

Universidade Brasil – Campus Itaquera
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

***Caracterização de Óleo de Girassol Ozonizado em Diferentes
Tempos Usando Espectroscopia de Infravermelho com
Transformada de Fourier***

DANIELA TERESA ROSSIGNOLI UEBELE

ORIENTADORA: Profa. Dra. Laurita dos Santos
COORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

São Paulo, SP
2020

Characterization of ozonized sunflower oil by Fourier-transform infrared spectroscopy

DANIELA TERESA ROSSIGNOLI UEBELE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Área de Concentração: Sistemas de reabilitação e procedimentos terapêuticos/Novos sistemas e produtos terapêuticos e cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Laurita dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

São Paulo, SP
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

UEBELE, Daniela
U23c Caracterização de óleo de girassol ozonizado em diferentes tempos usando Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier / Daniela Uebele. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020. 90 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Laurita dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil.

1. Ozonioterapia. 2. Óleo de Girassol. 3. Análise por FTIR. 4. Lesões Cutâneas. I. Santos, Laurita dos. II. Pessoa, Rodrigo Sávio III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA TERESA ROSSIGNOLI UEBELE

“CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO EM DIFERENTES TEMPOS
USANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof(a). Dr(a) Laurita dos Santos (presidente-orientador)



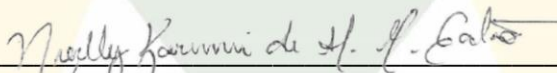
Prof(a). Dr(a) Rodrigo Sávio Pessoa (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Claudio Alberto Tellez Soto (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Carla Roberta Tim (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Nierlly Karinni de Almeida Maribondo Galvão (ITA)



Prof(a). Dr(a) Dorotéa Vilanova Garcia (UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA)

São Paulo, 14 de abril de 2020.
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Laurita dos Santos

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

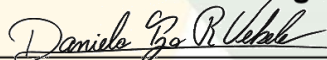
Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós -Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

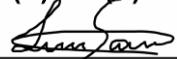
Título do Trabalho: **“CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO EM DIFERENTES TEMPOS USANDO ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER”**

Autor(es):

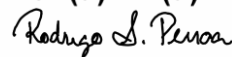
Discente: **Daniela Teresa Rossignoli Uebele**

Assinatura: 

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Laurita dos Santos**

Assinatura: 

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo Sávio Pessoa**

Assinatura: 

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Data: 14/04/2020

AGRADECIMENTOS

Nada melhor que a gratidão para demonstrar a sensação de satisfação por ter apoio para trilhar um caminho árduo, com dedicação e responsabilidade.



Todo dia percebo mais o quanto precisamos uns dos outros, e garanto que toda construção por menor e simples que pareça, realizada em conjunto, com apoio técnico e emocional, o objetivo almejado tem mais valor, tem vida, tem consistência.

O resultado desse estudo permitiu semear uma sementinha rica em vontade de projetar construções maiores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) que apoiou a realização do presente trabalho.

Ao laboratório Labmat do LPP (Laboratório de Plasmas e Processos) do Departamento de Física do Instituto de Tecnologia Aeronáutica (ITA)

Agradeço imensamente a minha orientadora - professora Dr^a Laurita dos Santos, ao coorientador Prof. Dr^o Rodrigo Savio; aos professores – Dr^a Dorotéa Vilanova Garcia e Prof Dr^o Claudio Alberto Téllez Soto; aos meus colegas de trabalho da UNISANTA e da Etec Doutora Ruth Cardoso que sempre me apoiaram muito, em especial ao Diretor Antonio de Salles Penteado e à Prof^a Me. Nilene Janine de Oliveira Seixas, por toda compreensão nos períodos de ausências na Faculdade, aos colegas que acompanharam e apoiaram todo o estudo e desenvolvimento, sempre estimulando, não citarei nomes com receio de esquecer de alguém.

Aos meus alunos da ETEC Dr^a Ruth Cardoso, do ano de 2019, que me apoiaram intensamente no período de ensaios, ficando após o horário para acompanhar o desenvolvimento deste estudo, entender sobre os softwares e a não desanimar com todo o trabalho. Um agradecimento especial a minha mãe Maria Inês Rossignoli Uebele, que sempre está por perto quando eu mais preciso, a minha irmã Cristina Uebele, sobrinha Giovanna Uebele, as amigas Liliam Yuri Yoshida e Camila Rocha Peixoto e ao meu companheiro Reinaldo Paes Junior.

Já há muito tempo, atentei para o fato de que pessoas de grandes realizações raramente relaxam e deixam as coisas acontecerem para elas. Elas correm atrás e fazem acontecer.

Leonardo Da Vinci

RESUMO

O número de pacientes estimados no Brasil e no exterior, enfatiza a necessidade de um melhor acompanhamento e tratamento de lesões cutâneas, causadas por inúmeros problemas de saúde, além do agravamento por infecções virais, bactérias, fungos e protozoários - a perspectiva é de aumento de casos em países em desenvolvimento e sub desenvolvidos. Isso se deve aos tratamentos ineficientes oferecidos pelos hospitais, com ênfase para os hospitais públicos. Esses, são motivos mais que suficientes, para se investir tempo na análise de um tratamento terapêutico de custo acessível em relação aos atuais – tal como o uso da “ozonioterapia”. Esta é reconhecida e utilizada nos 5 continentes, sendo inclusive incentivada e patrocinada pelos governos e planos de saúde de inúmeros países. Uma das formas mais seguras da utilização do ozônio em tratamentos, é por meio dos subprodutos gerados na ozonólise de óleos vegetais, que podem agir na pele, levando ao processo de desinfecção, por lise de célula. Neste trabalho a escolha foi pelo óleo de girassol devido as suas características físico-químicas. O objetivo é analisar a estrutura química do óleo de girassol ozonizado em diferentes tempos no decorrer de 90min, sem a utilização de controle da temperatura do reator de ozonólise. Para tanto, foi utilizado o processo de análise por espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR). Sendo coletados 9 espectros que foram analisados pelo processo de deconvolução, em comparação às bandas principais observadas pela segunda derivada. Os resultados mostram que houve aumento de temperatura do óleo (em torno de 10°C) durante a ozonização até o tempo de 30min. Foram analisadas três regiões dos espectros obtidos: 3050-2800cm⁻¹, 1130-1070cm⁻¹ e 1800-800cm⁻¹. Resultados estatísticos comprovam uma diferença significativa entre os sinais espectrais, com observância após o tempo de 20min do processo de ozonização óleo de girassol, com ênfase na região de 1800–1500cm⁻¹, que demonstra o rompimento das ligações duplas de carbono (C=C), quebrando a cadeia de lipídeos, e aumenta a cadeia CO₂ e assim reduz HC=CH, observado na análise dos espectros. Houve redução de intensidade da banda -CH de estiramento do fragmento -C=C-H acima da região 3000cm⁻¹, aumento das bandas de alongamento C-H dos grupos CH₃, redução da intensidade da ligação -C=C- de estiramento e intensidade constante da banda de estiramento -C, sendo que todas alterações detectadas por FTIR estão de acordo com os mecanismos de Criegee. Com estas observações pode-se reiterar o quão útil é a espectroscopia FTIR para as análises de alterações de compostos. Seguindo os estudos com apoio de colaboradores, foi efetuado ensaios iniciais da aplicação das amostras do óleo de girassol ozonizado, ampliando até o tempo de 120 minutos, em lesões cutâneas em ex-vivo em modelo animal, utilizando o mesmo processo de análise, observando se houve alterações entre os espectros. Na análise estatística essas alterações são sutis, não sendo suficiente para obter resultados. Para isso, faz-se necessária a análise em uma região mais ampla do espectro. Não foi possível obter evidência de seus benefícios no processo cicatricial. Necessitando de estudos aprofundados, levando em conta outros fatores relevantes ao estudo.

Palavras Chaves: Ozonioterapia, Óleo de girassol, Análise por FTIR, Lesões cutâneas.

ABSTRACT

The estimated number of patients in Brazil and abroad, emphasizes the need for better monitoring and treatment of skin lesions, caused by numerous health problems, in addition to worsening by viral infections, bacteria, fungi and protozoa - the prospect is of increasing cases in developing and underdeveloped countries. This is due to the inefficient treatments offered by hospitals, with an emphasis on public hospitals. These are more than enough reasons to invest time in the analysis of an affordable therapeutic treatment compared to the current ones - such as the use of "ozone therapy". This is recognized and used on 5 continents and is even encouraged and sponsored by the governments and health plans of many countries. One of the safest ways of using ozone in treatments is through the by-products generated in the ozonolysis of vegetable oils, which can act on the skin, leading to the disinfection process, by cell lysis. In this work, the choice was for sunflower oil due to its physicochemical characteristics. The objective is to analyze the chemical structure of ozonized sunflower oil at different times over 90 minutes, without using the temperature control of the ozonolysis reactor. For that, the process of analysis by Fourier transform spectroscopy (FTIR) was used. 9 spectra were collected and analyzed by the deconvolution process, in comparison to the main bands observed by the second derivative. The results show that there was an increase in oil temperature (around 10°C) during ozonation up to 30min. Three regions of the obtained spectra were analyzed: 3050-2800cm⁻¹, 1130-1070cm⁻¹ and 1800-800cm⁻¹. Statistical results show a significant difference between spectral signals, with observance after the time of 20min of the sunflower oil ozonation process, with emphasis on the 1800–1500cm⁻¹ region, which demonstrates the rupture of the double carbon bonds (C=C), breaking the lipid chain, and increasing the CO₂ chain and thus reducing HC=CH, observed in the analysis of the spectra. There was a reduction in the intensity of the -CH band of the stretching of the -C=CH fragment above the 3000cm⁻¹ region, an increase in the CH stretching bands of the CH₃ groups, a reduction in the intensity of the -C=C- binding stretch and constant intensity of the band stretch -C, and all changes detected by FTIR are in accordance with the Criegee mechanisms. With these observations it can be reiterated how useful FTIR spectroscopy is for the analysis of changes in compounds. Following the studies with the support of collaborators, initial tests of the application of the samples of the ozonized sunflower oil were carried out, extending up to 120 minutes, in cutaneous lesions in ex-vivo in an animal model, using the same analysis process, observing whether there were changes between the spectra. In the statistical analysis, these changes are subtle, not enough to obtain results. For this, it is necessary to analyze in a wider region of the spectrum. It was not possible to obtain evidence of its benefits in the healing process. In need of in-depth studies, considering other factors relevant to the study.

Key words: Ozone therapy, Sunflower oil, FTIR analysis, Skin lesions.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Nos países em desenvolvimento como o Brasil os tratamentos das feridas, causadas por problemas de saúde, e o seu agravamento por infecções, têm sofrido um aumento considerável devido aos tratamentos ineficientes promovidos pelos hospitais públicos. Motivando a busca por um tratamento de custo baixo e fácil aplicação, sugere-se a “ozonioterapia”, que atualmente é reconhecida e utilizada por inúmeros países. Uma das formas mais seguras para sua utilização, é por meio dos óleos vegetais ozonizados. O objetivo deste trabalho é a análise química estrutural do óleo de girassol ozonizado em diferentes tempos de processo. Para isso foi utilizada a técnica de FTIR que possui certa sensibilidade para detectar as mudanças causadas pela ozonização do óleo. As análises visuais dos espectros gerados e dos cálculos estatísticos, exibem diferenças após 20 min da ozonização. Nos ensaios da aplicação óleo ozonizado em lesões (rico em lipídeos que hidrata a pele) este demonstrou ser importante na restauração da lesão e da pele, podendo auxiliar na criação dos fibroblastos que auxilia a síntese dos colágenos, principal componentes restaurador de tecidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Uso e incentivo da ozonioterapia no mundo.....	17
Figura 2 - Formação de Ozônio na estratosfera	19
Figura 3 - Posição da Camada de Ozônio na atmosfera	20
Figura 4 - Mecanismo de ação do ozônio em bactérias. 1- Bactéria; 2- Parede celular sendo atacada pelo Ozônio; 3- Oxidação da parede celular; 4, 5 e 6- Ruptura e destruição da bactéria.	21
Figura 5 - Geração do ozônio através do processo corona	23
Figura 6 - Decomposição de ozônio dissolvido em água bidestilada.....	24
Figura 7 - Ozônio combatendo microrganismo no organismo.....	25
Figura 8 - Esquema da reação de formação do óleo vegetal.....	27
Figura 9 - Ácido Linoleico (18:2 ou Omega6) e ácido oleico (18:1 ou Omega9)....	29
Figura 10 - Estruturas de ressonância da molécula de ozônio	34
Figura 11 - Proposta do mecanismo de Criegee.....	34
Figura 12 - Síntese do zwitterion(39)	35
Figura 13 - Adição de ozônio à ligação C = C produz um ozonídeo inicial instável (I), que se decompõe em composto carbonílico (II) e óxido de carbonila (III). Na ausência de qualquer solvente participante, II e III recombina para gerar principalmente 1,2,4-trioxolanos e ozonídeos poliméricos. Moléculas de água podem ser eliminadas III para dar hidroperóxidos de hidroalquila (VI) se a ozonização for realizada em meio aquoso.	36
Figura 14 - Espectrômetro FTIR da Perkin Elmer, com acessório de amostragem tipo ATR	45
Figura 15 - Processo de ozonização, com gerador de oxigênio hospitalar em uma amostra de 80ml SFO.	46
Figura 16 - Espectro FTIR do óleo de Girassol com a sobreposição de todos os sinais.	49
Figura 17 - Sinais FTIR do óleo de Girassol sem ozonização (gir0), e os demais sinais com a aplicação de ozônio em 5min na sequência de 10 em 10min até a 1ª hora e após 90min.....	50
Figura 18 - a) Sinal do girassol puro com base line região 2800 a 3050cm ⁻¹ , b) 2ª derivada, c) gaussianas geradas pela deconvolução, d) sinal original com as	

Gaussianas sobrepostas do 1º ensaio do zero_girassol_1_1_total.txt. Dados gerados pelo PeakFit e Figuras gerados no MatLab.....	51
Figura 19 - Aproximando em detalhe a região com alteração.....	53
Figura 20 - Destaca-se as alterações nesta região entre 1070 a 1110 cm^{-1} com a sobreposição dos espectros FTIR.....	57
Figura 21 - Região 1070 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} dos espectros FTIR obtidos nos diferentes tempos ozonólise do óleo de girassol	58
Figura 22 - Espectros FTIR do óleo de girassol puro e do óleo ozonizado em diferentes tempos, sobreposto, ente 2800 cm^{-1} e 3050 cm^{-1}	59
Figura 23 - Espectros obtidos das regiões classificadas como: região com lesão, região sem lesão e região próxima à lesão.....	63
Figura 24 - Dendrograma obtido para os espectros FTIR obtidos das 3 regiões classificadas: Não lesão, próxima da lesão e pele saudável.....	64
Figura 25 - Espectro grupo controle (L6) e classificação dos componentes bioquímicos encontrados na pele.....	66
Figura 26 - Boxplot para os valores de área obtidos das bandas encontradas na região 1130 – 820 cm^{-1} dos espectros FTIR considerando as amostras do grupo controle (sem aplicação de óleo).....	69
Figura 27 - Boxplot para os valores de área obtidos das bandas encontradas na região 1800 a 1130 cm^{-1} dos espectros FTIR considerando as amostras do grupo controle (sem aplicação de óleo).....	71
Figura 28 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 1088 cm^{-1}	72
Figura 29 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 1034 cm^{-1}	72
Figura 30 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 969 cm^{-1}	73
Figura 31 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 865 cm^{-1}	73
Figura 32 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 850 cm^{-1}	74
Figura 33 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando os centros de banda da região 1800 a 1130 cm^{-1}	75

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Principais propriedades físico-químicas do ozônio.	20
Quadro 2: Relação temperatura X meia vida do ozônio.	23
Quadro 3: Características físico-químicas do óleo de girassol.	30
Quadro 4: Composição de ácidos graxos do óleo de girassol, Valores de Referência: Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes - AOCS.	31
Quadro 5: Regiões espectrais do Infravermelho	37
Quadro 6: FTIR regiões espectrais selecionadas como variáveis preditoras para tratamento de dados estatísticos. Classificação ^a de acordo com Guillén e Cabo (1998). ^b de acordo com Silverstein, Bassler e Morrill (1981).....	39
Quadro 7: Relação tempo pela temperatura durante o processo de ozonólise sem o uso do banho maria para o controle da temperatura.....	52
Quadro 8: Resumo dos 10 ensaios efetuados com o PeakFit destacando as bandas que surgiram em dois tempos de ozonização	54
Quadro 9: Classificação dos grupos funcionais segundo Silverstein, Guillén e Cabo (1998)	56
Quadro 10: Resultados obtidos a partir da deconvolução com os 10 ensaios para a 3050 a 2800 cm ⁻¹	60
Quadro 11: Áreas do software PeakFit e organizada para a visualização do T50 e T60	61
Quadro 12: Classificação referente a tecido biológico, segundo literatura.	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ABOZ	Associação Brasileira de Ozonioterapia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	American Oil Chemists' Society
ATR	Attenuated Total Reflectance
AV	Valor de acidez
Evib	Energia vibracional
FDA	Food and Drug Administration
FIR	Far Infrared
FTIR	Fourier Transform Infrared
GRAS	General Recognized As Safe
h	Constante de Plank
H_2O_2	Hidroperóxido
HCA	Alise hierárquica de agrupamentos
ISCO3	Comitê Científico Internacional de Ozonioterapia
LDA	Análise discriminante linear.
n	Número quântico vibracional
nm	nanômetro
O_2	Oxigênio
O_3	Ozônio
PCA	Análises de componentes principais
PLS	Mínimos quadros parciais
ppm	partes por milhão
PV	Valor de Peróxido
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
SFO	Sunflower oil
SIMCA	Modelagem independente flexível por analogia de classe
y	Fator de Anarmonicidade
ν	Frequência Vibracional Clássica
ω	Ômega (ácido que compõe os óleos)
ν	alongamento de vibração
δ	vibração de flexão
δ_s	deformação simétrica
ν_{as}	vibração de estiramento assimétrica
ν_s	vibração simétrica de alongamento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Como Ocorre a Geração do Ozônio (O ₃).....	19
2.2	Uso Direto.....	22
2.3	Ozonioterapia	25
2.4	Óleos Vegetais	27
2.4.1	Óleos vegetais e sua importância para a saúde.....	28
2.4.2	Óleo de girassol.....	30
2.5	Armazenamento em Óleo - Processo de Ozonólise.....	31
2.6	Variações das Análises dos Óleos Vegetais	32
2.7	Como ocorre a Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier ..	37
2.8	Métodos de Classificação Utilizando a Espectroscopia por Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR).....	38
2.9	Aplicações de óleo ozonizado na Área Médica	40
2.10	Métodos de Tratamento de Lesões	41
2.11	Motivação da pesquisa.....	44
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1	Local dos experimentos.....	45
3.2	Protocolo de experimento – óleo ozonizado.....	46
3.3	Protocolo de Experimento – Aplicação do Óleo Ozonizado em Ferida Cutânea de Rato	47
3.4	Processamento e Análise dos Dados.....	47
3.5	Análise Estatística	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1	Espectros FTIR da Ozonólise do Óleo de Girassol	49
4.1.1	Análise da 1ª região 790 a 630 cm ⁻¹	53
4.1.2	Análise da 2ª Região 1800 a 800 cm ⁻¹	55
4.1.3	Análise da Sub-região 1110 a 1070 cm ⁻¹ da 2ª região	57
4.1.4	Análise da Região 3050 a 2800 cm ⁻¹ da 3ª região	59
4.2	Análise dos sinais após aplicação do óleo na pele com lesão	62
4.2.1	Resultados para a região 1130 - 820 cm ⁻¹ – grupo controle.....	67
4.2.2	Resultados para a região 1800 - 1130 cm ⁻¹ – grupo controle.....	69

4.2.3 Resultados obtidos das amostras com aplicação dos diferentes tempos de ozonização do óleo: T0, T30, T60, T90 e T120.....	71
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

Embora no Brasil não haja dados precisos referente ao número de pacientes que necessitam de tratamentos de lesões cutâneas, estima-se que quase 3 % da população sofre com este mau (POGGETTO, 2013). Além disso, aproximadamente 4 milhões de pessoas apresentam lesões crônicas ou alguma forma de complicação no processo de reparo cicatricial (MANDELBAUM, 2003). Ainda sendo necessário um maior preparo dos profissionais de saúde, com treinamento mais amplo e conhecimento para trabalhar o problema, de investimentos em pesquisa para quantificar essa população com precisão e para novos recursos e tecnologias, com menor custo e maior eficácia, sendo mais apropriado e de fácil acesso para a população (ALMEIDA et al., 2012 e MANDELBAUM, 2003).

Com o constante aumento da população da terceira idade, obesidade e diabetes junto com programas de saúde ineficientes, que enfatizam o problema de ter que tratar quase 1,5 bilhão de pessoas. Estas são afetadas por infecções cutâneas e mucosas, devido a bactérias, vírus, protozoários e dismetabolismo. Por esses motivos o uso da hidrozonioterapia como um tratamento alternativo e seu complemento com a utilização de óleos vegetais ozonizados, tem sido adotado em inúmeros países (TRAVAGLI et al.,2010).

As doenças vão desde feridas: com necrose (em pé diabético), escaras (lesões sobre pressão), pós trauma ou queimaduras; infecções virais: crônicas (herpes I e II), vírus do papiloma humano, vaginais (*Candida*), *Chlamidia* e *Trichomonas*, da mucosa retal (ragadis anal), abscessos com fístula, e para terminar úlceras aftosas da boca. São infecções raramente mortais, porém, espantosamente dolorosas; o reparo de lesões envolve um processo com inúmeras fases: coagulação do sangue, inflamação, proliferação de tecidos e remodelação, inúmeros pacientes sofrem frequentemente de diabetes ou doenças vasculares com hipóxia tecidual, outros pacientes convivem com as drogas imunossupressoras ou com infecção concomitante pelo HIV (WERDIN, 2008).

A ozonioterapia surge como uma opção terapêutica para estas patologias, que consiste no uso do ozônio na forma natural gasosa ou veiculado em água ou em diversas variedades de óleos vegetais, que em contato com o tecido lesado, reage com inúmeras biomoléculas que, ligadas, formam um sistema de vedação

antioxidante. Ao ser usada como agente terapêutico, deve ser extraído do oxigênio medicinal utilizando equipamentos adequados. A maior parte dessas biomoléculas tem função de anti-inflamatório e analgésico que, de forma simultânea à oxidação, agem proporcionando o aumento da liberação de fatores de crescimento capazes de contribuir para reparação tecidual (CHAGAS et al., 2014).

A utilização do ozônio é conhecida há mais de 170 anos e teve a primeira publicação na *THE LANCET*, em 1916 e 1917 descrevendo o uso do Ozônio durante a 1ª Guerra Mundial pelos médicos alemães e ingleses que tratavam feridas dos soldados. Em 1935, Erwin Payr professor em Leipzig, importante cirurgião austríaco, optou em utilizar ozônio em seu tratamento com o seu cirurgião-dentista Edward A. Fisch, e logo após apresentou a publicação "O tratamento com ozônio na cirurgia". Devido às dificuldades da época em ter materiais resistentes à oxidação do ozônio como o plástico para utilização do gás no local da lesão ou mesmo para a insuflação retal, desmotivando o avanço das pesquisas por um período (ABOZ, 2019). As técnicas de uso da ozonioterapia são difundidas mundialmente. A prática ocorre nos 5 continentes há várias décadas (Figura 1).

Figura 1 - Uso e incentivo da ozonioterapia no mundo



Fonte: Adaptação a partir de © ABOZ, 2019.

Na Alemanha, por exemplo, a ozonioterapia faz parte dos tratamentos subsidiados pelos seguros-saúde do governo, devido à comprovação de seus benefícios. Na Espanha, vem sendo utilizada como complemento no tratamento de câncer além de estar sendo gradativamente implementada nos hospitais públicos,

também reconhecido e/ou adotado pelo Sistema de Saúde de várias outras nações (©ABOZ, 2019).

Cada vez mais divulgada, inúmeros países já se utilizam desta técnica com muito sucesso. Muitos trabalhos científicos vêm comprovando a eficiência e foram incorporados em alguns países nos cursos de medicina. Em Madrid, no Encontro Internacional de Ozonioterapia de 2010, foi criado um Comitê Científico Internacional de Ozonioterapia (ISCO3), tendo como objetivo recomendar protocolos aos praticantes da ozonioterapia (©ABOZ, 2019).

Um excelente exemplo a ser comentado é a farmácia do Hospital Universitário de Siena na Itália, onde os profissionais elaboram azeite ozonizado a partir da introdução do gás ozônio em azeite puro em torno de 30 min em um banho resfriado. Em outros países, o azeite puro é ozonizado por dois dias até que se solidifique (BOCCI, V., 2002). Uma das formas de analisar os óleos comestíveis ozonizados é pelo uso da técnica de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Essa técnica é considerada uma poderosa ferramenta e vem sendo utilizada no monitoramento da oxidação de óleos, tanto quantitativamente como qualitativamente (Lirong Xu et al., 2015).

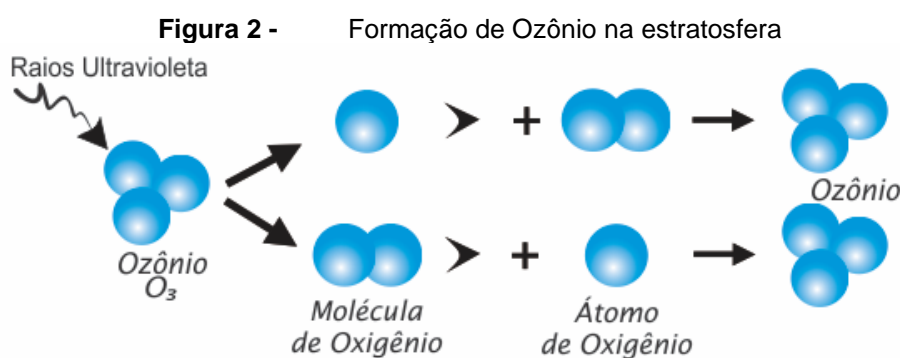
Nesse contexto, esse trabalho tem por objetivo caracterizar o Óleo Vegetal de Girassol (OG ou SFO – *Sunflower Oil*), utilizando a técnica da Espectroscopia no Infravermelho buscando compreender as modificações que ocorrem com óleo no processo de ozonização, buscando meios de justificar a utilização deste produto em lesões cutâneas crônicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Como Ocorre a Geração do Ozônio (O₃)

Em 1785 Van Marum descreveu pela primeira vez um odor intenso, detectado próximo de sua máquina eletrostática, no momento em que as centelhas passavam pelo ar. Em 1801 esse odor era detectado durante o processo de eletrólise da água e apenas em 1840 o Dr. Christian Friedrich Schönbein, pesquisador alemão, denominou este odor como “ozônio”, com base no significado da palavra grega “ozein” para “cheiro”. Apenas em 1893, ao estudar a decomposição eletrolítica da água, usou-se o ozônio pela primeira vez no tratamento de água em grande escala (LAPOLLI et al., 2003).

O americano Thomas Sterry Hunt, geólogo e químico, chegou a concluir em 1848 que o ozônio era a forma alotrópica do oxigênio (ver Figura 2). Os três átomos de oxigênio na molécula do ozônio são dispostos segundo um ângulo obtuso, onde um átomo central de oxigênio está atado a dois átomos de oxigênio equidistantes, o ângulo é aproximadamente 120 °C e a extensão da ligação é 1,278 Å. (VIDAL, 2003; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999),



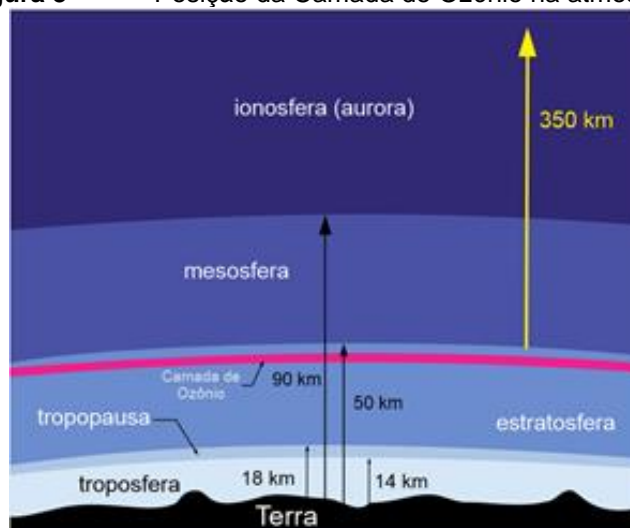
Fonte: Cartilha de saúde direta, 2018

Após uma década ficou identificada sua composição tri-atômica, por ter em sua formação molecular três átomos de oxigênio ligadas entre si, que tem sua representação química molecular por O₃, aproximadamente 50 % mais denso que o oxigênio (CHIATONNE et al., 2008).

Quando gerado a partir do ar seco, é um gás azul à temperatura normal, mas incolor quando gerado a partir de oxigênio de elevada pureza. Presente na atmosfera

terrestre em duas regiões, 10 % do ozônio se encontra na troposfera, entre 10 e 14 km da região mais próxima da superfície da terra e os demais 90 % na estratosfera, chamada de “camada de ozônio”, a uma distância entre 18 a 50 km (ver Figura 3).

Figura 3 - Posição da Camada de Ozônio na atmosfera



Fonte: Cartilha de saúde direta, 2018

A geração do ozônio é a reação do oxigênio do ar sob efeito da luz ultravioleta a um comprimento de banda de 140 a 190 nm, processo fotoquímica, que ocorre na estratosfera, sendo reproduzido em laboratório por meio de radiação emitida por lâmpadas ultravioleta. O elevado consumo energético e baixo rendimento inviabiliza o uso industrial (VIDAL, 2003; BRINK, 1991).

Suas propriedades Físico Química são descritos na Quadro1:

Quadro 1: Principais propriedades físico-químicas do ozônio.

Propriedades físico-químicas	
Massa molar	48 u.m.a.
Massa específica (0 °C e 101,3 kPa)	2,154 kg/m ³
Ponto de ebulição	-111,9 ± 0,3 °C
Ponto de fusão	-192,5 ± 0,3 °C
Solubilidade em água a 0 °C	20 g/m ³
Solubilidade em água a 30 °C	1,5 g/m ³
Temperatura crítica	-12,1 °C
Pressão crítica	5,53 Mpa ou 54,6 atm

Fonte: VIDAL (2003).

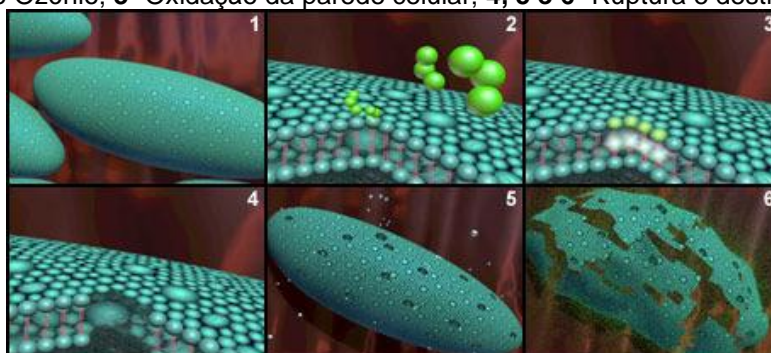
O ozônio é um pouco mais denso (2,14 g/L) em relação ao ar (1,28 g/L) a 0 °C e à pressão atmosférica (BOCCI, 2002).

Após uma descarga elétrica eventual ocorrida em meio gasoso no ano de 1857 foi gerado ozônio, descrito e documentado por Dr. Werner Von Siemens. Meritens em 1866, pela primeira vez desinfetou a água com o uso do gás ozônio, admitindo assim o ozônio como um vigoroso desinfetante de água. Apenas em 1875 na Alemanha foi construído o primeiro gerador de ozônio (JOHNSON,1975), em 1889 na Universidade de Sorbonne, em Paris, tiveram início os estudos do efeito germicida pelo químico Marius Paul Otto, e a efetiva ação bactericida foi comprovada em 1981 na Alemanha (BRINK, LANGLAIS, RECKHOW, 1991).

O poder de oxidação do ozônio ($E_o = 2,08 \text{ V}$) é alto ao comparar com outros agentes oxidantes como, Peróxido de hidrogênio H_2O_2 ($E_o = 1,78 \text{ V}$), com cloro ($E_o = 1,36 \text{ V}$) e oxigênio ($E_o = 1,23 \text{ V}$), perdendo somente para o radical livre hidroxila, entre produtos químicos normalmente usados no tratamento de água. Portanto, é capaz de oxidar muitos compostos orgânicos e inorgânicos presentes na água, desta forma a molécula pode reagir com inúmeras classes de compostos (BOCCI, 2002 E KUNZ et al., 2002).

A principal diferença da ação do gás ozônio nos agentes biocidas tradicionais está relacionado ao mecanismo de destruição dos microrganismos (Figura 4) que age na membrana celular, de forma a romper levando a morte em pouco tempo de contato, o que impossibilita a reativação do microrganismo após oxidação (© SNATURAL, 2018).

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



Fonte: © SNatural, 2018

Considerado um produto seguro, *General Recognized As Safe* – GRAS, para a utilização em tratar garrafas de água pela “*Food and Drug Administration*” americana - FDA em 1982, foi desenvolvida uma série de aplicações, como a desinfecção de

água de piscina e o tratamento de resíduos em água (TORRES, 1996; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999). Os Estados Unidos afirmaram o O₃ como uma substância GRAS, na década de 90, para uso em produtos alimentícios. (GRAHAM, 1997). Na área da indústria alimentícia já vem se utilizando o gás O₃ por décadas, pesquisas vêm sendo realizadas no Brasil, mesmo não existindo legislação específica que oriente aplicações para essa área, já que o O₃ não gera resíduos tóxicos, que são capazes de alterar o sabor e o odor do alimento (TORRES, 1996; LAPOLLI et al., 2003; FDA, 2019).

2.2 Uso Direto

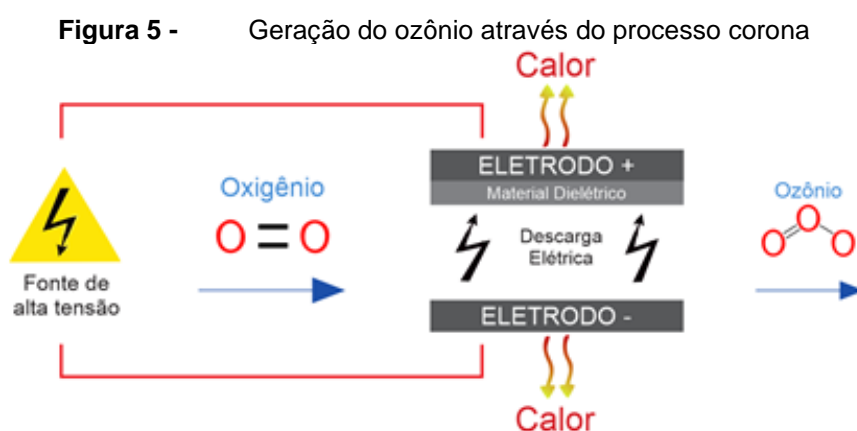
No ano de 1893 na cidade de Oudshoorn na Holanda foi implantada a primeira aplicação com a utilização do ozônio em afluentes, onde a água do rio Reno, após passar pelo processo sedimentação e de filtração, foi desinfetada com o uso do gás, em grande escala (JOHNSON, 1975). A empresa precursora na construção e instalação de equipamentos geradores de ozônio em 1897, foi fundada por Marius Paul Otto (LAPOLLI et al., 2003).

Foram construídas estações de tratamento na primeira década:

- França, em Paris nos anos de 1898 e 1909;
- França, em Nice em 1906;
- França, em Chartres no ano de 1908;
- Alemanha, em Wiesbaden em 1901;
- Alemanha, em Paderborn 1902;
- Estados Unidos, em Niágara - Nova York 1903;
- Antiga União Soviética. em São Petersburgo no ano 1905;
- Espanha, Madri em 1910.

Crescendo significativamente o uso de ozônio a partir do ano de 1914, em 22 anos já haviam sido construídas cerca de 100 estações de tratamento de afluentes na França e por volta de 40 unidades em outras partes do mundo (BRINK; LANGLAIS; RECKHOW; 1991). Desde então, o ozônio é utilizado para tratar o abastecimento público de água da Europa (GRAHAM, 1997; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

A produção comercial do O₃, para o tratamento de água ou mesmo em uso industrial, ocorre pelo processo de descarga elétrica, conhecido como processo corona conforme Figura 5 (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999). Constituído de dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (da ordem de ± 13000 V), a geração se dá pela passagem de oxigênio puro/ar entre os eletrodos; o funcionamento ocorre pelas colisões das moléculas de O₂ a partir do momento que os elétrons obtenham energia suficiente para dissociação das moléculas e a consequente formação do ozônio-O₃ (USEPA, 1999).



Fonte: Adaptação a partir de SILVA, 2011.

O ozônio por se decompor imediatamente a exposição ao ar (devido sua ampla instabilidade) ocasiona, por consequência, sua recomposição como oxigênio ($2O_3 \rightarrow 3O_2$), conforme Quadro 2; por isso, não é possível armazená-lo, tendo de ser gerado no local de uso (USEPA, 1999; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; LAPOLLI et al., 2003).

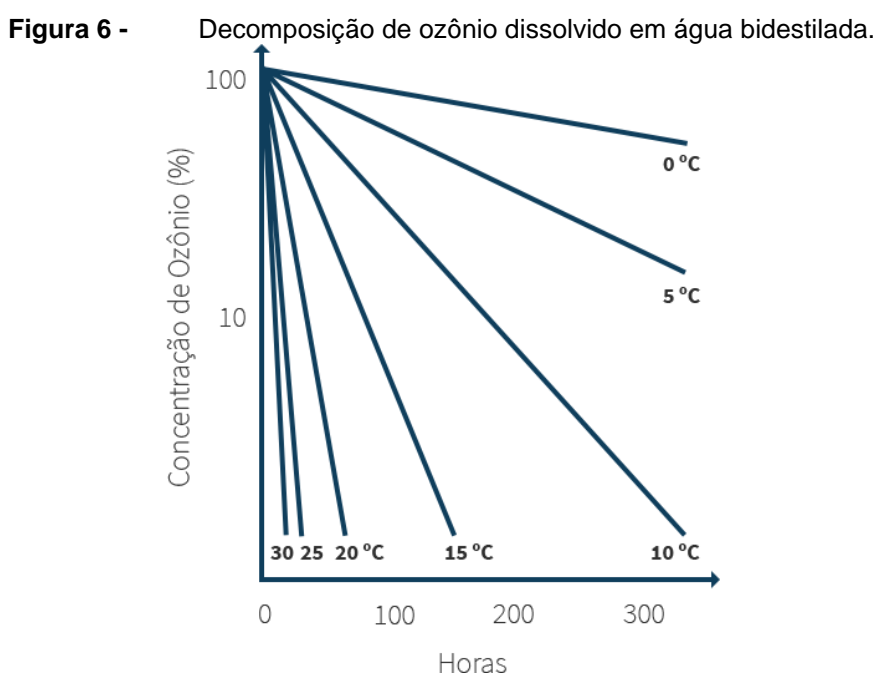
Quadro 2: Relação temperatura X meia vida do ozônio.

Temperatura do Gás	Tempo de Meia Vida (min)
30 °C	26
25 °C	35
20 °C	44
15 °C	58
10 °C	76
5 °C	101

Fonte: © 2019 - GRUPO PHILOZON

A produção de O₃ no processo corona varia dependendo da diferença de

potencial, da frequência da corrente elétrica, da constante dielétrica e do espaço de separação em meio os eletrodos (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999). Diante da concentração de ozônio e da temperatura (Figura 6), a velocidade de dissociação de O_3 para O_2 altera, ou seja, quanto maior a concentração e maior a temperatura, maior a dissociação, e vice-versa (BOCCI, 2002). A temperatura e a pureza influenciam diretamente a separação do ozônio na água.



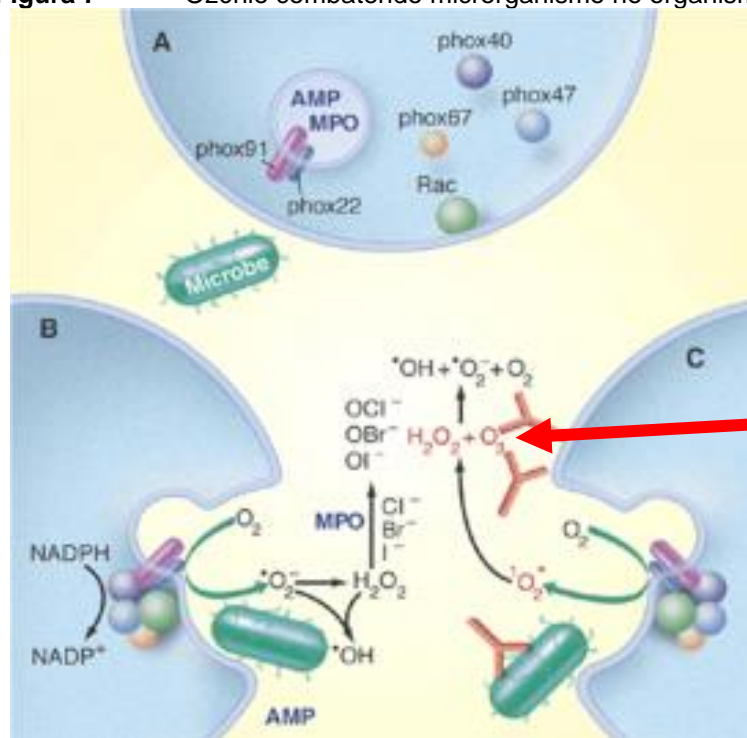
Fonte: Adaptado de BOCCI, 2002.

Em 1983, no Brasil, a ozonização passou a ser utilizada como alternativa aos métodos convencionais de pré-cloração e pré-aeração no tratamento de águas superficiais (LAPOLLI et al., 2003). O ozônio é 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).

O gás pode afetar o sistema respiratório e causar sintomas de toxicidade, como dor de cabeça, tontura, sensação de queimação na região dos olhos, tosse e irritação da garganta, o ozônio é tóxico para o sistema pulmonar durante inalação prolongada na concentração de $0.0002 \mu\text{g/mL}$ equivale a 0.2 ppm - partes por milhão, unidade essa mais comumente utilizada para mensurar as proporções de gases (GUZEL-

SEYDIM et al., 2004). Um indivíduo pode detectar o típico cheiro do ozônio em concentrações 0,01 a 0,05 ppm (CHIATONNE et al., 2008). A ação do ozônio dá-se diretamente na parede da célula causando a ruptura e a morte em menor tempo de contato (Figura 7), inviabilizando a recuperação dos microrganismos após oxidação (SNATURAL TECNOLOGIAS AMBIENTAIS LTDA, 2011).

Figura 7 - Ozônio combatendo microrganismo no organismo



Fonte: GRUPO PHILOZON – ©2019

Pesquisas recentes têm demonstrado que o ozônio é produzido no corpo humano a partir da ativação do anticorpo e atua no processo de destruição de bactérias, contribuindo para o sistema de defesa imunológica do organismo, ou seja, o organismo também produz ozônio (WENTWORTH, 2002).

2.3 Ozonioterapia

Após a descoberta, o interesse pelo gás foi imediato após sua descoberta, utilizado hoje para os mais diversos propósitos. Sendo um agente antimicrobiano poderoso, é aplicável 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., 1999).

O O₃ é dez vezes mais solúvel que o O₂ e tem a capacidade para se dispersar e infiltrar nos tecidos, pois dilui com facilidade no plasma sanguíneo e nos fluidos extracelulares, reagindo no mesmo instante com as moléculas presentes no meio que, frequentemente, são: proteínas, carboidratos e ácidos poli-insaturados, permanecendo instável em meios líquidos e sendo um potente oxidante é denominado antioxidante (BOCCI, 2005).

Nas duas últimas décadas, aprendeu-se dosear precisamente sua concentração, assim sendo, é possível incorporar o gás em triglicerídeos, onde o ozônio gasoso reage com os substratos insaturados gerando derivados terapêuticos ativos (TRAVAGLI *et al.*, 2010). O ozônio médico é indicado para tratamento no sistema circulatório na área da geriatria, doenças virais, lesões inflamadas, infectadas, mal curadas e de inflamações crônicas e como terapia complementar em variados tipos de câncer; é aplicado em imunotivação geral e em baixas dosagens (©ABOZ, 2019).

Formas de aplicação do ozônio: auto-hemoterapia Maior – GAHT¹, auto-hemoterapia Menor - PAHT², insuflação retal³, insuflação vaginal⁴, tópico com ozônio (bolsa, bag, touca)⁵, água ozonizada e azeite ozonizado⁶, injeções: intra-articular⁷, intra-discal⁸, subcutânea⁹ (analgesia e estético), sauna com ozônio¹⁰ e hidrozonioterapia¹¹ (©ABOZ, 2019).

No Brasil na cidade de São Paulo no ano de 1975, o médico Heinz Konrad foi o precursor da prática em sua clínica da utilização do ozônio em tratamentos terapêuticos, que permanece até hoje. Em 1979 foi fundada a Sociedade Médica Alemã de Ozônio pelo Dr. Hans H. Wolff, tendo seu nome modificado, posteriormente, para Sociedade Médica para Aplicação Preventiva e Terapêutica do Ozônio, publicou o livro "O Ozônio Medicinal" no ano que antecedeu seu falecimento, onde apresenta suas práticas médicas do uso do ozônio, estudadas e pesquisadas. Na cidade de

1 aplicação de ozônio em um volume de sangue, seguido de reinfusão pela via endovenosa.

2 aplicação de ozônio em um volume de sangue, seguido de reinfusão pela via intramuscular

3 forma sistêmica, minimamente invasiva com introdução através de cateter no cólon.

4 aplicação tópica por meio de sonda estéril e descartável, indolor.

5 aplicado topicamente em sistema fechado no local e eficiente no tratamento de lesões

6 ozonização do líquido, aplicado diretamente nas lesões a ser desinfetado e hidratado

7 injetado diretamente na articulação afetada, utilizado em artrites, artroses e rigidez articular

8 injetado diretamente entre as vértebras, trata hérnias de disco.

9 o gás é injetado sob a pele, para alívio da dor ou tratamento de celulite, microvarizes etc.

10 evaporação por meio de uma resistência para ebulição da água irradiando vapor de água ozonizada

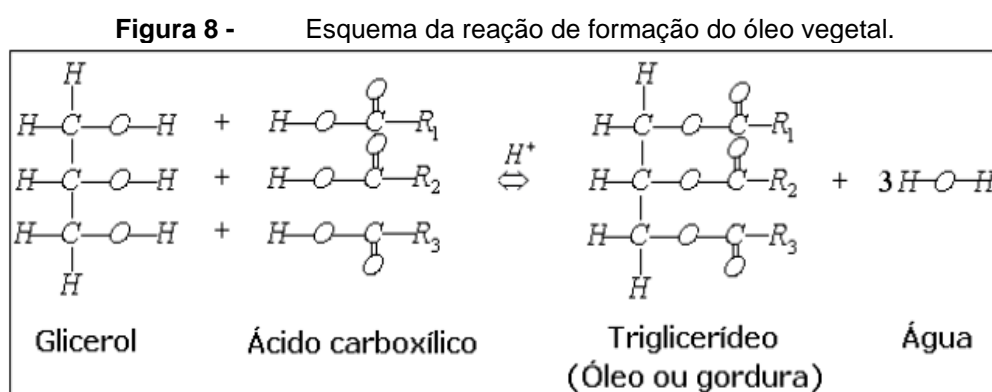
11 banho de imersão com o gás de ozônio borbulhado por todo o corpo.

Santa Catarina, houve a propagação das práticas e pesquisas com o O₃ por meio de congressos e cursos devido aos esforços do Dr. Edison de Cezar Philippi cardiologista, fundador da empresa Philozon, em meados de 1990 (©ABOZ, 2019).

Apesar de tantos anos de utilização das técnicas de ozonioterapia e a adesão de inúmeros países, o Conselho Federal de Medicina em 10 de Julho de 2018, publicou no Diário Oficial a Resolução CFM nº 2.181/2018, definindo a ozonioterapia como um procedimento a ser realizado apenas com o escopo de caráter de estudo, que devem seguir os critérios definidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Essa Resolução reforça a proibição dos médicos poderem prescrever procedimentos se utilizando das técnicas. A decisão ocorreu, devido o relator entender, que os trabalhos desenvolvidos até o momento não oferecem a garantia da eficiência e a segurança na utilização da ozonioterapia.

2.4 Óleos Vegetais

Conjunto de compostos que compreendem o glicerol tem como seu principal componente os chamados ácidos graxos e compostos resultantes da condensação destes, os ésteres, denominados triglicerídeos ou triacilgliceróis (Figura 8); possuem cadeias de átomos de carbono com diferentes graus de insaturação (HARTMAN, 1973).



Fonte: HARTMAN, 1973.

Os óleos vegetais também são constituídos de algumas substâncias como esteróis, tocoferóis, fenóis, flavonoides, compostos voláteis, vitaminas, pigmentos, entre outros (APARÍCIO, 2000).

Suas moléculas apolares não são capazes de formar ligações intermoleculares fortes com as moléculas de água, o que as tornam hidrofóbicas (insolúveis em água). Possuem estabilidade oxidativa em diversas aplicações, como na fritura, pois contêm altos níveis de antioxidantes naturais (tocoferóis, constituintes da vitamina E, óleo de girassol), tornando-os mais resistentes à rancidez (HARTMAN, 1973).

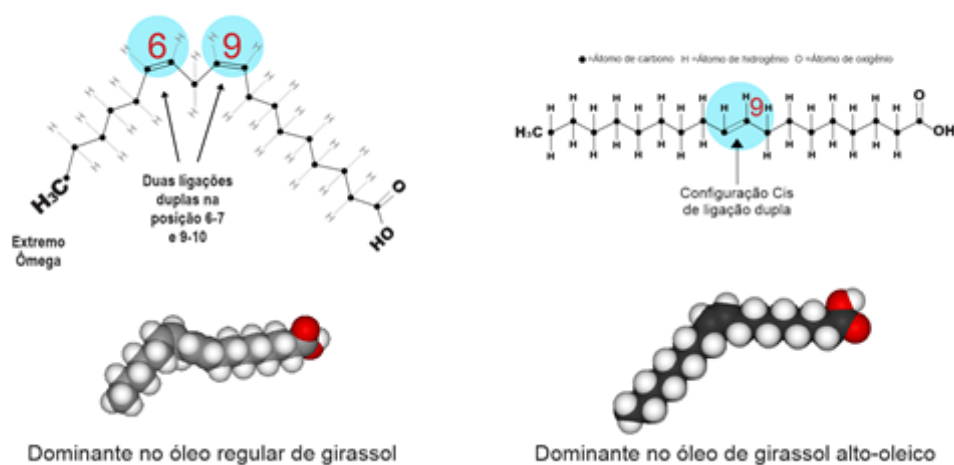
Os ácidos graxos em sua maior parte são classificados como monocarboxílicos, por ter uma cadeia linear de carbono em quantidade de número par originado da bioprodução da unidade de acetato (CH_3COSCoA = acetil coenzima A combinada com CO_2 no malonil coenzima A). A diferença ocorre entre eles pelo grau de insaturação, o que caracteriza os ácidos como mono, di, tri e poli-insaturados. Um dos ácidos mais relevantes são os esteáricos pertencentes ao grupo dos ácidos graxos saturados, entre estes estão araquídico, behênico, butírico, cáprico, láurico, mirístico e palmítico. Os insaturados se apresentam na natureza com maior frequência, fazendo parte do grupo oleico, linoleico, α -linolênico, araquidônico, elaídico e erúcico, sendo os 3 primeiros os predominantes (HARTMAN, 1973; VOET, 2000).

2.4.1 Óleos vegetais e sua importância para a saúde

A gordura exerce uma ação protetora no organismo, por isso seu consumo é importante para a saúde. As gorduras saturadas são as que comprometem a saúde, por aumentar o nível de colesterol do sangue e promoverem a arteriosclerose dos vasos sanguíneos. Todavia, as gorduras insaturadas exercem uma influência benéfica nas funções vasculares e ajudam a reduzir o nível de colesterol (PEREIRA, 2007).

São encontradas nos óleos comestíveis, principalmente aqueles que possuem grandes quantidades de ácidos graxos mono e poli-insaturados, como os de soja, arroz, girassol, milho e muitos outros. Apesar de serem utilizados como temperos em alimentos, deve-se evitar em frituras devido ao excesso de calorias (HARTMAN, 1973). Os ácidos graxos α -linolênico, linoleico e oleico das famílias ômega 3, ômega 6 e ômega 9 (ω -3, ω -6 e ω -9) respectivamente, fazem parte de um grupo especial de ácidos graxos poli-insaturados, denominados de essenciais (Figura 9).

Figura 9 - Ácido Linoleico (18:2 ou Omega6) e ácido oleico (18:1 ou Omega9)
 Ácido Linoleico ou 18: 2 ou Omega 6 Ácido Oleico ou 18: 1 ou Omega 9



Fonte: Adaptado de SYNGENTA, ALONSO, 2017.

A ingestão desses ácidos graxos é muito importante, pois eles ajudam a reduzir os níveis de colesterol do sangue e desempenham funções fisiológicas imprescindíveis nos organismos vivos. Os ácidos graxos (mono e poli-insaturados) são os mais distribuídos na natureza, pois constituem mais da metade do total de muitos óleos e gorduras comestíveis. O óleo de oliva, pode conter até 80 % de ácido oleico; já nas gorduras animais os níveis chegam a pouco mais de 40 %. Esses ácidos graxos ajudam a diminuir o risco de ataques cardíacos além da formação de arteriosclerose (BOBBIO,1989).

Devido as células não terem a capacidade de sintetizarem ácidos graxos (mono e poli-insaturados), devem ser ingeridos por meio dos alimentos que os contêm. O ácido oleico é um ácido graxo e pode ser produzido em pequenas quantidades no organismo e funciona como precursor dos ácidos graxos essenciais (FIRESTONE, 2006).

Para se adquirir óleos de alta qualidade, que contenha ácidos graxos para o consumo humano, é necessário que as condições de cultivo, preparo e armazenamento das sementes sejam as mais adequadas possíveis, pois além de se obter produtos de qualidade, o rendimento é maior. Os óleos brutos, que contêm em média 95 % de triglicerídeos, dependendo da sua origem e natureza, possuem uma composição variável de ácidos graxos saturados e insaturados ligados ao esqueleto de glicerol (FIRESTONE, 2006) e 5 % de impurezas; são extraídos (mecanicamente ou com solventes) das sementes tratadas e aptos a passarem por uma tecnologia de

processamentos que visa torná-los comestíveis. Essa tecnologia é conhecida como refinação e tem como objetivo melhorar a aparência, o cheiro e o gosto dos óleos brutos produzidos, removendo alguns componentes indesejáveis (HARTMAN, 1982).

2.4.2 Óleo de girassol

Os óleos de girassol apresentam odor e sabor suave, aspecto límpido e amarelo-dourado-claro como principais características deste produto. Além de ser excelente para o processo digestivo e ter um maior teor de gorduras do tipo poli-insaturadas, é, comprovadamente, um dos óleos mais interessante para o consumo humano e com bom custo benefício (CAMPESTRE, 2017). Ao extrair o óleo das sementes de girassol, seu rendimento está entre 48 e 52 % no processo de extração à frio, sua excelente qualidade nutricional, se dá devido o óleo conter alto teor de ácido linoleico (Ômega 6) e tocoferóis (vitamina E), que são capazes de tratar e prevenir doenças cardiovasculares produzidas pelo excesso de colesterol nos vasos sanguíneos (HARRIS E VON SHACKY, 2004).

Os Quadros 3 e 4 apresentam as características físico-químicas e a composição de ácidos graxos presentes no óleo de girassol.

Quadro 3: Características físico-químicas do óleo de girassol.

Propriedades Físico-Químicas	Faixa de aceitação para consumo	Unidades
Densidade Relativa	0,918 - 0,923 (20° C/20 °C) 0,915 - 0,920 (25° C/25 °C)	g/cm ³
Índice de Iodo	110 – 143	g I ₂ / 100 g
Índice de Peróxido	< 10,0	meq/kg
Índice de Refração	1,467 - 1,469	-
Índice de Saponificação	188 – 194	mg KOH/g
Matéria Insaponificável	< 1,5	g/100 g
Acidez, óleo refinado	< 0,3	g ácido oléico/100 g
Acidez, óleo semi-refinado	< 0,5	g ácido oléico/100 g
Acidez, óleo bruto	< 2,0	g ácido oléico/100 g
Acidez, óleo virgem	< 2,0	g ácido oléico/100 g

Fonte: ANVISA até ser revogada em 2005

Quadro 4: Composição de ácidos graxos do óleo de girassol, Valores de Referência: Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes - AOCS.

Estrutura	Ácidos graxos	Valores De Referência (%)
C 12:0	Láurico	≤0,1
C<14	-	< 0,4
C 14:0	Mirístico	≤0,2
C 16:0	Palmítico	5,0 - 8,0
C 16:1	Palmitoléico	≤0,3
C 18:0	Estearico	2,5 - 7,0
C 18:1	Oléico (ω-9)	13,0 - 40,0
C 18:2	Linoléico (ω-6)	48,0 - 74,0
C 18:3	A-Linolênico (ω-3)	≤ 0,3
C 20:0	Araquídico	0,2 - 0,5
C 20:1	Eicosenóico	< 0,5
C 22:0	Behênico	0,5 - 1,3
C 24:0	Lignocérico	≤ 0,4
C 22:1	Erúcico	≤ 0,5

Fonte: COPYRIGHT © 2005 - 2017 - Campestre Ind. E Com. De Óleos Vegetais LTDA

Em 2013 segundo ©Actualitix (Dados estatísticas sobre o mundo) os produtores em ordem de relevância na produção óleo de girassol (*Helianthus annuus*) são os países: Rússia, Ucrânia, Argentina, Turquia, França, Hungria, Espanha, Romênia, China e África do Sul. O Brasil, neste último levantamento, encontrava-se em 27º lugar de produção, sendo pouco expressivo. Essa semente oleaginosa ocupava o 3º lugar nos produtores da América do Sul, produzindo neste mesmo ano 44.500 Toneladas de óleo de Girassol.

2.5 Armazenamento em Óleo - Processo de Ozonólise

O gás ozônio em sua forma natural é a via mais antiga a ser empregada, sendo a mais perigosa pois causa danos pulmonares graves ao ser inalado. O problema pode ser contornado por meio de geradores seguros e eficientes (Bocci, 2005). Na água, o ozônio é 10 vezes mais solúvel que o oxigênio; em água destilada com ph 7 a 20 °C, tem meia-vida, em torno de 9 a 10 horas - o que torna o seu uso bem interessante - pois permite o armazenamento posterior, sendo eficiente, por exemplo, na irrigação cirúrgica em exodontias (AGRILLO; PRIORI; IANNETTI, 2007).

É possível utilizar o armazenamento em óleo, obtendo como vantagem, o fato deste se manter em contato com a superfície lesionada por mais tempo, o que possibilita exercer sua função por um maior período. Considerando que sob a forma

de gás a sua meia vida é quase que insignificante e, em forma de óleo, é possível o armazenamento por vários meses (BOCCI, 2005; OLIVEIRA AF & MENDES HJ, 2009).

Deve-se considerar o fator econômico e sua eficiência no processo de extração, bem como a complexidade das reações químicas do ozônio quando borbulhado em um óleo vegetal; sendo necessário: análises eficientes para atualização das mudanças nos grupos funcionais, que ocorrem durante a ozonização. A devida identificação dos produtos sem que seja necessário o uso das técnicas tradicionais da separação de seus compostos, nem o uso dos inúmeros reagentes e suas calibrações (ZANARDI ET AL., 2008).

O óleo de girassol ozonizado tem um espectro antimicrobiano bastante extenso, com atividade inibitória e mortal em bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos do gênero *Cândida* e protozoários como *Giardia lamblia* (DÍAZ et al., 2006). A AOCS (*American Oil Chemists' Society*) oferece parâmetros com limites específicos da qualidade dos óleos vegetais, além de um conjunto de normas, considerando a capacidade ou não para o consumo, visando existir um padrão de qualidade a ser seguido (PEREIRA,2007).

2.6 Variações das Análises dos Óleos Vegetais

Mirabal et al. (data), Bocci (2003) e Zanardi et al 2008 citam que é fundamental o entendimento dos parâmetros físicos e químicos dos óleos ozonizados para sua caracterizá-lo e indicar sua qualidade. Técnicas analíticas mais comuns, como: densidade, viscosidade, medição de cor, os índices de peróxido, índice de iodo e acidez, índice de saponificação e o índice de refração geralmente utilizados para determinar a qualidade dos óleos vegetais e dos produtos ozonizados. Esses parâmetros de qualidade podem ser determinados por métodos de referência como aqueles estabelecidos pela AOCS, os quais têm sido bastante empregados por muitos laboratórios e indústrias.

Inúmeros estudos podem ser encontrados na literatura, objetivando autenticar e classificar óleos vegetais, sem o processo de ozonização. A AOCS recomenda que o índice de acidez tenha o limite de 0,3 g/100 g; essa pode ser determinada por meio da titulação ácido-base, usando hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador de parâmetro químico. O teor de acidez é uma das características determinante da

qualidade dos óleos vegetais - os fatores que influenciam principalmente esse valor são: o tratamento dado às sementes na colheita; e o armazenamento, no processamento e na condição de conservação dos óleos vegetais (PEREIRA, 2007).

Pode-se, também, verificar métodos que determinem alguns constituintes presentes nos óleos, tais como: triglicerídeos, esteróis, tocoferóis e ácidos graxos. Devido à complexidade das matrizes dos óleos vegetais, ferramentas quimiométricas como a modelagem independente flexível por analogia de classe - SIMCA, a análise hierárquica de agrupamentos - HCA, análise discriminante linear - LDA, tem sido muito utilizadas, além dessas, também as análises de componentes principais - PCA e os mínimos Quadros parciais - PLS (PEREIRA, 2007).

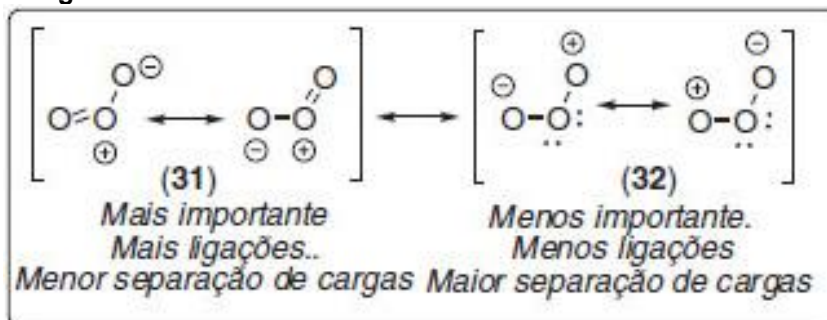
O aumento da viscosidade se dá com o comprimento das cadeias dos ácidos graxos constituídos dos triglicerídeos e reduz com o aumento da insaturação. O índice de refração entre a velocidade da luz no ar e no meio, irá variar na razão inversa da temperatura e tende a aumentar com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos triglicerídeos. Sendo ambos parâmetros físicos (MORETTO; FETT, 1998). Inúmeros métodos analíticos têm sido propostos para a determinação, caracterização e autenticação de óleos comestíveis, dentre as quais, a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H / ^{13}C (RMN), Espectroscopia de Massa Cromatografia Gasosa, e Espectroscopia no Infravermelho Próximo (*Near Infrared* - NIR).

Para determinar a qualidade dos óleos, os protocolos sugeridos pela AOCS são muito utilizados devido à simplicidade dos ensaios, no entanto, são métodos lentos, trabalhosos, de pouca precisão, em alguns testes (como o de acidez que necessita de grandes quantidades de amostras e reagentes, havendo dificuldade na visualização do ponto de viragem do indicador), o método analítico por Espectroscopia, tem sido capaz de superar tais inconvenientes, fornecendo agilidade, sem pré-tratamento, reproduzíveis, não invasivo, baixo custo relativo e não geram subprodutos químicos tóxicos (PEREIRA, 2007).

Devido aos benefícios, sua aplicação tem sido indispensável nos laboratórios e nas indústrias de: alimentos, borrachas, cosméticos, fibras, químicas, tintas, lãs, polímeros, farmacêuticas, petroquímicas, têxteis, entre outras. A sua aplicação tem auxiliado a agricultura na análise da composição química dos solos, além de ser empregada em restaurações de imagens decorativas de pinturas históricas (PEREIRA, 2007). Em 1963, Huisguen propôs que a molécula de O_3 se comportasse

como um dipolo 1,3 e contivesse os híbridos de ressonância que constam na Figura 10.

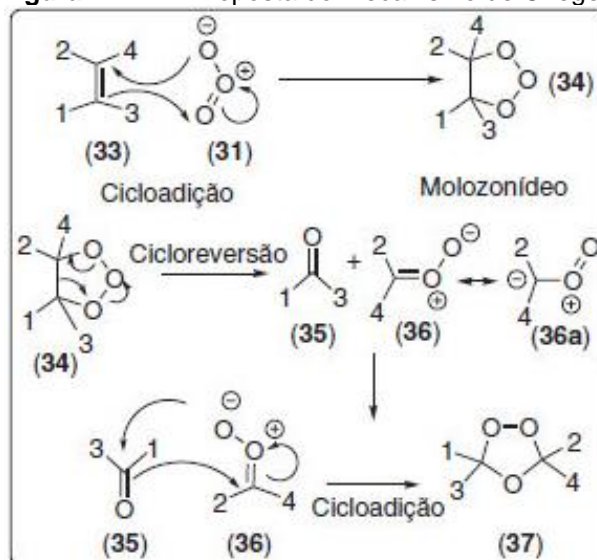
Figura 10 - Estruturas de ressonância da molécula de ozônio



Fonte: OLIVEIRA E WOSCH, 2012

Com uma visão atualizada sobre a reação da ozonólise, apenas em 1975, Criegee propôs que a etapa inicial ocorresse via cicloadição 1,3-dipolar do ozônio ($4s+2s$) à olefina, formando um molozonídeo volúvel 34, que é seguido por uma ciclo reversão, formadora do zwitterion 36 (ou óxido de carbonila) e um composto carbonílico. Uma nova cicloadição forma o ozonídeo 37 como descrito na Figura 11 (CRIEGEE, 1975).

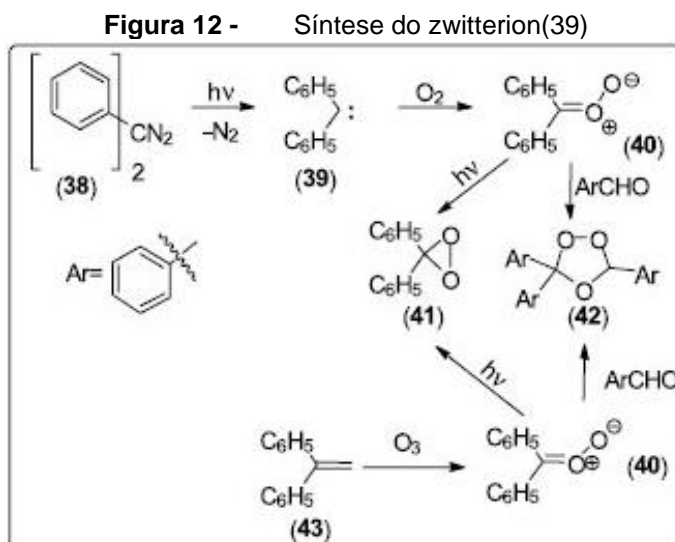
Figura 11 - Proposta do mecanismo de Criegee



Fonte: OLIVEIRA E WOSCH, 2012

Apesar do molozonídeo 34 cindir rapidamente, há evidências espectroscópicas obtidas por $^1\text{H}^{13}\text{C}$ RMN a -130°C sobre sua existência (DURHAM;

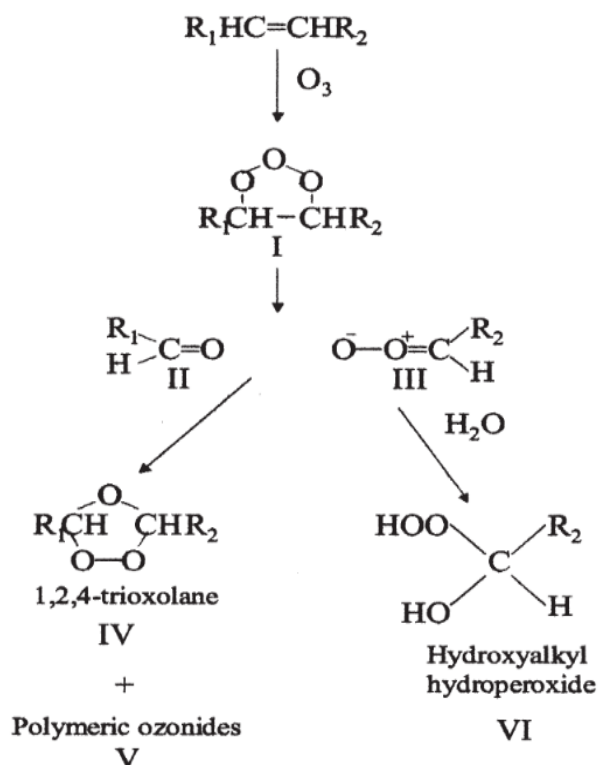
GREENWOOD,1967). Em 2000, o zwitterion 40 (Figura 12) - que é estável em solução a -80°C - foi sintetizado pela reação do difenil carbeno 39 com oxigênio elementar (NAZAROV, 2000).



Fonte: Oliveira e Wosch, 2012

O composto 40 também foi obtido pela reação de ozonólise do 1,1-difenil-eteno 43. O zwitterion 40 reage da mesma maneira com aldeídos, formando 42, independente da maneira como foi produzido. A propagação do composto 40, obtido por qualquer dos dois métodos, forma o difenildioxirano 41 - que é estável a 20°C , e pode ser identificado analiticamente (BLOCK et al.; 2012). O efeito de ozonólise é uma das reações mais limpas, reprodutíveis (OLIVEIRA, 2012). Conforme o mecanismo descrito por Criegee (Figura 13) são formados ozonídeos ou 1,2,4 anéis de trioxolano e peróxidos, sendo esses os produtos mais relevantes, que justifica a atividade antimicrobiana e estimulando as propriedades de reparação e regeneração de tecidos.

Figura 13 - Adição de ozônio à ligação C = C produz um ozonídeo inicial instável (I), que se decompõe em composto carbonílico (II) e óxido de carbonila (III). Na ausência de qualquer solvente participante, II e III recombina para gerar principalmente 1,2,4-trioxolanos e ozonídeos poliméricos. Moléculas de água podem ser eliminadas III para dar hidroperóxidos de hidroalquila (VI) se a ozonização for realizada em meio aquoso.



Fonte: Soriano, 2003

Essa geração ocorre, pois o ozônio reage com ligações duplas carbono-carbono (C=C) de ácidos graxos insaturados; estas, por sua vez, possuem a ligação sigma(σ) que é forte e as ligações pi(π) que é a ligação fraca. Por possuírem elétrons disponíveis facilmente para formar uma nova ligação com outro composto (nova espécie), são quebradas facilmente com a ação dos 3 átomos de oxigênio do ozônio, já que se trata de uma molécula deficiente em elétrons. Faz-se, então, necessária a aquisição de novos elétrons, levando a quebra destas ligações para ligações simples C-C, em um primeiro estágio. Dentro do processo natural existe a possibilidade da reconstrução desta ligação, no entanto com a continua aplicação do O₃ no óleo o processo de reação permanece agindo nas ligações simples entre os carbonos existentes (C-C), o que irá gerar aldeídos ou cetonas (OLIVEIRA e WOSCH, 2012).

No caso de o lipídeo ser uma cadeia longa de carbono e as ligações duplas não estarem na extremidade, ter-se-á a criação de 2 cetonas. O entendimento do mecanismo da reação da ozonólise vem permitindo avanços em uma reação existente

há mais de 100 anos (SCHWARTZ et al., 2006; SCHIAFFO et al., 2008).

2.7 Como ocorre a Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho ocorre em três regiões distintas do espectro eletromagnético, conforme Quadro 5, que inclui os fenômenos associados à emissão de energia radiante e à absorção. A condição para que haja absorção da radiação infravermelha é que uma molécula apresente uma variação, no momento de dipolo elétrico como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Isso ocorre em moléculas heteronucleares, como HC. Todavia, não ocorre em moléculas homonucleares, como H₂ (Hidrogênio), que não absorvem radiações no infravermelho (SKOOG,1992).

Quadro 5: Regiões espectrais do Infravermelho

Região	Região em Nº Banda	Região em λ de Banda	Região em Frequência
Usual	4.000 a 670 cm ⁻¹	2,5 a 15 μm	1,2x10 ¹⁴ a 2,0x10 ¹³ Hz
Distante	200 a 10 cm ⁻¹	50 a 1000 μm	6,0x10 ¹² a 3,0x10 ¹¹ Hz
Médio	4.000 a 200 cm ⁻¹	2,5 a 50 μm	1,2x10 ¹⁴ a 6,0x10 ¹² Hz
Próximo	12.800 a 4.000 cm ⁻¹	0,78 a 2,5 μm	3,8x10 ¹⁴ a 1,2x10 ¹⁴ Hz

Fonte: SKOOG,1992.

Ao incidir radiação infravermelha a molécula a absorve esta, o que ocasiona a vibração dos átomos, causando o aumento da amplitude do sinal. Essa alteração de comportamento lembra a de um oscilador harmônico que, pela mecânica quântica é possível quantizar, entre dois átomos de uma molécula, os níveis de energia vibracional, conforme a **Equação 1.1**.

$$E_{vib} = h\nu(n+1/2) \quad (1.1)$$

Onde E = energia vibracional, h = constante de Plank, ν = frequência vibracional clássica e n = número quântico vibracional. No entanto, as moléculas possuem na realidade um comportamento de oscilação anarmônico; a equação 1.2 exibiu esse comportamento. Dá-se por não possuírem espaçamento idêntico nos níveis de energia quantizados, o que faz com que moléculas não tenham um comportamento ideal e impede o uso do modelo do oscilador harmônico para justificar o

comportamento das moléculas de forma real, pois desconsidera a quebra das ligações e a interação coulômbica entre átomos.

$$E_{vib} = h\nu[1 - (2n + \Delta n + 1)y] \quad (1.2)$$

O fator anarmônico é representado por y e as transições entre a oscilação e os estados de energia vibracional podem vir a causar essa anarmonicidade, onde $\Delta n = \pm 2, \pm 3, \dots$, são as transições produzidas pela absorção das bandas chamadas de sobretons, as transições vibracionais fundamentais em comparação aos sobretons são pouco prováveis de ocorrer, caracterizadas pelas transições vibracionais mais fracas (PASQUINI, 2003; SKOOG E LEARY, 1992).

2.8 Métodos de Classificação Utilizando a Espectroscopia por Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR)

Os inúmeros métodos oficializados pela AOCS que determinam o estado oxidativo do óleo entre os mais frequentes são os valores de peróxidos (PV) e ácido (AV). A titulação odométrica que determina a quantidade de iodo liberado pelo iodeto de potássio que reage com os peróxidos presentes no óleo em análise é o método mais convencional.

Soriano em 2003 - utilizando as técnicas de espectroscopia de RMN de ^1H ^{13}C e FTIR - monitorou a velocidade da degradação do linoleato com e sem água, constatando que os produtos gerados pelo processo foram os aldeídos e ozonídeos com anel de 1,2,4-trioxolano. Já o surgimento da hidroxila, descrito no seu artigo "*Ozonation of sunflower oil: Spectroscopic monitoring of the degree of unsaturatio.*", ainda em 2003, Soriano publicou o seu estudo referente à ozonização de óleo de girassol por puros ésteres metílicos utilizando FTIR e RMN. Na fase inicial do processo de ozonização, a absorção do gás foi exclusivamente quantitativa. Alcançou-se a ozonização completa após a inserção de 0,20 g de O_3 rapidamente para 25 %. No final do processo, o ozoneto e aldeído que reagiu com O_3 em saturação máxima resultou o ácido carboxílico, todos identificados seguindo o mecanismo de Criegee. Por meio do número de bandas, é possível identificar cada composto químico. Em 1981, Silverstein, Bassler, e Morrill elaboraram um quadro com as análises

desenvolvidas e comprovadas em suas pesquisas, referentes à composição dos óleos vegetais.

Quadro 6: FTIR regiões espectrais selecionadas como variáveis preditoras para tratamento de dados estatísticos. Classificação ^a de acordo com Guillén e Cabo (1998). ^b de acordo com Silverstein, Bassler e Morrill (1981).

Id	Intervalo, cm ⁻¹	Grupo Funcional	Freq. Nominal	Modo Vibracional
1	3029–2989	=C–H (trans)	3025 ^a	Alongamento
		=C–H (cis)	3006 ^a	Alongamento
2	2989–2946	–C–H (CH ₃)	2953 ^a	Alongamento (assin)
3	2946–2881	–C–H (CH ₂)	2924 ^a	Alongamento (assin)
4	2881–2782	–C–H (CH ₂)	2853 ^a	Alongamento (sin)
5	1795–1677	–C=O (éster)	1746 ^a	Alongamento
		–C=O (ácido)	1711 ^a	Alongamento
6	1486–1446	–C–H (CH ₂)	1465 ^b	Flexão (scissoring)
7	1446–1425	–C–H (CH ₃)	1450 ^b	Flexão (asym)
8	1425–1409	=C–H (cis)	1417 ^a	Flexão (Balanço)
9	1409–1396	=C–H	1400 ^b	Flexão
10	1396–1382	=C–H	– ^b	Flexão
11	1382–1371	–C–H (CH ₃)	1377 ^a	Flexão (sym)
12	1371–1330	O–H	1359 ^b	Flexão (no plano)
13	1330–1290	Não-atribuído	1319 ^a	Flexão
14	1290–1211	–C–O	1238 ^a	Alongamento
		–CH ₂ –		Flexão
15	1211–1147	–C–O	1163 ^a	Alongamento
		–CH ₂ –		Flexão
16	1147–1128	–C–O	1138 ^b	Alongamento
17	1128–1106	–C–O	1118 ^a	Alongamento
18	1106–1072	–C–O	1097 ^a	Alongamento
19	1072–1043	–C–O	– ^b	Alongamento
20	1043–1006	–C–O	1033 ^a	Alongamento
21	1006–929	–HC=CH– (trans)	968 ^a	Flexão (fora do plano)
22	929–885	–HC=CH– (cis)?	914 ^a	Flexão (fora do plano)
23	885–802	=CH ₂	850 ^b	Oscilação
24	802–754	–C–H	– ^b	Flexão (plano distinto)
25	754–701	–(CH ₂) _n –	723 ^a	Balanço
		–HC=CH– (cis)		Flexão (fora do plano)
26	701–640	C–C	685 ^b	Flexão (fora do plano)
		O–H	650 ^b	Flexão (fora do plano)

Fonte: adaptada de [LERMA-GARCÍA et al. (2010). Copyright 2009 Elsevier Ltd]

Após dezessete anos foi complementado por Guillén e Cabo (1998) conforme quadro 6, podendo, assim, definir quais subprodutos estão sendo degradados pelo processo de ozonização do óleo e qual produto está surgindo ou aumentando em cada uma das bandas ou pequenas regiões, ao capturar os sinais por meio da espectroscopia no infravermelho.

Em 2015, Lirong et al. publicou um artigo com o título “Análise qualitativa de oxidação de óleo comestível por espectroscopia FTIR usando uma “célula” de malha”,

os resultados de sua pesquisa - que seguiu os padrões da AOCS em relação aos valores de peróxido e ácido dos óleos - criou um conjunto de referências a partir de óleos comestíveis puros e a calibração com base em procedimentos de FTIR na qualidade entre os óleos oxidados e os não oxidados, na faixa de número de banda de 3750 cm^{-1} a 3150 cm^{-1} e após a normalização, o reconhecimento da calibração foi de 100 % e os modelos de validação de 96,9 %. Desse modo, resultou em um método efetivo quanto aos métodos padrões na predição da oxidação nos óleos comestíveis, concluindo que é viável a aplicação do método FTIR, baseado na célula de malha na análise qualitativa.

A reação de deterioração é relevante no que se diz respeito à oxidação de gorduras e óleos por ter implicação direta no valor comercial do produto. Os hidroperóxidos são os produtos gerados inicialmente na oxidação dos triacilgliceróis; em uma segunda quebra, forma compostos de baixo peso molecular, como os aldeídos, ácidos gordos livres, álcoois e cetonas, gerando um produto rancido (LI et al., 2000).

2.9 Aplicações de óleo ozonizado na Área Médica

Existem muitos outros óleos vegetais ozonizados produzidos comercialmente no mercado, como o Coccozone - fabricado a partir de óleo de coco na Grã-Bretanha, OOO (azeite ozonizado) - fabricado nos EUA e no Canadá O2-Zap (© SNATURAL, 2018). Esses produtos farmacêuticos e cosméticos que são comercializados com a utilização de óleos ozonizados como princípios ativos, inclui: Oxaktiv® produzido por Pharmoxid Arznei GmbH & Co.KG, na Alemanha (OZONOSAN, 2012), Oleoforte® pela empresa NaturOzone, na Espanha-2012 e Ozonia 10® pela empresa Innovares, na Itália (ALMEIDA et al., 2012)

A uma temperatura ambiente, os óleos vegetais ozonizados podem ser líquidos ou semissólidos e têm períodos de estabilidade que podem ser adequados para distribuição comercial. O Oleozon® (Óleo de girassol ozonizado) é um fármaco registrado a nível nacional, desenvolvido no Centro de Pesquisa de Ozônio em Cuba, testado e verificado havendo uma valiosa atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus.

O artigo "*Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review*" de Travagli et al., de 2010, segundo pesquisa, a estabilidade e a eficácia dos óleos ozonizados já

foram demonstradas, mas devido a uma infinidade de produtos comerciais, o trabalho teve como objetivo analisar esses derivados sugerindo a estratégia para obter produtos com as melhores características para os tratamentos de lesões. Embora a medicina ortodoxa tenha fornecido uma variedade de agentes anti-infecciosos tópicos, alguns deles se tornaram escassamente efetivos devido a agentes patogênicos terem se tornado resistente aos antibióticos e à quimioterapia.

Almeida et al., 2012, publicou “Óleos vegetais ozonizados e propriedades terapêuticas: uma revisão”, no meio de inúmeras patologias dermatológicas a gestão de óleos ozonizados possuem uma abordagem interessante na área farmacêutica, Com o uso das técnicas FTIR e RMN, e confirmou as mudanças sofridas na estrutura do óleo durante a ozonização as quais podem ser consideradas como princípios ativos e ao mesmo tempo um veículo, aumentando a absorção e a penetração na pele. Por possuir uma ampla atividade biológica com baixos efeitos colaterais, esses produtos são uma alternativa de recursos disponíveis, a partir de fontes naturais e renováveis.

Chagas et al., em 2014, no artigo a “Evidências da ozonioterapia no tratamento da lesão cutânea crônica”, objetivando estabelecer recomendações para o uso do ozônio no tratamento de lesão cutânea crônica, após realizar a busca de artigos em bases de dados, cuja amostra fosse composta por adultos com lesão cutânea de qualquer etiologia e que o tratamento tivesse sido feito com aplicação tópica do ozônio. Todos os estudos consideraram como desfecho a cicatrização total da ferida ou a redução do tamanho da lesão, seguidos da ação bactericida. Devido à existência apenas de 1 estudo classificado de qualidade dos 4 artigos relevantes concluiu que não foi possível estabelecer recomendações para a utilização da ozonioterapia no tratamento de lesões cutâneas, devido à falta de pesquisa e profundidade de informações sobre o processo de ozonização de óleos vegetais.

2.10 Métodos de Tratamento de Lesões

O processo multifásico de cicatrização das feridas envolve coagulação do sangue, inflamação, proliferação de tecidos e remodelação (MARTIN, 1997), porém os sistemas imunes inativos como os sistemas adotivos, são muitas vezes dificultados pela infecção crônica que naturalmente traz dificuldades de superar tais infecções. Essa é também a razão que explica a falha no processo cicatricial, fator esse que

implica no crescimento de úlceras fortemente contaminadas (YAMADA et al., 2006; PAPANAS; MALTEZOS, 2007).

O uso judicioso do ozônio (O₃) parece providencial por eliminar os agentes patogênicos, e ao liberar oxigênio (O₂) os autores supõem que ativa a proliferação de fibroblastos e fibras de colágeno com o início da construção matricial intercelular, seguindo da conseqüente proliferação de keratinoblastos e cicatrização sucessiva (OLIVEIRA; MENDES, 2009; KIM et al., 2009). Segundo Santos et al. (2017), a matriz extracelular cria uma base mecânica de colágeno, elastina e glicoproteínas com a função de servir de suporte, regulando o desenvolvimento e diferenciando as células para obter a regeneração do tecido.

A escolha do tratamento adequado para feridas se dá pela profundidade da lesão no tecido, sendo esse um fator determinante para um bom reparo do tecido, já que os processos de regeneração da pele de contração e o de reepitelização da lesão depende de tal tratamento. A união de diferentes lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos torna o processo de análise complexo em amostras biológicas, tornando significativamente interessantes o seu estudo (BALAN et al., 2016).

Uma das principais proteínas envolvidas no processo de reparo é o colágeno - considerado uma proteína estrutural, encontrada em maior quantidade no organismo, e um biopolímero, composta por uma sequência de três aminoácidos Gly-XY, cadeias polipeptídicas gerando uma fita tripla helicoidal, onde contêm em torno de 30 % de Gly que é o aminoácido glicina; X em geral é prolina compondo 12 % e Y, hidroxilisina 1 % ou hidroxiprolina 10 %, e 11 % de alanina (PORFÍRIO; FANARO, 2016).

Dentre os diversos tipos de colágenos, pode-se destacar aqueles de tipo I e III que estão envolvidos no processo de cicatrização. O colágeno tipo I, possui como característica as três hélices α organizadas, com essa agregação 3D (tridimensional) de triplas hélices em fibrilas de colágeno. Desse modo torna-se para o tecido conjuntivo uma formação da matriz extracelular essencial. É relevante quantificar o colágeno tipo I, já que sua concepção está ligada ao processo final de reparo do tecido em lesões cutâneas. O colágeno tipo III possui menor grau de organização por sua estrutura menos organizada das fibras, que são criadas rapidamente logo no início do processo de cicatrização. Ressalta-se que essas são as etapas do processo de cicatrização, mas que não determinam o tempo, já que cada indivíduo responde de forma diferente (NOGUEIRA, 2016).

Para analisar estas fases da cicatrização, e entender melhor todas as estruturas biológicas envolvidos no processo, se utiliza-se do método de análise da espectroscopia, por ser capaz de identificar as variações das bandas vibracionais das biomoléculas, identificando os compostos dos tecidos e caracterizando por meio dos modos vibracionais dos radicais moleculares, gerando, inclusive, imagens de cortes histológicos.

Nos últimos anos as pesquisas desenvolvidas utilizando o FTIR com o uso do ATR (reflexão total atenuada) permitiu avanços significativos, citados em todos os estudos de análise de tecidos biológicos (NOGUEIRA, 2016).

A espectroscopia ATR-FTIR foi utilizada para comparar tecidos lesionados, tecidos normais da pele e após aplicação do óleo em diferentes tempos de ozonização, os espectros da região da impressão digital de $630\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, fornecem informações dos modos vibracionais associados aos conteúdos relevantes da célula. Utilizou-se dos mesmos procedimentos para as análises dos tecidos orgânicos, buscando identificar e classificar alterações, para diagnóstico (SANTOS et al., 2017).

Conforme revisão feita por Nogueira (2016), que relacionou as características encontradas em tecidos biológicos referente ao órgão pele, utilizando 9 referências de estudos, que analisa exclusivamente o tecido biológico pele, levando em conta o grau da organização das fibras e das estruturas secundárias, que diferencia os tipos de colágeno no processo de cicatrização e de mais compostos encontrados no decorrer do processo, identificando inclusive as modificações biomoleculares em conjunto com as condições fisiológicas e patológicas conhecida como histopatologia molecular.

Lima (2015), ao estudar alterações bioquímicas na pele devido à carcinoma epidermoide cutânea, utilizou-se do FTIR - ATR por oferecer a adição de informações bioquímicas a morfologia histopatológica. A partir de análises hierárquicas conseguiu-se 86,4 % de diferenciação entre as amostras.

Tian (2015), publica que a combinação da classificação SVM junto com a técnica de espectroscopia FTIR é uma ferramenta rápida, objetiva e precisa, para distinguir tumores benignos de malignos durante a operação. Nesse sentido, destaca-se um complemento eficaz para o diagnóstico patológico de tecidos. Tendo taxas de 90 % de sensibilidade, 98 % em especificidade e 94 % na precisão.

Esses estudos analisam as proteínas (Amida I, II e III), lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos - compostos encontrados também nos tecidos da pele, que fazem parte do processo de cicatrização das lesões.

2.11 Motivação da pesquisa

O uso indiscriminado do ozônio em tratamentos médicos vem aumentando e, apesar de inúmeras pesquisas na utilização do ozônio, em especial com óleos ozonizados (com a primeira patente aceita em 1911), ainda se faz necessário o aprofundamento de seu processo de geração e subsequente uso em aplicações biomédicas através do uso de técnicas não-destrutivas. Isto se faz necessário de modo a compreender, por exemplo, o processo de ação do ozônio sob o tratamento de lesões cutâneas pela aplicação de óleos vegetais ozonizados.

Sabe-se que em lesões, o ozônio atua como um possível sinalizador intracelular gerando os peróxidos e aldeídos que interagem com os diferentes tipos de células. Os óleos vegetais ozonizados podem ser líquidos ou semissólidos à temperatura ambiente, sendo esse um meio - estável na conservação dos compostos - obtido por um período para a devida aplicação doméstica, o que permite a distribuição comercial.

Diversos tipos de óleos vegetais podem ser usados com essa finalidade, entre eles são citados: óleo de girassol, canola, soja, coco e azeite de oliva e inúmeros outros extraídos a frio com ou sem o uso de solventes. Para este trabalho, o objetivo é a caracterização por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com o uso do acessório de reflexão total atenuada (ATR) do óleo de girassol, por ter em sua composição a vitamina E (tocoferóis), em diferentes tempos durante o processo de ozonólise do óleo, no decorrer de 90 min, sem o uso de resfriamento. Para primeiro teste de aplicação em lesão cutânea, amostras de óleos de girassol foram ozonizados em diferentes tempos e aplicados em lesão cutânea em modelo animal. Após eutanásia dos animais, amostras de pele, da região com a lesão e região sadia íntegra foram analisadas com FTIR a fim de verificar se houve diferenciação na cicatrização tecidual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos

No laboratório Labmat do LPP (Laboratório de Plasmas e Processos) do Departamento de Física do Instituto Tecnológico Aeronáutico (ITA), com sistema de ar condicionado adequado ao ambiente, seguindo as orientações do fabricante, foram obtidos os espectros FTIR das amostras, com o equipamento de espectroscopia FTIR da Perkin Elmer, modelo Frontier, utilizando acessório de amostragem do tipo ATR (Sensor de reflectância total atenuada), que gerou os espectros no infravermelho na região espectral de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} (Figura 14).

Figura 14 - Espectrômetro FTIR da Perkin Elmer, com acessório de amostragem tipo ATR



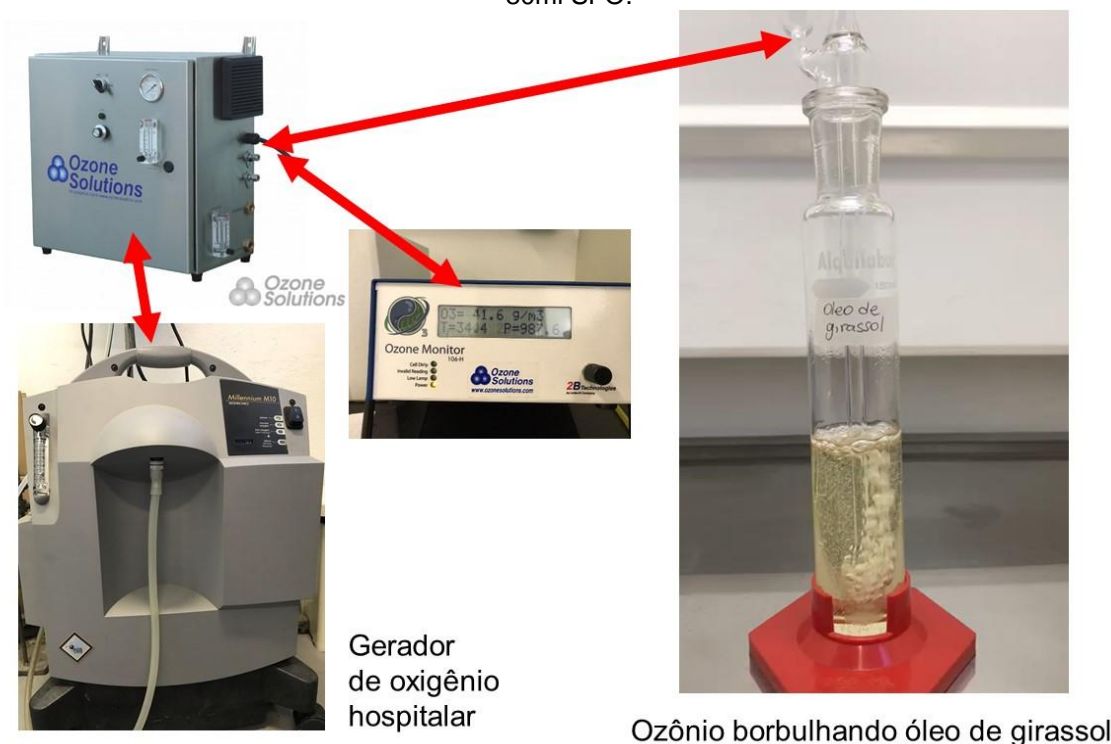
Fonte: Autoria própria.

Para o processo de ozonização do óleo, foi utilizado o gerador de ozônio da *Ozone Solutions* a uma concentração de $41,6\text{ g/m}^3$, inserindo a massa de gás por meio de um borbulhador.

3.2 Protocolo de experimento – óleo ozonizado

O experimento ocorre a partir da aquisição de um litro de óleo de girassol de uma marca comercial para uso alimentício, retirando a gota de amostra diretamente do frasco e levando ao equipamento espectroscópico. Após a análise do óleo de girassol no seu estado natural, nomeado de T0, originaram-se 80 ml de uma amostra, inserindo a massa de gás de ozônio (Figura 15), visando a coleta de amostras deste óleo em diferentes tempos do processo de ozonização

Figura 15 - Processo de ozonização, com gerador de oxigênio hospitalar em uma amostra de 80ml SFO.



Fonte: Autoria própria.

O óleo foi ozonizado durante 90 min, conforme ilustrado na Figura 15. Durante o processo, não foi utilizado um sistema de resfriamento para o controle de temperatura do óleo. A análise dele, no decorrer do processo de ozonização, deu-se no tempo de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min e, por fim, no tempo de 90 min. Foi retirada - com um conta-gotas - uma gota em cada um dos tempos do estudo e levada ao mesmo equipamento da análise inicial gerando 9 espectros no total.

3.3 Protocolo de Experimento – Aplicação do Óleo Ozonizado em Ferida Cutânea de Rato

Após o processo de ozonização do óleo, o produto foi encaminhado para colaboradores que realizaram o procedimento experimental sobre feridas cutâneas em modelo animal. Ratos machos Wistars foram submetidos à anestesia e submetidos a lesão de espessura total, incluindo a derme e a epiderme removida por *punch* dermatológico com diâmetro de 10 mm, para simular uma lesão cutânea. Ao todo, 42 animais passaram pelo procedimento, sendo divididos em 6 grupos: grupo controle (sem uso de óleo), grupo óleo puro (apenas aplicação de óleo de girassol não ozonizado), grupo 30 min (aplicação de óleo ozonizado por 30 minutos), grupo 60 min (aplicação de óleo ozonizado por 60 minutos), grupo 90 min (aplicação de óleo ozonizado por 90 minutos) e grupo 120 min (aplicação de óleo ozonizado por 120 minutos), para essa etapa, optou-se em fazer uso do óleo ozonizado por 120 min, sendo gerado esta amostra. Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios de experimentação animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo: 0312/2019)

Após um período de 10 dias das lesões provocadas e tratadas com 80 uL de cada amostra em seus respectivos grupos, iniciando a aplicação após a 1 h da cirurgia ter ocorrido e repetindo diariamente no período da manhã, os animais passaram pela eutanásia. A região da epiderme abrangendo a lesão, região limítrofe e a epiderme foram extraídas, sendo as amostras incluídas em parafina e seções obtidas por meio de um micrótomo rotativo, estando no processo de reconstrução tecidual.

A partir das amostras obtidas, foram coletados pelo menos 3 espectros FTIR de cada lâmina. O equipamento usado foi o mesmo para as amostras de óleo de girassol ozonizado. A região analisada nessas amostras corresponde à região de 1800 cm^{-1} a 620 cm^{-1}

3.4 Processamento e Análise dos Dados

Os espectros obtidos foram normalizados pelo equipamento logo após a captura do espectro FTIR. A análise dos espectros envolveu três regiões espectrais onde observou-se maior variação entre as amostras. A deconvolução foi baseada na 2ª derivada da região de interesse, sendo realizada pelo software PeakFit® V4.12 (SeaSolve Software Inc.), delimitando cada uma das regiões. A partir da utilização da

segunda derivada para identificar os centros de bandas dos sinais em estudo, houve o processo de deconvolução, geraram-se as gaussianas de cada uma das bandas, obtendo os valores das áreas, amplitude, centro da banda e a largura de cada gaussiana.

Foi necessário definir um padrão dos parâmetros para uma análise uniforme. Definidos a partir de alguns ensaios aleatórios das amostras, que se repetiram com maior frequência, a *baseline* (linha de base) foi a Linear, D2, *smoothing* (suavização) foi de 17,9 %, o *Peak Type* foi Spectroscopy e Gauss Amp. com a função *Review Fit*. Para a criação dos Figuras foi utilizado o Software Matlab 2015a, a partir do desenvolvimento de um código de leitura dos arquivos gerado no PeakFit, para obter maior qualidade nos Figuras.

3.5 Análise Estatística

Para cada região, o procedimento foi realizado 10 vezes, visando obter um resultado médios no cálculo das áreas das bandas encontrados em cada uma das 4 regiões, já que foram observadas pequenas variações ocorrendo durante o processo. Para a comparação estatística entre os conjuntos de valores de área obtidos de cada uma das quatro regiões foi usado o software Graph Pad Prism 5.

Para verificar se os dados seguiam uma distribuição gaussiana, foram aplicados os testes kolmogorov-Smirnov. Assim, usou-se a análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para distribuição não gaussiana (Apêndice B).

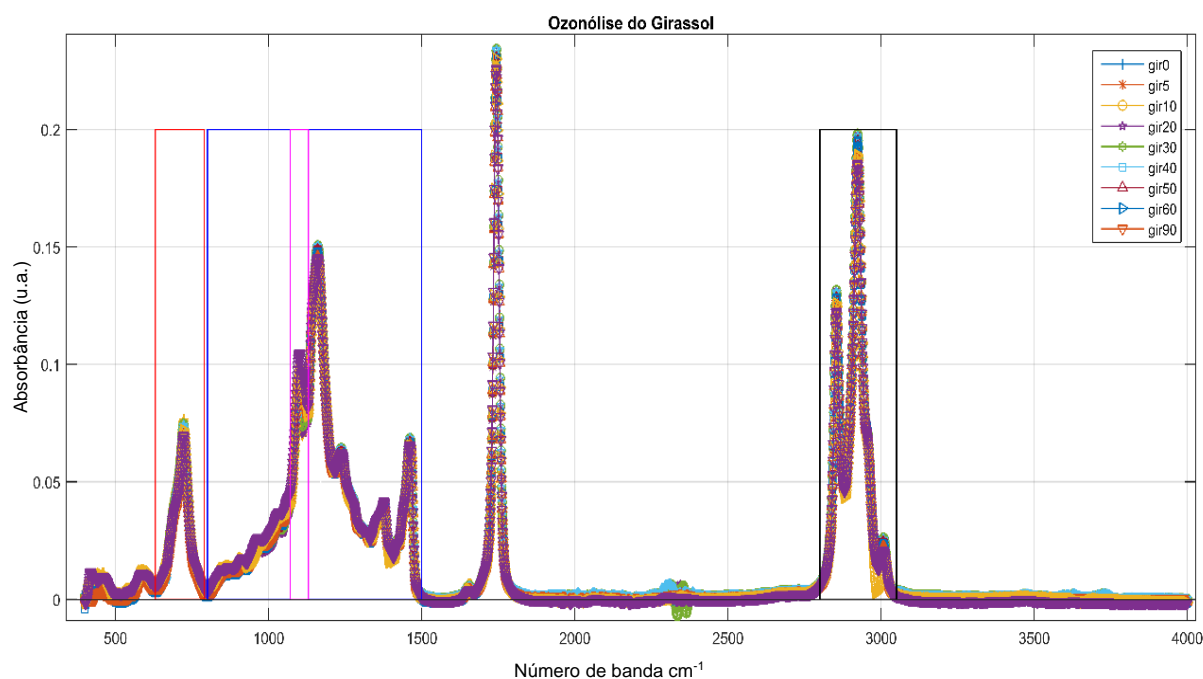
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das duas etapas são apresentados nesse capítulo de acordo com os protocolos experimentais desenvolvidos, sendo que inicialmente são apresentados os resultados e discussões obtidos a partir dos espectros FTIR do óleo de girassol ozonizado durante 90 minutos. Após, são apresentados os resultados obtidos a partir dos espectros FTIR das lesões cutâneas com aplicação dos óleos de girassol.

4.1 Espectros FTIR da Ozonólise do Óleo de Girassol

Após 90 min de ozonólise do óleo de girassol, os seguintes espectros foram obtidos, de acordo com o tempo: antes de iniciar a ozonização (T0), 5 min após iniciado o procedimento (T5), 10 min iniciado o procedimento (T10), 20 min (T20), 30 min (T30), 40 min (T40), 50 min (T50), 60 min (T60) e 90 min (T90). As Figuras 16 e 17 apresentam os espectros obtidos destacando-se as regiões de análise.

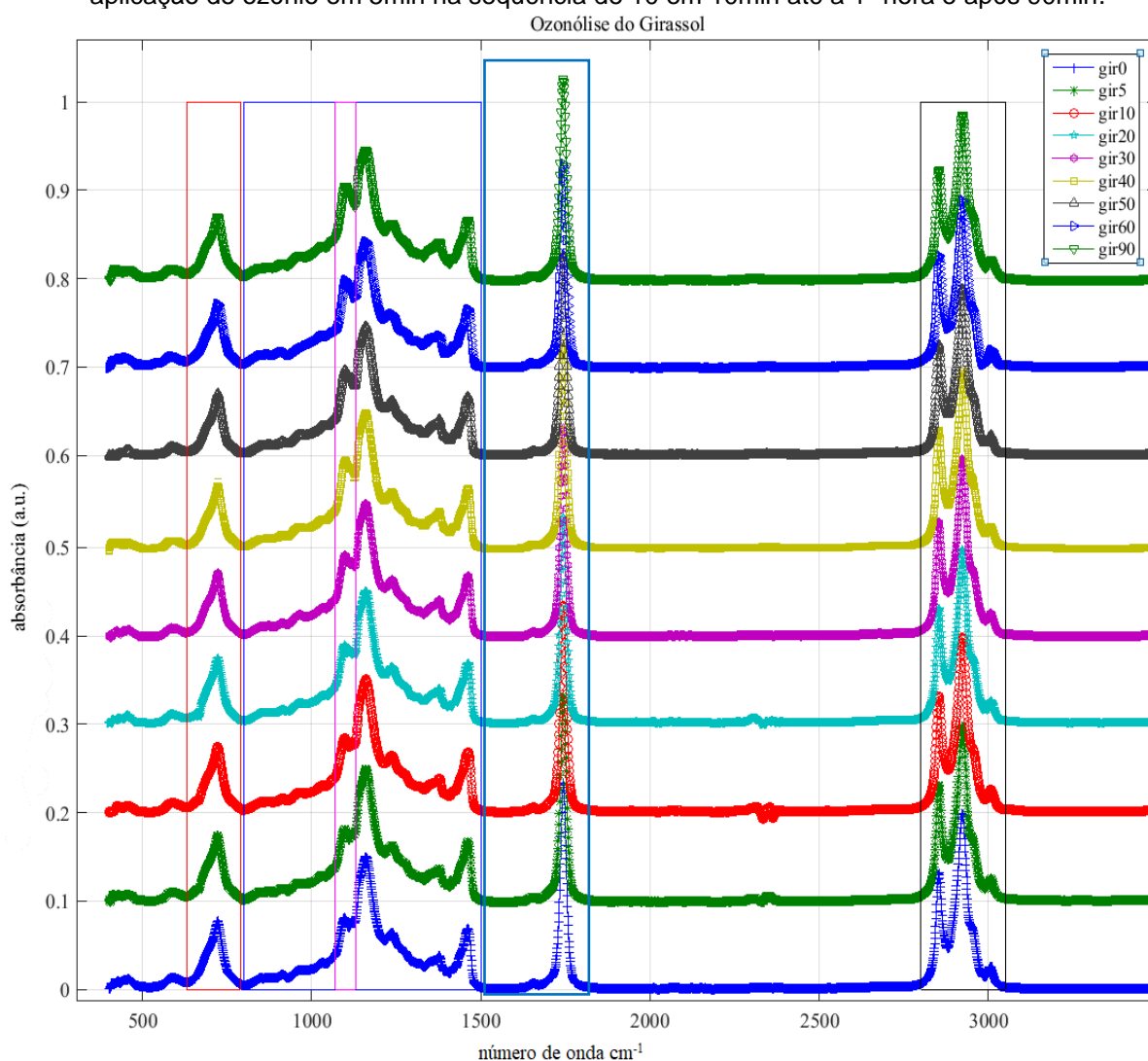
Figura 16 - Espectro FTIR do óleo de Girassol com a sobreposição de todos os sinais.



Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, foram definidas as regiões de análise de forma visual, onde se inicia uma nova banda, logo após o término de outra banda em seu ponto mais inferior antes da retomada da absorbância: 1ª região de 790 cm^{-1} a 630 cm^{-1} , 2ª região de 1500 cm^{-1} a 800 cm^{-1} , 3ª região de 1130 cm^{-1} a 1070 cm^{-1} (sub-região da anterior) e 4ª região entre 3050 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} , com o objetivo de analisar regiões menores (Figura 17).

Figura 17 - Sinais FTIR do óleo de Girassol sem ozonização (gir0), e os demais sinais com a aplicação de ozônio em 5min na sequência de 10 em 10min até a 1ª hora e após 90min.

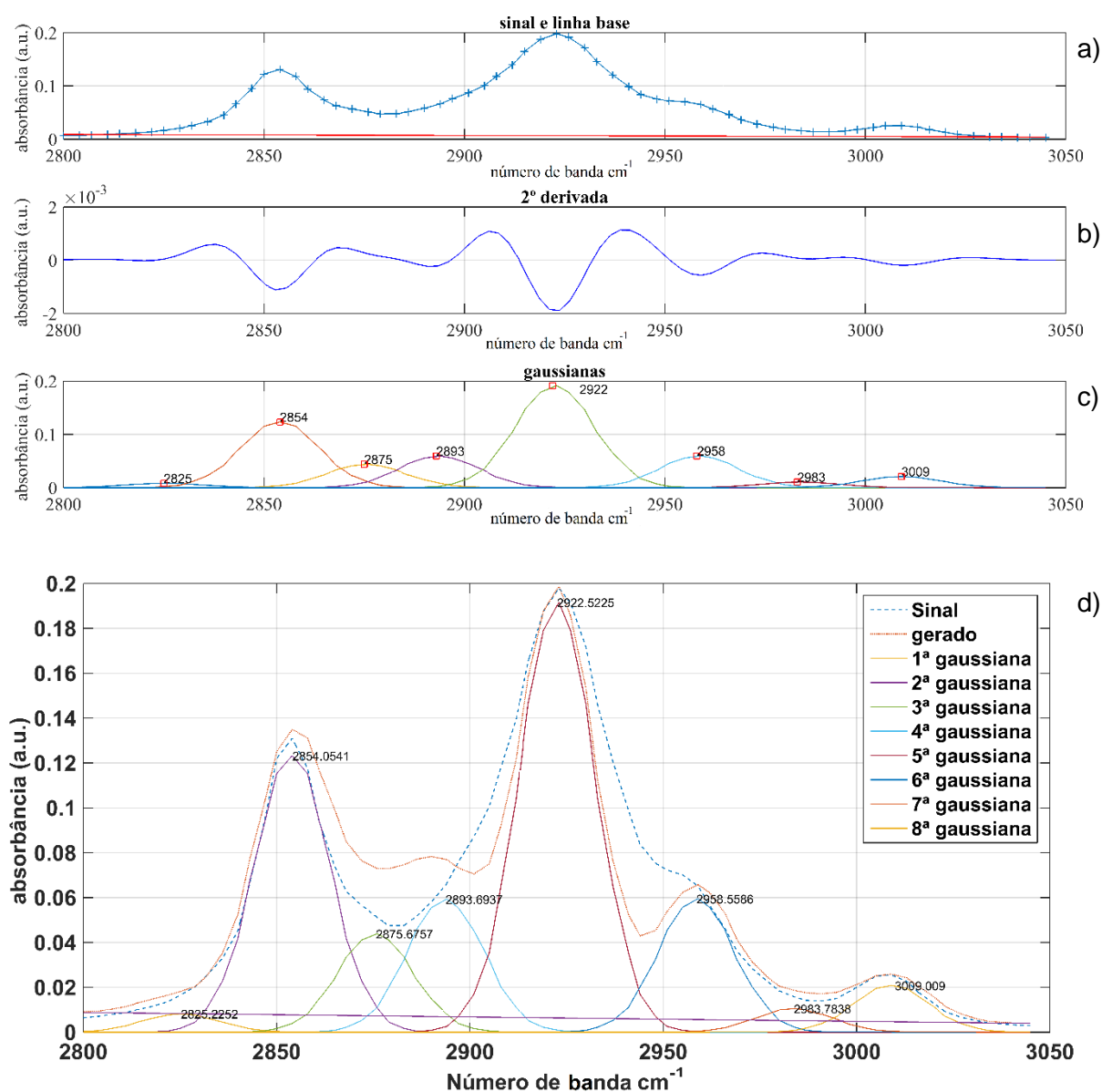


Fonte: Autoria própria.

Um exemplo dos resultados obtidos pelo processo de deconvolução para a região de 3050 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} está demonstrado na Figura 18 – a qual mostra o trecho do espectro original: (a) a obtenção da 2ª derivada; (b) e a partir da identificação

dos centros das bandas, que identificaram os picos encontrados na 2ª derivada; a partir desse aspecto, foi calculada a deconvolução do sinal original (c); e (d) a sobreposição do espectro original com as bandas obtidas pelo processo de deconvolução da região.

Figura 18 - a) Sinal do girassol puro com base line região 2800 a 3050 cm^{-1} , b) 2ª derivada, c) gaussianas geradas pela deconvolução, d) sinal original com as Gaussianas sobrepostas do 1º ensaio do zero_girassol_1_1_total.txt. Dados gerados pelo PeakFit e Figuras gerados no MatLab.



Fonte: Autoria própria.

Durante o processo de ozonólise observou-se o aumento da temperatura do óleo até o tempo de 30 min. Isso ocorre pois nos primeiros 30 min a quebra das

ligações duplas C=C, como descrito pelo mecanismo Criegee, gera a mudança dos elétrons entre os compostos em um processo exotérmico. Ao encerrar a degradação da maior parte dos compostos que reagem com o processo de ozonização, ocorre a redução do movimento de elétrons, conforme é possível visualizar no Quadro 7. O que, provavelmente, desencadeia a redução de temperatura, que também é passível da ação do resfriamento que se dá pela inserção contínua do próprio gás ozônio no sistema de borbulhamento, já que a introdução da massa de gás se encontra a uma temperatura ambiente, inferior à do óleo durante o processo.

Quadro 7: Relação tempo pela temperatura durante o processo de ozonólise sem o uso do banho maria para o controle da temperatura

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0	22,1
5	26,8
10	30,7
20	33,1
30	33,4
40	31,2
50	28,1
60	28,1
90	26,8

Fonte: Autoria própria.

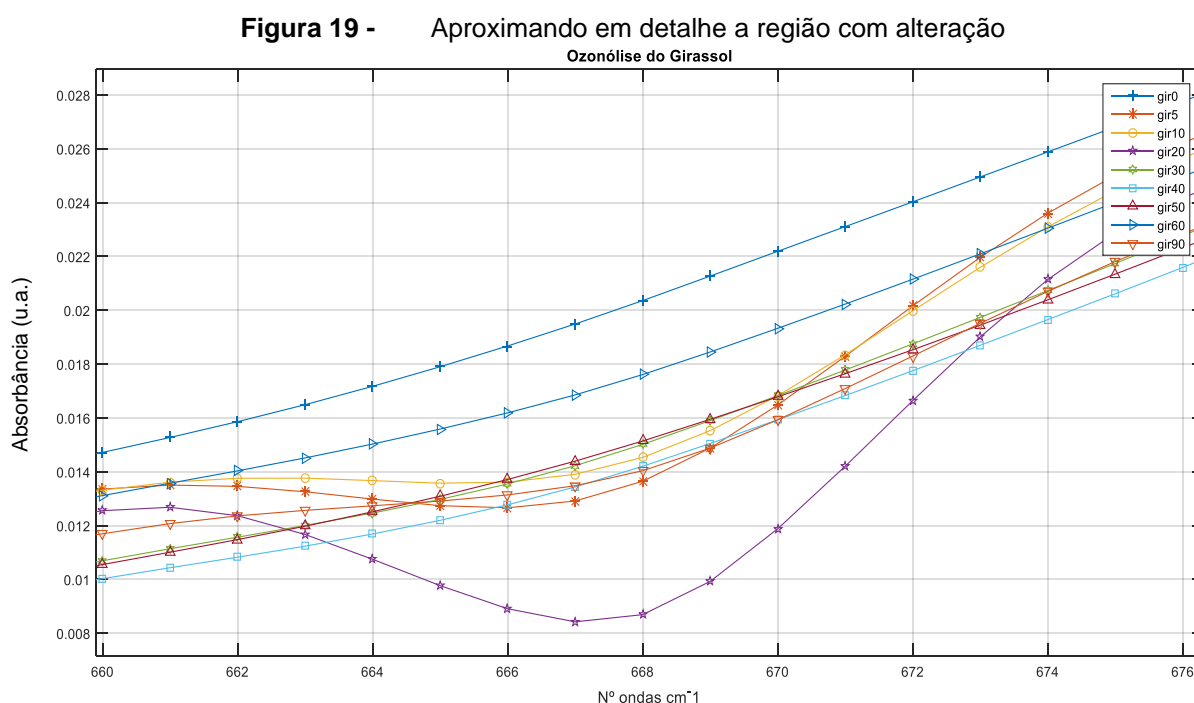
Essa reação demonstra a primeira etapa do mecanismo de Criegee que gerou ozonídeos. Com a saturação de ozônio, a decomposição dos ozonídeos geram o composto carbonílico e óxido de carbonila, com a insistente inserção do O₃. Após a 1ª etapa de degradação e geração de compostos, principalmente a 1,2,4-trioxolanes e polímeros de ozonídeos, descritos no mecanismo Criegee (CRIEGEE, 1975 e SADOWSKA, 2008).

O uso de banho maria no processo de ozonização é comum na produção de óleos vegetais ozonizados, visando reduzir a degradação durante todo o processo. No entanto, haverá de qualquer forma a degradação descrita pelo mecanismo de Criegee; um dos compostos a ser degradado, devido à instabilidade deste composto no ambiente, será convertido em gás - provavelmente por ter característica de ser altamente volátil não foi encontrado na análise, ficando os ozonídeos e peróxidos. Vale ressaltar que para o processo em discussão, não houve o controle da temperatura por meio do banho Maria.

4.1.1 Análise da 1ª região 790 a 630 cm^{-1}

A alteração se dá de forma suave na redução do sinal na banda 667 cm^{-1} no tempo de ozonólise em gir5=T5, gir10=T10 e gir20=T20. No tempo de 5 min de ozonização houve uma queda significativa, recuando bem pouco no tempo de 10 min com uma nova queda considerável no tempo de 20 min. Os demais tempos permaneceram em uma linha constante e, apenas com os 90 min, observa-se novamente uma pequena variação.

O espectro na região de 660 a 676 cm^{-1} é demonstrado na Figura 19. Segundo Silverstein (1998), o grupo funcional O-H com frequência nominal no centro de banda 650 cm^{-1} , tem vibração de flexão ou angular fora do plano; duas moléculas se movem em relação à molécula central em forma de tesoura e por ser fora do plano este movimento ocorre para a frente e para trás alternadamente. Sendo esse o mais próximo da banda em análise 667 cm^{-1} , essa oscilação também pode ocorrer por motivos de interferência de aquecimento ou mesmo alguma oscilação no momento da aquisição do sinal, ou seja, um ruído.



Fonte: Autoria própria.

Para todos os 10 ensaios realizados com o PeakFit nessa região foram encontrados os mesmos valores de largura nas 4 bandas, com variação do centro de

banda em $\pm 7 \text{ cm}^{-1}$; destacam-se o T5 e T20 que adquiriram um 5º centro de banda, na 1º banda 641 cm^{-1} e na 3ª banda 695 cm^{-1} , respectivamente (Quadro 8).

Quadro 8: Resumo dos 10 ensaios efetuados com o PeakFit destacando as bandas que surgiram em dois tempos de ozonização

	Pico	Área	Amplitude	Centro	Largura
T0	1	0,0654	0,0020	645	31,1041
	2	1,0914	0,0330	688	
	3	2,2574	0,0682	724	
	4	0,2009	0,0061	768	
T5	1	0,0597	0,0018	641	31,2897
	2	0,2199	0,0066	656	
	3	0,8786	0,0264	681	
	4	2,2591	0,0678	724	
	5	0,2064	0,0062	768	
T10	1	0,1749	0,0051	656	32,01296
	2	0,8493	0,0249	681	
	3	2,2935	0,0673	724	
	4	0,2107	0,0062	768	
T20	1	0,0916	0,0037	656	23,3923
	2	0,5605	0,0225	681	
	3	0,9161	0,0368	696	
	4	1,6564	0,0665	724	
	5	0,1508	0,0061	768	
T30	1	0,0582	0,0017	645	31,2806
	2	1,0405	0,0312	688	
	3	2,1912	0,0658	724	
	4	0,1630	0,0049	771	
T40	1	0,1572	0,0049	656	29,9439
	2	0,9756	0,0306	688	
	3	2,0793	0,0652	724	
	4	0,1966	0,0062	768	
T50	1	0,0573	0,0017	645	30,9241
	2	1,0118	0,0307	688	
	3	2,1425	0,0651	724	
	4	0,2159	0,0066	768	
T60	1	0,0824	0,0025	649	30,5928
	2	0,9883	0,0303	688	
	3	2,1134	0,0649	724	
	4	0,2031	0,0062	768	
T90	1	0,1305	0,0041	656	29,7163
	2	0,9268	0,0293	688	
	3	2,0013	0,0633	724	
	4	0,2031	0,0062	768	

Fonte: Autoria própria.

Usando-se do software GraphPad Prism 5 (Software Mackiev™), foram inseridas as áreas das 9 amostras (T0 a T90) de todos os 10 ensaios realizados para cada uma das amostras, encontradas por meio do software PeakFit. Para a verificação desta invariância, foram efetuadas mudanças no range com variação de $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$, visando encontrar possíveis alterações. Os resultados obtidos permaneceram os mesmos (Apêndice A).

Utilizando as classificações segundo Silverstein, Guillén e Cabo (1198), as 4 bandas encontradas têm sua análise nos centros de bandas:

1) 655 cm^{-1} representa o grupo funcional O-H com frequência nominal em 650 cm^{-1} no modo vibracional de flexão fora do plano;

2) 688 cm^{-1} a frequência nominal é o centro de banda 685 cm^{-1} do grupo funcional C–C com vibração de flexão fora do plano;

3) 724 cm^{-1} que vai de encontro com a frequência nominal 723 cm^{-1} que tem seu grupo funcional $-(\text{CH}_2)_n-$ com deformação angular assimétrica no plano denominada de balanço;

4) 767 cm^{-1} se encontra no range de 802 a 754 cm^{-1} não existe para este range uma frequência nominal definida, porém se encontra no grupo funcional C–H com vibração de flexão fora do plano;

Toda essa região possui ligação simples entre os compostos, os quais sofrem mínimas alterações no processo de ozonólise.

4.1.2 Análise da 2ª Região 1800 a 800 cm^{-1}

Observou-se nessa região que após a deconvolução foram obtidas 14 bandas. Valores obtidos pela estatística descritiva para as bandas desta região. Por meio da análise usando o teste comparativo de Dunn, é possível observar que apenas nos centros de bandas P6, P7, P8, P10, P12, P13 e P14 (Apêndice B) tem diferenças significativas ($p < 0,05$) inferior ao tempo de 20 min de ozonólise. Havendo ainda uma diferenciação das outras bandas nesta região em relação ao T0 e os espectros a partir de T20, incluindo o centro de banda P6, P8 apresentaram alteração entre o T0 e T5, já nos P7 e P10 a diferença ocorre entre T0 e T10. No centro de banda P12 que se refere a carbonila, surge em T20 até o T50 o P11 que demonstra o aumento do composto C=C- com vibração de alongamento, estando em seu número de onda $1634,3 \pm 16,6 \text{ cm}^{-1}$, tendo suas diferenças estatísticas significativas entre os tempos

20, 30 e 40 minutos, O surgimento desta banda se justifica devido à quebra das ligações duplas de carbono da cadeia lipídica causando o aumento da cadeia de CO₂, reduzindo também os compostos -HC=CH- seguindo o que o mecanismo de Criegee descreve, onde o subproduto obtido no final do mecanismo são os aldeídos e as cetonas, caracterizados pelo grupo de carbonila ligado a um átomo de hidrogênio e ligação dupla com oxigênio sempre no final de uma cadeia de carbono. O aldeído com maior aplicação é o metanal que compõe o formol.

Considerando que as ligações duplas de carbono são as que primeiro sofrem a degradação do ozônio - o que possivelmente justifica o centro de banda 1 - sofre alterações. No entanto, para as demais bandas por serem ligações simples, provavelmente existe o surgimento destes novos compostos a partir da degradação dos compostos iniciais. Ainda cabe nesta região uma análise mais cautelosa dos demais valores. Analisando aqueles que apresentam diferenças para cada uma das bandas segundo Silverstein, Guillén e Cabo (1198) e para uma análise dos grupos funcionais foi criado o Quadro 9.

Quadro 9: Classificação dos grupos funcionais segundo Silverstein, Guillén e Cabo (1198)

Nº Pico	Centro de Banda (cm ⁻¹)	Frequência nominal (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Modo vibracional
1	850	850	=CH ₂	:d(CH ₂) Balanço
2	911	914	-HC=CH- (cis)	ρ↑↓(CH), Flexão (Fora do Plano)
3	965	968	-HC=CH- (trans)	
4	1030	1033	-C-O	ν(CO) alongamento
5	1091	1097		
6	1180	1163		
7	1236	1238		
8	1300	1319	C=C	Flexão (no plano) deformação de alcenos (CC-H)
9	1365	1359	O-H	Flexão (no plano)
10	1452	1450	-C-H(CH ₃)	Flexão (sim)
11*	1634.3 ± 16.6	1650	-C=C-	alongamento
12	1658	1650		
13	1701			Sobretom de 850 cm ⁻¹ banda
14	1744	1725	-C=O	n(C=O) alongamento

Fonte: Autoria própria.

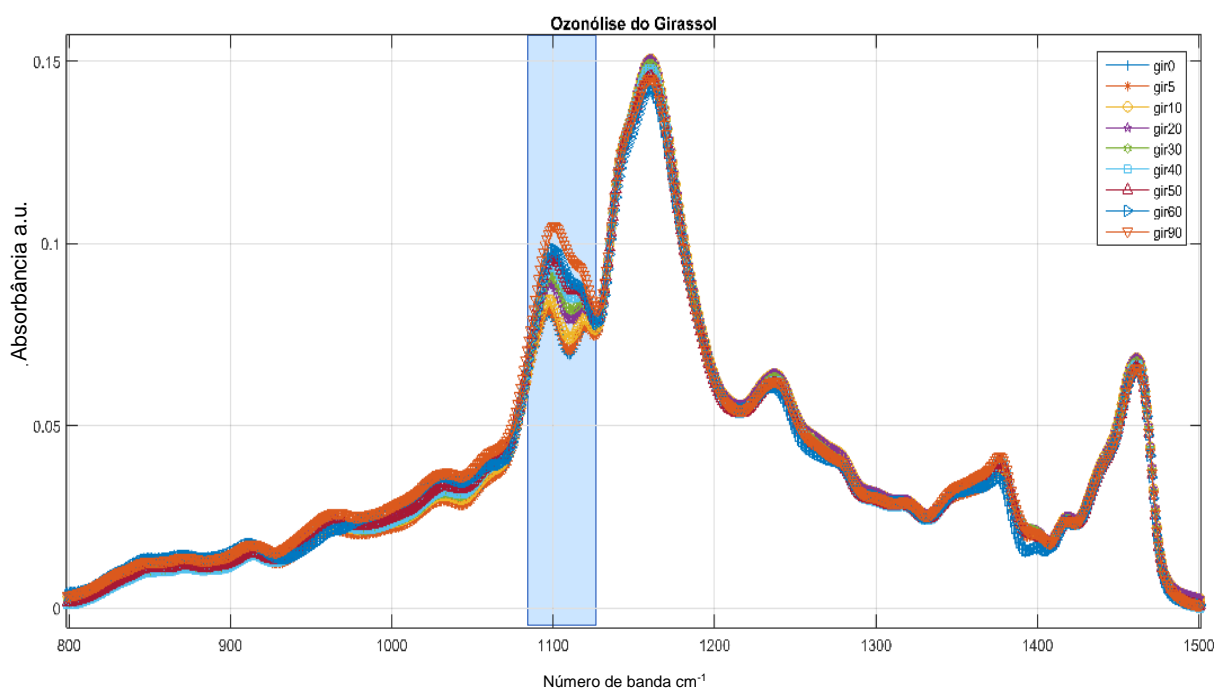
Em comparação com os estudos encontrados referente ao óleo de soja com análise de espectros por FTIR, na região de 1300 a 900 cm⁻¹ (onde contém uma parte da região de “impressão digital” dos compostos) as vibrações de deformação axial da

ligação C–O que referem-se aos ésteres constituintes dos triacilglicerídeos, nos quais se encontram nas bandas de absorção (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2013), onde os espectros do óleo de Girassol puro e ozonizado possuem esta mesma característica, levando à constatação que os espectros FTIR dos óleos vegetais possuem poucas alterações entre eles no que se refere aos compostos a serem encontrados em suas estruturas.

4.1.3 Análise da Sub-região 1110 a 1070 cm^{-1} da 2ª região

A região espectral de 1300 – 900 cm^{-1} é considerada a impressão digital dos compostos com ligações -C-O e vibração de deformação axial relacionada com o ranger característico do alongamento $\nu(\text{CO})$ de forma a constituir os ésteres do triacilglicerol (Tena, 2009). É possível visualizar as alterações ocorrendo durante a ozonólise desde o T5 até o T90 de forma crescente. No entanto, essas alterações são intercaladas entre os tempos de ozonização, conforme a Figura 20.

Figura 20 - Destaca-se as alterações nesta região entre 1070 a 1110 cm^{-1} com a sobreposição dos espectros FTIR.



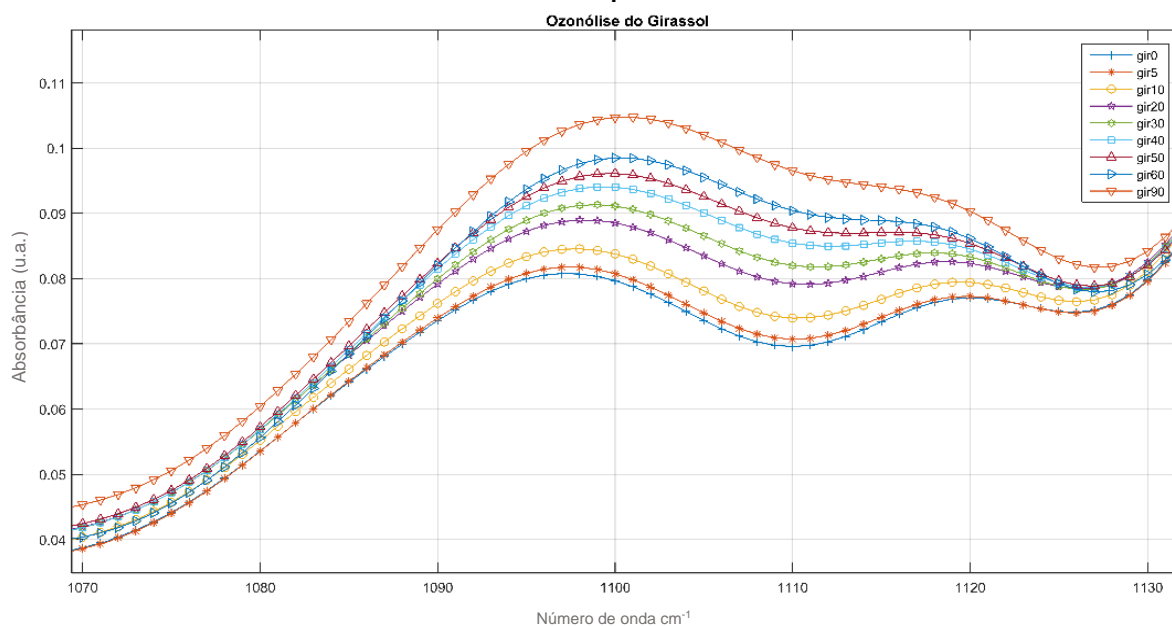
Fonte: Autoria própria.

Com tais características, ao analisar esses limites, encontrou-se mais um centro de banda. Nesse intervalo existem duas bandas subsequentes, sendo uma

iniciando em 1070 cm^{-1} e encerrando em 1110 cm^{-1} , encontrada na 1ª análise da 2ª região, refere ao centro de banda 5; e a segunda se inicia no mesmo ponto de encerramento da anterior em 1110 cm^{-1} e se encerra em 1126 cm^{-1} , não encontrado no mesmo processo da deconvolução anterior.

O centro da banda 1091 cm^{-1} , com frequência nominal 1097 cm^{-1} , refere-se à ligação química -C-O com vibração de alongamento característica. Essa classificação é a mesma para o centro de banda 1120 cm^{-1} com frequência nominal 1118 cm^{-1} ., segundo Guillén and Cabo (1998), no mesmo grupo funcional -C-O e com mesma vibração de alongamento (Figura 21).

Figura 21 - Região 1070 cm^{-1} e 1130 cm^{-1} dos espectros FTIR obtidos nos diferentes tempos ozonólise do óleo de girassol



Fonte: Autoria própria.

Para todos os 10 ensaios realizados ocorreu uma leve diferença apenas no 1º ensaio, no entanto, mantêm-se o centro de banda e pequenas alterações de valores na absorvância, bem como largura e área das duas bandas encontradas com o software PeakFit v4.2. O deslocamento das bandas ocorre a partir do T30, no aumento da absorvância. Ressalta-se que a partir dos 20 minutos existe o fator limitante no processo de quebra das ligações de carbono que devido à geração do difenildioxirano sua estabilidade ocorre aos 20°C (BLOCK, et al., 2012). Considerando que no T20 a temperatura já se encontra em $\pm 33^{\circ}\text{C}$, esse composto não será visualizado.

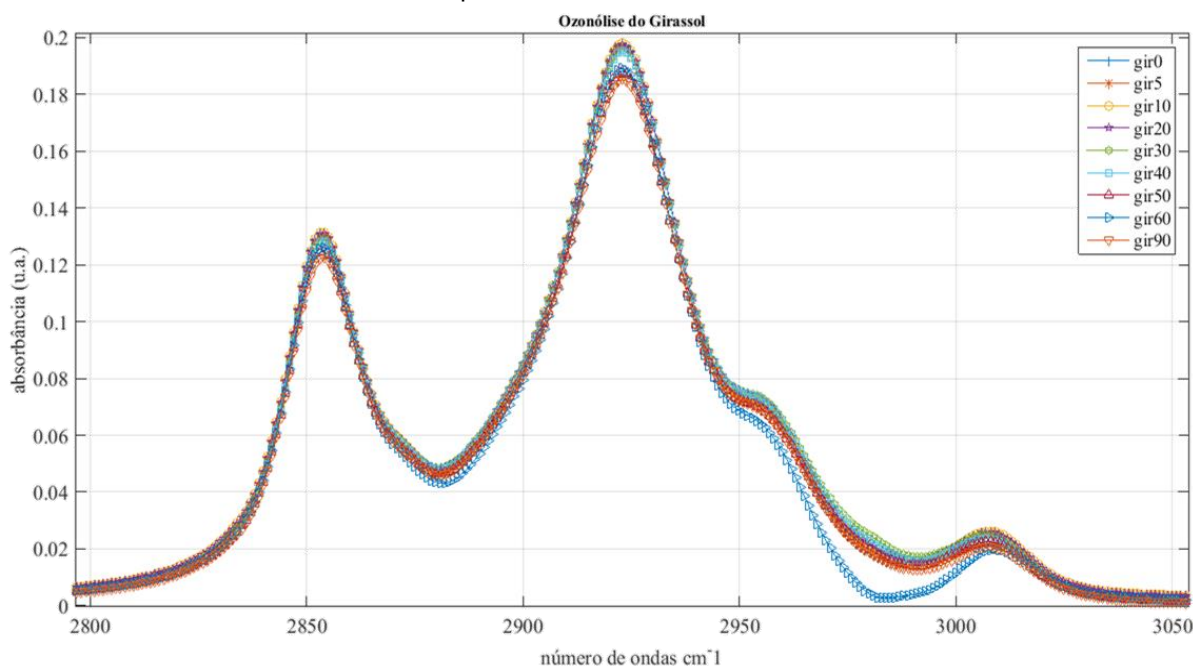
Utilizando-se do mesmo processo anterior para analisar o 2º centro de banda – P2 (1120 cm^{-1}) da região em estudo dos 10 ensaios realizados, no T0 e T40 é que se encontram as alterações. Esse é exatamente o centro de banda que só foi possível analisar após efetuar a seleção dessa região específica (Apêndice C).

Utilizando a distribuição gaussiana pelo cálculo da área, tendo como resultado valores diferentes em T0 e T40 entre os dois tempos em especial, é nessas 2 bandas analisadas de forma individual, em que se destacam as alterações que ocorre nesses compostos após o T30 no processo de ozonólise, com o aumento da absorbância, quase que de forma constante com a variação em torno de 10 na diferença da soma da classificação (Dif) entre as colunas dos tempos de uma em uma. Vale também ressaltar que S (Summary), o resumo conclui que o nível de importância para cada uma das linhas tem uma significância alta (***)

4.1.4 Análise da Região $3050\text{ a }2800\text{ cm}^{-1}$ da 3ª região

Nessa região, encontra-se por meio do processo de deconvolução, 8 bandas para serem analisadas. A Figura 22 exhibe claramente todos os tempos da ozonólise nesta região escolhida.

Figura 22 - Espectros FTIR do óleo de girassol puro e do óleo ozonizado em diferentes tempos, sobreposto, entre 2800 cm^{-1} e 3050 cm^{-1}



Fonte: Autoria própria.

Em uma primeira análise visual é notória a redução de algum dos compostos no tempo de 60 minutos e o aumento de compostos no tempo de 30 minutos.

Verificando os ensaios no T60 de ozonização, tem-se o ensaio 9 que não apresenta o 1º centro de banda 2821 cm^{-1} , tendo o seu 1º centro em 2854 cm^{-1} . Dessa forma a sua 1ª banda é equivalente ao 2º dos demais ensaios, e surge uma nova banda em 2872 cm^{-1} ; as bandas de 3 a 5 são um padrão para todos os ensaios, e um 6º centro de banda diferente ocorre na banda 2972 cm^{-1} , o que criou um 7º centro de banda, para o T60, que não aparece nos demais ensaios que se equivale ao 6º centro de banda (Quadro 10).

Quadro 10: Resultados obtidos a partir da deconvolução com os 10 ensaios para a 3050 a 2800 cm^{-1}

	Nº	Área	Amplitude	Centro	Largura
1-8 e 10 ensaio	1	0,1374	0,0051	2822	25,47
1-10 ensaio	2	3,2205	0,1188	2854	25,47
9 ensaio	2	1,1390	0,0472	2872	22,68
1-10 ensaio	3	1,521	0,0561	2894	25,47
1 -10 ensaio	4	4,9703	0,1832	2923	25,47
1 -10 ensaio	5	1,4303	0,0527	2958	25,47
9 ensaio	6	0,2672	0,0111	2973	22,68
1-8 e 10 ensaio	6	0,4285	0,0158	3009	25,47
9 ensaio	7	0,3815			22,68

Fonte: Autoria própria.

O Quadro 11 foi gerado a partir dos dados calculados com os valores médios dos 10 ensaios realizados. É importante observar que no tempo de 50 e tempo de 60 minutos existem alterações significativas. Analisando o processo de ozonólise no tempo de 50 minutos, o cálculo da área das bandas 2 e 5 apresenta desvio médio entre os 10 ensaios aplicados no PeakFit e a variação de seu valor também é significativa em relação aos tempos anteriores.

Quadro 11: Áreas do software PeakFit e organizada para a visualização do T50 e T60

	T0 (a)	T5 (b)	T10 (c)	T20 (d)	T30 (e)	T40 (f)	T50 (g)	T60 (h)	T90 (i)	p-value
P1	*h	*f, g, h, i	*f, g, h, i	*g, h, i	*h	*i				
2825 cm ⁻¹	0.201 ±0.001	0.205±0.002	0.205	0.202	0.199	0.197	0.190±0.002	0.137	0.188	< 0.0001
P2	*e, g, i	*g, i	*g, i		*h	*h	*h	*i		
2854 cm ⁻¹	2.962± 0.213	2.893±0.283	3.018	3.008	2.995	3.000	2.571±0.350	3.220	2.874	< 0.0001
P3	*d, e, f, h	*d, e, f, h	*h	*g	*g	*g, i	*h	*i		
2875 cm ⁻¹	1.076± 0.008	1.076±0.011	1.086	1.097	1.127	1.128	1.07±0.014	N.A.	1.086	< 0.0001
P4	*d, e, f, h	*d, e, f, h	*f, h		*g	*g	*h			
2893 cm ⁻¹	1.455± 0.011	1.454±0.015	1.467	1.484	1.526	1.531	1.452±0.019	1.521	1.473	< 0.0001
P5	*d, e, h, i	*d, h, i	*h, i			*h	*h, i	*i		
2922 cm ⁻¹	4.787± 0.251	4.861±0.334	4.690	4.677	4.681	4.687	4.897±0.415	4.970	4.463	< 0.0001
P6	*d, e, f	*e	*h	*g, h	*g, h, i	*g, h, i				
2958 cm ⁻¹	1.459± 0.012	1.466±0.016	1.486	1.505	1.569	1.561	1.453±0.020	1.430	1.472	< 0.0001
P7	*d, e, f, g	*d, e, f, h	*e, f		*i					
2983 cm ⁻¹	0.259± 0.002	0.263±0.003	0.282	0.309	0.414	0.383	0.307±0.004	N.A.	0.294	< 0.0001
P8	*d, f, g, i	*g, i	*g, i		*f, g, i					
3009 cm ⁻¹	0.511± 0.005	0.502±0.006	0.500	0.493	0.506	0.490	0.451±0.007	0.429	0.430	< 0.0001

Fonte: Autoria própria.

No tempo de 60 minutos os valores das áreas 3 e 7 desaparecem havendo, assim, a redução de duas bandas para esse tempo de ozonização. Na região 3050 cm⁻¹ a 2825 cm⁻¹ foi realizada a análise por 2^a derivada, onde os pontos mínimos da curva obtida são coincidentes com as máximas das bandas presentes nessa região espectral segundo os cálculos estatísticos efetuados pelo GraphPad. Para cada espectro, a 2^a derivada obteve 8 bandas em comum a todo o conjunto, lembrando que, para tempo de 60 minutos, obteve-se a redução de duas bandas: 2875 cm⁻¹ e 2983 cm⁻¹.

Para essa região, analisando cada uma das 8 bandas encontradas, pode-se descrever como sendo:

Às bandas de 2825 cm⁻¹, 2854 cm⁻¹ e 2875 cm⁻¹ a frequência nominal mais próxima é 2853 cm⁻¹, conforme quadro de referência de Silverstein e Guillén and Cabo (1198), com grupo funcional –C–H(CH₂) com vibração por alongamento síncrono, sendo que o 3^o centro de banda não é identificado no T60, que pode estar relacionada a sobreposição deste sinal ao centro de banda 2854 cm⁻¹;

Às bandas 2893 cm⁻¹ e 2922 cm⁻¹, respectivamente o 4^o e 5^o centro de banda, a frequência nominal 2924 cm⁻¹ e o grupo funcional que ambos pertencem é –C–H(CH₂) e vibração de alongamento assíncrona;

O 6^o centro de banda é a região 2958 cm⁻¹ que tem a vibração igual a região anterior e o seu grupo funcional –C–H(CH₃) e a frequência nominal 2953 cm⁻¹;

Penúltimo centro de banda de região 2983 cm^{-1} outro centro de banda que no T60 deixa de existir, está incluída na classificação da região anterior que está na região de 2989 a 2946 cm^{-1} , por ter sua área tão pequena, provavelmente houve o seu deslocamento para a região 5, que inclusive, possui alteração em seu valor de área;

A última região se encontra em 3009 cm^{-1} bem próximo da sua região nominal 3006 cm^{-1} do grupo funcional $=\text{C}-\text{H}$ (cis) e vibração por alongamento. Para a análise desenvolvida por García em 2013 para os espectros FTIR do óleo de soja, cuja composição química está presente nos grupos funcionais dos ácidos graxos, com bandas de absorção de intensidade alta na região de 3050 a 2800 cm^{-1} , que foram atribuídas às vibrações de deformação axial das ligações duplas ($=\text{C}-\text{H}$), ligações $\text{C}-\text{H}$ dos grupamentos metila (CH_3), metileno (CH_2), o mesmo ocorreu no estudo em questão, o que leva a entender que as alterações ocorridas no processo de ozonização do óleo de girassol e no óleo de soja são muito similares. Valeria confrontar esses dados com os demais óleos vegetais virgens (extraídos a frio).

4.2 Análise dos sinais após aplicação do óleo na pele com lesão

É importante salientar que amostras de óleos de girassol ozonizados foram obtidas em diferentes tempos: controle não ozonizado (T0), 30 minutos (T30), 60 minutos (T60), 90 min (T90) e 120 min (T120). Essas amostras foram enviadas para colaboradores, que realizaram a aplicação em lesão de pele em modelo animal. O protocolo experimental, cuja uma das etapas envolvia aplicação do óleo ozonizado, foi aprovado pelo comitê de pesquisa em animal da Universidade Brasil. Para esse trabalho, considerou-se apenas os espectros FTIR obtidos a partir das amostras obtidas na parte experimental.

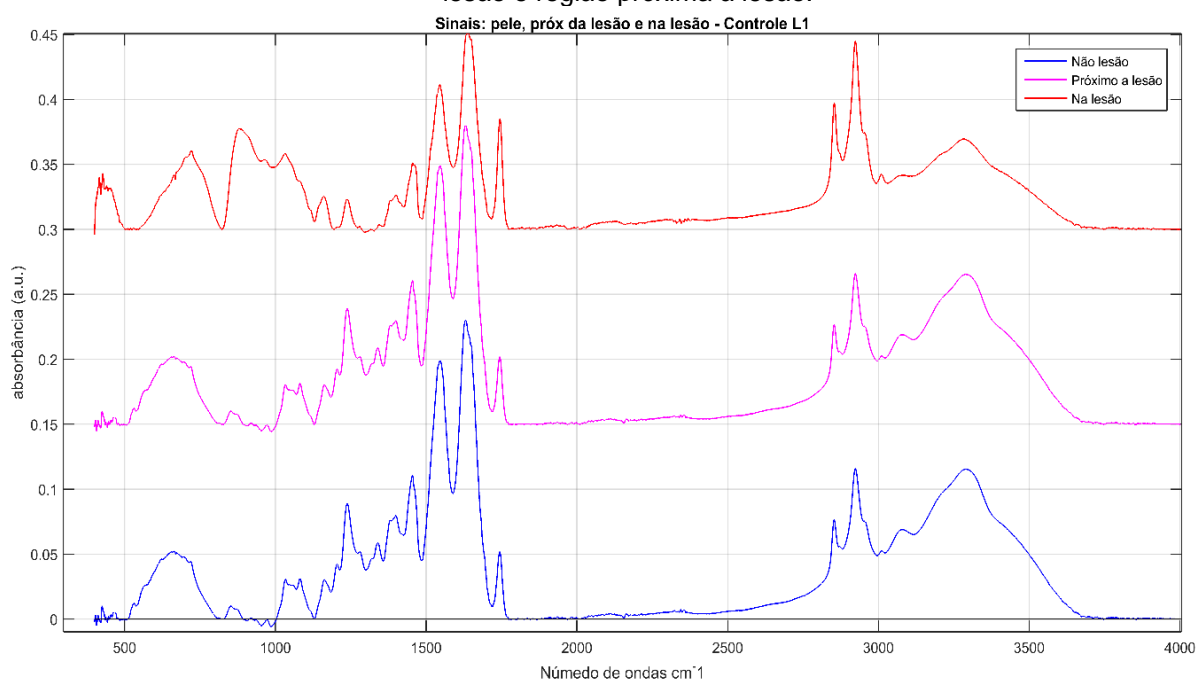
A área de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ de IR chamadas regiões de impressão digital é a região mais comumente usada para análise das aplicações biológicas. Essa região inclui as representações de lipídios, proteínas, amida I / II, carboidratos e ácidos nucléicos (Balan, 2019). Foram efetuadas as coletas de amostras na lesão, próximo à lesão e fora dela. Para a seleção da região usando obtenção do sinal pelo FTIR, as regiões foram estabelecidas de forma visual, sem auxílio preciso do microscópio.

A primeira análise consistiu em verificar se os espectros das 3 regiões poderiam ser diferenciados conforme a classificação usada: região com lesão, região

sem lesão e região intermediária (próxima à lesão). Para se verificar os espectros FTIR obtidos do grupo controle podem ser diferenciados considerando as 3 regiões da amostra.

A Figura 23 permite observar três sinais espectrais do grupo controle. Os sinais dispostos com um distanciamento entre o espectro não lesão e próximo da lesão se mostram visualmente muito similares, sendo que o espectro da região com lesão aponta para possíveis diferenças a serem analisadas.

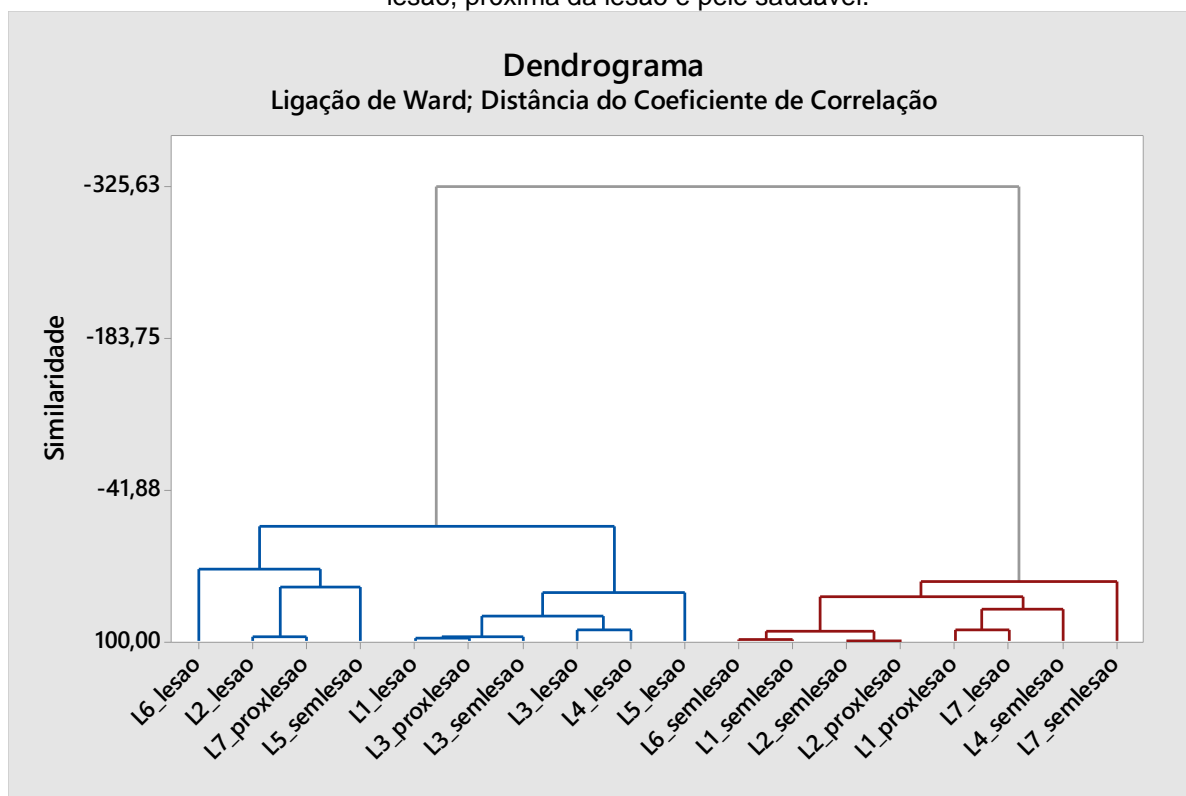
Figura 23 - Espectros obtidos das regiões classificadas como: região com lesão, região sem lesão e região próxima à lesão.



Fonte: Autoria própria.

É importante salientar que a tomada dos espectros, considerando as 3 regiões, foi realizada visualmente, o que dificulta a precisão desse procedimento. Considerando tal fator, foi calculada a análise de clusterização hierárquica (HCA) ou dendrograma. Todo o conjunto de espectros do grupo controle, totalizando 18 espectros, foi subtraído do valor médio obtido dos espectros, permitindo assim a remoção da tendência que possivelmente poderia existir no conjunto de dados. Os parâmetros para o HCA foram: método de *Ward* e cálculo de similaridade. Na Figura 24 é possível observar dois grandes *clusters*, sendo um predominantemente para os espectros da região lesão e outro predominantemente para os espectros da região não lesão.

Figura 24 - Dendrograma obtido para os espectros FTIR obtidos das 3 regiões classificadas: Não lesão, próxima da lesão e pele saudável.

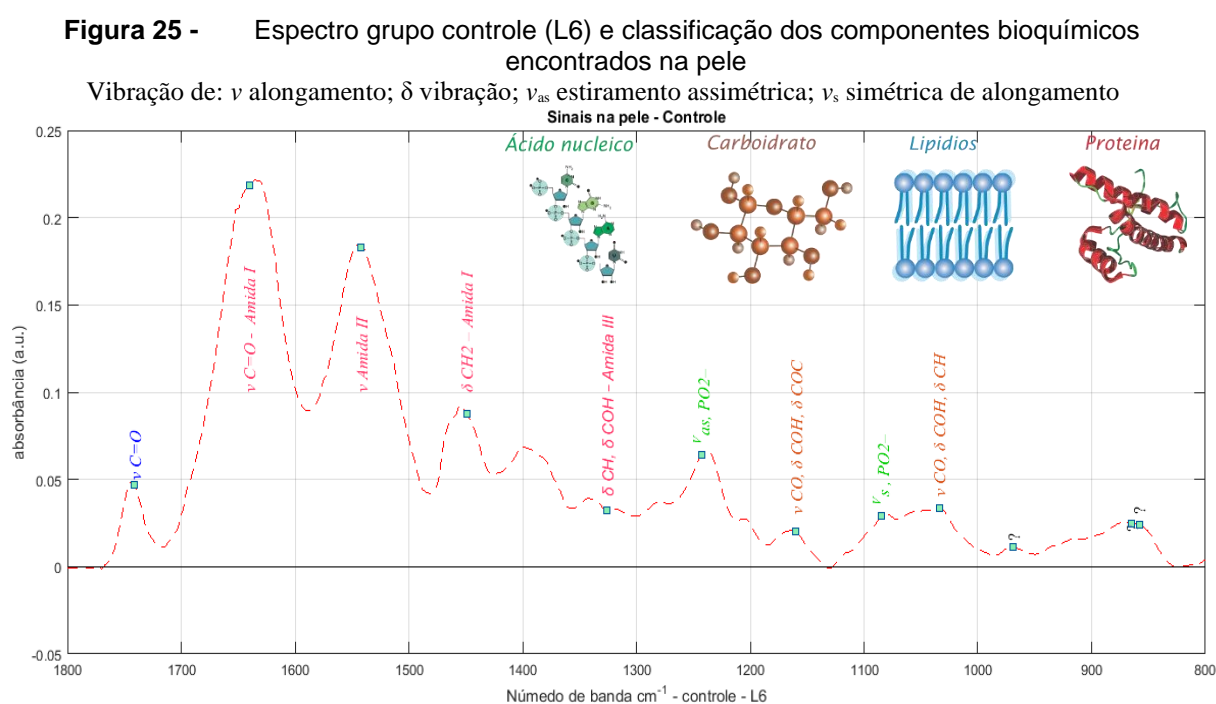


Fonte: Autoria própria.

Em ambos os agrupamentos, observam-se espectros FTIR obtidos da região próxima à lesão com predomínio para o agrupamento destacado em azul, correspondente ao cluster formado pelos espectros da região lesão. Esse fato pode ser justificado por dois fatores: a distância da região próxima à lesão da lesão em si, já que quanto mais distante da lesão, maior a sobreposição e reparação tecidual, o outro fato se dá possivelmente pelas condições clínicas de cada indivíduo, que está intrinsecamente presente na análise do material biológico.

Com um total de 75 sinais FTIR das amostras coletadas dos grupos de controle e aplicações do óleo de girassol puro e ozonizado, no decorrer do tempo de estudo de 30 min a 120 min, em períodos de 30 em 30 min, obteve-se 37 sinais de tecido saudável e 38 de tecido lesionado. Com a sobreposição dos sinais, definiu-se para a atribuição das bandas encontradas pela deconvolução (de acordo com a literatura) o critério do centro da banda com uma variação em torno de 5 cm^{-1} , como pode ser visualizado no Quadro 13 separado em duas tabelas. A análise foi efetuada de forma individual, seguindo a delimitação clara existente nos espectros, buscando maior precisão pelo sistema e o maior número de centro analisado.

Para efetuar a atribuição das bandas, buscou-se uma relação entre os estudos apenas com o óleo em seu processo de ozonização e a classificação desta banda, ambos relacionados à pele. Por meio das referências a partir do trabalho de revisão bibliográfica e catalogação de inúmeros artigos efetivado por Talari et al. (2016), encontradas entre os trabalhos estudados nesta revisão, selecionou-se apenas o que se referia diretamente ao estudo do tecido orgânico pele, já que o artigo, traz a coletânea de estudos por FTIR em todo e qualquer tecido biológico do organismo humano. Seguem abaixo, as considerações referentes ao resumo do quadro 13, em relação ao espectro FTIR da amostra L6.



Fonte: Autoria própria.

Ao pesquisar materiais biológicos, os espectros mais relevantes se encontram na região de $1450 - 600 \text{ cm}^{-1}$ por serem as medidas que se referem à impressão digital (BAKER et al., 2014). A 1ª região de $1130 - 820 \text{ cm}^{-1}$ para este estudo, compete à esta região a identidade das moléculas, e sub sequente a ela, observa-se que à região de $1800 - 1130 \text{ cm}^{-1}$ apontam-se os compostos orgânicos de significância para o processo de reparo, como presença de algumas proteínas.

A 2ª região encontra-se na amida I e amida II de $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, associadas às vibrações de flexão, localizadas nas moléculas de impressão digital do esqueleto

de carbono. Junto a essas regiões indo até a banda de 3500 cm^{-1} , compreende a região conhecida como impressão digital bioquímica das estruturas e funções de amostras celulares de forma geral (BAKER et al.,2014).

Todos os autores estudados concordam com essa classificação da região de análise. Lima et al. (2015), que estuda alterações na pele por carcinoma, entende que a região de impressão digital está entre os centros de banda de $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$. No artigo de revisão de Talari et al. (2016), todos os autores citados que fazem análise exclusiva por FTIR, os tecidos naturais e biologia celular, também se utilizam da mesma região. Todos os estudos que buscam em sua maioria encontrar as alterações nos tecidos biológicos na identificação de patologias em seu processo inicial de desenvolvimento, encontram-se na região de banda de $3611 - 472\text{ cm}^{-1}$. O que se observa são as pequenas oscilações existentes entre as bandas analisadas, levando a acreditar que elas se dão devido ao tipo de tecido em estudo, no entanto, de forma geral, a classificação dos compostos biológicos se mantém.

Para analisar os espectros FTIR coletados das amostras de tecidos, dos grupos controle e da aplicação do óleo em diferentes tempos de ozonização, segue conforme os sub capítulos abaixo, separados em 2 regiões, segundo justificado acima. Descreve-se o que foi encontrado nos centros de bandas dentro da sub-região, a quantidade de centro de bandas encontrados com maior frequência e se discute o que é citado pelos autores em estudos correlatos.

4.2.1 Resultados para a região $1130 - 820\text{ cm}^{-1}$ – grupo controle

Obteve-se nas amostras biológicas a 1ª sub-região de $858 - 848\text{ cm}^{-1}$. Nos sinais referentes à pele foram analisados 23 espectros. Ao analisar exclusivamente o óleo obteve-se o centro de banda em 850 cm^{-1} , sendo atribuído ao grupo $=\text{CH}_2$ com vibração balanço.

No 2º centro de banda encontrado da região entre $870 - 860\text{ cm}^{-1}$ não ocorreu classificação específica para esta banda, nem para o óleo nem para o tecido. No processo de ozonólise do óleo, essas bandas não foram encontradas, levando a crer que se trata de uma análise exclusiva de algum composto referente ao tecido pele.

Santos et al. (2017), descreve a região de $1200 - 900\text{ cm}^{-1}$ dos modelos biológicas de FTIR, como normalmente predominantes no ácido nucléico, pelo alongamento simétrico da PO_2^- e alongamento de COC e COP de carboidratos do

tipo oligossacarídeos e polissacarídeos. Incluindo nessa classificação a 3ª banda de 973 - 962 cm^{-1} , nos espectros do óleo, encontra-se a banda em 965 cm^{-1} , tendo como referência nominal o centro de banda 968 cm^{-1} do grupo funcional $-\text{HC}=\text{CH}-$ com flexão fora do plano.

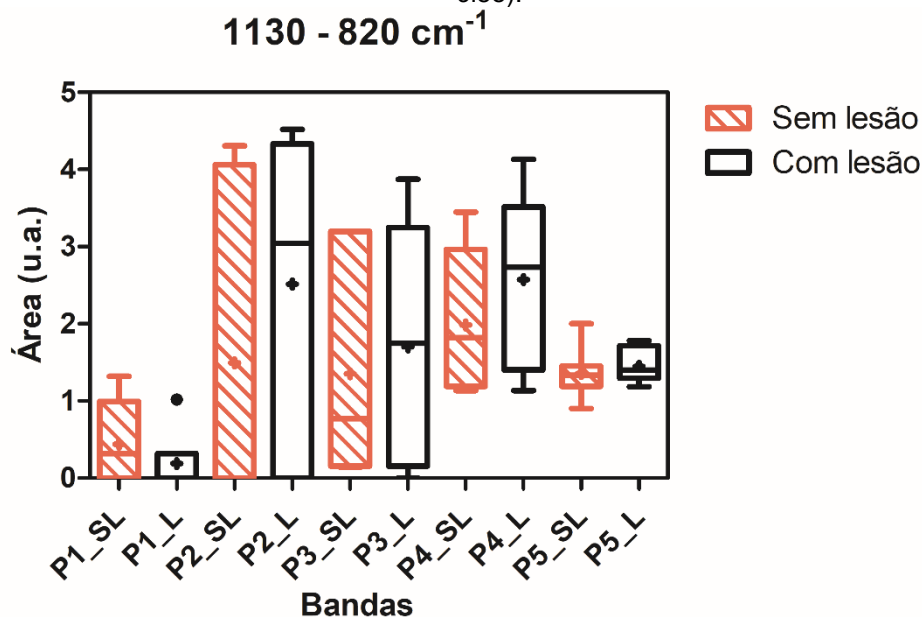
Para a análise de pele, encontra-se a estrutura do DNA, segundo revisão do artigo de Talari et al. (2016) que cita o trabalho de Lima et al. (1915), e diferencia o tecido normal e do carcinoma, onde a banda 970 cm^{-1} representa o processo de fosforilação da proteína, que estimula a replicação celular. A banda 971 cm^{-1} se refere ao alongamento simétrico de monoésteres de fosfato diamônico de proteínas fosforiladas e ácidos nucleicos. Nogueira classifica a região da banda de 990 – 955 cm^{-1} também como vibração de alongamento simétrico de PO_4^- .

No 4º centro de banda de 1040 – 1027 cm^{-1} , para a análise do óleo, identificou-se a banda 1030 cm^{-1} , com frequência nominal 1033 cm^{-1} , vibração de alongamento e grupo funcional $-\text{C}-\text{O}-$. O tecido biológico tem o centro de banda de 1033 cm^{-1} , em C-C conformação esquelética *cis*, em CH_2OH , e C-O com mesma vibração do óleo, e alongamento acoplado à flexão C-O. Segundo os autores citados por Talari et al. (2016), Hammody et al. os estudos deles discriminam alterações entre melanoma maligno e epiderme normal. Ainda nessas sub-região, Tian et al. (2015) cita a banda em 1040 cm^{-1} , como vibração em alongamento CO, COH e CH com vibração de flexão relacionado com carboidratos.

Na última sub-região de 1092 – 1081 cm^{-1} , ao estudar o óleo, foi identificado o centro de banda em 1091 cm^{-1} no grupo funcional $-\text{C}-\text{O}-$ de frequência nominal 1097 cm^{-1} e vibração de alongamento. Na análise dos sinais biológico, obteve-se por meio de Talari et al. (2016) as bandas de 1087 cm^{-1} relacionado ao DNA, identificado pela pesquisa de Lucassen, Van e Jansen (1998). Tiran et al. (2015) aponta o centro de banda de 1080 cm^{-1} com vibração simétrica de alongamento para o composto PO_2^- que está relacionado com o ácido nucleico.

A Figura 26 apresenta os valores obtidos para todas as bandas encontradas na região do espectro analisada de 1130 a 820 cm^{-1} . Considerando o grupo controle dividido em espectros da região com lesão e espectros da região sem lesão para as amostras obtidas, não há diferença estatística significativa entre as bandas obtidas.

Figura 26 - Boxplot para os valores de área obtidos das bandas encontradas na região 1130 – 820 cm^{-1} dos espectros FTIR considerando as amostras do grupo controle (sem aplicação de óleo).



Fonte: Autoria própria.

4.2.2 Resultados para a região 1800 - 1130 cm^{-1} – grupo controle

Nesta região foram encontradas 8 bandas a serem analisadas. A região de 1167–1157 cm^{-1} sugerem o centro de banda em 1160 cm^{-1} que está ligado aos carboidratos (CO) (TIAN,2015). Nogueira et al. (2016) aponta a região de 1189 – 1200 cm^{-1} : classifica no mesmo grupo, porém compreende que é composto por proteínas, carboidratos e éteres cíclicos, não apenas por carboidratos.

A região de 1247 – 1239 cm^{-1} analisada no sinal espectrográfico da pele, encontra-se segundo revisão de Talari et al. (2016) relacionada ao centro de banda 1240 cm^{-1} classificada como Amida III, e 1244 cm^{-1} classificada como RNA. Tian et al. (2015) classifica o centro de banda como 1250 cm^{-1} relacionado com ácido nucléico. Nogueira entende que a região de 1274 – 1189 cm^{-1} é classificada como Amida III, por ter o alongamento C-N e deformação N-H. A região de 1328 – 1318 cm^{-1} foi classificada por Tian et al. (2015) a banda mais próxima em 1300 cm^{-1} no grupo CH e COH com vibração de flexão, da banda Amida III.

Para as duas sub regiões seguintes, Nogueira et al. (2016) atribui a região de 1480 – 1350 cm^{-1} , com deformação assimétrica C-H de CH_2 e CH_3 devido à deformação, que consiste das proteínas e carboidratos. Tian et al. (2015) classifica o

centro de banda em 1400 cm^{-1} no grupo CH e COH em vibração de flexão, igual a banda anterior, no entanto, relacionado com os lipídeos.

Para a 5ª sub-região de $1452 - 1442\text{ cm}^{-1}$, com centro de banda englobada na banda anterior por Nogueira et al. (2016), tem a frequência nominal no estudo do óleo que se dá pelo centro de banda 1450 cm^{-1} , encontrada na análise no centro de banda em 1452 cm^{-1} , que faz parte do grupo funcional $-\text{C}-\text{H}(\text{CH}_3)$ com vibração de flexão assimétrico.

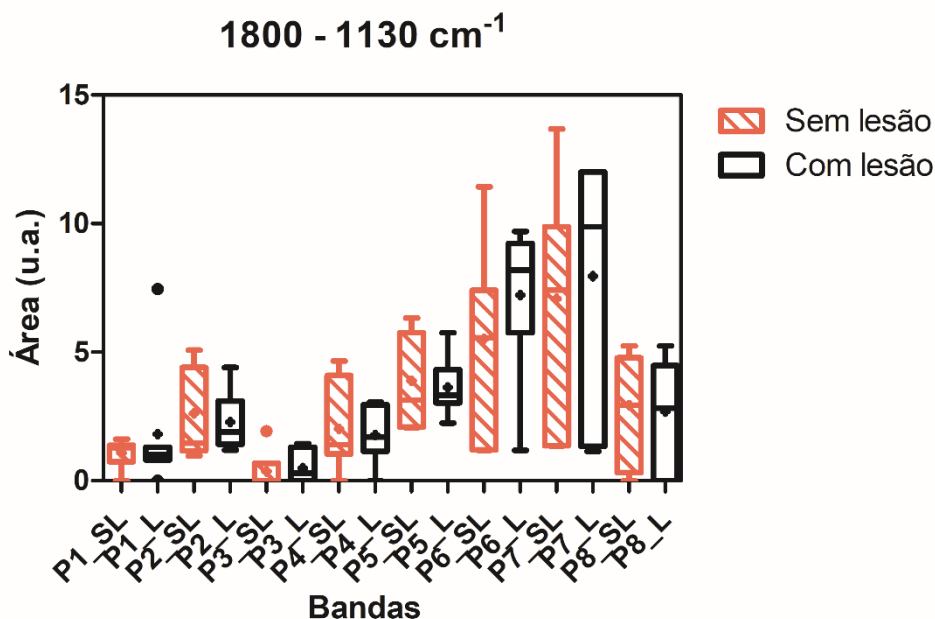
Para a 6ª sub-região $1548 - 1537\text{ cm}^{-1}$, encontra-se a classificação em pele no centro de banda em 1545 cm^{-1} como amida II. Observando os autores estudados, entende-se a região de $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ como amida II, devido ao estiramento $\text{C}=\text{N}$ e $\text{N}=\text{C}$ com deformação, seguindo a classificação de Nogueira et al. (2016). Enquanto Lima et al. (2015) define que as bandas entre $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ que fornecem ligações peptídicas relacionadas com as proteínas em sua estrutura secundária. Na mesma região, Santos et al. (2017), relaciona às principais bandas de colágeno.

Na sub-região de $1644 - 1636\text{ cm}^{-1}$, classificada como amida I, encontra-se o centro de banda 1640 cm^{-1} , sendo uma proteína (TIAN et al., 2015), o centro de banda 1636 cm^{-1} com ligação $\text{C}=\text{O}$ de alongamento do grupo carbonila, típica absorção de sacarídeo. Lima et al. (2015) classifica 1638 e 1694 cm^{-1} estão associadas à estrutura secundária de proteínas das folhas β , mais especificamente à configuração paralela e antiparalela.

De forma geral as bandas de $1710 - 1482\text{ cm}^{-1}$, refere-se a alongamento simétrico $> (\text{C}=\text{O})$ -RNA / DNA, atribuído ao alongamento $\text{C}=\text{O}$ e aos ácidos nucleicos RNA e DNA, que compreendem a amida I com alongamento simétrico $\text{C}=\text{O}$ e amida II com alongamento simétrico em $\text{C}-\text{N}$, ambas com deformação simétrica $\text{N}-\text{H}$ (NOGUEIRA et al., 2015). Na última sub-região estudada de $1748-1741\text{ cm}^{-1}$ encontra-se os lipídios com vibração de alongamento no grupo funcional $\text{C}=\text{O}$, com bandas referenciadas em 1740 e 1743 cm^{-1} conforme Tian et al. (2015).

A Figura 27 apresenta os valores obtidos para todas as bandas encontradas na região do espectro analisada de 1800 a 1130 cm^{-1} . Considerando o grupo controle dividido em espectros da região com lesão e espectros da região sem lesão para as amostras obtidas, não há diferença estatística significativa entre as bandas obtidas.

Figura 27 - Boxplot para os valores de área obtidos das bandas encontradas na região 1800 a 1130 cm^{-1} dos espectros FTIR considerando as amostras do grupo controle (sem aplicação de óleo).



Fonte: Autoria própria.

4.2.3 Resultados obtidos das amostras com aplicação dos diferentes tempos de ozonização do óleo: T0, T30, T60, T90 e T120.

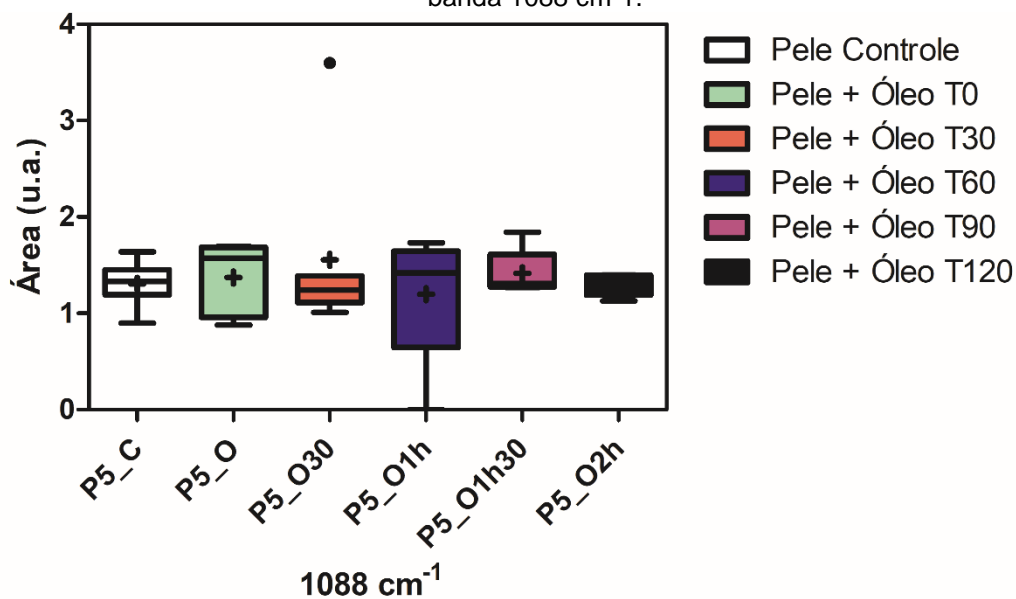
Nesta seção, apenas os espectros da região com lesão foram analisados, uma vez que, tinha como objetivo verificar a influência do óleo no processo cicatricial. Foram considerados 6 grupos:

- 1) amostra contendo apenas amostra tecidual da lesão cutânea (pele controle);
- 2) lesão tratada com óleo de girassol não ozonizado (pele + óleo T0);
- 3) lesão tratada com óleo de girassol ozonizado por 30 minutos (pele + óleo T30);
- 4) lesão tratada com óleo de girassol ozonizado por 60 minutos (pele + óleo T60);
- 5) lesão tratada com óleo de girassol ozonizado por 90 minutos (pele + óleo T90);
- 6) lesão tratada com óleo de girassol ozonizado por 120 minutos (pele + óleo T120)

Considerando a região do espectro de 1130 a 820 cm^{-1} foram obtidos 5 centros de bandas coincidentes nos espectros analisados. Desta região em particular, os cinco centros de bandas obtidos correspondem aos seguintes números de onda: 1088 cm^{-1} (Figura 28), 1034 cm^{-1} (Figura 29), 969 cm^{-1} (Figura 30), 865 cm^{-1} (Figura 31) e

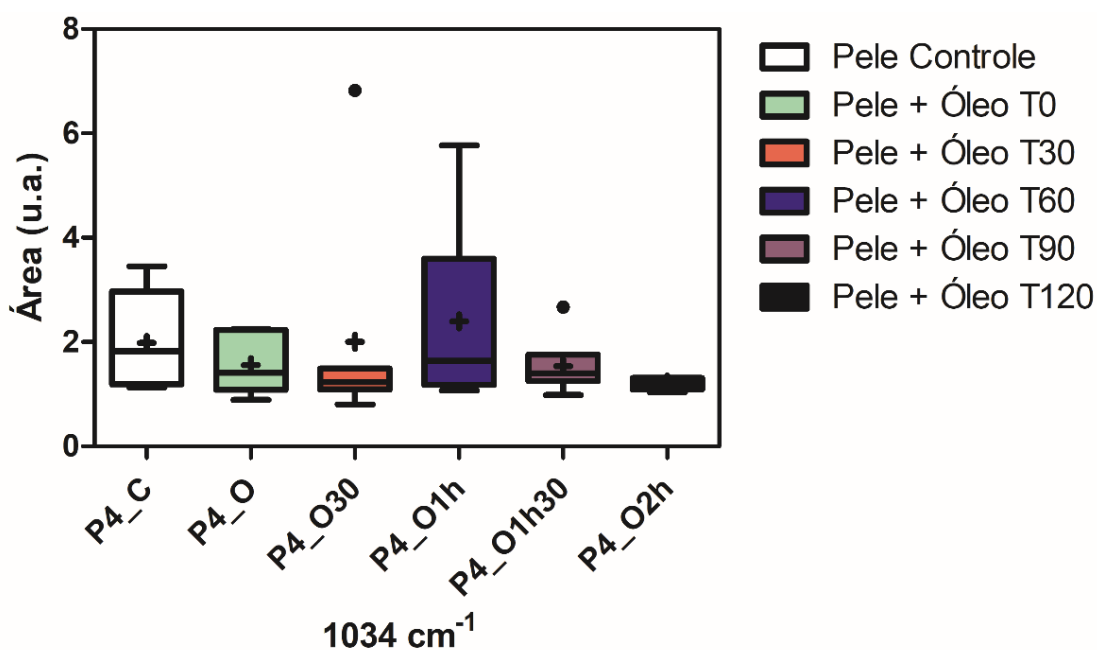
850 cm^{-1} (Figura 32). Das áreas obtidas para os centros supracitados, observou-se que apesar da variação existente, particularmente para o centro de banda 850 cm^{-1} , não há diferença estatística significativa.

Figura 28 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 1088 cm^{-1} .



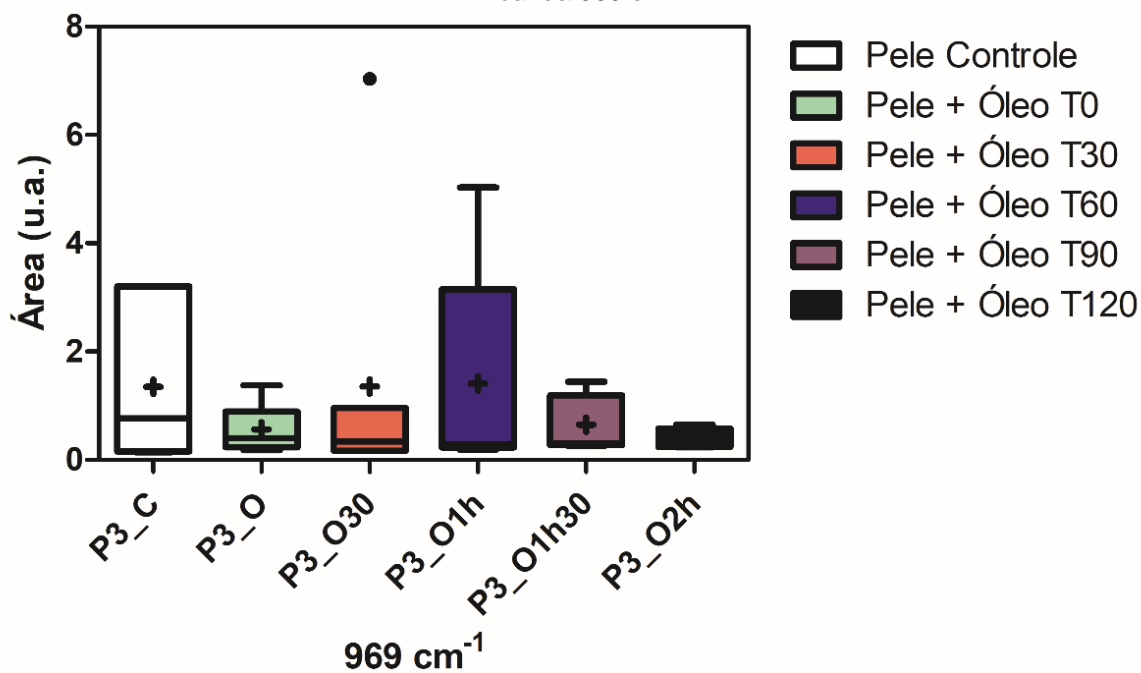
Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 1034 cm^{-1} .



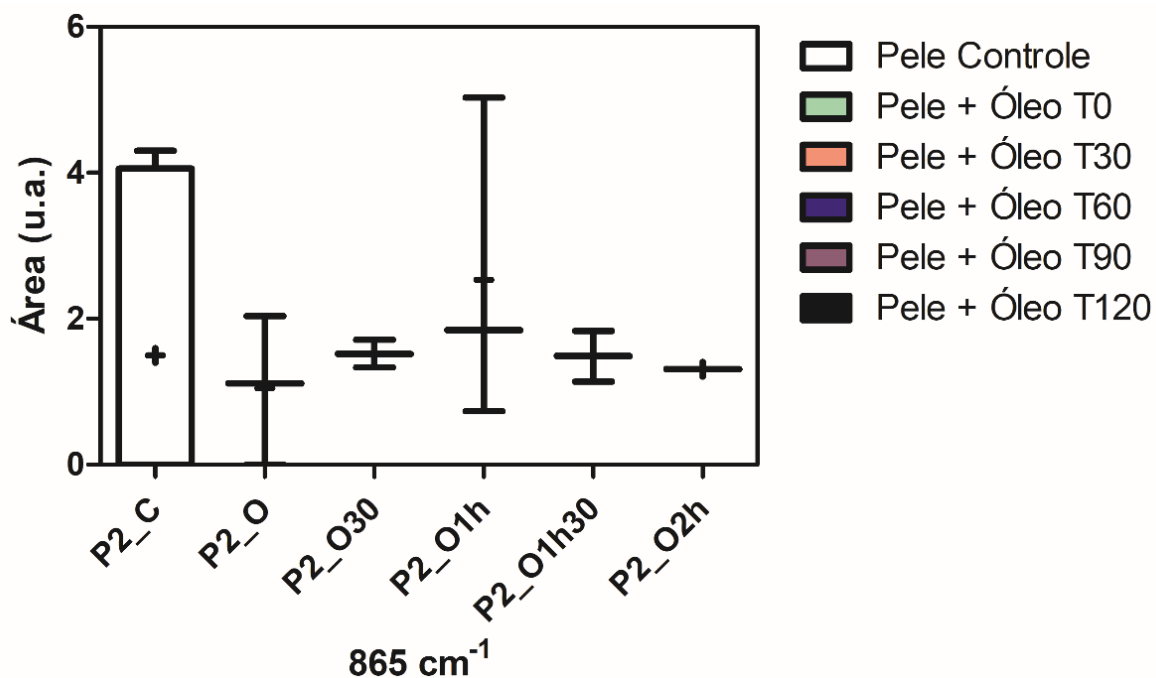
Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 969 cm^{-1} .



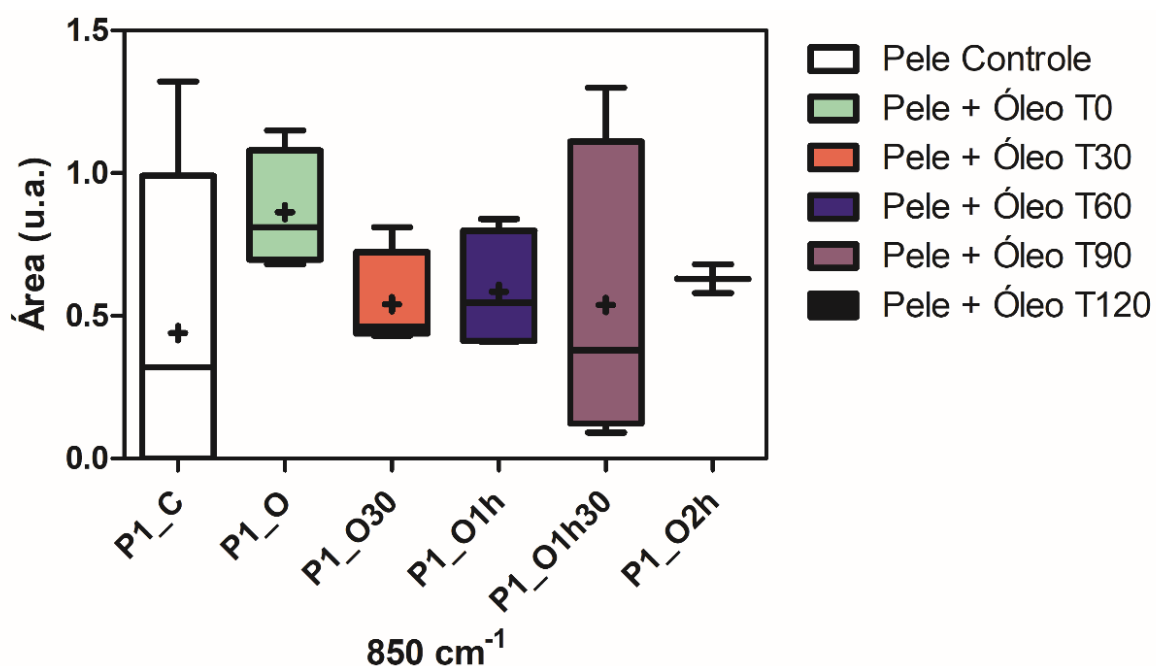
Fonte: Autoria própria.

Figura 31 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 865 cm^{-1} .



Fonte: Autoria própria.

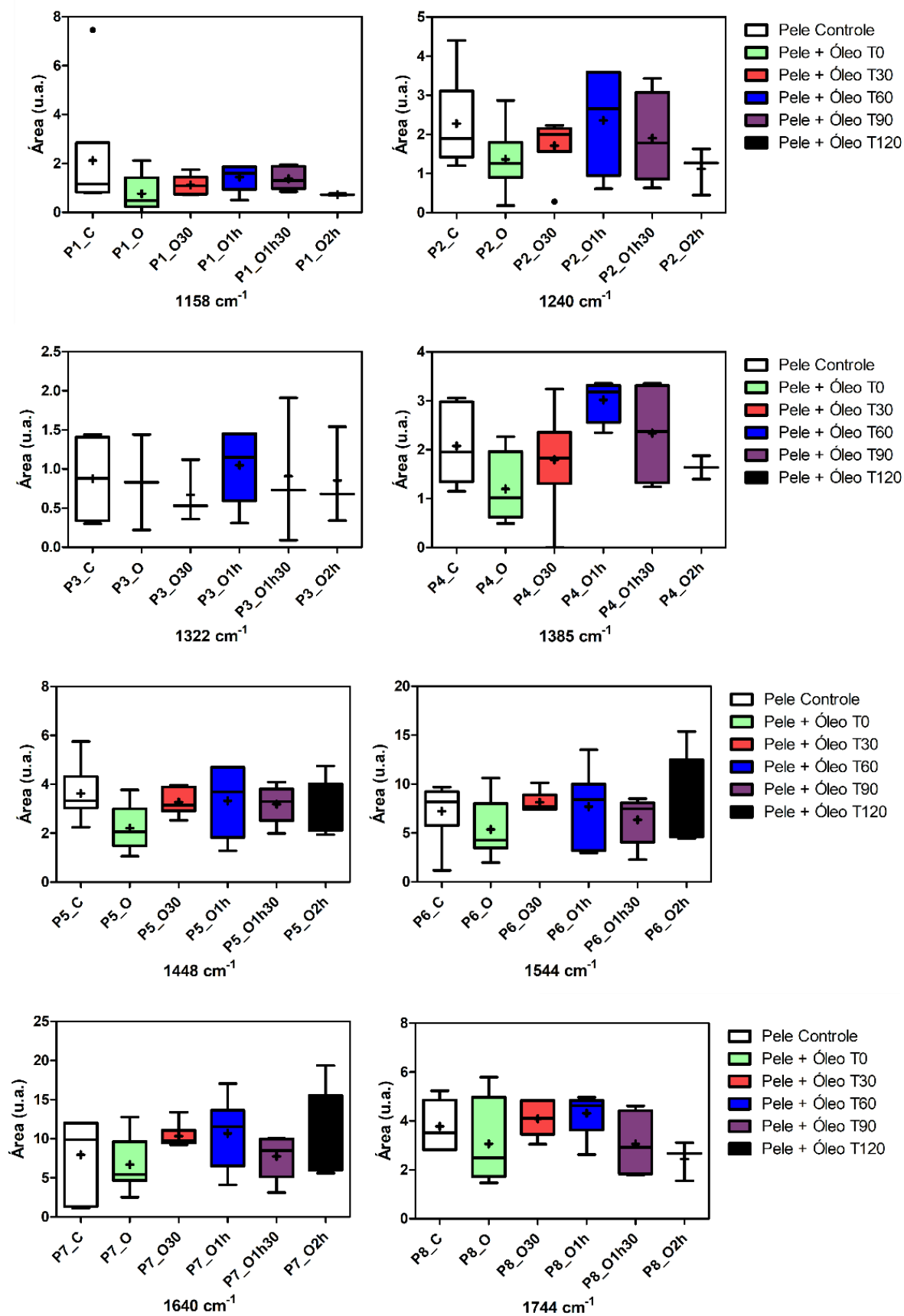
Figura 32 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando o centro de banda 850 cm⁻¹.



Fonte: Autoria própria.

Para a região 1800 – 1130 cm⁻¹ foram obtidos 8 centros de banda, sendo estes: 1744 cm⁻¹, 1640 cm⁻¹, 1544 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹, 1385 cm⁻¹, 1322 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹ e 1158 cm⁻¹. Das áreas obtidas para os centros supracitados, observou-se que apesar da variação existente, particularmente para os centros de banda 1240 e 1385 cm⁻¹, não há diferença estatística significativa, conforme mostrado na Figura 33.

Figura 33 - Boxplot dos valores de área obtidos para os seis grupos considerando os centros de banda da região 1800 a 1130 cm^{-1} .



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em conta o número de pessoas que necessitam de tratamentos eficientes e, preferencialmente de baixo custo, além de fácil aplicação, o estudo do processo de ozonização do óleo vegetal de girassol, tem um significado relevante, no tratamento das lesões cutâneas crônicas ou não, devido às suas características no que se refere à concentração da Vitamina E (tocoferóis) e do ômega 6 (ácido linoleico entre 48 e 74 - AOCS), compostos estes são considerados de grande relevância para o organismo, mesmo que seja com sua aplicação externa.

Seguindo as bibliografias estudadas, concorda-se que ainda se fazem necessários maiores estudos e aprofundamentos no processo de ozonização e a verificação das alterações que ocorrem no decorrer do processo, para que se possa identificar os compostos que são degradados e os que são gerados a partir deste processo.

O que se observa nas análises referentes ao processo de ozonização do óleo vegetal de girassol, é que os óleos vegetais apresentam alterações similares em sua estrutura. Essas diferenças ocorrem devido ao processo ser dinâmico, com a persistência da inserção do gás ozônio, o que faz com que nesse processo forme e/ou degrade produtos existentes em sua composição e gerem novos subprodutos.

Observando os espectros FTIR em especial o número de onda $1634,3 \pm 16,6 \text{ cm}^{-1}$, que surge nos tempos de 20, 30 e 40 minutos, esta banda se justifica devido à quebra das ligações duplas de carbono da cadeia lipídica causando o aumento da cadeia de CO_2 , reduzindo também os compostos $-\text{HC}=\text{CH}-$ seguindo o que o mecanismo de Criegee descreve, sendo gerado os subprodutos aldeídos e cetonas, que são compostos que possuem a carbonila (carbono com ligação dupla ao oxigênio e ligação simples com o hidrogênio) capaz de reagir com inúmeros compostos orgânicos, um exemplo de composto seria o formol usado como desinfetante, justifica o combate a patógenos.

O processo estatístico utilizado corrobora na confirmação das alterações visíveis nos espectros FTIR, e com o processo da deconvolução a partir da 2ª derivada, sendo esses métodos muito eficientes no processo proposto pelo estudo. Portanto, ainda se faz necessário de que esse processo longo e demorado - com a utilização de 2 softwares distintos - possa ser simplificado, ou mesmo que o retorno

da classificação das bandas possa ser efetuado com maior eficiência, por meio de um software único.

Como melhoria do processo, a fim de obter controle total, é recomendado que haja o resfriamento e controle total, em termos de temperatura durante o procedimento de ozonização. Com a caracterização do óleo ozonizado durante os 90 minutos, foi possível observar que as reações estabelecidas estão de acordo com o mecanismo de Criegee, com formação dos produtos ozonídeos, conforme variação evidenciada na região do número de onda 3000 cm^{-1} . Em relação ao tempo de ozonólise do óleo de girassol, dada pela alteração da temperatura que sugere estar relacionada à formação dos produtos ozonídeos, recomenda-se que o óleo permaneça pelo menos 30 minutos em inserção de ozônio, garantindo, assim, a formação dos produtos.

Quanto à caracterização das amostras de lesão cutânea com aplicação dos óleos ozonizados usando FTIR, observa-se que existe uma alteração entre alguns espectros, mas sem diferença estatística significativa. Entretanto, para melhor compreensão, são necessárias análises na região acima de 1800 cm^{-1} , não realizada neste trabalho. O estudo efetuado até o momento não evidencia a eficácia do uso do óleo ozonizado com até 120 minutos de ozonização em lesões.

É relevante o aprofundamento deste estudo com a análise da borda da lesão utilizando equipamentos para a confirmação da aquisição do espectro em cada uma das regiões a serem estudadas com precisão, que inclua no procedimento uma análise clínica dos indivíduos investigados e considere o tempo de reparo para a análise no decorrer deste processo, levando em conta que dentre os trabalhos encontrados com a utilização de óleos vegetais ozonizados, a grande totalidade se dá em lesões com infecções e/ou em fase crônica, o que também se faz necessário a análise para esta situação em relação a uma lesão sem agravamentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

© ABOZ – Associação Brasileira de Ozonioterapia, 2018 – Disponível em: www.aboz.gorg.br; Acessado em: 06/10/2017

Agrillo A, Priori P, Iannetti G. Ozone therapy in extractive surgery on patients treated with bisphosphonates. *The Journal of Craniofacial Surgery* 2007; 18(5):1068-70

Almeida, N. R. de; Adilson, B.; Micheletti, A. C.; Arruda, E. J. de; Óleos vegetais ozonizados e propriedades terapêuticas: uma revisão; *ORBITAL the electronic Journal of chemistry* oct-dez 2012 vol4 n4; Campo Grande, MS, Brazil.

Alonso, L. C., Qualidade de óleo e saúde, Syngenta, 2017

AOCS (Ca 5a-40): American Oil Chemists' Society. 5ª ed., 1998.

Aparício, R. R.; Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, v.881, P.93-104, 2000.

Baker, M J; Trevisan, J; Bassan, P; Bhargava, R; Butler, H J; Dorling, K M; Fielden, P R; Fogarty, S W; Fullwood, N J; Heys, K A; Hughes, K; Lasch, P; Martin-Hirsch, P L; Obinaju, B; Sockalingum, G D; Sulé-Suso, J; Strong, R J; Walsh, M J; Wood, B R; Gardner, P; Martin, F L; Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. Published in final edited form as: *Nat Protoc.* 2014 Aug; 9(8): 1771–1791. Published online 2014 Jul 3. doi: 10.1038/nprot.2014.110 PMID: PMC4480339

Balan V, Mihai CT, Cojocaru FD, Uritu CM, Dodi G, Botezat D, Gardikiotis I. Vibrational Spectroscopy Fingerprinting in Medicine: from Molecular to Clinical Practice. *Materials (Basel)*. 2019 Sep 6;12(18):2884. doi: 10.3390/ma12182884. PMID: 31489927; PMID: PMC6766044.

Block, K.; Kappert, W.; Kirschfeld, A.; Muthusamy, S.; Schroeder, K.; Sander, W.; Kraka, E.; Sosa, C.; Cremer, D. *Em Peroxide Chemistry: Mechanistic and Preparative Aspects of Oxygen Transfer*; Adam, W., ed.; Wiley, 2001, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600396.ch7/summary>, acessada em Janeiro 2012.

Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A. *Introdução à Química de Alimentos*. 2ª ed., Editora e Livraria Varela LTDA, São Paulo: 1989.

Bocci V.; *Ozone: A New Medical Drug*. Dordrecht: Ed. Springer; 2005

Bocci, V.; *Arch. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the ArtMed. Res.* 2006, 37, 425.

Bocci, V.; *Oxygen Ozone Therapy: A critical Evaluation*. Kluwer Academia Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2002.

Brink, D. R.; Langlais, B.; Reckhow, D. A.; *Ozone in water treatment: application and engineering*; Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, 568 p.; 1991.

Chagas, I. C. S. das; Borges, E. L.; Evidências da ozonioterapia no tratamento da lesão cutânea crônica; Revista in Derme, Ano 14 - Nº 69 / 7 - Abril/Maio/Junho – 2014 - Cinahl – Information Systems USA, classificada como Qualis International B2 da Capes e no Grupo EBSCO Publicações.

Chiattonne, P.V.; Torres, L.M.; Zambiasi, R.C. Aplicação do Ozônio na Indústria de Alimento. Alim. Nutr., v.19, n.3, p. 341-349, jul/set. 2008.

COPYRIGHT © 2005 - 2017 - Campestre Ind. e Com. De Óleos Vegetais LTDA: Disponível em: <http://www.campestre.com.br/oleo-de-girassol.shtml> Acessado em 15/07/2019.

Copyright © Actualitix Word Atlas – Statistics by country, 2019 – Disponível em: <https://pt.actualitix.com/estatistica-agricultura.php>; Acessado em 24/08/2019

Criegee, R.; Mechanism of Ozonolysis, Angew. Chemie Int. Ed. English. (1975). <https://doi.org/10.1002/anie.197507451>.

Díaz, M. F.; Gavín, J. A.; Characterization by NMR of Ozonized Methyl Linoleate; J. Braz. Chem. Soc. Vol. 17, No. 2, 403-407, 2006 e 2007

Díaz, M. F.; Hernández, R.; Martínez, G.; Vidal, G.; Gómez, M.; Fernández, H; Garcés, R.; Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil; J. Braz. Chem. Soc. vol.17 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2006; <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000200026>

Diário Oficial da União; Resolução 2.181, de 20 de abril de 2018; Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=10/07/2018&jornal=515&pagina=106&totalArquivos=107>; acessado em 18 de Abril de 2020.

Durham, L. J.; Greenwood, F. L.; *Chem. Commun.* 1967,843.

Elvis, A. M., Ekta, J. S., Terapia com ozônio: uma revisão clínica Viveknand Education Society's, College of Pharmacy, Mumbai, India – 2011

FDA – Food and Drug Administration; CFR - Code of Federal Regulations Title 21 ;chapter I -- food and drug administration department of health and human services, Firestone, D.; Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes, 2th. AOCS, 2006. Revised as of April 1, 2019; acessado em 7 de maio de 2020.

García, M. J. L; Characterization and Authentication of Olive and Other Vegetable Oils. Springer Theses; 2012. doi:10.1007/978-3-642-31418-6

García-González, D. L.; Baeten, V.; Pierna, J. A. F.; Tena, N.; Infrared, Raman, and Fluorescence Spectroscopies: Methodologies and Applications; Springer; 2013.

Graham, D. M.; Use of ozone for food processing. *Food Technology*, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997

Guillén, M. D., e Cabo, N.; Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their Fourier transform infrared

spectra. Role of some bands of the fingerprint region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, p.1788–1793; 1998

Guzel-Seydim, Z. B.; Greene, A. K.; Seydim, A. C.; Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, San Diego, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

Güzel-Seydim, Z.; Greene, A. K.; Seydim, A. C. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.37, p.453-460, 2004.

Harris, W.; Schacky, C.; The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?. *Preventive Medicine*, vol. 39, pp. 212– 220.; (2004).

Hartman L.; Esteves W. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais*. São Paulo, 1982.

Johnson, J. D. *Disinfection Water and Wastewater*. By American Arbor Science, Publishers, Inc. (1975).

Kim, J. G.; Yousef, A. E.; Dave, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, Sept. 1999

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. et al. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. *Revista Química Nova*, São Paulo, v. 25, p. 78-82, 2002.

Lapolli, F. R.; Santos, L. F.; Hássemer, M. E. N.; Aisse, M. M.; Piveli, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). *Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica*. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208.

Lima, C A; Goulart, V P, Côrrea L, Pereira T M; Zezell, D M. ATR-FTIR Spectroscopy for the Assessment of Biochemical Changes in Skin Due to Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 24;16(4):6621-30. doi: 10.3390/ijms16046621.

Lirong Xu, Tao Fei, Qinghua Li, Xiuzhu Yu; Lei Liua; Qualitative analysis of edible oil oxidation by FTIR spectroscopy using a mesh “cell” *Analytical Methods*, *Anal. Methods*, 2015, 7, 4328, This journal is © The Royal Society of Chemistry; Abril de 2015; (DOI: 10.1039/c5ay00438a www.rsc.org/methods)

Lucassen, G. W., Van Veen, G. N. and Jansen, J. A. (1998). Band analysis of hydrated; human skin stratum corneum attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectra in vivo. *J. Biomed. Opt.* 3(3), 267-280.

Mandelbaum, S. H.; Di Santis, E. P.; Mandelbaum, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, ago. 2003.

Moretto, E.; Fett, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. Editora e Livraria Varela LTDA, São Paulo, 1998.

Nazarov, A. M.; Yamilova, G. A.; Komissarov, V. D.; *React. Kinet. Catal. Lett.* 2000,71,363.

Nogueira, V C; Raniero, L; Costa. G B; de Freitas Coelho, N P; Miranda, F C; Arisawa, E Â. Comparative Study of Morphometric and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analyses of the Collagen Fibers in the Repair Process of Cutaneous Lesions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016 Feb 1; 5(2): 55–64. PMID: 26862463; doi: 10.1089/wound.2015.0641

Oliveira, A. F. de; Mendes, H. J.; Aplicações Clínicas Do Ozônio Na Odontologia; Ver. Saúde Com; 2009

Oliveira, A. R. M.; Wosch, C.L.; Ozonolysis: the search for a mechanism; UFP, CP 19081, 81531-990; Curitiba - PR, Brasil, 2012; *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 7, 1482-1485, 2012

Papanas, N. e Maltezos, E.; “Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: new technologies, any promises?” *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, vol. 6, no. 1, pp. 37–53, 2007.

Pasquini, C.; Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J. Brazilian Chemical Society*, v.14 (2), p.198-219, 2003.

Pereira, A. F. C.; Pontes, M. J. C.; Gambarra Neto, F. F.; Santos, S. R. B.; Galvão, R. K. H.; Araújo, M. C. U. Nir Spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using iPLS and variable selection. *Food Research International* (2007), doi: 10.1016/j.foodres.2007.12.013.

Pereira, A. F. da C.; Determinação simultânea de acidez, índice de refração e viscosidade em óleos vegetais usando Espectroscopia NIR, calibração multivariada e seleção de variáveis; João Pessoa – PB; 03/2007

Philozon - © 2019 - Grupo Philozon - Disponível em: <http://www.philozon.com.br/sobre-o-ozonio/propriedades-fisicas/>, Acessado em: 05/12/2017

Poggetto, Márcia T D, et al.; Cuidados Às Pessoas com Úlcera Venosa: Percepção dos Enfermeiros da Estratégia de Saúde da Família; REME • Rev Min Enferm. 2013. DOI: 10.5935/1415-2762.20130009

Russel, A. D.; Hugo, W. B.; Avliffe, G. A. J.; Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826 p.

Sadowska, J.; Johansson, B.; Johannessen, E.; Friman, R.; Broniarz-Press, L.; Rosenholm, J.B.; Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods, *Chem. Phys. Lipids*. 151 (2008) 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.10.004>.

Santos MOD, Latrive A, De Castro PAA, De Rossi W, Zorn TMT, Samad RE, Freitas AZ, Cesar CL, Junior NDV, Zezell DM. Multimodal evaluation of ultra-short laser pulses treatment for skin burn injuries. PMID: 28663850. PMCID: PMC5480565 Biomed Opt Express. 2017 Feb 16;8(3):1575-1588. doi: 10.1364/BOE.8.001575. eCollection 2017 Mar 1.

Saúde Direta, 2018 Disponível em:
<http://www.saudedireta.com.br/docsupload/1332766748Cartilha%20MS-MMA.pdf>
acessado em 05/10/2018

Schiaffo, C. E.; Dussault, P. H.; *J. Org. Chem.*; 2008,73,4688.

Schwartz, A.; Ozone therapy in the treatment of recurrent vulvo-vaginitis by *Candida albicans* Revista Española de Ozonoterapia, vol. 5, nº 1, pp. 99-107, 2015 (ISSN: 2174-3215)

Schwartz, C.; Raible, J.; Mott, K.; Dussault, P. H.; *Tetrahedron* 2006,62,10747.

Silva, S. B.; Luvielmo, M. M.; Geyer, M. C.; Prá, I; Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos; Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, abr/jun. 2011; DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32n2p659

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., & Morrill, T. C. (1981). Spectrometric identification of organic compounds. Chichester: John Wiley & Sons.

Skoog, D. A.; Leary, J. J. Principles of instrumental analysis. 4ª Ed.; Saunders College, 1992.

Snatural Tecnologias Ambientais LTDA, 2011; disponível em:
<http://www.snatural.com.br/ozonio-oleo-ozonizado-desinfeccao-cicatrizacao/>,
acessado em: 20/03/2017

Snatural Tecnologias Ambientais LTDA, 2011; disponível em:
<http://www.snatural.com.br/ozonio-tratamento-agua-desinfeccao/>, © SNatural 1989 – 2018 ,
acessado em: 13/06/2018

Soriano Jr, N. U.; Migo, V. P., Matsumura, M.; Ozonização de óleo de girassol: Monitoramento espectroscópico do grau de instauração © 2003 Elsevier Ireland Ltd.

Talari, A C S; Martinez, M A G; Movasaghi, Z; Rehman, S & Ihtesham your Rehman: Advances in Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, Applied Spectroscopy Reviews, 2016 DOI: 10.1080/05704928.2016.1230

Tena, N.; Aparicio, R.; García-GONZÁLEZ, D.L.; Thermal deterioration of virgin olive oil monitored by ATR-FTIR analysis of trans content, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 9997–10003. <https://doi.org/10.1021/jf9012828>.

Thomson, P. M.; Anticevic, S. C., Rodríguez, H. B. e Silva, V. V.; Actividad antifúngica y perfil de seguridad el producto natural derivado del aceite de maravilla ozonizado (AMO₃) en dermatofitos; Trabajo premiado en el XXVII Congreso Chileno de Infectología. Valdivia, 2010, Rev Chil Infect 2011; 28 (6): 512-519, www.sochinf.cl

Tian, P; Zhang, W; Zhao, H; Lei, Y; Cui, L; Wang, W; Li, Q; Zhu, Q; Zhang, Y; Xu, Z. Intraoperative diagnosis of benign and malignant breast tissues by fourier transform infrared spectroscopy and support vector machine classification. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(1): 972–981. Published online 2015 Jan 15. PMID: PMC4358538

Torres, E. A. F. S.; Regê Ferreira, A. F.; Rímoli, C. D.; Estudos das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. *Higiene Alimentar*, Itapetininga, v. 10, n. 42, p. 8-23, 1996

Travagli, V.; Zanardi, I.; Valacchi, G.; Bocci, V.; Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review, Creative Commons Attribution, Hindawi Publishing Corporation - Volume 2010, Article ID 610418, 9 pages, doi:10.1155/2010/610418

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. 1999. Disponível em: <https://www.epa.gov/dwreginfo/guidance-manuals-surface-water-treatment-rules>; Acesso em: 30 maio 2008

VIDAL, F. J. R. Processo de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Madrid : Ediciones Díaz de Santos, 2003, 253 p.

Voet D.; Voet J. G.; Pratt C. W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre, 2000.

4. BOBBIO, Wentworth Jr, P., et al.; Evidence for Antibody-Catalyzed Ozone Formation in Bacterial Killing and Inflammation; *Science* 13 Dec 2002: Vol. 298, Issue 5601, pp. 2195-2199 DOI: 10.1126/science.1077642

Werdin, F; Tenenhaus M., e Rennekampff H.-O., “Chronic wound care,” *The Lancet*, vol. 372, no. 9653, pp. 1860–1862, 2008.

Yamada N., Li W., Ihaya A., et al.; “Platelet-derived endothelial cell growth factor gene therapy for limb ischemia,” *Journal of Vascular Surgery*, vol. 44, no. 6, pp. 1322–1328, 2006.

Zamora R. Z., Pérez, S.; Aceite de girasol ozonizado de uso oral como tratamento en los procesos diarreicos del conejo; *Veterinaria (Montevideo)*; Volumen 51; Nº 199; 2015

Zamora, R. Z.; González, D. G.; Merino, N., Menéndez, S.; Hernández, F.; Alonso, Y. and Schulz, S.; Ozonized sunflower oil reduces oxidative damage induced by indomethacin in rat gastric mucosa; *Inflammation Research*; © Birkhäuser Verlag, Basel, 2008

Zanardi D, Nunes D. H., Pacheco A.S., Tubone M. Q. e Souza Filho J. J.; Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis. *An Bras Dermatol* 83(2): 119-124; 2008

APÊNDICE A

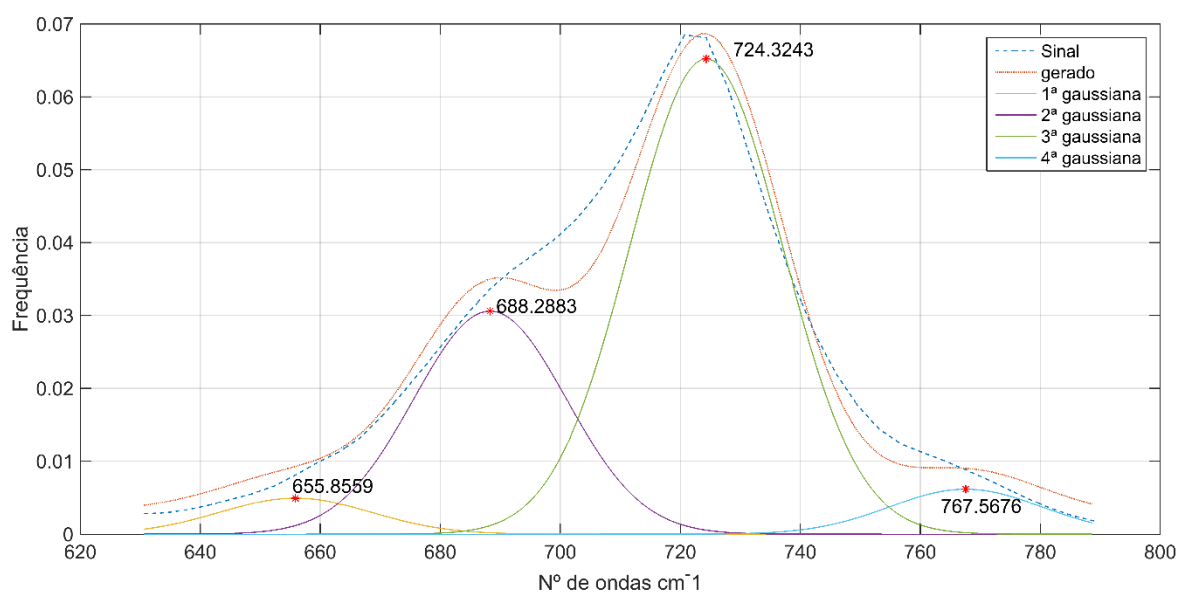
1ª Região 790 a 630 cm^{-1}

Exemplificando com o centro de banda 1 os valores constantes, obtidos com GraphPad

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Minimum; 25 %; Median; 75 %; Maximum; Mean	0,065	0,060	0,17	0,092	0,058	0,157	0,057	0,082	0,130
Std. Deviation	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Std. Error	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lower 95 % CI of mean	0,065	0,060	0,1749	0,09157	0,05815	0,1572	0,05735	0,08239	0,1305
Upper 95 % CI of mean	0,065	0,0560	0,1749	0,09157	0,05815	0,1572	0,05735	0,08239	0,1305

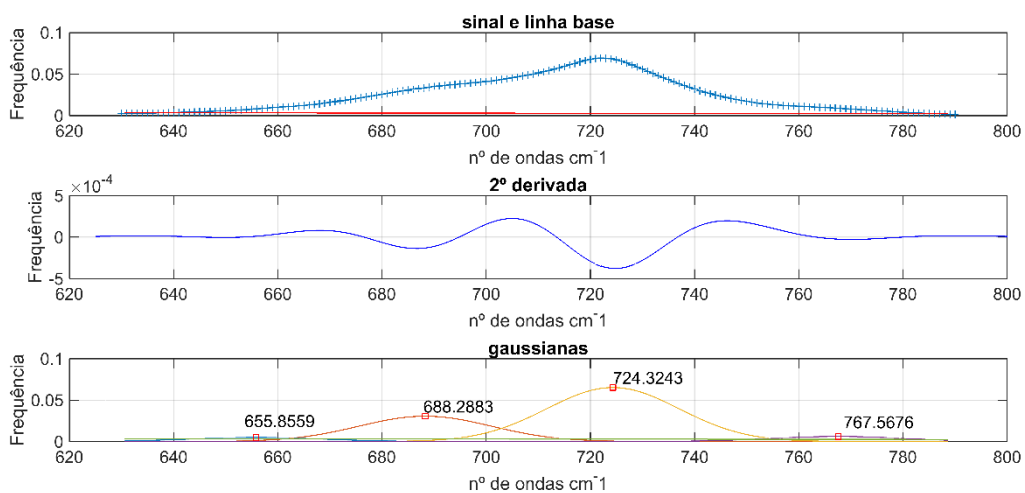
Fonte: Autoria própria.

Gráfico da região, com gaussiana a partir da 2ª derivada.



Fonte: Autoria própria.

Gráficos do sinal da 1ª região: a) gráfico do sinal; b) gráfico da 2ª derivada e c) gráfico das gaussianas.



Apêndice B

2ª Região 1800 a 800 cm⁻¹

Análise estatística das 10 bandas da 2ª região, destaca se o centro de banda no tempo de 30 minutos.

	T30P1	T30P2	T30P3	T30P4	T30P5	T30P6	T30P7	T30P8	T30P9	T30P10
Mínimo	0,3949	0,5506	1,104	1,446	4,325	8,342	3,248	1,48	1,779	1,859
25 %; média; 75 %;	0,4223	0,5886	1,181	1,546	4,625	8,342	3,473	1,582	1,901	3,057
Máximo										
Média	0,4195	0,5848	1,173	1,536	4,595	8,561	3,45	1,572	1,889	2,937
Desvio padrão	0,0087	0,0120	0,0242	0,0316	0,0949	0,6921	0,0713	0,0324	0,0387	0,3788
Erro padrão	0,0027	0,0038	0,0077	0,0100	0,0300	0,2188	0,0225	0,0102	0,0122	0,1198
Menor 95 % CI da média	0,4133	0,5762	1,156	1,514	4,527	8,066	3,399	1,549	1,861	2,666
Maior 95 % CI da média	0,4258	0,5934	1,191	1,559	4,663	9,056	3,501	1,595	1,917	3,208
Teste de normalização KS	Teste de normalização D'Agostino & Pearson omnibus						Teste de normalização Shapiro-Wilk			
KS distância	0,5241	K2			28,56		W		0,3657	
P valor	< 0,0001									
Passa no teste de normalidade (alpha=0.05)?	No									
P valor resumido	***									
um	4,195	5,848	11,73	15,36	45,95	85,61	34,5	15,72	18,89	29,37
Teste Kruskal-Wallis										
P valor	< 0,0001									
Valor de P exato ou aproximado?	Aproximação Gaussiana									
P valor resumido	***									
As medianas variam de forma significativa. (P < 0.05)	Yes									
Número de grupos	9									
ruskal-Wallis	7,37	8,7	8,7	8,17	8,7	8,7	3,36	4,96	8,17	1,49

Fonte: Autoria própria.

Valores da área das bandas obtidos a partir do procedimento de desconvolução (1500 cm^{-1} – 800 cm^{-1} região) considerando T0 até espectro S T90. A análise de variância e testes pós-hoc foi realizada considerando $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa.

	T0 (a)	T5 (b)	T10 (c)	T20 (d)	T30 (e)	T40 (f)	T50 (g)	T60 (h)	T90 (i)	p-value
P1	*d, g, h, i	*d, g, h, i	*g, h, i		*h	*h, i				
850 cm^{-1}	0.374	0.403	0.413	0.432	0.420±0.009	0.421	0.442	0.475	0.453	< 0.0001
P2	*d, h, i	*h, i	*e, f	*e, f	*h, i	*g, h, i	*h			
911 cm^{-1}	0.596	0.629	0.656	0.682	0.585±0.012	0.586	0.646	0.717	0.697	< 0.0001
P3	*d, e, f, g, i	*e, f, g, i	*f, i	*i	*h	*h, i		*i		
965 cm^{-1}	0.911	0.945	0.999	1.101	1.173±0.024	1.195	1.151	0.990	1.226	< 0.0001
P4	*d, f, g, h, i	*f, g, h, i	*g, h, i	*i	*h, i					
1030 cm^{-1}	1.340	1.451	1.500	1.582	1.536±0.032	1.694	1.721	1.760	1.874	< 0.0001
P5	*e, f, g, h, i	*f, g, h, i	*f, g, i	*g, i	*i					
1091 cm^{-1}	3.838	4.116	4.221	4.407	4.595±0.095	5.037	5.067	4.968	5.423	< 0.0001
P6	*b, f, g, h, i	*e	*h, i	*g, h, i	*g, h, i	*h, i				
1160 cm^{-1}	9.459	8.166	8.200	8.214	8.561±0.692	8.185	8.009	7.597	7.943	< 0.0001
P7	*c, d, e, f	*h	*h	*h, i	*g, h, i	*g, h, i				
1236 cm^{-1}	3.215	3.376	3.385	3.390	3.45±0.071	3.417	3.334	3.130	3.328	< 0.0001
P8	*b, c, d, e, f	*g, h, i	*f, g, h, i	*g	*g					
1300 cm^{-1}	1.468	1.583	1.597	1.572	1.572±0.032	1.569	1.550	1.563	1.568	< 0.0001
P9	*d, e, f, g, i	*e, f, i	*f, i	*i	*h	*h, i	*h	*i		
1365 cm^{-1}	1.584	1.698	1.735	1.794	1.889±0.039	1.906	1.873	1.690	1.951	< 0.0001
P10	*c, d, e, f, h	*h	*h	*i	*g, i	*g, i	*h	*i		
1452 cm^{-1}	2.243	2.976	2.981	2.984	2.937±0.379	3.001	2.926	3.240	2.922	< 0.0001
P11				*e, f		*g				
1634.3 cm^{-1}				0.041	0.025	0.028	0.005			< 0.0001
P12	*b, d, e, f, g	*f	*e, f	*h	*h, i	*h, i	*h, i			
1658 cm^{-1}	0.056	0.048	0.048	0.147	0.027	0.025	0.042	0.050	0.050	< 0.0001
P13	*b, c, d, h	*e	*e, f	*e, f, g	*h, i			*f, g, i		
1701 cm^{-1}	0.094	0.117	0.119	0.120	0.112	0.114	0.117	0.154	0.117	< 0.0001
P14	*b, c, d, f	*g	*g, h	*g, h, i	*f, g	*g, h, i				
1744 cm^{-1}	5.255	5.313	5.326	5.33	5.31	5.336	5.238	5.283		< 0.0001

*Diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem significativamente umas das outras pela aplicação da análise de Kruskal-Wallis e pelo teste de comparação múltipla de Dunn em $p < 0,05$. Cada letra minúscula representa um espectro, onde T0 = a, T5 = b, T10 = c, T20 = d, T30 = e, T40 = f, T50 = g, T60 = h e T90 = i.

APENDICE C

Apresenta a comparação entre a área das bandas para todos os espectros considerando a segunda região 1130 – 1070 cm^{-1} . Há uma diferença estatisticamente significativa, considerando T0 até espectros T90. A análise de variância e testes pós-hoc foram realizadas para $p < 0,05$ tendo diferença estatisticamente significativa.

	T0 (a)	T5 (b)	T10 (c)	T20 (d)	T30 (e)	T40 (f)	T50 (g)	T60 (h)	T90 (i)
P1	*e, f, g, h, i	*e, g, h, i	*g, h, i	*h, i		*i			
1097	0.49	0.516	0.544	0.609	0.658 ± 0.002	0.654 ± 0.002	0.682	0.744	0.778
P2	*e, f, g, h, i	*f, g, h, i	*g, h, i	*h, i	*i				
1118	0.095 ± 0.001	0.103	0.112	0.134	0.158	0.236 ± 0.027	0.262	0.305	0.32

*Diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem significativamente umas das outras pela aplicação da análise de Kruskal-Wallis e pelo teste de comparação múltipla de Dunn em $p < 0,05$. Cada letra minúscula representa um espectro, onde T0 = a, T5 = b, T10 = c, T20 = d, T30 = e, T40 = f, T50 = g, T60 = h e T90 = i.

É possível examinar as colunas do Quadro 10, gerados pelo software GraphPad contendo as áreas de cada um dos tempos coletados.

Teste de Comparação Múltipla de Dunn.

	P1		P2	
	Dif	S	Dif	S
T0 vs T30	-49,5	***	-40,5	*
T0 vs T40	-40,5	*	-49,5	***
T0 vs T50	-60	***	-60	***
T0 vs T60	-70	***	-70	***
T0 vs T90	-80	***	-80	***
T5 vs T30	-39,5	*		
T5 vs T40			-39,5	*
T5 vs T50	-50	***	-50	***
T5 vs T60	-60	***	-60	***
T5 vs T90	-70	***	-70	***
T10 vs T50	-40	*	-40	*
T10 vs T60	-50	***	-50	***
T10 vs T90	-60	***	-60	***
T20 vs T60	-40	*	-40	*
T20 vs T90	-50	***	-50	***
T30 vs T90			-39,5	*
T40 vs T90	-39,5	*		

Fonte: Autoria própria.

APENDICE D

Valores da área das bandas obtidos a partir do procedimento de deconvolução (3050 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} região) considerando T0 até espectros T90. A análise de variância e testes pós-hoc foram realizadas considerando $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa.

	T0 (a)	T5 (b)	T10 (c)	T20 (d)	T30 (e)	T40 (f)	T50 (g)	T60 (h)	T90 (i)	p-value
P1	*h	*f, g, h, i	*f, g, h, i	*g, h, i	*h	*i				
2825 cm^{-1}	0.201 \pm 0.001	0.205 \pm 0.002	0.205	0.202	0.199	0.197	0.190 \pm 0.002	0.137	0.188	< 0.0001
P2	*e, g, i	*g, i	*g, i		*h	*h	*h	*i		
2854 cm^{-1}	2.962 \pm 0.213	2.893 \pm 0.283	3.018	3.008	2.995	3.000	2.571 \pm 0.350	3.220	2.874	< 0.0001
P3	*d, e, f, h	*d, e, f, h	*h	*g	*g	*g, i	*h	*i		
2875 cm^{-1}	1.076 \pm 0.008	1.076 \pm 0.011	1.086	1.097	1.127	1.128	1.07 \pm 0.014	N.A.	1.086	< 0.0001
P4	*d, e, f, h	*d, e, f, h	*f, h		*g	*g	*h			
2893 cm^{-1}	1.455 \pm 0.011	1.454 \pm 0.015	1.467	1.484	1.526	1.531	1.452 \pm 0.019	1.521	1.473	< 0.0001
P5	*d, e, h, i	*d, h, i	*h, i			*h	*h, i	*i		
2922 cm^{-1}	4.787 \pm 0.251	4.861 \pm 0.334	4.690	4.677	4.681	4.687	4.897 \pm 0.415	4.970	4.463	< 0.0001
P6	*d, e, f	*e	*h	*g, h	*g, h, i	*g, h, i				
2958 cm^{-1}	1.459 \pm 0.012	1.466 \pm 0.016	1.486	1.505	1.569	1.561	1.453 \pm 0.020	1.430	1.472	< 0.0001
P7	*d, e, f, g	*d, e, f, h	*e, f		*i					
2983 cm^{-1}	0.259 \pm 0.002	0.263 \pm 0.003	0.282	0.309	0.414	0.383	0.307 \pm 0.004	N.A.	0.294	< 0.0001
P8	*d, f, g, i	*g, i	*g, i		*f, g, i					
3009 cm^{-1}	0.511 \pm 0.005	0.502 \pm 0.006	0.500	0.493	0.506	0.490	0.451 \pm 0.007	0.429	0.430	< 0.0001

*Diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem significativamente umas das outras pela aplicação da análise de Kruskal-Wallis e pelo teste de comparação múltipla de Dunn em $p < 0,05$. Cada letra minúscula representa um espectro, onde T0 = a, T5 = b, T10 = c, T20 = d, T30 = e, T40 = f, T50 = g, T60 = h, e T90 = i. N.A = não aparecem mais.