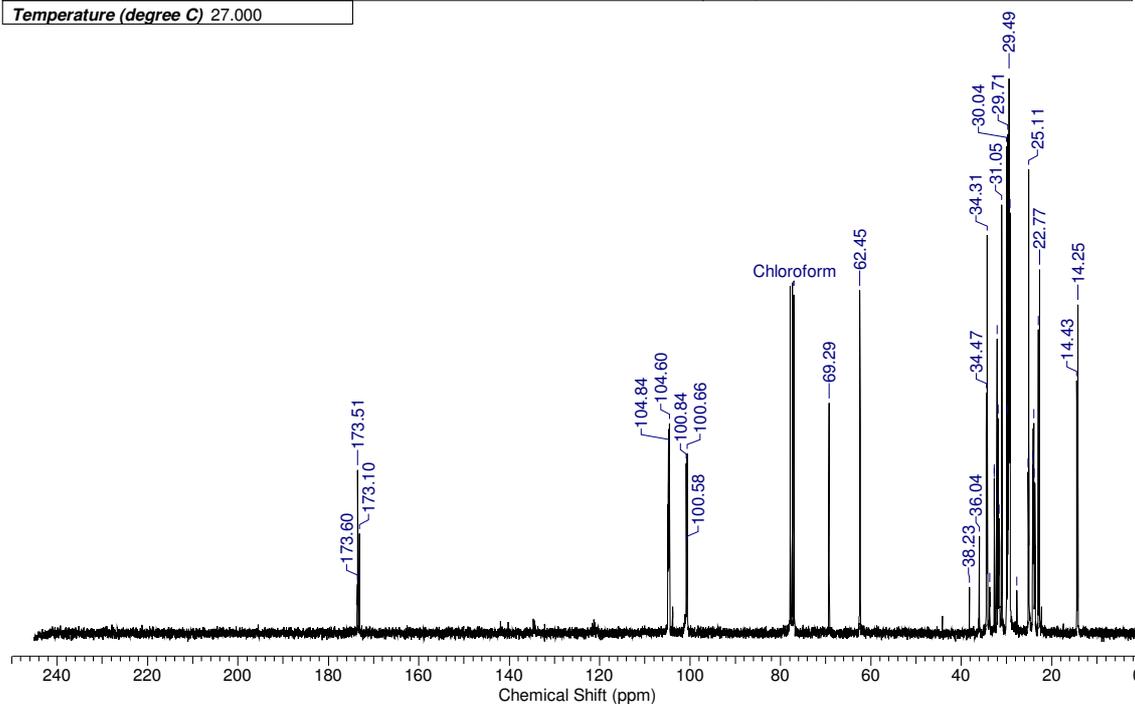
E4: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 12 h, em CDCl_3

File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA-06_001001r		
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H
Original Points Count	32768	Points Count	65536
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27
Temperature (degree C)	27.000		



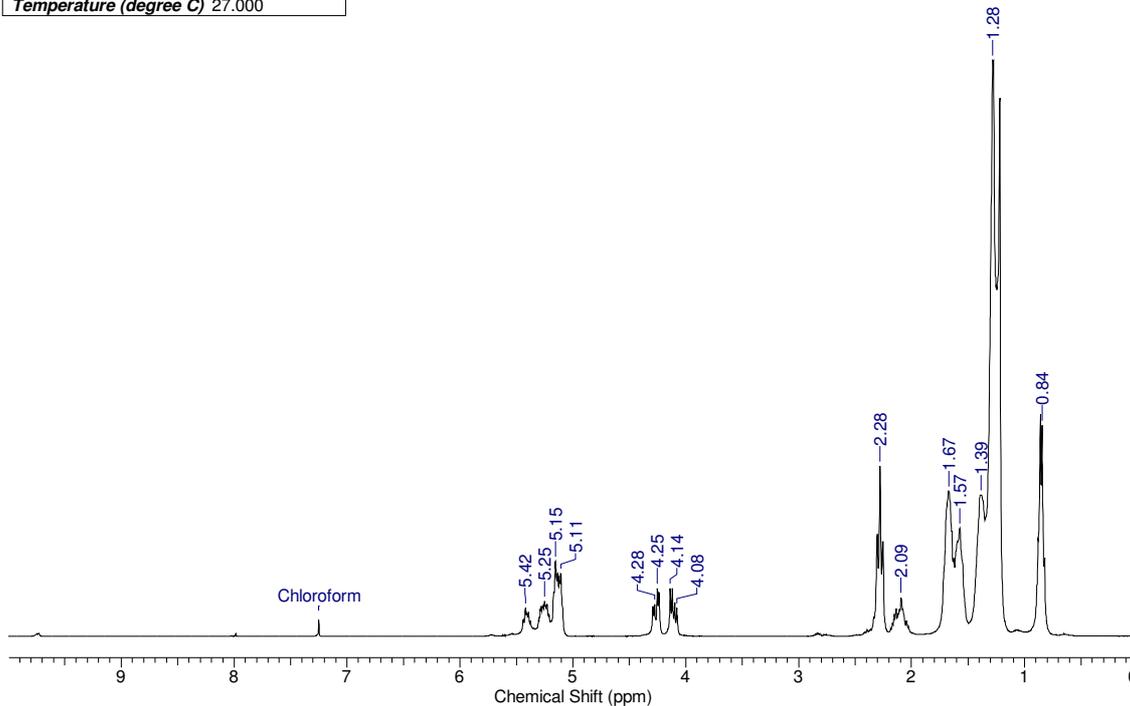
E5: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 24 h, em CDCl_3

Acquisition Time (sec)	0.8700	Date	12 May 2011 17:58:40
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA-06_003001r		
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	^{13}C
Original Points Count	16384	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
Temperature (degree C)	27.000		



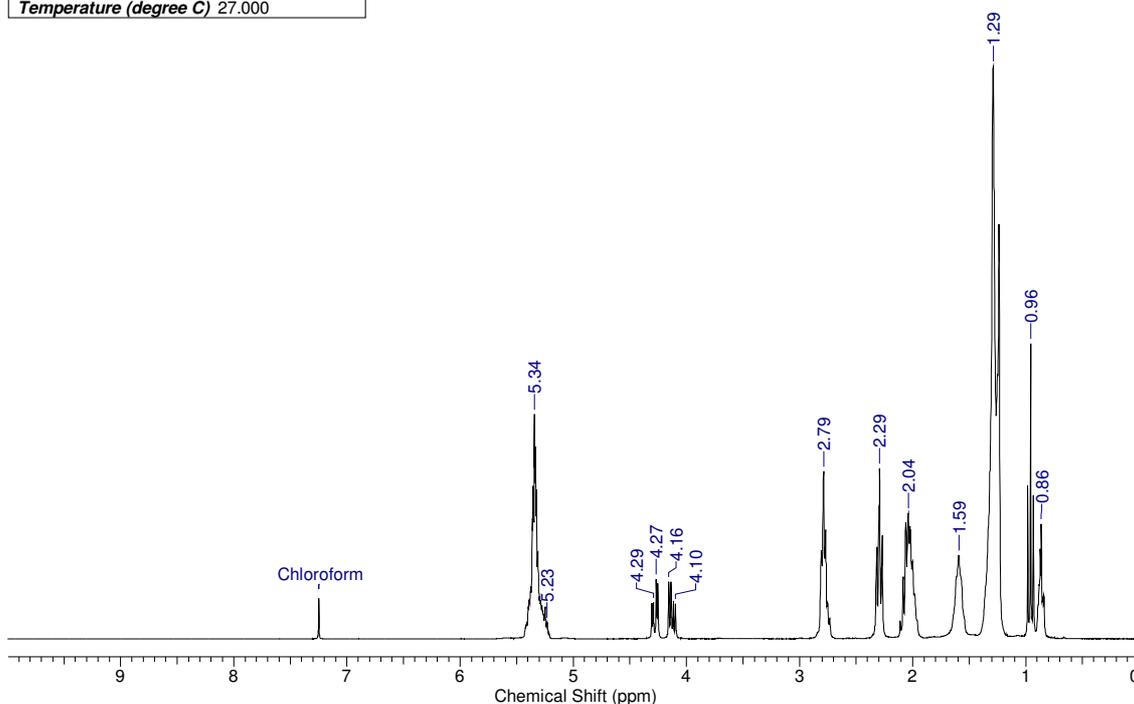
E6: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de girassol ozonizado por 24 h, em CDCl_3

Acquisition Time (sec)	6.8420	Date	04 Jul 2011 15:50:50		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA07_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27		
Temperature (degree C)	27.000				



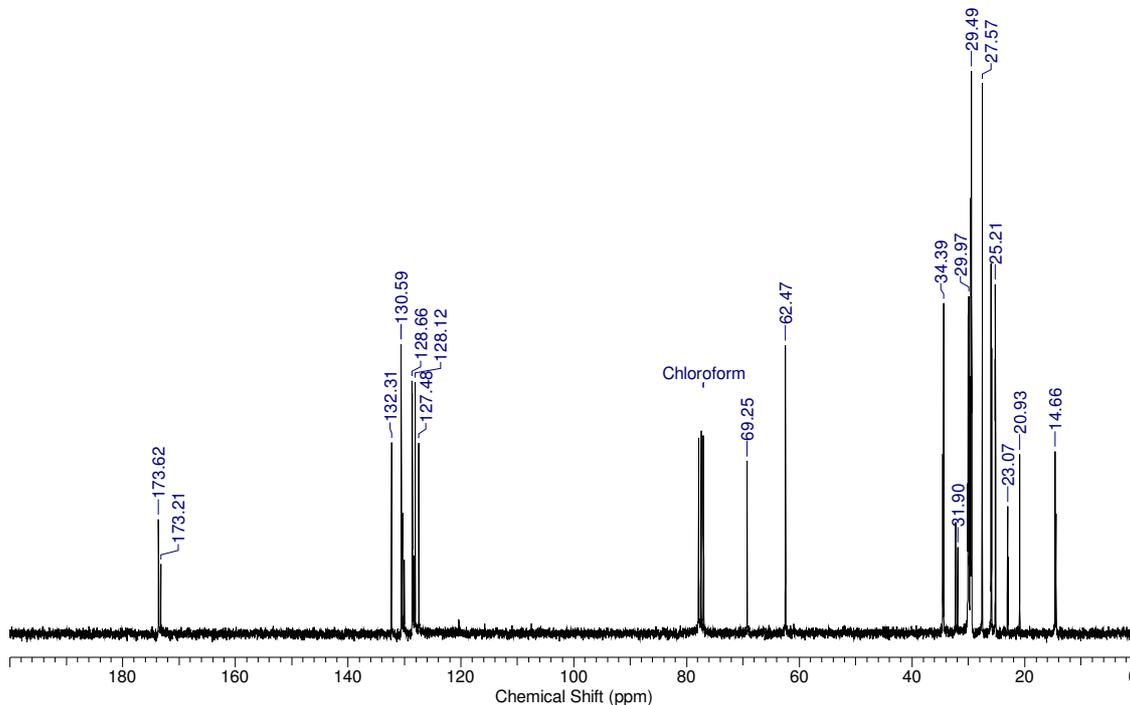
E7: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 36 h, em CDCl_3 .

Acquisition Time (sec)	6.0555	Comment	1H- CDCl_3 - NRAL01 - Nathalia		
Date	24 Oct 2011 09:33:02				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRAL01_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5411.26		
Temperature (degree C)	27.000				



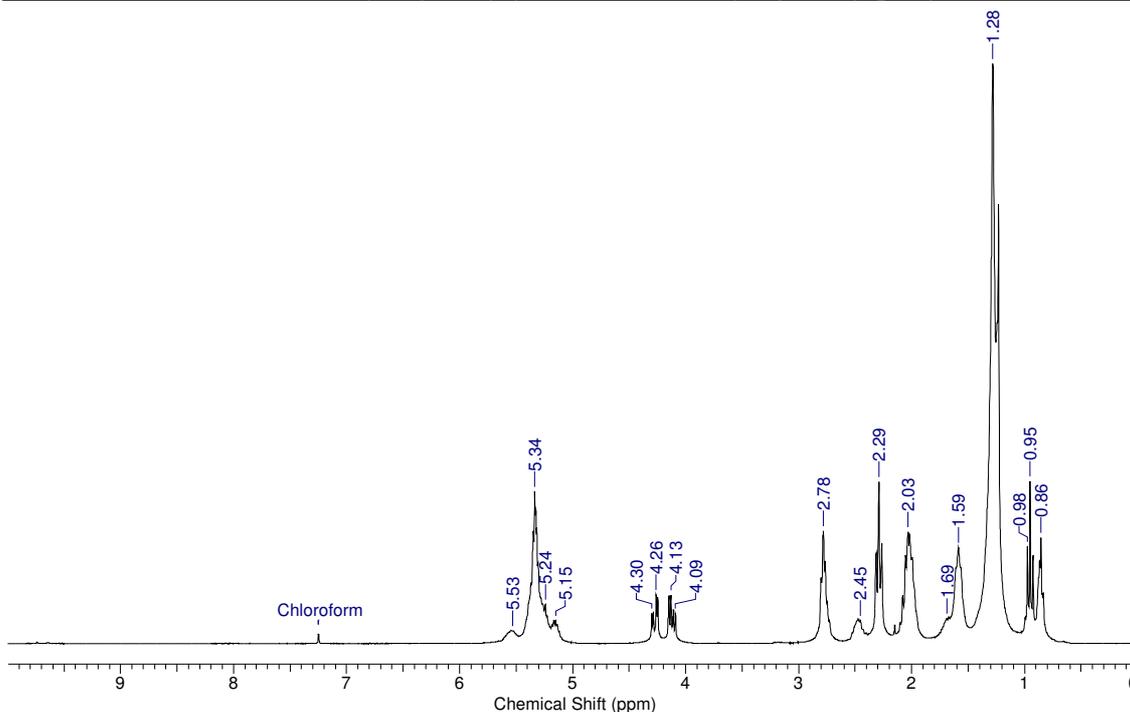
E8: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça em CDCl_3

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C- CDCl3 - NRAL01 - Nathalia		
Date	07 Nov 2011 10:23:20				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRAL01_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	1336
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zpgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



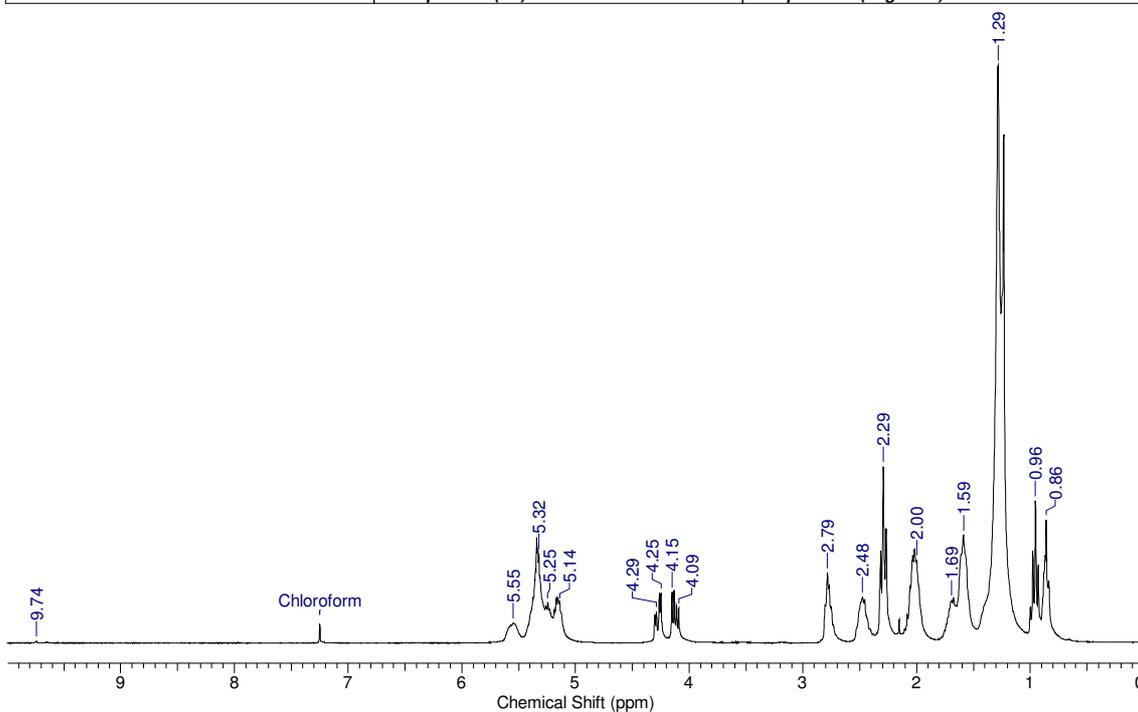
E9: Espectro de RMN ^{13}C do óleo de linhaça, em CDCl_3 .

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - NRALA02 - Nath - AB		
Date	05 Feb 2013 14:45:28				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRALA02_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



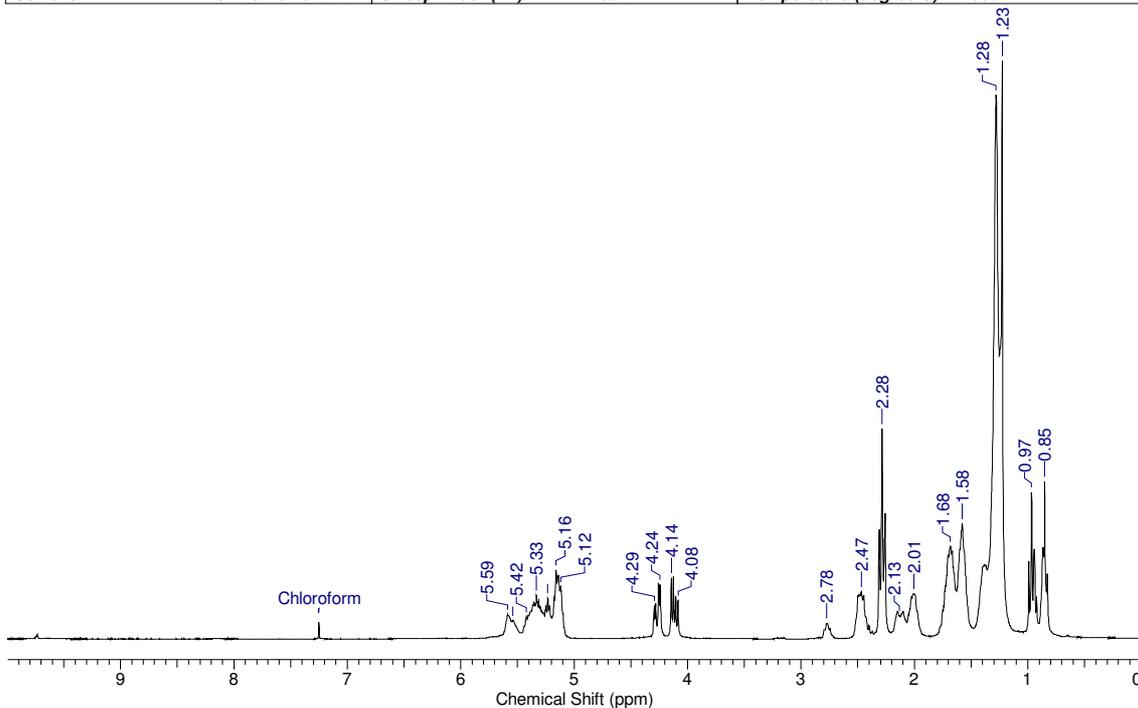
E10: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 6 h, em CDCl_3

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCI3 - NRALA03 - Nath - AB		
Date	05 Feb 2013 15:41:00				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRALA03_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



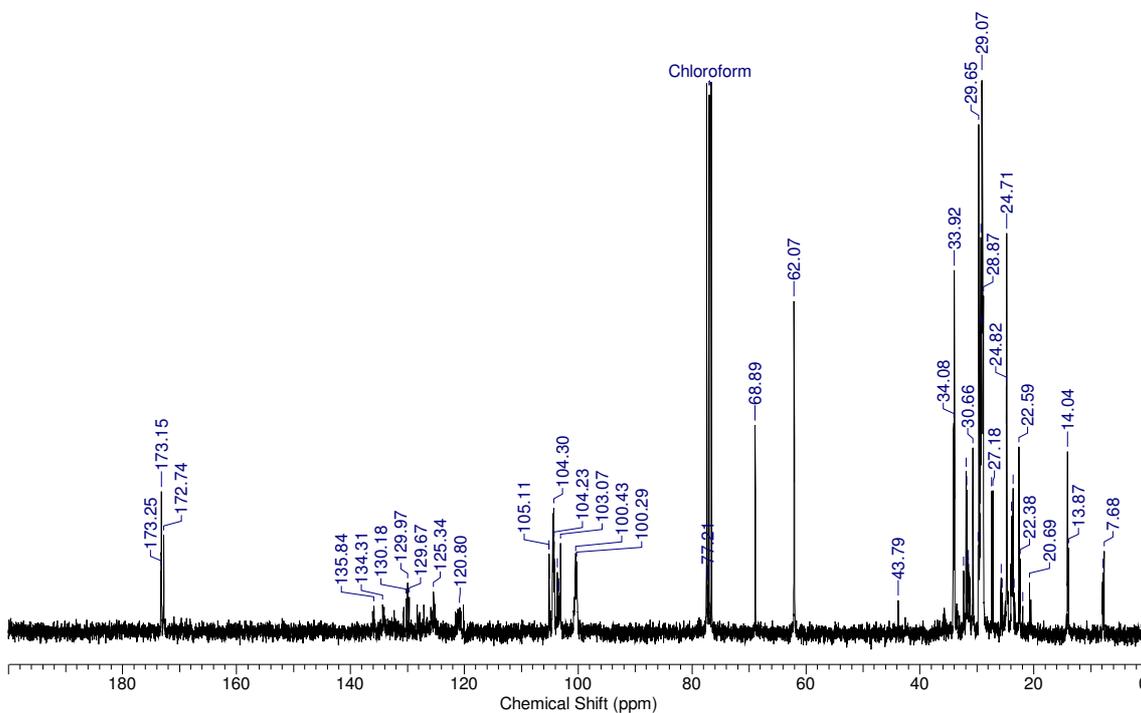
E11: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 12 h, em CDCl_3

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCI3 - NRALA05 - ab - nath		
Date	23 Jan 2013 09:27:08				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRALA05_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



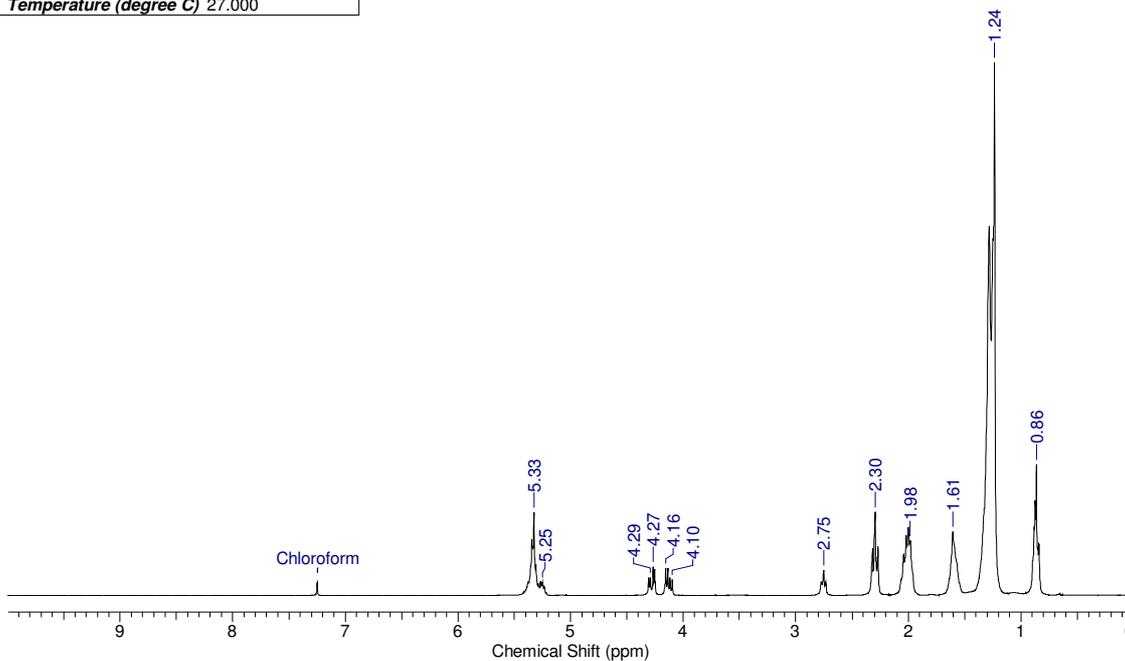
E12: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 24 h, em CDCl_3

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C - CDCl3 - NRALA05 - ab - nath
Date	24 Jan 2013 10:39:50		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRALA05_003001r		
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C
Original Points Count	16384	Points Count	32768
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39
		Number of Transients	3628
		Pulse Sequence	zgpg30
		Temperature (degree C)	27.000



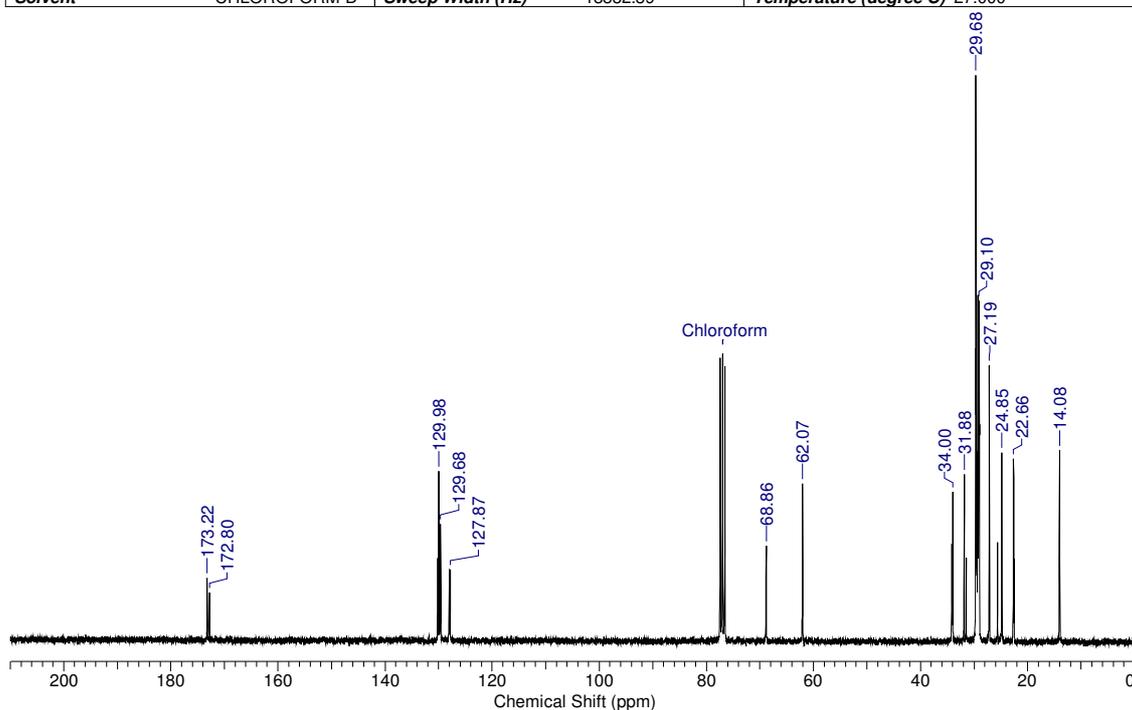
E13: Espectro de RMN ¹³C do óleo de linhaça ozonizado por 24 h, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - NRAB01 - AB - Nathalia
Date	24 Jul 2012 13:14:56		
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRAB01_001001r		
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H
Original Points Count	32768	Points Count	65536
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27
Temperature (degree C)	27.000	Number of Transients	8
		Pulse Sequence	zg



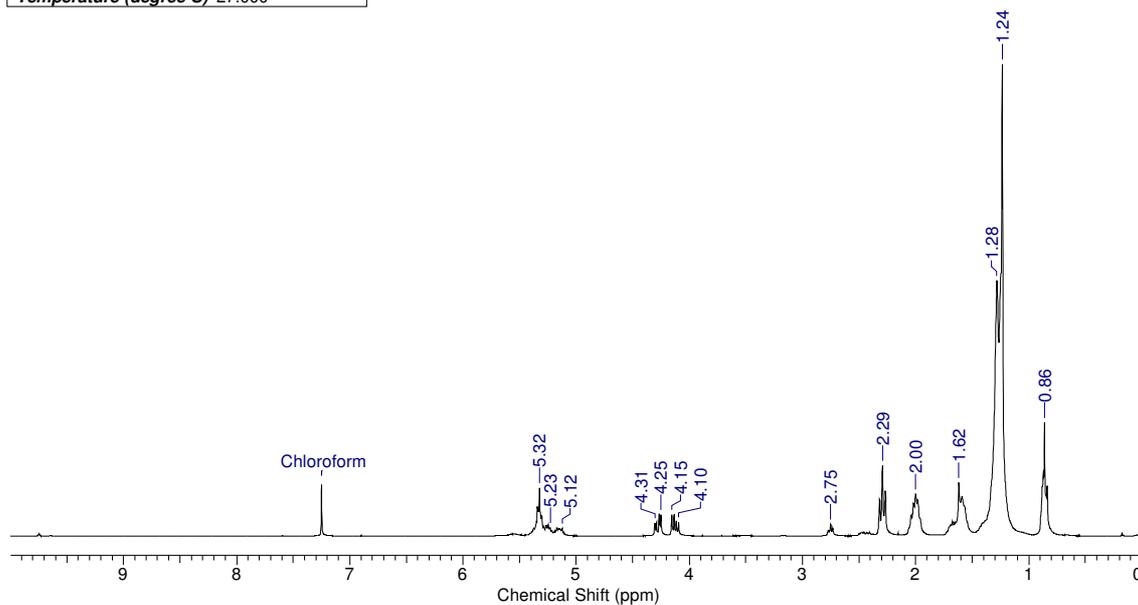
E14: Espectro de RMN ¹H do óleo de baru, em CDCl₃

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C- CDCI3 - NRAB01 - AB - Nathalia		
Date	28 Aug 2012 18:27:48				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRAB01_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	3484
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zpgpg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



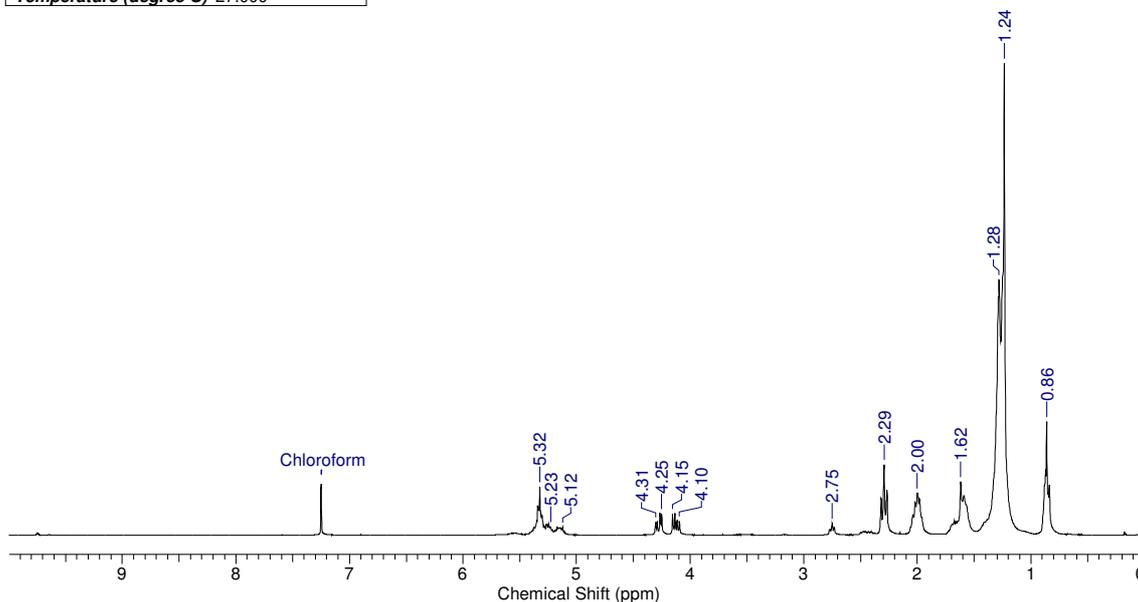
E15: Espectro de RMN ¹³C do óleo de baru, em CDCl₃

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCI3 - NRAB03 - AB - Nath		
Date	01 Aug 2012 16:52:48				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRAB03_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27		
Temperature (degree C)	27.000				



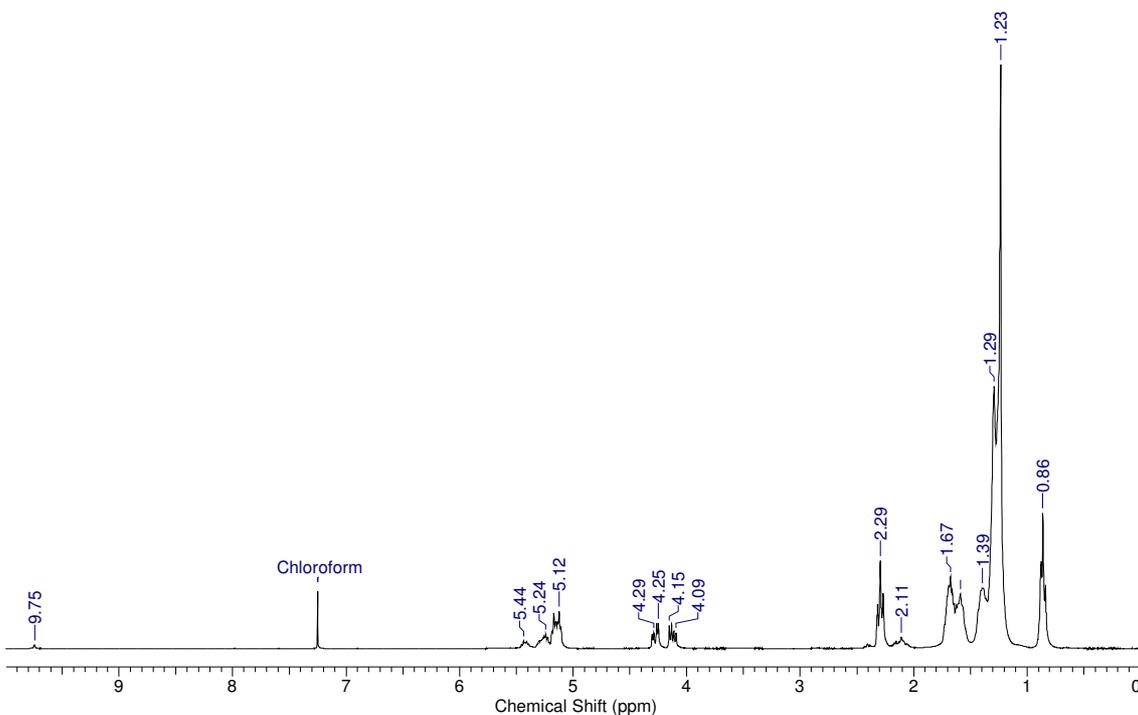
E16: Espectro de RMN ¹H do óleo de baru ozonizado por 6 h, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl ₃ - NRAB03 - AB - Nath		
Date	01 Aug 2012 16:52:48				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRAB03_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D		Sweep Width (Hz)	4789.27	
Temperature (degree C)	27.000				



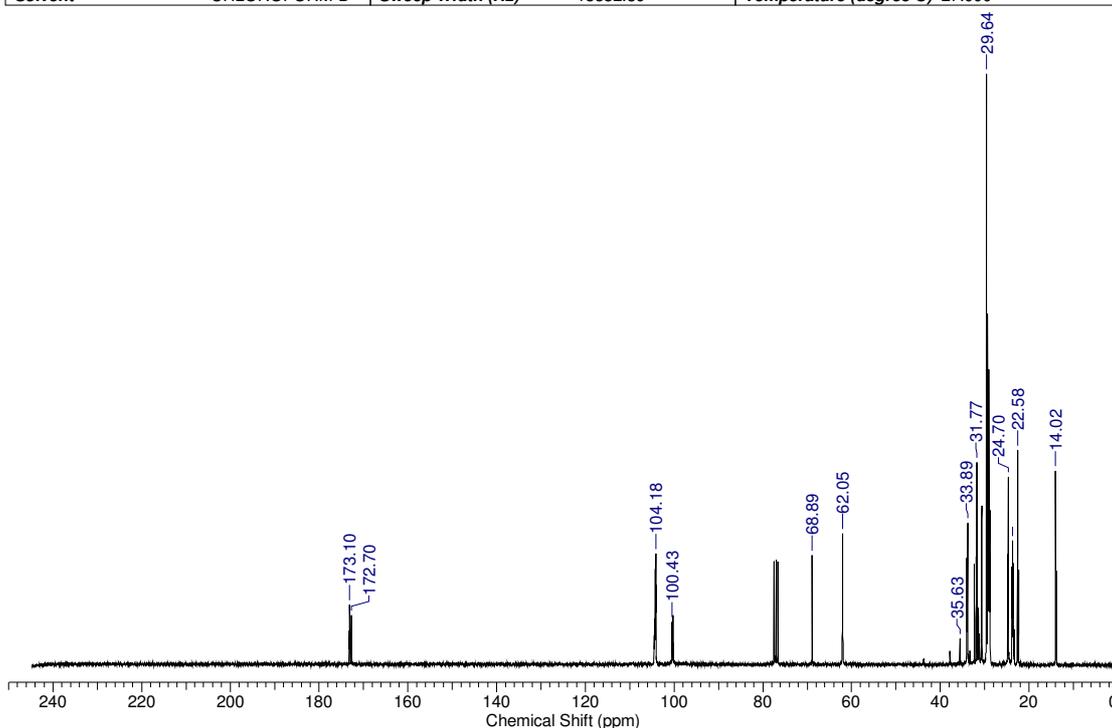
E17: Espectro de RMN ¹H do óleo de baru ozonizado por 12 h, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl ₃ - NRAB05 - nath - ab		
Date	10 Jan 2013 14:33:50				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRAB05_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D		Sweep Width (Hz)	4789.27	
Temperature (degree C)	27.000				



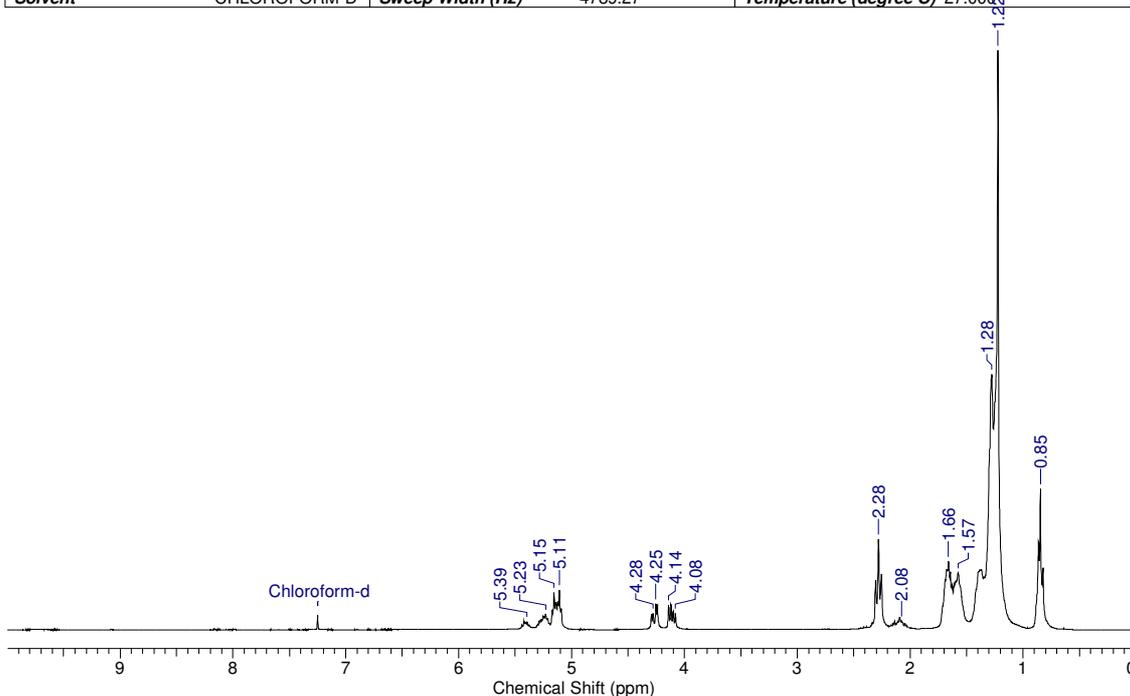
E18: Espectro de RMN ¹H do óleo de baru ozonizado por 24 h, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	0.8700	Comment	13C - CDCl3 - NRAB05 - nath - ab		
Date	22 Jan 2013 10:57:50				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRAB05_003001r				
Frequency (MHz)	75.47	Nucleus	13C	Number of Transients	4339
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zpgg30
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	18832.39	Temperature (degree C)	27.000



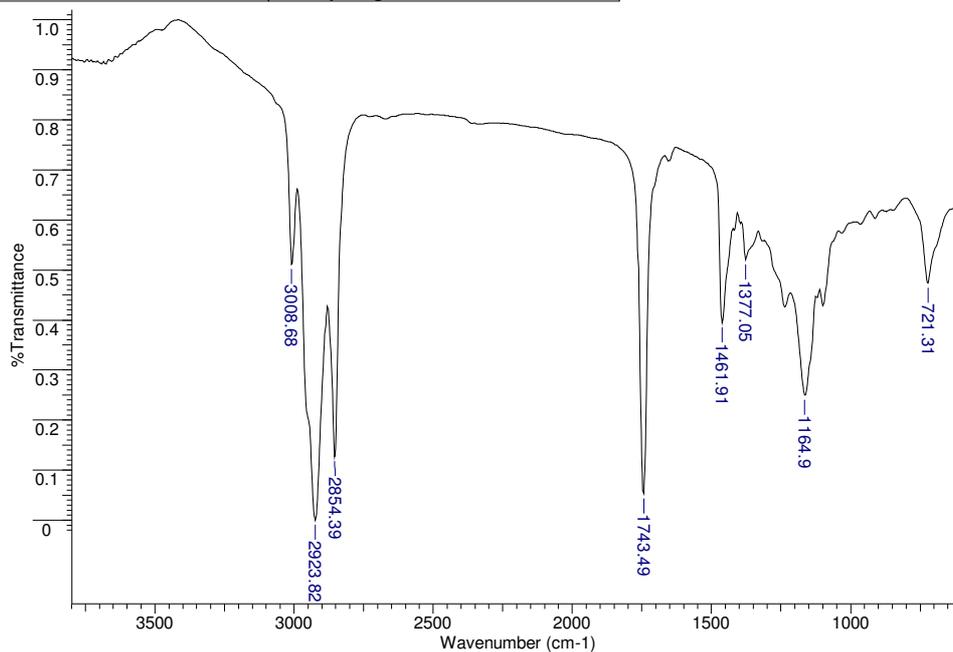
E19: Espectro de RMN ¹³C do óleo de baru ozonizado por 24 h, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - NRAB06 - nath - ab		
Date	15 Jan 2013 17:37:00				
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRAB06_001001r				
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence	zg
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000



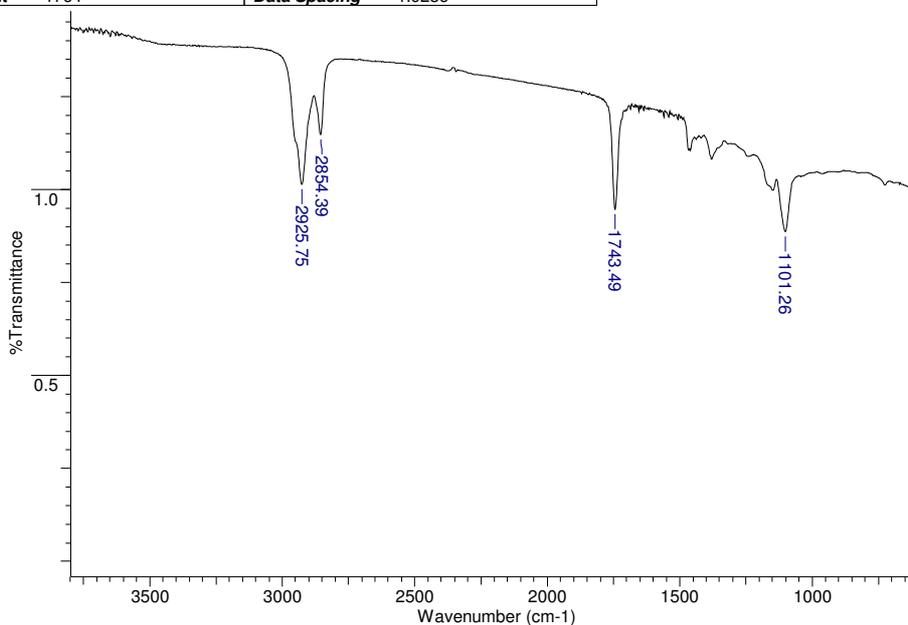
E20: Espectro de RMN ¹H do óleo de baru ozonizado por 36 h, em CDCl₃.

File Name	C:\USERS\NATHALIA\DESKTOP\ÓLEOS VEGETAIS - OZONIZADOS\IR\NRA-0.PRN				
Date	06 Feb 2012 11:10:24	Technique	Infrared	Spectral Region	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range 597.8799 - 4000.0000	
Points Count	1765	Data Spacing	1.9286		



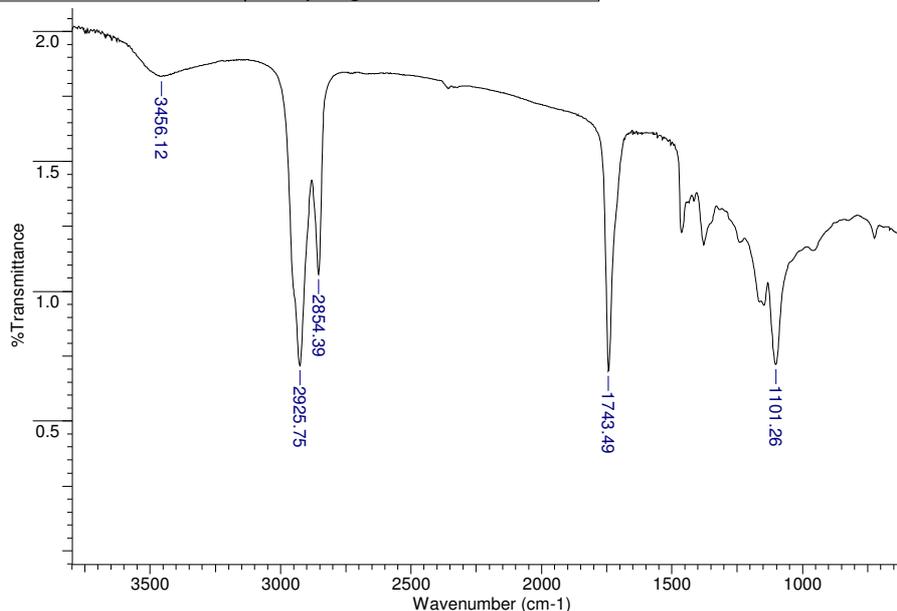
E21: Espectro de IV do óleo de girassol.

File Name	C:\USERS\NATHALIA\DESKTOP\ÓLEOS VEGETAIS - OZONIZADOS\IR\NRA05.PRN				
Date	06 Feb 2012 11:10:34	Technique	Infrared	Spectral Region	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	%Transmittance	Spectrum Range 599.8101 - 4000.0000	
Points Count	1764	Data Spacing	1.9286		



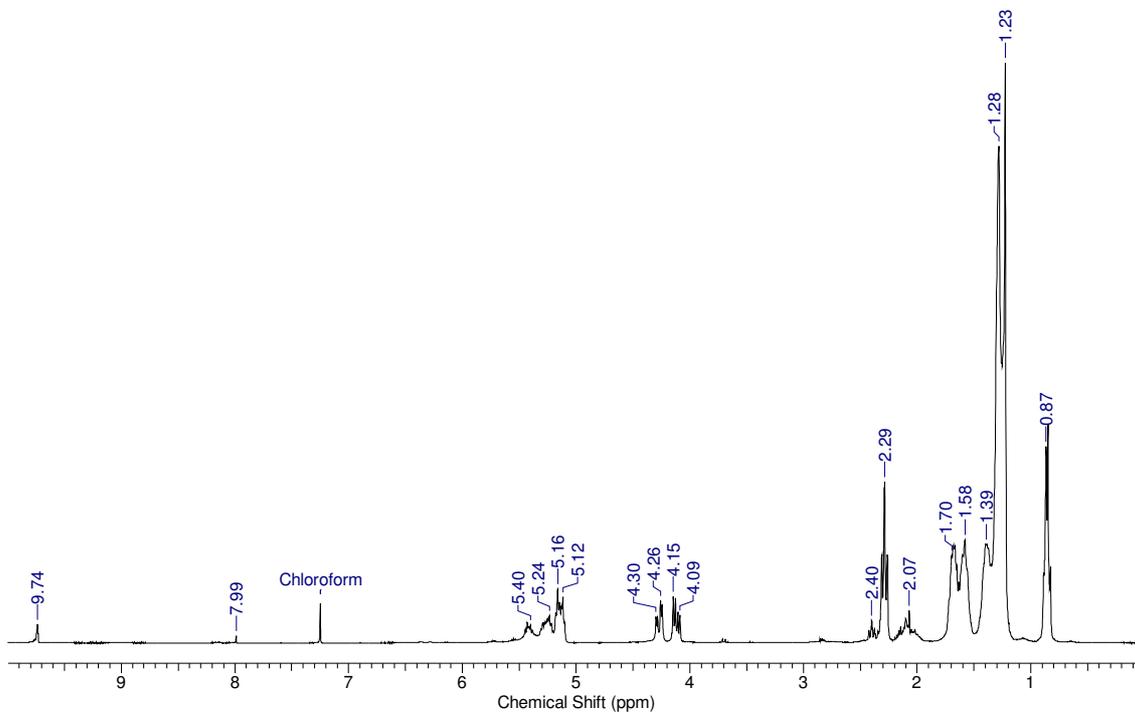
E22: Espectro de IV do óleo de girassol ozonizado por 24 h.

File Name	C:\USERS\NATHALIA\DESKTOP\ÓLEOS VEGETAIS - OZONIZADOS\IR\NRAH03.PRN		
Date	06 Feb 2012 11:10:44	Technique	Infrared
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	%Transmittance
Points Count	1764	Data Spacing	1.9286
		Spectral Region	IR
		Spectrum Range	599.8101 - 4000.0000



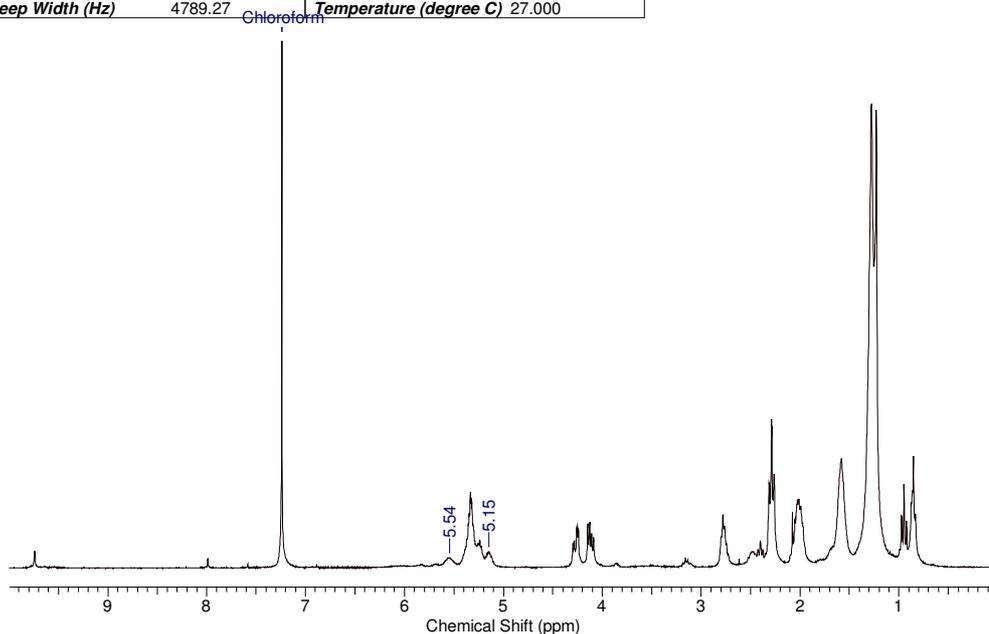
E23: Espectro de IV do produto gelificado.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Date	13 Sep 2011 16:21:36
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\NRA0A-01_001001r		
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	¹ H
Original Points Count	32768	Points Count	65536
Solvent	CHLOROFORM-D	Pulse Sequence	zg
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	4789.27



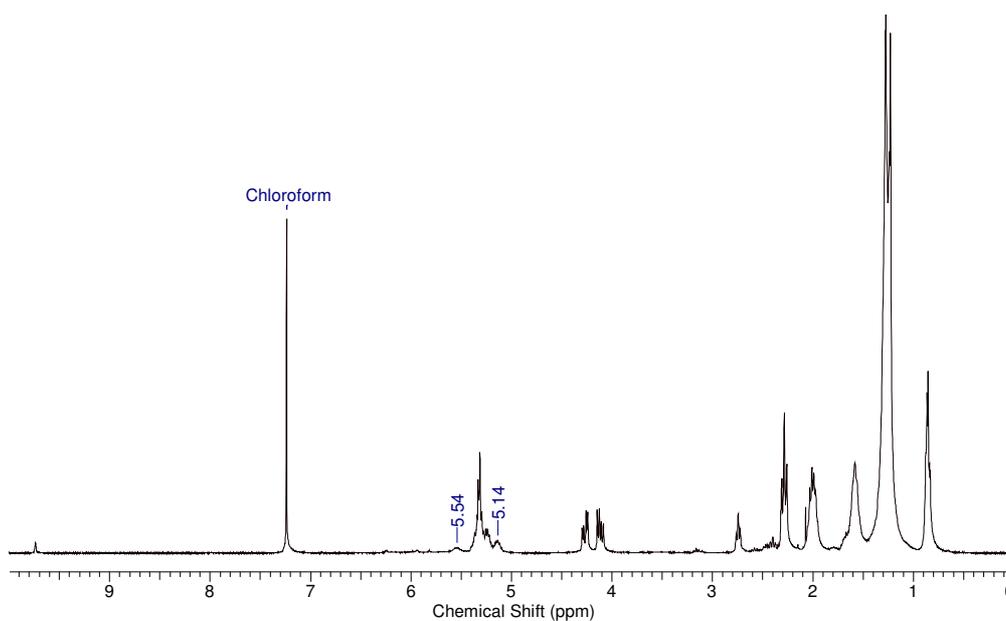
E24: Espectro de RMN ¹H do produto gelificado, em CDCl₃.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - NRAIP04 - ab - nath	
Date	05 Feb 2013 15:14:34			
File Name	C:\Users\Nathalia\Dropbox\RMN_AB_LP4\NRAIP04_001001r	Frequency (MHz)	300.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	8	
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg	
Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000	



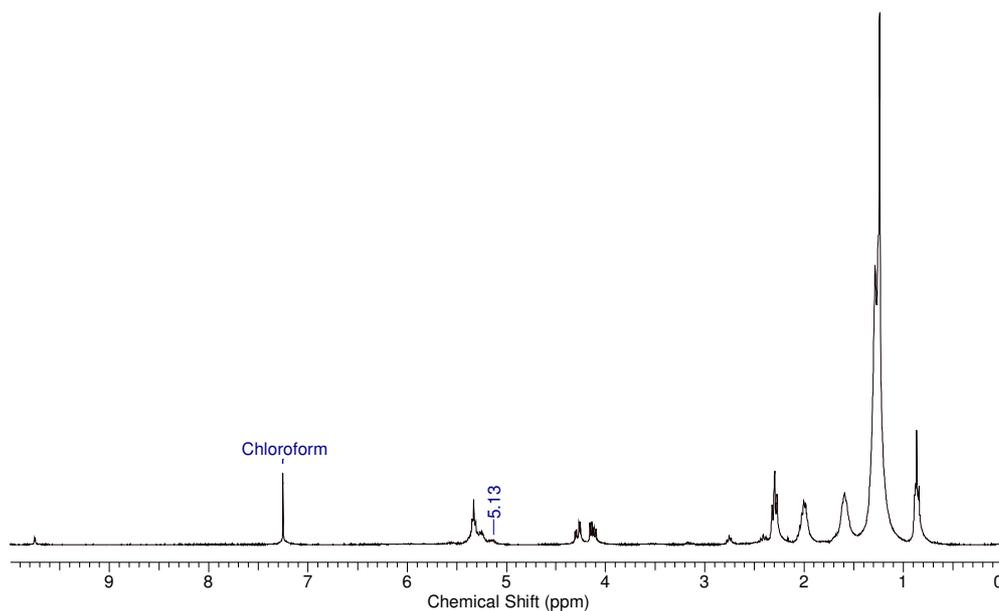
E25: Espectro de RMN ^1H do óleo de linhaça ozonizado por 12 h após 24 h de reação com iodeto de potássio.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 - NRAIP05 - nath - AB	
Date	14 Feb 2013 14:36:02			
File Name	C:\Users\Nathalia\Dropbox\RMN_AB_LP4\NRAIP05_001001r	Frequency (MHz)	300.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	8	
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg	
Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000	



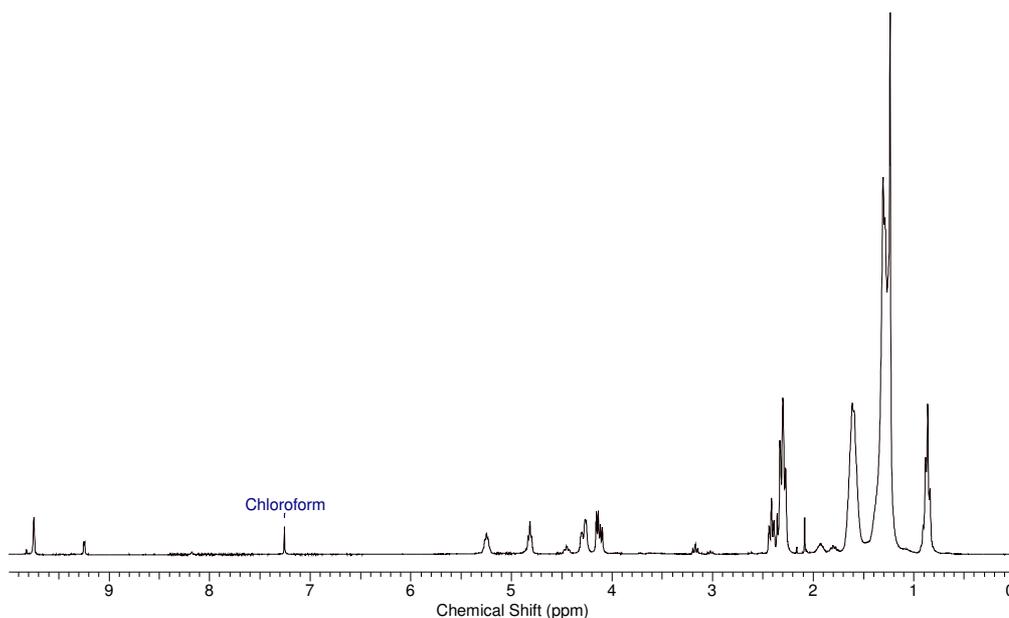
E26: Espectro de RMN ^1H do óleo de girassol ozonizado por 6 h após 24 h de reação com iodeto de potássio.

Acquisition Time (sec)	6.8420	Comment	1H - CDCl3 -NRAIP07 - nath - AB	
Date	14 Feb 2013 14:51:14			
File Name	C:\Users\Nathalia\Dropbox\RMN_AB_LP4\NRAIP07_001001r	Frequency (MHz)	300.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	8	
Points Count	65536	Pulse Sequence	zg	
Sweep Width (Hz)	4789.27	Temperature (degree C)	27.000	
		Solvent	CHLOROFORM-D	



E27: Espectro de RMN ^1H do óleo de baru ozonizado por 6 h após 24 h de reação com iodeto de potássio.

Acquisition Time (sec)	5.4657	Comment	1H - CDCl3 -NRAPG02 - AB NATHALIA-	
Date	27 Sep 2012 10:40:02			
File Name	C:\Users\Nathalia\Desktop\Óleos Vegetais - Ozonizados\FIDs\Novos 2\NRAPG02_001001r			
Frequency (MHz)	300.13	Nucleus	1H	Number of Transients
Original Points Count	32768	Points Count	65536	Pulse Sequence
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)
				27.000



E28: Espectro de RMN ^1H do oleogel após índice de peróxido.