

UNIVERSIDADE BRASIL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
CAMPUS FERNANDÓPOLIS

WAGNER RAFAEL DA SILVA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ÓLEOS VEGETAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS EM *Acinetobacter*  
*baumannii*

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *IN*  
*NATURE* AND OZONIZED VEGETABLE OILS IN *Acinetobacter*  
*baumannii*

São Paulo – SP  
2021

WAGNER RAFAEL DA SILVA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
ÓLEOS VEGETAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS EM *Acinetobacter*  
*baumannii*

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

Profa.Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani  
**Orientadora**

São Paulo – SP  
2021

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

Silva, Wagner Rafael da  
S584c      Composição química e atividade antimicrobiana de óleos vegetais in natura e ozonizados em *Acinetobacter baumannii* / Wagner Rafael da Silva. – São Paulo: Universidade Brasil, 2021.  
90f. : il. ; 29,5cm.

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.

Orientadora: Profa. Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. Ozônio. 3. Atividade bactericida.  
4. Plantas medicinais. I.Título.

CDD 615.321

# TERMO DE APROVAÇÃO



## TERMO DE APROVAÇÃO

WAGNER RAFAEL DA SILVA

### "COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS VEGETAIS IN NATURA E OZONIZADOS EM ACINETOBACTER BAUMANNII"

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) Dora Inês Kozusny-Andreami (presidente-orientadora)

Prof(a). Dr(a) Luciana Estevam Simonato (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Ricardo Scarpato Navarro (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Carlos Eduardo Maia de Oliveira (INSTITUTO FEDERAL DE SÃO PAULO)

Prof(a). Dr(a) Marliisa Flavia Pereira Di-Tanno (CEETEPS)

São Paulo, 14 de abril de 2021.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Dora Inês Kozusny-Andreami

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

# FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO



## Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo 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: "COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS VEGETAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS EM *ACINETOBACTER BAUMANNII*"

Autor(es):

Discente: **Wagner Rafael da Silva**

Assinatura: Wagner Rafael da Silva

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Dora Inês Kozusny-Andreani**

Assinatura: Dora Inês Kozusny-Andreani

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Data: 14/04/2021

Dedico o presente trabalho, primeiramente, a Deus pelo dom da vida.

A minha família, que me proporcionou ser.

À Dra. Dirce Maria Ignácio dos Santos Gonzaga e à ilustre, amiga e brilhante orientadora Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani,

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus.

Aos meus pais.

À Universidade Brasil.

Ao Instituto de Hematologia.

Ao Hemocentro de Fernandópolis,

À Dra. Dirce Maria Inácio dos Santos Gonzaga pela paciência e ajuda.

A minha orientadora e inspiradora Profa. Dra. Dora Inês Kozusny-Andreani.

## RESUMO

O estudo de mecanismos de controle de infecções causadas por bactérias é tema de interesse de diferentes profissionais envolvidos no ambiente hospitalar. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar composição química de óleos vegetais de canola, coco e dendê, *in natura* e ozonizados, e a atividade antimicrobiana *in vitro* frente à *Acinetobacter baumannii*, uma espécie de bactéria que se destaca como importante agente patogênico oportunista e responsável por infecções relacionadas à assistência à saúde. Todas as amostras de óleos testadas foram caracterizadas pelas técnicas de cromatografia a gás, índice de I<sub>2</sub> e peróxidos. A característica mais alterada foi sob o efeito do processo de ozonização, passando de não detectáveis nas amostras de óleos *in natura* para as frações de  $125,7 \pm 0,2$ ;  $422,4 \pm 0,2$  e  $434,8 \pm 0,2$  mEq/Kg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para o óleo de canola, coco e dendê ozonizados. A redução da carga microbiana em cepas de *A. baumannii* foi de 93,5, 71,6 e 85,9% para óleos de canola, coco e dendê *in natura*, respectivamente, e de 96,2, 93,8 e 91,0% para os óleos de canola, coco e dendê ozonizados, respectivamente. Além disso, a eficiência no tempo de inibição de *A. baumannii* mostrou que óleos ozonizados apresentam imediata ação bactericida, onde sua contagem bacteriana em 10 min se iguala aos resultados de óleos *in natura* após 30 min da incubação. Esses resultados revelaram que os óleos testados podem ser utilizados no controle de infecções bacterianas e a ozonização desses óleos potencializa a ação bactericida. Os resultados evidenciaram, porém, que a comparação entre as contagens microbianas dos óleos *in natura* e ozonizados não apresentou diferenças significativas, já que todos os valores p resultantes foram superiores ao nível de significância adotado para o teste comparativo. Resultado semelhante foi verificado na comparação entre os óleos ozonizados quanto à contagem microbiana, ou seja, não houve diferenças significativas entre as contagens de micro-organismos quando os diferentes tipos de óleos ozonizados foram comparados.

**Palavras-chave:** *Acinetobacter baumannii*. Ozônio. Atividade bactericida. Plantas medicinais.

## ABSTRACT

The study of infection control mechanisms caused by bacteria is a topic of interest to different professionals involved in the hospital environment. This work aimed to investigate the use of vegetable oils as an alternative treatment in the control of these infections. The bactericidal effect of canola, coconut and palm oil, *in natura* and ozonized oils, was evaluated under *Acinetobacter baumannii*, a species of bacteria that stands out as an important opportunistic pathogen and is responsible for infections related to the care of health. All the tested oil samples were characterized by the techniques of gas chromatography, I<sub>2</sub> and peroxides index, the most altered characteristic under the effect of the ozonation process, passing from undetectable in the samples of *in natura* oils to the fractions  $125,7 \pm 0,2$ ;  $422,4 \pm 0,2$  and  $434,8 \pm 0,2$  meq/Kg of Na<sup>2</sup>S<sup>2</sup>O<sup>3</sup> for canola oil, coconut and ozonized palm oil. The reduction of microbial load in *A. baumannii* strains was 93,5, 71,6 and 85,9% for canola, coconut and *in natura* palm oils, respectively, and 96,2, 93,8 and 91,0% for the oils of canola, coconut and ozonized palm oil, respectively. In addition, the efficiency in the inhibition time of *A. baumannii* showed that ozonized oils present immediate bactericidal action, where their bacterial count in 10 min equates to the results of *in natura* oils after 30 min of incubation. These results revealed that the oils tested can be used in the control of bacterial infections and the ozonation of these oils potentiates the bactericidal action. The results showed, however, that the comparison between the microbial counts of *in natura* and ozonized oils did not point significant differences, since all the resulting p-values were higher than the level of significance adopted for the comparative test. A similar result was found in the comparison among ozonized oils in terms of microbial count, that is, there were no significant differences among microorganism counts when the different types of ozonized oils were compared.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*. Ozone. Bactericidal activity. Medicinal plants.

## DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A *Acinetobacter baumannii* apresentou-se sensível aos óleos naturais utilizados no estudo, onde foi possível determinar as concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas, assim como a verificação das diferenças cromatográficas físico-químicas dos óleos (ozonizados e *in natura*) quando submetidos ao tratamento. Nos resultados obtidos, foi possível comparar os óleos naturais, o óleo de canola ozonizado se destacou como o mais eficiente em matar a bactéria. Os demais óleos ozonizados apresentaram redução da carga microbiana acima de 90% nos primeiros dez minutos de tratamento. Para uso *in natura*, o óleo de dendê se destacou com redução de 85,9% na carga microbiana. O resultado mostrou que a eficiência dos óleos ozonizados foi maior tanto no CIM quanto no CBM, quando comparados entre os grupos ozonizado e *in natura*, e que a bactéria é sensível aos óleos ozonizados. Ainda assim, a atividade antibacteriana dos óleos naturais é notória, mostrando que eles foram expressivamente eficazes na inibição do crescimento de *Acinetobacter baumannii*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modos de transmissão de superfícies inanimadas para hospedeiro suscetível <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	21
Figura 2 – Reação de determinação de ácidos graxos livres .....	31
Figura 3 – Reação de determinação do índice de saponificação .....	32
Figura 4 – Linhagem de <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978, cultivada em meio ágar sangue .....	43
Figura 5 – Gerador de ozônio O&L 1,5 RM.....	45
Figura 6 – Placa de microdiluição de 96 poços utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos vegetais <i>in natura</i> e ozonizados frente a <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17978. ....	46
Figura 7 – Esquema de separação em cromatografia a gás.....	48
Figura 8 – Cromatógrafo a gás.....	49
Figura 9 – Amostra de óleo de canola ozonizado (a) e não ozonizado(b) .....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	
Figura 10 – Amostra de óleo de coco ozonizado (a) e não ozonizado (b) .....	55
Figura 11 – Amostra de óleo de dendê ozonizado (a) e não ozonizado (b). ....	57
Figura 12 – Intervalos de confiança (95%) da contagem microbiana de acordo com os tratamentos estudados.....	59
Figura 13 – Intervalos de confiança (95%) da contagem microbiana de acordo com os tipos de óleos vegetais.....	59
Figura 14 – Contagem microbiana de <i>Acinetobacter baumannii</i> para o óleo de canola <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição .....	60
Figura 15 – Contagem microbiana de <i>Acinetobacter baumannii</i> para o óleo de coco <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição.....	61
Figura 16 – Contagem microbiana de <i>Acinetobacter baumannii</i> para o óleo de dendê <i>in natura</i> e ozonizado de acordo com os tempos de exposição .....	61
Figura 17 – Variação percentual da contagem microbiana dos óleos essenciais de acordo com os tratamentos <i>in natura</i> e ozonizado.....	63
Figura 18 – Variação percentual da contagem microbiana de acordo com o tipo de óleo vegetal.....	64



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização físico-química de óleo de canola ozonizado.....	52
Tabela 2 – Caracterização físico-química de óleo de canola não ozonizado.....	52
Tabela 3 – Caracterização físico-química de Óleo de coco ozonizado.....	54
Tabela 4 – Caracterização físico-química de óleo de coco não ozonizado.....	54
Tabela 5 – Caracterização físico-química de óleo de dendê ozonizado.....	56
Tabela 6 – Caracterização físico-química de óleo de dendê não ozonizado.....	56
Tabela 7 – Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para cada de óleos vegetais <i>in natura</i> e ozonizados.....	57
Tabela 8 – Média±desvio padrão (Mediana) do <i>Acinetobacter baumannii</i> submetido aos óleos vegetais <i>in natura</i> e ozonizados.....	58
Tabela 9 – Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos óleos vegetais avaliados.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i>
AbMDR	<i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistente
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
AI	Autoindutor
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	American of Official Analytical Chemistis
APIC	Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	National Committee for Clinical Laboratory Standard
CRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> carbepenem resistente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Equipamento de proteção individual
EPS	Exopolissacarídeos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IACS	Infecções adquiridas nos cuidados de saúde
HDL	High-density lipoprotein / Lipoproteínas de alta densidade
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
LDL	Low Density Lipoproteins / Lipoproteínas de baixa densidade
LOPs	Produtos de oxidação lipídica
LQ	Limites de quantificação
MDR	Multidrug-resistant (Resistente a múltiplas drogas)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados
ND	Não detectado
NNIS	Sistema Nacional de Vigilância Nosocomial
PMF	Força motriz do próton
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
QS	<i>Quorum sensing</i>

RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SENTRY	Programa de vigilância antimicrobiana
TLC	Técnica Cromatográfica Líquida
UTI	Unidade de terapia Intensiva
VAP	Pneumonia associada ao ventilador

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO .....	19
3.2 EPIDEMIOLOGIA .....	19
3.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À AQUISIÇÃO DE INFECÇÃO OU COLONIZAÇÃO POR <i>A. BAUMANNII</i> .....	21
<b>3.3.1 Infecções nosocomiais mais frequentes</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3.2 Impacto clínico</b> .....	<b>24</b>
3.4 PREVENÇÃO DE INFECÇÕES POR <i>ACINETOBACTER</i> SPP. NOS SERVIÇOS DE SAÚDE .....	25
3.5 NOVOS MÉTODOS DE CONTROLE DE <i>A. BAUMANII</i> .....	27
3.6 CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS VEGETAIS .....	31
<b>3.6.1 Métodos de caracterização de óleos vegetais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6.2 Propriedades do óleo de canola</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6.3 Propriedades do óleo de coco</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6.4 Propriedades do azeite de dendê</b> .....	<b>37</b>
3.7. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ANTIMICROBIANAS DO OZÔNIO .....	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 LINHAGEM BACTERIANA E MEIOS DE CULTIVO .....	43
4.2 OZONIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS .....	44
4.3 EFICIÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS OZONIZADOS .....	45
4.4 CINÉTICA BACTERICIDA DOS ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E <i>IN NATURA</i> .....	47

4.5 CROMATOGRAFIA A GÁS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS VEGETAIS <i>IN NATURA</i> E OZONIZADOS .....	47
4.6 ANÁLISE DOS DADOS .....	49
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS OZONIZADOS E SEM OZONIZAÇÃO .....	51
5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) .....	57
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

*Acinetobacter baumannii* é uma bactéria aeróbia Gram-negativa. Oportunista, responde por diversas infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS) (ROBERTS; FINDLAY; LANG, 2001; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; BREIJ *et al.*, 2010). Sua importância clínica relaciona-se à alta prevalência em epidemias e endemias; é capaz de adquirir resistência aos antibióticos e à dessecação, e formar biofilmes em dispositivos médicos (ROBERTS; FINDLAY; LANG, 2001; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; BREIJ *et al.*, 2010).

A resistência das espécies de *Acinetobacter* pode advir de genes de outros organismos, de mutações ou de subpopulações com resistência preexistente que podem tornar-se dominante sob pressão antimicrobiana seletiva. *Acinetobacter baumannii* multirresistente é um patógeno emergente no ambiente de saúde e provoca infecções que incluem bacteremia, pneumonia, meningite, infecção do trato urinário e infecção da ferida. É capaz de sobreviver sob ampla gama de condições ambientais e persistir em superfícies por longos períodos de tempo, o que o transforma em causa frequente de surtos de infecção e doença endêmica (MARAGAKIS; PERL, 2008).

Nas últimas décadas, a elevada resistência de *A. baumannii* aos antibióticos habitualmente empregados relaciona-se a mecanismos intrínsecos ou adquiridos (LEE *et al.*, 2006). Com o passar dos anos, porém, para o tratamento tornou-se necessário administrarem-se antimicrobianos mais potentes, entre os quais se destacam os carbapenêmicos, devido a índices crescentes de cepas resistentes a essas drogas refletidos na emergência das  $\beta$ -lactamases (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Por isso, a administração de lipopolipeptídeos, como a polimixina B e polimixina E, tem sido considerada como “último recurso” para vencer a resistência (HORTON; PANKEY, 1982).

Amplamente empregados em ocorrência de infecções por *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* na década de 1960, os lipopolipeptídeos, no entanto, foram substituídos por outras drogas como as cefalosporinas e os aminoglicosídeos, eficazes e menos tóxicas (HORTON; PANKEY, 1982; DRABICK, 1998). Com o aparecimento de cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a múltiplas

drogas (MDR) na década de 1990, a aplicação de lipopolipeptídeos foi restabelecida, em especial no tratamento contra bactérias resistentes aos carbapenêmicos.

Nos últimos anos, o emprego intensivo das polimixinas tem proporcionado o aparecimento de amostras de *A. baumannii* resistentes. A Espanha relata taxas de resistência de 40,7% por *A. baumannii*, e a Coreia, 30,6% (KO *et al.*, 2007; ARROYO, *et al.*, 2009). Todavia, atualmente, as polimixinas têm sido consideradas, em alguns países, como a única alternativa no tratamento de infecções graves por *A. baumannii* multirresistente (GOMES *et al.*, 2016).

Além da resistência, os antibióticos usados contra micro-organismos patógenos podem induzir efeitos colaterais graves, especialmente em pacientes que estão sob tratamento terapêutico prolongado, e também podem alterar a microbiota, que é importante para a eubiose do intestino e do corpo. Os agentes antimicrobianos que aumentam a disbiose criam um ambiente ideal para a colonização de micro-organismos patogênicos e outras infecções com possíveis episódios recorrentes (LAGACÉ-WIENS; RUBINSTEIN, 2012; MATTAPPALIL, MERGENHAGEN, 2014).

Por consequência à multirresistência do *A. baumannii* em tratamento antibacteriano e, principalmente, a mortalidade associada à infecção pela bactéria concomitante à terapia inadequada, iniciou-se a busca por novos agentes antimicrobianos, entre os produtos naturais, que contêm centenas de ingredientes naturalmente ativos em proporções variáveis e eliminam o risco de resistência, pois os micro-organismos não são capazes de se adaptar às suas estruturas heterogêneas (UGAZIO *et al.*, 2020).

O ozônio é amplamente reconhecido como um dos melhores agentes bactericidas, antivirais e antifúngicos. Atualmente, tem sido usado como um mediador terapêutico em feridas crônicas, úlceras e isquemias, decorrentes da capacidade de diminuir infecções bacterianas, curar danos dérmicos devido ao efeito de “morte oxidativa” nos micro-organismos (TRAVAGLI *et al.*, 2010; VALACCHI, 2011).

Os óleos ozonizados têm demonstrado atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos e podem ser propostos para uso na prevenção e tratamento de infecções crônicas locais, em formulações adequadas e em casos controlados, como alternativa aos antimicrobianos tópicos (LIU *et al.*, 2015; VIOTTO *et al.*, 2020). Isso pode ser útil para contrastar o uso generalizado e indiscriminado de antibióticos, que levou ao surgimento de resistência bacteriana (WILLIAMSON; CARTER; HOWDEN, 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar composição química de óleos vegetais de canola, coco e dendê, *in natura* e ozonizados, e a atividade antimicrobiana, *in vitro*, frente à *Acinetobacter baumannii*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar óleos vegetais *in natura* e óleos vegetais submetidos à ozonização, quanto ao perfil de ácidos graxos e índice de peróxidos.
- Avaliar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima dos óleos vegetais *in natura* e ozonizados frente a *A. baumannii*.
- Realizar a cinética bactericida dos óleos vegetais ozonizados e *in natura*.
- Avaliar e quantificar a atividade antibacteriana dos óleos *in natura* quando comparados aos óleos ozonizados e evidenciar os resultados da CIM e CBM.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

*Acinetobacter* spp. são cocobacilos Gram-negativos não hemolíticos, aeróbicos, imóveis, oxidase-negativos, catalase positivos, não fermentadores de glicose, pertencentes à subclasse  $\gamma$ -*Proteobacteria* família *Moraxellaceae* (KARAGEORGOPOULOS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2016).

Com os avanços na taxonomia bacteriana molecular, em particular o sequenciamento de rDNA 16S e a hibridação DNA-DNA, as espécies podem ser distinguidas com maior precisão. Atualmente, foram identificadas 34 espécies de gênero *Acinetobacter* (KARAGEORGOPOULOS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2014), das quais se destacam quatro genoespécies: *Acinetobacter calcoaceticus* (genoespécie 1); *Acinetobacter baumannii* (genoespécie 2); *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, também conhecido como ABC, que congrega 4 espécies altamente similares, sem evidência fenotípica entre si: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus* (genoespécies 3 e 13TU) e *Acinetobacter haemolyticus* (genoespécies 4), ligadas a doenças em humanos (HOWARD *et al.*, 2012; LIN; LAN, 2014).

#### 3.2 EPIDEMIOLOGIA

Ocasionalmente, as espécies de *Acinetobacter* são comensais na pele, garganta e nas secreções de pessoas saudáveis. Comumente isolado em hospitais, *Acinetobacter* infecta pacientes críticos, debilitados por suas comorbidades ou imunocomprometidos. *A. baumannii* é, habitualmente, encontrado em unidades de terapia intensiva (UTIs), unidades de queimados, de oncologia, de cirurgia e neurocirurgia, responsável por numerosas complicações nosocomiais, (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; ALLEN; HARTMAN, 2010; LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; GOMES *et al.*, 2016).

A bactéria dispõe de múltiplos mecanismos de virulência relacionados à capacidade de as espécies de *Acinetobacter* aderirem, colonizarem e invadirem células epiteliais humanas; possui excelente capacidade de produção de biofilme e resistência (inerente e adquirida) a vários antimicrobianos, que facilitam sua sobrevivência em condições ambientais variadas. *Acinetobacter baumannii* tem

causado, com frequência, surtos de infecção hospitalar pela sua longa persistência em superfícies (HOWARD *et al.*, 2012).

Os determinantes patogênicos desse gênero incluem a formação de biofilme mediada por *pilus* a uma proteína de membrana externa que se associa à apoptose em células humanas – um sistema de aquisição de ferro, lipopolissacarídeos e um sistema de detecção de *quórum sensing*<sup>1</sup>. Os *pili* exercem importante papel para que *A. baumannii* adira a superfícies (inertes ou vivas) e forme biofilme bacteriano (JAWAD *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2014).

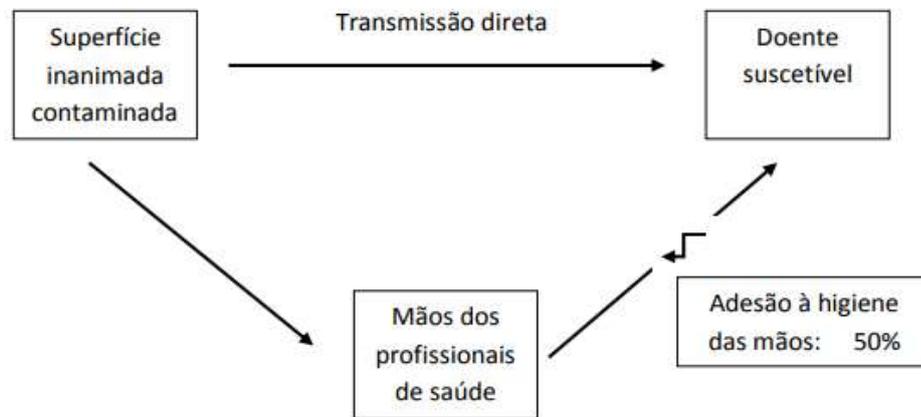
Um biofilme compõe-se de bactérias vivas caracterizadas por células aderidas a um substrato, embebidas por substâncias poliméricas extracelulares, tais como exopolissacarídeos (EPS), proteínas, ácidos nucleicos, possibilitando que as bactérias resistam a mecanismos de defesa do hospedeiro, antibióticos e forças de cisalhamento hidrodinâmico. Dessa forma, *A. baumannii* é capaz de colonizar e persistir em superfícies bióticas e abióticas, causando infecções relacionadas ao uso de equipamentos médicos, aumenta o risco de disseminação e a ocorrência de surtos. Segundo recentes estudos, a probabilidade de as espécies do complexo ABC formarem um biofilme em uma interface líquido-sólida a 25°C é três vezes maior do que a dos complexos não ABC (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; MARTÍ *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2014; LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014; HOMENTA *et al.*, 2014).

*Acinetobacter*, quando comparado a outros gêneros de bactérias Gram-negativas e avaliado em ambiente hospitalar simulado, é residente nas mãos e em superfícies secas. Nesta simulação, *A. baumannii* consegue sobreviver por aproximadamente um mês, embora possa persistir por até cinco meses. A transmissão de cepas epidêmicas de *Acinetobacter*, isoladas e identificadas na pele de pacientes e profissionais da saúde, foi comprovada por isótopos 17 (JAWAD *et al.*, 1998; KARAGEORGOPOULOS *et al.*, 2008) conforme apresentado na Figura 1.

---

<sup>1</sup> *Quorum sensing* (QS) é um mecanismo de comunicação entre bactérias, pela produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras, através de membranas bacterianas; as bactérias produzem, detectam e respondem a compostos de baixa massa molecular, os autoindutores (AIs), que são liberados no ambiente (CAMPOS-GALVÃO, 2012; SOLA *et al.*, 2012). A comunicação intra e interespecies de micro-organismos baseia-se na emissão de estímulos e respostas dependente da densidade populacional. Essa interação reflete a capacidade de os micro-organismos habitarem ambientes diversos, captarem informações do meio, comunicarem-se com diferentes espécies, monitorarem a densidade populacional, regularem sua manifestação gênica e controlarem processos celulares como a esporulação, formação de biofilmes, fatores de virulência, produção de bacteriocinas e antibióticos e a bioluminescência (SOLA *et al.*, 2012).

Figura 1 – Modos de transmissão de superfícies inanimadas para hospedeiro suscetível *Acinetobacter baumannii*



Fonte: Adaptado de Kramer, Schwebke e Kampf (2006)

Patógenos bacterianos são hábeis em promover a morte celular, o que lhe confere importância no escape das defesas do hospedeiro e sua capacidade de sobreviver; tal habilidade está implicada no mecanismo de patogênese de uma variedade de doenças infecciosas (SMANI; DOMINGUEZ-HERRERA; PACHON, 2011). Segundo Krzyminska, Fracknowiak e Kaznowski (2012), linhagens de *Acinetobacter* do complexo ABC ativam a apoptose em células do epitélio, pelo mecanismo de adesão às células e por meio da citotoxicidade mediada pelo contato. Outras linhagens de *Acinetobacter*, porém, entram em contato com as células epiteliais, em seguida as invadem e causam a citotoxicidade acompanhada de morte celular por oncosse. Para Lim e Webb (2005), a ativação de diferentes formas de morte celular em células epiteliais pode constituir-se um mecanismo importante de patogênese, bem como vias pelas quais as linhagens bacterianas conseguem escapar do sistema imune e provocar doenças.

### 3.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À AQUISIÇÃO DE INFECÇÃO OU COLONIZAÇÃO POR *A. BAUMANNII*

Atualmente, dedica-se atenção crescente às espécies de *Acinetobacter* por serem importantes agentes patogênicos oportunistas, geralmente no contexto de doença subjacente grave (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; BARAN *et al.*, 2008;

VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011). O número de infecções por *A. baumannii* tem-se ampliado na última década (KARAGEORGOPOULOS *et al.*, 2008) como causa de surtos em âmbito mundial, caracterizados enfaticamente pela multidrogarresistência (MDR), com relato de casos em todos os continentes (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011; LIN; LAN, 2014).

No ambiente hospitalar, cepas de *Acinetobacter* foram identificadas como patógenos presentes em uma ampla variedade de infecções, afetando, especialmente, pacientes criticamente doentes e com déficits significativos de defesas, cujas maiores ocorrências referiam a APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*), relacionadas a infecções sanguíneas, cutâneas e de tecidos moles, feridas, trato urinário, meningite e pneumonia (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

As infecções nosocomiais e os surtos foram atribuídos principalmente a *A. baumannii* (especialmente em UTI) e, em menor proporção, às espécies genômicas 13 (*A. nosocomialis*) e espécies genômicas 3 (*A. pittii*). Outras espécies de *Acinetobacter* também foram relatadas como agentes de infecções hospitalares, entre elas *Acinetobacter bereziniae*, *Acinetobacter guillouiae*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter schindleri*, *Acinetobacter soli* e *Acinetobacter ursingii*, embora estivessem relacionadas a ocorrências raras e restritas, como infecções sanguíneas associadas ao uso de cateter (HIGGINS *et al.*, 2010; WISPLINGHOFF *et al.*, 2004) e é relativamente baixa a mortalidade associada a esses patógenos, uma vez que referenciam um curso clínico benigno. Surtos de menor expressão que têm como agente patogênico espécies de *Acinetobacter* também foram observados, mas, com frequência, estão vinculados a fluidos de infusão contaminados, a heparina solúvel (VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

Vários são os fatores de risco que possibilitam ou facilitam a colonização, invasão e infecção por *A. baumannii*: severidade da doença do hospedeiro, hospitalização prolongada, uso de drogas antimicrobianas em tratamento prévio, procedimentos invasivos (como intubação, drenagem abdominal e torácica, ventilação mecânica, cateteres intravasculares, cateter urinário ou neurocirurgia), traumas, queimaduras, parto prematuro, entre outros (VILLERS *et al.*, 1998; FALAGAS; RAFAILIDIS, 2007; GARCÍA-GARMENDIA *et al.*, 2001; TORRES *et al.*, 2010; MARCHAIM *et al.*, 2012).

### 3.3.1 Infecções nosocomiais mais frequentes

A pneumonia adquirida é a ocorrência clínica de infecção hospitalar por *A. baumannii* mais comum, associada ao ventilador (VAP), embora, muitas vezes, seja difícil distinguir entre colonização e infecção verdadeira do trato respiratório superior (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Nos Estados Unidos, o Sistema Nacional de Vigilância Nosocomial (NNIS) revelou um significativo aumento de ocorrências de pneumonia hospitalar associada a *A. baumannii*, e entre 5 a 10% dos episódios de pneumonia adquirida em UTI são causados por este agente (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; GAYNES; EDWARDS JR, 2005).

*A. baumannii* posiciona-se em décimo lugar entre os micro-organismos mais frequentes causadores de infecções hospitalares nos EUA e responde por 1,3% de todas as infecções nosocomiais da corrente sanguínea (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). A infecção sanguínea de *A. baumannii* pode estar vinculada a uma morbimortalidade elevada em esfera mundial de até 58% (VISCA; SEIFERT. TOWNER, 2011; CHUANG *et al.*, 2011).

Sabe-se, há muito tempo, que *A. baumannii* é capaz de colonizar e infectar feridas em pacientes que sofreram queimaduras ou traumatismos graves. Caracteristicamente, a colonização e a infecção por *A. baumannii* estão associadas a desastres naturais (terremotos, inundações) ou eventos catastróficos causados pelo homem (como guerras, ações terroristas), momento em que a demanda de pacientes que buscam atendimento excede a capacidade de acolhimento por parte dos hospitais, e os procedimentos de limpeza e higienização padrão não podem mais ser aplicados com eficácia (SCOTT *et al.*, 2007; SEBENY; RIDDLE; PETERSEN, 2008).

*A. baumannii* despertou a atenção pública quando foram notificadas infecções graves de feridas e osteomielite em soldados que apresentaram ferimentos importantes durante operações militares no Iraque ou no Afeganistão, e que foram repatriados para os EUA ou para o Reino Unido (SCOTT *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2005; MOULTRIE; HAWKER; COLE, 2011). Os dois principais fatores de risco identificados na infecção por *Acinetobacter* MDR incluíam procedimentos invasivos (cateterismo e ventilação mecânica) e a associação ao tratamento prévio com antimicrobianos. Outros fatores de risco foram adicionados aos anteriores, como tempo prolongado de permanência em hospital e lesões próprias ao campo de batalha

(MOULTRIE; HAWKER; COLE, 2011). Os isolados dessas infecções, muitas vezes, apresentavam multirresistência às drogas antimicrobianas administradas. Tomando-se por base a interpretação errônea e generalizada de que "*A. baumannii* é um organismo ubíquo", aventou-se a possibilidade de que o organismo poderia ter sido inoculado no momento da lesão de pele já colonizada, ou por meio pó ou solo contaminados (SCOTT *et al.*, 2007).

*A. baumannii* apenas ocasionalmente atinge o trato urinário pela infecção, que está, habitualmente, relacionada a cateteres. Em trato urinário, tais infecções são benignas e estão mais presentes nos centros de reabilitação do que em UTIs (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007). Um caso clínico distinto é a meningite cerebral relacionada à hidrocefalia em pacientes que passaram por neurocirurgia (KIM *et al.*, 2009).

### 3.3.2 Impacto clínico

É difícil avaliar o impacto clínico real da infecção hospitalar por *A. baumannii* em pacientes com bacteremia ou pneumonia; essa dificuldade tem sido tema de debate contínuo. Pesquisadores alegavam, anteriormente, que os pacientes morriam por doença subjacente a *A. Baumannii*, mas não por infecção por esta bactéria; todavia, pesquisas recentes combinando estudos de corte e caso-controle concluíram que as infecções por *A. baumannii* estão, efetivamente, associadas ao aumento da mortalidade atribuível de 8 a 32% (GAYNES; EDWARDS, 2005; TORRES *et al.*, 2010; CHUANG *et al.*, 2011).

O aumento de resistência dessa bactéria, capaz de contrapor-se, com eficiência, à ação de antibióticos, acompanha o impacto clínico de *A. baumannii*, agravado pelo uso desmedido de antimicrobianos em hospitais. Este fato causa grande preocupação, particularmente porque essas bactérias propendem à transmissão cruzada, possivelmente devido à sua resistência a múltiplos medicamentos e à sua capacidade de sobreviver por períodos prolongados em ambiente hospitalar (FOURNIER; RICHET; WEINSTEIN, 2006; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011). Pesquisas relacionadas à vigilância microbiológica apontam que taxas de multirresistência se aproximaram de 30% (KARAGEORGOPOULOS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009).

As cepas de *A. baumannii* se apresentam multirresistentes à maioria dos antimicrobianos comerciais. Na criação de mecanismos de resistência, as bactérias podem ter, como alvos, diversas classes de antimicrobianos (como a  $\beta$ -lactamase classe B: metaloenzimas, e classe D: enzimas OXA), bombas de efluxo, enzimas que modificam os aminoglicosídeos (MARTINS *et al.*, 2012; LIN; LAN, 2014), redução da permeabilidade da membrana externa e perda de porinas (MARTINS *et al.*, 2012; LIN; LAN, 2014; VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO, 2014) Todavia, outros mecanismos podem atuar em conjunto para contribuir com a resistência a uma classe específica de antimicrobianos.

A multirresistência em *A. baumannii* se propaga, especialmente, por plasmídeos conjugados, transposons ou integrons mobilizados, para, por meio de um conjunto de genes, codificar resistência a famílias de antimicrobianos (LIN; LAN, 2014; VANEGAS-MÚNERA; RONCANCIO-VILLAMIL; JIMÉNEZ-QUICENO, 2014).

Entre agosto/2009 e julho/2010, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2010), no monitoramento de resistência bacteriana por meio de tipagem molecular, avaliou isolados bacterianos em amostras enviadas por hospitais credenciados em sua rede. Das 540 amostras analisadas, 165 foram identificadas como isolados de *A. Baumannii*. Das 89 amostras enviadas pelo LACEN de Goiás, em 13 delas (provenientes de 3 hospitais de Goiânia) foram identificados 11 isolados positivos para OXA-23, enquanto 76 amostras tinham 66 isolados positivos para OXA-23 e foram consideradas como surto. Todas as amostras enviadas pelo hospital confirmaram a existência de um padrão de arranjo genético (padrão genômico) de resistência aos carbapenêmicos naquele estado.

#### 3.4 PREVENÇÃO DE INFECÇÕES POR *ACINETOBACTER* SPP. NOS SERVIÇOS DE SAÚDE

As fontes de contágio ou infecção por *Acinetobacter* spp. em ambientes hospitalares são amplas e diversas e trazem enormes dificuldades e desafios para o monitoramento e controle de surtos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). Diferentes fatores interferem na garantia de segurança ao paciente, derivados do inter-relacionamento de suas condições pessoais, da qualidade dos serviços que lhe são prestados e da própria estrutura da organização (PINA *et al.*, 2010). O tempo de permanência da bactéria no ambiente hospitalar estabelece uma proporção direta

a maiores possibilidades de infecção dos usuários e propagação entre profissionais, o que explica os surtos de longa duração (LUNA; ARUJ, 2007).

Como *A. baumannii* multirresistente (AbMR) é particularmente capaz de produzir surtos, é imprescindível, para o controle de infecção, o cumprimento rigoroso das medidas previstas nas Precauções Padrão e Alargadas, em conformidade com os *Guidelines for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*, de 2007, e o *Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings*, de 2006, emanados pelos *Centers for Disease Control and Prevention* – recomendações que orientam as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar das diferentes instituições de assistência em saúde (ANVISA, 2010; COELHO, 2012).

Diante de infecções adquiridas por *Acinetobacter* na prestação de cuidados de saúde (IACS), é essencial conhecer sua epidemiologia e adotar medidas rígidas de segurança e proteção ao paciente, tais como: isolamento do paciente colonizado/infectado e cuidados com sua higiene, limpeza/higienização das mãos dos profissionais com soluções antissépticas e uso de equipamentos de proteção (EPIs) de forma diferenciada e adequada às diversas situações na prestação dos serviços, bem como medidas para desinfecção do meio ambiente e esterilização de materiais e equipamentos médicos utilizados (como ventiladores). Tais medidas referem condutas simples como formas de prevenir contra infecções no contato com os pacientes, consideradas até mesmo mais eficazes do que outras medidas preventivas padrão à aquisição e disseminação de bactérias multidrogas resistentes (MDR) em hospitais (PIMENTEL *et al.*, 2005; SIEGEL *et al.*; RHINEHART; JACKSON; CHIARELLO, 2007; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; KARAGEORGOPOULOS *et al.*, 2008).

A resiliência ambiental combinada com sua ampla gama de determinantes de resistência faz do AbMR um patógeno bem-sucedido em ambiente hospitalar (MARAGAKIS; PERL, 2008). Para o controle inicial da dispersão do patógeno no ambiente, é essencial, pois, que os pacientes infectados ou colonizados sejam isolados, aplicando-se medidas de bloqueio por contato; se necessário, porém, outras medidas mais rigorosas podem ser tomadas, como o fechamento de unidades para se proceder a uma desinfecção completa e radical (LUNA; ARUJ, 2007). É a situação especial e exemplar de ocorrência de surtos, em que o reprocessamento de materiais e higienização da unidade devem se traduzir em procedimentos de

precaução enfáticos para impedir que o local se transforme em fonte de inóculo do AbMR (MARAGAKIS; PERL, 2008; APIC, 2010).

O rastreamento regular e sistemático de pacientes provenientes de outros hospitais pode, igualmente, traduzir-se em outra medida visando conter surtos: trata-se de uma estratégia que possibilita reduzir os casos de infecções, quebrar sua frequência e descontinuar sua ocorrência, transformando-a em acidental e inviabilizando sua passagem para níveis endêmicos (COOPER *et al.*, 2003).

Segundo Bierhals (2012), o tratamento das infecções provocadas por *A. baumannii* era executado com a aplicação dos antibióticos aminoglicosídeos,  $\beta$  - lactâmicos e tetraciclina. Com o aparecimento e aumento das cepas resistentes a esses antimicrobianos, os carbapenêmicos têm-se revelado a terapia de escolha para o tratamento das infecções causadas por esse patógeno. Atualmente, porém, com o surgimento de novas cepas resistentes aos carbapenêmicos (AbMDR), restam aos médicos poucas opções terapêuticas (colistina e polimixina B) (CAUDURO, 2015).

De acordo com a *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology* (APIC, 2010), a contenção da transmissão de AbMDR, que estão associadas com o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes internados (BIERHALS, 2012), se faz por meio da adoção de medidas objetivas: avaliar o risco; promover a vigilância contínua das infecções; aderir a protocolos de limpeza e higienização das mãos; implementar medidas de prevenção padrão tomando-se por base a transmissão; manter sempre um ambiente descontaminado; avaliar a existência de surto e, em existindo, estabelecer medidas imediatas para seu controle; administrar antimicrobianos de modo comedido e racional (REBMANN; ROSENBAUM, 2011).

### 3.5 NOVOS MÉTODOS DE CONTROLE DE *A. BAUMANII*

As doenças infecciosas respondem pela segunda *causa mortis* em esfera global (NATHAN, 2004). Essas infecções são seguidas por despesas exorbitantes de tratamento, aumento da mortalidade e surtos. Segundo Alberti *et al.*, (2002), as infecções são responsáveis pela morte de 88 mil pessoas no mundo, gerando um ônus econômico anual de 4,5 bilhões. Segundo Blair *et al.*, (2015), a resistência antimicrobiana como um dos maiores desafios para a Medicina. Segundo Cardoso *et al.* (2021), a exposição inadequada das bactérias aos antimicrobianos tem levado ao

desenvolvimento de mecanismos de resistências aos antibióticos e, em decorrência, a falhas terapêuticas frequentes, de forma que a disseminação da resistência bacteriana devido às práticas indevidas (higiene e uso indiscriminado de antibióticos) tem dificultado, de modo crescente, o tratamento de pessoas com infecções. Novos métodos de intervenção em infecções bacterianas ganharam importância e mostraram eficácia de opções alternativas na antibioticoterapia, entre eles a terapia com o ozônio (O<sub>3</sub>), que revelou benefícios substanciais na ação antimicrobiana e cicatricial nas lesões cutâneas crônicas (CARDOSO *et al.*, 2021).

Como o *A. baumannii* é persistente e hábil em adquirir resistência a antibióticos, exerce pressão seletiva sobre as drogas, especialmente em ambiente hospitalar, tornando-se mais complexo evitar a criação de resistência em múltiplos medicamentos (MDR). O mecanismo de resistência mais relevante encontrado em cepas analisadas foi a presença de carbapenemase, que gera um grande desafio clínico, microbiológico e epidemiológico na atividade médica (HART CASARES *et al.*, 2010; RARO *et al.*, 2017). Esta resistência antibiótica se circunscreve em um crescente contínuo e amplia o tempo de hospitalização do paciente (KOLLEF; FRASER, 2001; HEIDARI-SOURESHJANI *et al.*, 2017).

Em virtude dos efeitos colaterais e da resistência das bactérias às drogas, os medicamentos fitoterápicos têm sido pesquisados como substitutos à terapia convencional (SEFIDGAR *et al.*, 2015) nos últimos anos. Sabe-se que cerca de 30 a 50% dos medicamentos atuais são extraídos de plantas medicinais, cujo emprego teve aumento considerável, embora ainda seja necessária muita atenção a esta forma de terapia contra os micro-organismos patogênicos (COWAN, 1999; HEIDARI-SOURESHJANI *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2020).

Souza *et al.* (2005) consideram que as propriedades dos óleos essenciais sejam inseticidas, nematicidas, fungistáticas, antibacterianas e antifúngica. Estes autores reportaram que uma avaliação da atividade antibacteriana por diferentes métodos evidenciou que os óleos essenciais extraídos de partes aéreas de *O. basilicum* são capazes de inibir parcialmente a ação de *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*. De modo semelhante, ainda segundo Souza *et al.* (2005), estudos sobre especiarias e seus subprodutos (como extratos e óleos essenciais) igualmente inibem a ação de patógenos oportunistas, primários, e mesmo a produção de toxinas microbianas. Por isso, O conhecimento de possível atividade antifúngica dos óleos

essenciais é considerado de importância relevante, pois abre possibilidades para se obterem futuros medicamentos antifúngicos de origem natural (KUME *et al.*, 2021).

Extratos, óleos essenciais e óleos vegetais, produzidos por plantas, possuem substâncias com propriedades antimicrobianas provenientes de um metabolismo secundário. As atividades antimicrobianas de extratos e óleos de plantas nativas têm sido reportadas por países como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, cuja flora é diversificada e têm compilado uma tradição no uso de plantas medicinais com finalidade antibacteriana ou antifúngica (DUARTE, 2006; CARVALHO *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2020; KUME *et al.*, 2021), reportando apenas 44 espécies de plantas (incluindo espécies nativas e exóticas) pertencentes a 20 famílias com atividade antimicrobiana eficiente.

Os óleos vegetais são ricos em lipídios insaturados que têm ligações duplas carbono-carbono. Sua exposição ao O<sub>3</sub> (oxigênio ozonizado) produz reação com essas ligações, permite a formação de ozonídeos e favorece a formação de peróxidos, hidroperóxidos e aldeídos, que “reagem com a membrana e o citoplasma das bactérias causando aumento da permeabilidade celular e alterações citoplasmáticas” (CARDOSO *et al.*, 2021, p. 1), de modo que fica interrompido o crescimento bacteriano e o efeito bactericida é induzido. Considera-se, também, que a ozonização dos óleos vegetais tem eficácia no tratamento contra bactérias multirresistentes, pois esses microrganismos não dispõem de ferramentas que impeçam a ação oxidativa do O<sub>3</sub>. Em contato com a lesão, tais compostos também são capazes de ativar o sistema imunológico e aumentar a vascularização (CARDOSO *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais apresentam compostos capazes de inibir, de forma direta ou indireta, as enzimas bacterianas, cujo comportamento se assemelha ao dos antibióticos, entendidos como capazes de matar a bactéria ou outros microrganismos, ou de inibir seu desenvolvimento (GUNSTONE, 2002; DUARTE, 2006).

Os óleos essenciais e vegetais atingem um amplo espectro antimicrobiano e agem tanto contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus ssp.*, *Micrococcus ssp.* e *Bacillus ssp.*), como Gram-negativas (*Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophyla*, *Shigella ssp.*, *Salmonella* entérica *Typhimurium* e *Enteritidis*, e *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter baumannii*), fungos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Dermatófitos) e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (GUNSTONE,

2002; CARVALHO *et al.*, 2020; GUIMARÃES; OLIVEIRA; KOZUSNY-ANDREANI, 2020; KUME *et al.*, 2021).

Como são várias as substâncias das plantas medicinais com propriedades antimicrobianas, Ahmad e Beg (2001) cogitaram a criação e implementação de programas de triagem que poderiam revelar compostos e, em decorrência, o desenvolvimento de novos antibióticos. No entanto, existem limitações para as investigações que visem determinar a capacidade terapêutica potencial dos óleos essenciais: carência de estudos experimentais prévios sobre suas possíveis propriedades antibióticas, demanda crescente do conhecimento das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e real eficácia como agentes antimicrobianos (DUARTE, 2006; FRIEDMAN, 2015).

Tendo-se em vista os vários benefícios apresentados, Kume *et al.* (2021, p. 2-3) consideram a ozonioterapia<sup>2</sup> uma técnica de destaque como opção para o tratamento de diferentes enfermidades. A técnica apresenta vantagens expressivas, tais como “baixo custo, baixa invasividade, ação antimicrobiana, fácil aplicação sistêmica ou local e ausência de efeitos colaterais, intolerância ou contraindicações quando utilizada em doses terapêuticas” e se constitui um “método [...] utilizado tanto na medicina humana como na medicina veterinária”. Os benefícios comprovados do uso de compostos dos óleos essenciais ozonizados respondem por ampla atividade biológica, bem como pelas atividades antimicrobianas e antifúngicas (KOZUSNY-ANDREANI *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2020; UGAZIO *et al.*, 2020).

---

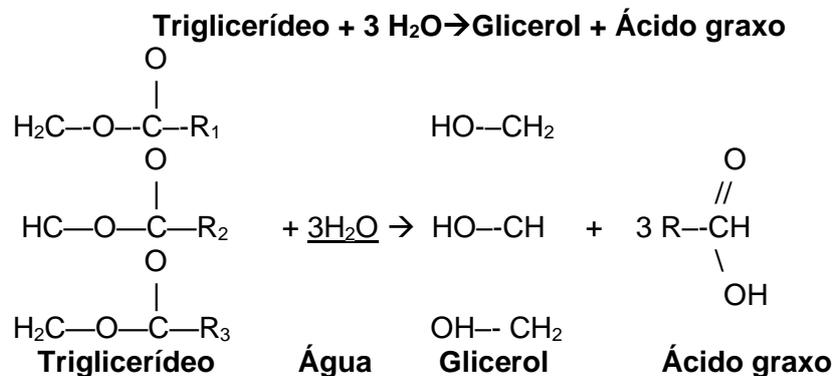
<sup>2</sup> O Senado Federal reconheceu a aplicação medicinal da ozonioterapia por meio do Projeto de Lei n. 9001 e Projeto de Lei 227, ambos de 2017, que autorizam a prescrição do procedimento em todo o território nacional (BRASIL, 2017a,b). A prática da ozonioterapia foi regulamentada pela Resolução 685, de 30 de janeiro de 2020. A Resolução reconhece como atribuição do farmacêutico os serviços em ozonioterapia como prática complementar e integrativa (BRASIL, 2020).

Entre as atribuições do farmacêutico para a prática da ozonioterapia estão: a realização da anamnese farmacêutica, com avaliação de sinais e sintomas, identificação das necessidades do paciente para utilização da ozonioterapia como prática complementar e integrativa; participar da formulação de protocolos clínicos específicos para cada paciente; implementar os diferentes protocolos necessários, de acordo com o plano de cuidado; contribuir para a qualidade do tratamento baseando-se nas melhores evidências; aplicar o ozônio medicinal de maneira isolada ou em combinação, em local licenciado que atenda às normas sanitárias vigentes para a execução desta atividade; acompanhar a farmacoterapia com registro no prontuário do paciente; empregar equipamentos e materiais apropriados, devidamente registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa); responder tecnicamente pela aplicação de ozônio em clínicas ou hospitais, como na desinfecção de ambientes e materiais diversos. É, pois, relevante que o farmacêutico conheça as características dos óleos essenciais e ozonizados e suas aplicações terapêuticas, bem como as propriedades físico-químicas do gás ozônio medicinal (BRASIL, 2020).

### 3.6 CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS VEGETAIS

O índice de acidez do óleo é caracterizado pela rancidez hidrolítica, proveniente da hidrólise da ligação éster por lipase e umidade, e corresponde à quantidade de miligramas (mg) de hidróxido de potássio capaz de neutralizar os ácidos livres de um grama (g) da amostra. O índice de acidez aponta as condições de conservação dos óleos, bem como a decomposição dos glicerídeos que pode ser estimulada por aquecimento e exposição à luz. Segundo Barthus (1999), Araújo (2019) e Uieara (s.d.), a formação de ácidos graxos acompanha a rancidez (Figura 2).

Figura 2 – Reação de determinação de ácidos graxos livres



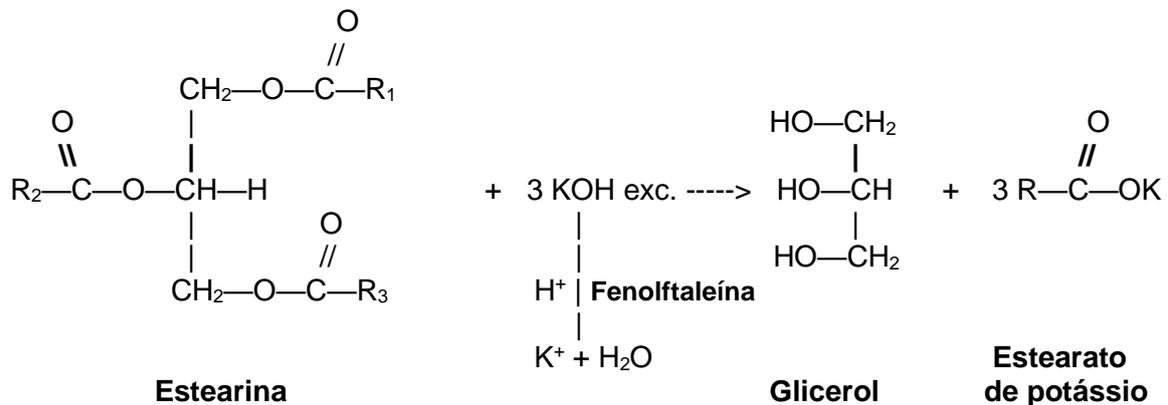
Fonte: Adaptada de Barthus (1999)

A rancidez oxidativa é determinada pelo índice de peróxido, determinado pela auto-oxidação dos acilgliceróis associados com ácidos graxos insaturados por oxigênio atmosférico (ARAÚJO, 2019), que deteriora os caracteres sensoriais mais modernos do óleo devido à sua estabilidade. Quando sua concentração atinge certo nível, ocorrem transformações complexas que formam compostos moleculares de baixo peso originários de sua degradação (ARAÚJO, 2019; UIEARA, s.d.).

Na indicação do peso molecular dos ácidos graxos (alto ou baixo) recorre-se ao índice de saponificação, que equivale à quantidade de base necessária para saponificar determinada quantidade de óleo ou gordura. Esse índice se expressa em miligramas de hidróxido de potássio para uma amostra de um grama (BARTHUS, 1999; UIEARA, s.d.).

A Figura 3 evidencia a reação química de determinação do índice de saponificação.

Figura 3 – Reação de determinação do índice de saponificação



Fonte: Adaptada de Araújo (2019)

O índice de iodo (índice total de insaturação) dos óleos vegetais é obtido quando não existe conjugação das duplas ligações entre os carbonos nem posicionamento adjacente à carboxila, com adição incompleta ou não quantitativa de halogênios (BARTHUS, 1999; MORETTO; ALVES, 1998). Assim, a adição de 100 gramas da amostra de halogênio expressa o peso de iodo (MORETTO; ALVES, 1998).

A umidade, expressa a 105°C % m/m, é caracterizada como importante fator de controle de qualidade no processamento de óleos, uma vez que ela degrada o óleo por hidrólise. Devem, pois, ser analisados e considerados os insolúveis orgânicos, compostos oxidados e outros contaminantes que alterem odor, paladar e cor no processo de refino e desumidificação dos óleos. O resíduo da umidade é dissolvido pela queima de éter de petróleo em mufla a 550°C e, dessa forma, obtêm-se os insolúveis totais, cujas cinzas são expressas em % m/m. Assim, o número de gramas de insolúveis no éter é calculado diminuindo-se do peso de insolúveis totais o número de gramas de cinzas relacionados (MORETTO; ALVES, 1998).

### 3.6.1 Métodos de caracterização de óleos vegetais

Vários são os métodos descritos na literatura para se determinarem os índices dos óleos vegetais, tais como acidez, saponificação, iodo, peróxido. Para a determinação quantitativa desses índices, o Instituto Adolfo Lutz (PREGNOLATTO; PASCUET, 1985), a *American of Official Analytical Chemistis* (AOAC, 1990) e a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) empregam a volumetria. Por seu turno, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com vistas à proteção à saúde da

população, determina as características mínimas de qualidade para os óleos e gorduras vegetais (BRASIL, 2010).

No presente trabalho, todavia, além da revisão da literatura, foi utilizado o método da cromatografia a gás, cujas características e peculiaridades estão descritas a seguir.

A cromatografia a gás refere uma técnica de caracterização de ácidos graxos em amostras – um processo físico-químico que permite separar sólidos em uma solução, baseado na distribuição das substâncias entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (LANÇAS; MCNAIR; BONATO, 1983; COLLINS; BRAGA, 1995). Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados dos óleos por meio da “cromatografia a gás” (ou gasosa), que possibilita analisar os ácidos graxos e determinar a composição de óleos comestíveis. Alguns valores só podem ser detectados por meio deste método, porque os componentes físico-químicos do produto final se precipitam dentro do óleo puro (LANÇAS; MCNAIR; BONATO, 1983; COLLINS; BRAGA, 1995).

Em um sistema de injeção, introduz-se a amostra em uma coluna em fase estacionária. Quando a área for proporcional à massa do analito, o detector gera um sinal (um pico), cuja área permite determinar a concentração de cada um dos componentes da amostra. As substâncias são vaporizadas a temperaturas apropriadas no local de injeção da amostra e na coluna; de acordo com suas características e fase estacionária, são retidas por tempos definidos, mas saem da coluna em tempos diferentes, o que permite sua detecção e quantificação (LANÇAS; MCNAIR; BONATO, 1983). Uma cromatografia a gás eficiente, por constituir-se uma técnica que proporciona separação analítica, possibilita analisar dezenas de substâncias simultaneamente com ínfimas quantidades de analito (COLLINS; BRAGA, 1995).

Quando se trata de análise de substâncias voláteis e termicamente estáveis, a cromatografia a gás é uma técnica a ser empregada eficazmente; no entanto, compostos de baixa volatilidade e termicamente instáveis (caso de aminoácidos, ácidos graxos e açúcares) necessitam sofrer derivatização que os transforme em substâncias voláteis e termicamente estáveis para que se separem e determinem seus componentes. Assim a derivatização, em cromatografia a gás, permite analisar praticamente qualquer substância (ARAÚJO, 2019).

### 3.6.2 Propriedades do óleo de canola

São três as espécies das cultivares de canola: *Brassica napus*, *B. rapa* e *B. juncea*. Pertencentes à família *Brassicaceae* (*Cruciferae*), são compostas por cerca de 3 mil espécies de plantas. Cultivadas desde a pré-história, suas raízes, caules, folha, flores e grãos são empregados no consumo humano e outros usos. Substâncias naturais tóxicas da planta (ácido erúxico e glucosinolatos, presentes na *Brassica napus*) tornavam-na imprópria ao consumo humano ou animal (GRIMALDI; TOMM, 2017).

O gênero *Brassica* engloba mais de 100 espécies vegetais caracterizadas, incluindo a *Brassica napus* L., conhecida como colza ou canola, entre as quais estão algumas de grande interesse agrônômico. As brássicas detêm uma grande variedade de sementes, tubérculos, flores, frutos e folhagens, destinados ao consumo humano e animal. O gênero *Brassica* tem despertado interesse nos setores industrial e de alimentos por englobar espécies que constituem a terceira maior fonte de óleo do mundo. A *Brassica napus* é a espécie mais cultivada no Brasil devido à sua capacidade de adaptação às condições tropicais e produz óleo de alta qualidade nas regiões mais frias do sul do Brasil, embora seu cultivo seja insuficiente para atender a demanda de óleo para consumo humano (BASSEGIO; ZANOTTO, 2020).

Entre as espécies de *Brassica*, destaca-se a colza ou canola, *Brassica napus* L. e sua variante oleífera *Brassica rapa* L. (ESTEVEZ *et al.*, 2014), tradicionalmente cultivada para extração de óleo vegetal alimentício ou industrial (RIBEIRO, 2014). *Brassica napus* L. (também conhecido como nabo) é um dos vegetais mais amplamente cultivados e mais antigos do mundo. Importante como fonte de óleo, *Brassica rapa* L. também é empregado como medicamento tradicional no tratamento de dores de cabeça, dores no peito, reumatismos, edemas, gonorreia, sífilis e raiva (PAUL *et al.*, 2019). O óleo de canola detêm menos de 10% de ácidos graxos saturados, o que o elege como um dos óleos mais recomendados para o uso doméstico. Seu uso auxilia na redução da ingestão de ácidos graxos da série Omega-6, que são precursores de diversos compostos responsáveis por origem inflamatória. A canola é, também, uma oleaginosa de maior produtividade no mercado e seu consumo é considerado seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) (GRIMALDI; TOMM, 2017).

O óleo de canola é considerado um dos óleos vegetais mais saudáveis para o consumo humano. Possui elevada quantidade de Ômega-3, vitamina E, elevado teor de monoinsaturados e altas concentrações de ácido oleico, linoleico e alfa-linoleico, que agem como substâncias cardioprotetoras; o óleo de canola traz benefícios à pele, saúde do coração, controle de peso e contra o diabetes (LOGANES; BALLALI; MINTO, 2016). Seu consumo é sugerido pela Organização Mundial de Saúde, principalmente porque o óleo de canola está associado ao controle dos níveis plasmáticos de colesterol e à redução no risco de doença arterial coronariana (RIBEIRO, 2019). O ácido oleico reduz as lipoproteínas de baixa densidade (LDL – associado ao aumento de doença cardiovascular), sem afetar as lipoproteínas de alta densidade (HDL, que protege o indivíduo contra a aterosclerose), e mostra atividade anti-hipertensiva e anti-inflamatória (LOGANES; BALLALI; MINTO, 2016).

O óleo de canola (*Brassica rapa* L. e sua variante *Brassica napus* L.), comparado com outros óleos existentes, ainda apresenta teor de ácidos graxos saturados inferior (7%), alto teor de monoinsaturados (61%) e poli-insaturados (32%), ácido alfa-linoleico ou ômega 3 (11%). De cor amarelada, o óleo de canola tem sabor e odor característicos (MOHAMMADI *et al.*, 2014). O óleo das sementes de *Brassica* deve conter menos de 2% de ácido erúxico, embora, atualmente, os valores encontrados deste ácido graxo no óleo de canola sejam inferiores a 0,2%, enquanto a torta desengordurada e seca deve conter menos de 30 micromoles de um ou qualquer mistura de glucosinolatos (3-butenyl glucosinolato, z-pentenyl glucosinolato, z-hydroxy-j butenyl glucosinolato, e z-hydroxy- z-pentenyl glucosinolato) por grama (GRIMALDI; TOMM, 2017).

Investigação farmacológica em nabos aponta que o óleo de canola é antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, cardioprotetor, hipolipemiante, hepatoprotetor, antidiabético, nefroprotetor e propriedades analgésicas, além de promover alívio ou diminuição da obesidade e da síndrome metabólica (PAUL *et al.*, 2019).

### 3.6.3 Propriedades do óleo de coco

A espécie *Cocos nucifera* L., popularmente conhecida como coco-da-praia ou coco-da-Bahia, é uma planta típica do nordeste brasileiro, da família *Arecaceae* (*Palmae*), subfamília *Cocoideae*. Monocotiledônea, possui duas principais variedades:

a Típica (gigante) e a Nana (anã). Do cruzamento das duas variedades resulta um híbrido, mais cultivado (GUNSTONE, 2002; MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006).

Da polpa do coco fresco maduro se obtém o óleo de coco, em cuja composição estão ácidos graxos saturados (mais de 80%) e ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos saturados são representados pelos ácidos caproico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico; os insaturados são representados pelo oleico e linoleico. O óleo de coco também se destaca por ter uma concentração acima de 40% de ácido láurico. As gorduras láuricas possuem propriedades físicas importantes em relação à oxidação, não enzimática, porque têm temperatura de fusão baixa e bem definida (24,4 - 25,6°C) (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O óleo de coco possui propriedades farmacológicas diversas, dentre as quais se podem destacar a ação antibacteriana, antiviral e antiprotozoária determinada pela presença de ácido láurico, que se transforma em monolaurina – um monoglicerídeo que destrói a capa lipídica de vários micro-organismos como *Candida albicans*, citomegalovírus, clamídia, estreptococos, giárdia, *H. pylori*, herpes, influenza, *Neisseria gonorreae*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, vírus HIV, entre outros. A grande vantagem da monolaurina é que só atua contra agentes patogênicos, sem afetar as bactérias benéficas à microbiota intestinal. Dessa forma, o ácido láurico tem atividade antimicrobiana ao inativar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ENIG, 1997; LIAU *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2020).

O óleo de *Cocos nucifera* L. é composto de gorduras saturadas possuindo 70% a 80% de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), por isso, encontra-se na forma líquida (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006). Os AGCM têm rápida absorção no intestino sem a necessidade de utilização de lipase pancreática; são rapidamente oxidados, geram energia, não participam do ciclo do colesterol nem são armazenados em forma de gordura. A absorção dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), presentes em gorduras saturadas de outros óleos vegetais, é feita por lipase pancreática, sendo transportados pela linfa para a circulação sistêmica na forma de *quilomícrons* para, depois, atingir o fígado, onde passam por beta-oxidação, biossíntese de colesterol, ou são resintetizados como triglicerídeos (ENIG, 1997).

### 3.6.4 Propriedades do azeite de dendê

O óleo de palma destaca-se por se tratar de uma matéria-prima com grande potencial de aplicação em diversos produtos. Tem como importância sua característica semissólida em temperatura ambiente (25°C), constituindo-se esta propriedade física uma possibilidade interessante para uma infinidade de usos em alimentos, como margarinas, óleos para fritura, dentre outros (SANTOS, 2014).

O óleo de palma é extraído do mesocarpo do dendezeiro, o *Elaeis guineensis* N. J. *Jacquin* (de origem africana) e *Elaeis oleifera* (América do Sul); é considerado o óleo mais produzido no mundo, totalizando 63 milhões de toneladas, das quais 80% são provenientes da Ásia (BALASUNDRAM *et al.*, 2003; OLUBA *et al.*, 2009).

O modo rústico de extração do azeite de dendê é uma característica típica da produção do óleo de palma, além da grande variedade de produtos comercializados em feiras e supermercados (CURVELO *et al.*, 2011). Para a extração do azeite de dendê, comprime-se a polpa ou mesocarpo dos frutos da palmeira *Elaeis guineensis*, composto por 50% de gordura saturada, 40% de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e 10% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). É rico em ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0), ácido oleico (18:1), vacênico (18:1cis1), linoleico (18:2), linolênico (18:3), araquídico (20:0), pró-vitamina A (betacaroteno), vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis – considerados antioxidantes), vitamina K, CoQ10, esqualeno, fitosteróis, flavonoides, ácidos fenólicos e glicolipídios (BALASUNDRAM *et al.*, 2003; OLUBA *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2011).

A terapêutica natural emprega suas folhas e frutos como emoliente e antirreumático. Estudos da Medicina tradicional em Gana, na África, evidenciaram que o óleo de dendê atua contra malária, com resultados iniciais promissores. Outras pesquisas realizadas na Guiné-Bissau, Nigéria, Austrália e Colômbia demonstraram que extratos e óleo do fruto que possuem atividade antioxidante, inseticida, vermífugo e tenífugo, além de antibiótico e anti-inflamatório nas dermatoses persistentes (GOH *et al.*, 1994; PANZA *et al.*, 2009; ASASE; AKWETEY; ACHEL, 2010; SANTOS, 2014; WANTUIL, 2016).

*In natura*, o óleo de dendê representa uma fonte natural rica em carotenoides, com cerca de 700 a 1.000 ppm de concentrações, principalmente de betacarotenos e alfa-carotenos. É aplicado suavemente aquecido ou sob forma de emplastos, sendo utilizado na recuperação de anêmicos. Seus frutos manifestam propriedades

medicinais significativas de ação gastroprotetora. Os tocotrienóis do óleo de palma exibem atributos anticancerígenos, apresentando-se, em humanos e ratos, mais eficientes na inibição do crescimento de tumores do que os tocoferóis (PANZA *et al.*, 2009).

Wantuil (2016) considera que o consumo mundial de óleo de palma se distribui em 71 % alimentos (margarina, alimentos processados, cereais, biscoitos, chocolate, dentre outros), 24% produtos de consumo (cosméticos, detergentes, velas e outros) e 5 % energia (eletricidade, aquecimento e combustível). Assim, o óleo de palma apresenta vantagens sedutoras que não se resumem apenas à sua multiplicidade de uso. Outrossim, trata-se de uma lavoura eficiente, e sua produção de óleo por hectare é dez vezes maior do que a da soja por exemplo. Seu cultivo utiliza 5% de terra, produz-se um total de 38%. Seu elevado emprego por indústrias de processamento de alimento, cosméticos, sabões, entre outros usos, se explica pela sua produtividade e baixo custo de produção, que torna o cultivo da palma, relativamente, o mais barato do mundo (WANTUIL, 2016).

Na culinária, o óleo de palma apresenta boas características para frituras, porque contém pequenas quantidades de ácido linoleico (10%), traços de linolênico (muito susceptíveis à oxidação) e alto teor de ácidos graxos monoinsaturados e de antioxidantes naturais (carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis), o que proporciona maior resistência a temperaturas elevadas. O óleo de palma entra como ingrediente em diversos pratos da culinária baiana (moquecas, vatapá, xinxim de galinha, caruru e acarajé). Os bolinhos são elaborados com feijão fradinho descorticado, cebola ralada e sal, e fritos por imersão em óleo de palma bruto, geralmente servidos em porções individuais e acompanhados de recheio de vatapá, camarão, caruru e salada. Em Salvador, Bahia, são amplamente comercializados nas ruas pelas *baianas de acarajé*. O acarajé é considerado patrimônio imaterial do país (CURVELO *et al.*, 2011).

### 3.7. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ANTIMICROBIANAS DO OZÔNIO

Em hospitais, os pacientes internados estão expostos a uma ampla variedade de patógenos, particularmente em Unidade de Terapia Intensiva, onde são rotineiros os procedimentos invasivos e a administração de antimicrobianos potentes de largo espectro (MOURA *et al.*, 2007).

O Plano de Ação Global em Resistência Microbiana, aprovado em 2015 pela Assembleia Mundial de Saúde, objetivou garantir a ininterruptão da capacidade de tratar e precaver enfermidades infecciosas empregando drogas eficazes, seguras e com qualidade comprovada, usadas de forma responsável e que sejam acessíveis a todos os que delas necessitam. Salientou-se, principalmente, a necessidade de se implementarem ações eficazes de higiene e saneamento como medidas de prevenção à incidência de infecções hospitalares e da comunidade (WHO, 2015,2016).

Dessa maneira, a busca por métodos antimicrobianos capazes de inviabilizar e neutralizar os agentes patogênicos nesses locais tornou-se imprescindível a fim de se atingirem as metas propostas pelo plano global. Entre essas tecnologias salientam-se as de alta pressão hidrostática, irradiação, radiação UV, campo elétrico pulsado, luz pulsada, ultrassom, homogeneização e ozônio, destacando-se este último por suas propriedades antimicrobianas e por ser totalmente degradável em oxigênio sem deixar resíduos ou produtos tóxicos (TIWAR *et al.*, 2009; TIWARI *et al.*, 2010).

Existem inúmeras áreas de aplicação de ozônio, como o saneamento de equipamentos, higiene de superfícies, reuso de águas residuais entre outros (MOHAMMAD; NAJAFI; KHODAPARAST, 2009; TIWARI *et al.*, 2010; RENSI *et al.*, 2014; CANADÁ *et al.* 2014; ZANZARINI, KOZUSNY-ANDREANI, 2019; ABELÁN *et al.*, 2020). Considerado o átomo de oxigênio um oxidante potente, o ozônio (O<sub>3</sub>) possui alta reatividade, penetrabilidade e decomposição natural como características de um produto inofensivo (O<sub>2</sub>). Seu alto poder de oxidação torna-o capaz de desinfetar, esterilizar e sanitizar em menor tempo de contato e concentração, o que o torna um bom agente para esterilização, isento de resíduos químicos e seguro contra micro-organismos que são incapazes de resistir à oxidação (TIWARI *et al.*, 2009; MOHAMMAD; NAJAFI; KHODAPARAST, 2009; RENSI *et al.*, 2014; WHO, 2016; WANG *et al.*, 2016; GONZAGA; KOZUSNY-ANDREANI, 2018; KOZUSNY-ANDREANI *et al.*, 2018). Esta propriedade também o torna excelente antioxidante em doenças arteriais, sistema imunológico e descontaminação de ambientes fechados (WYSOK; URADZINSKI; GOMOLKA-PAWLICKA, 2006; WYSOK; URADZINSKI; GOMOLKA-PAWLICKA, 2006; SILVA *et al.*, 2011; WHO, 2016; BRODOWSKA; ŚMIGIELSKI, 2013).

O ozônio é 52% mais potente que o cloro, o que lhe confere uma vantagem potencial importante, além de ser eficaz a um amplo espectro de micro-organismos em comparação com o cloro e outros desinfetantes. Como requer baixas

concentrações do gás por curto tempo para inativá-los, tem a atividade microbicida efetiva na membrana celular bacteriana, causando danos tanto às membranas celulares quanto a componentes citoplasmáticos, o que inativa a ação de bactérias e fungos (THANOMSUB *et al.*, 2002; NASCENTE *et al.*, 2019).

Portanto, o ozônio age, primariamente, sobre a parede celular dos micro-organismos e reage contra vários constituintes como as glicoproteínas, glicolípídeos, enzimas e aminoácidos da parede celular, interagindo com substâncias citoplasmáticas e nucleicas, degradando purinas e pirimidinas do DNA, como ocorre com alguns vírus em que o ozônio destrói o RNA e altera as cadeias polipeptídicas, produzindo a desnaturação dos componentes celulares, interferindo na permeabilidade, provocando sua lise em tempo mínimo de contato e inibindo a recuperação dos micro-organismos após o ataque (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; KADRE; YOUSEF; KIM, 2001; THANOMSUB *et al.*, 2002; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004). Quando penetra na célula, o ozônio recombina-se com elementos citoplasmáticos, oxida aminoácidos e ácidos nucleicos, clivando-os e promovendo a morte celular (VELANO *et al.*, 2001).

O ozônio diferencia-se de outros agentes biocidas pelo seu mecanismo de destruição dos micro-organismos: ao agir diretamente na parede da célula, rompe-a, inviabiliza sua recuperação após oxidação e causa sua morte em menor tempo de contato (KIM; YOUSEF; DAVE, 1999; VELANO *et al.*, 2001; KADRE; YOUSEF; KIM, 2001; THANOMSUB *et al.*, 2002; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

Lapoli *et al.* (2003) admitiram que a oxidação e a inativação de bactérias pelo ozônio são rápidas, além de não específicas em relação aos constituintes celulares, podendo agir sobre as bases dos ácidos nucleicos. Em esporos, ao degradar a camada de revestimento da célula, expõe o córtex e o núcleo à oxidação. Em geral, bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* apresentam maior sensibilidade potencial ao tratamento com ozônio do que as Gram-positivas (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; SILVA *et al.*, 2011; CHIATTONE; TORRES; ZAMBIAZI, 2008; BRODOWSKA; ŚMIGIELSKI, 2013; AMORIM *et al.*, 2013; CAJAMARCA, 2015).

No entanto, há fatores que interferem na sensibilidade das bactérias ao ozônio, tais como estirpe, idade da cultura, densidade da população e estágio de crescimento, concentração celular, tipos de micro-organismos, meios de cultura, temperatura, a concentração de ozônio, tempo de exposição e o método de sua

aplicação (KHADRE; YOUSEF, 2001; LAPOLLI *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2013; CAJAMARCA, 2015; RAMOS *et al.*, 2016; KOZUSNY-ANDREANI *et al.*, 2018).

Considerado potente oxidante e aplicado como desinfetante em águas potáveis e residuais (ALVAREZ; O'BRIEN, 1982; BOSSCHE; WUSTMANN; KRIETEMEYER, 1994; GUNDAROVA *et al.*, 1996; LEGNANI *et al.*, 1996; ARANA *et al.*, 1999; DÍAZ *et al.*, 2006), o ozônio também tem sido usado em grande número de indicações médicas sob diferentes formas (FINCH *et al.*, 1993; ALVAREZ *et al.*, 1997; MORRIS; MENENDEZ, 1997; LINCHETA *et al.*, 1998; KOMANAPALLI; LAU, 1998), uma vez que ele atua na degradação e morte de bactérias (SAWADAISHI *et al.*,; ISHIZAKI, 1986). A análise estrutural do ARNt mostrou que a degradação ocorre preferencialmente em resíduos de guanina (SHINRIKI *et al.*, 1981).

A ozonólise do DNA superenrolado também foi demonstrada (SAWADAISHI *et al.*, 1986), configurando-se as proteínas e os lipídios como alvos importantes na aplicação do ozônio, que afeta diretamente a membrana bacteriana (SECHI *et al.*, 1999; PRYOR; UPPU, 1993). Ele fraciona proteínas nos resíduos de triptofano mesmo diante das diferenças em aminoácidos e peso molecular (PRYOR; UPPU, 1993), enquanto a reação com lipídios ocorre nas ligações duplas carbono-carbono presentes em ácidos graxos insaturados, o que resulta em diferentes produtos tóxicos, como peróxido de hidrogênio, hidroxidroperóxidos e aldeídos (PRYOR; UPPU, 1993; LEGNANI *et al.*, 1996; LEZCANO *et al.*, 1998).

A administração terapêutica do ozônio, conhecida como terapia de ozônio, surge como um possível tratamento para a reparação de tecidos, pois promove a cicatrização de feridas. Tem propriedades bactericidas, antivirais e antifúngicas e tem sido utilizado como recurso terapêutico no tratamento da inflamação. Os efeitos benéficos são decorrentes da cicatrização de feridas, pela redução da infecção microbiana, efeito de desbridamento, modulação da fase inflamatória, estímulo à angiogênese bem como reações biológicas e enzimáticas que favorecem o metabolismo do oxigênio, melhorando a cicatrização da ferida (ANZOLIN *et al.*, 2020; VIOTTO *et al.*, 2020).

O ozônio não contamina a atmosfera nem possibilita resistência bacteriana a esta substância. Sua aplicação pode ser mais extensa, variando do tratamento de infecções graves ou profundas, como as causadas por *H. pylori* e *S. aureus* (LEZCANO *et al.*, 1998; YAMAYOSH; TATSUMI, 1993), à infecção da epiderme (ALVAREZ; O'BRIEN, 1982). Gundarova *et al.* (1996), Finch *et al.* (1993) e Sawadaishi

*et al.* (1986) relataram que soluções ozonizadas diferentes foram utilizadas com sucesso contra infecções como otite, infecções intraoculares e vaginite.

O ozônio pode ser infundido em óleo, neste processo reage com as duplas ligações dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, formando principalmente ozonídeos (1,2,4-trioxolanos) e peróxidos como hidroperóxidos,  $H_2O_2$ , peróxidos poliméricos e outros peróxidos orgânicos (ALMEIDA *et al.*, 2012; ZANARDI *et al.*, 2008).

O tratamento de feridas com óleos vegetais ozonizados leva à criação de um reservatório de ozônio que é liberado lentamente na pele, graças ao fato de que o ozônio pode ser mantido como ozonídeo de ácidos graxos insaturados (UGAZIO *et al.*, 2020)

Os óleos ozonizados, além de promover a cura, reduzem os sintomas relacionados a queimaduras na pele, evita a hiperpigmentação pós-lesão e reduz a dor das úlceras aftosas. Portanto, o óleo ozonizado representa uma alternativa terapêutica eficaz e barata que deve ser implantada no sistema público de saúde (ZANARDI *et al.*, 2008).

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

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGEM BACTERIANA E MEIOS DE CULTIVO

Foi utilizada a linhagem de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 (*American Type Culture Collection*), mantida na coleção de micro-organismos do laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, *campus* de Fernandópolis. Foram empregados o meio ágar sangue (Oxoid®) e incubação a 37°C por 24 horas (Figura 4) para a reativação da linhagem.

Figura 4 – Linhagem de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, cultivada em meio ágar sangue



Fonte – Autoria própria (2019)

Posteriormente, três a quatro colônias da linhagem de *Acinetobacter baumannii* cultivadas anteriormente em ágar sangue foram inoculadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid®) e incubadas em condições de aerobiose por 24 horas a 37°C, quando se procedeu à centrifugação (4000 rpm) por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o material precipitado ressuspenso em DMSO (dimetilsulfoxido, Synth®) e, novamente, submetido à centrifugação. Esse procedimento foi repetido cinco vezes visando retirar os componentes existentes no meio de cultura (RAMOS *et al.*, 2016) que poderiam interferir na avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

Após esse procedimento, a suspensão bacteriana foi diluída em DMSO até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland standard (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), equivalente à concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas para atingir a concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Essa suspensão bacteriana constituiu o inóculo para avaliação antibacteriana dos óleos pela técnica de microdiluição em placas (CLSI, 2012, 2020), para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) da concentração bactericida mínima (CBM) e a cinética bactericida dos óleos essenciais.

## 4.2. ÓLEOS VEGETAIS

Foram utilizados óleos vegetais de *Brassica napus* L. (canola, Liza<sup>®</sup>), *Cocos nucifera* L. (coco, Katigua<sup>®</sup>), *Elaeis guineensis* Jacq. (dendê, Hemmer<sup>®</sup>).

## 4.2 OZONIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Para a ozonização, foi empregado 1 litro de cada óleo vegetal. O ozônio foi produzido por meio de um gerador que tem como princípio o efeito corona (Ozon & Life, 1,5 RM, registro ANVISA 81509100001 (Figura 5) e o oxigênio puro foi fornecido por cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi levado para o difusor por um tubo de silicone, gerando, assim,  $15 \mu\text{g minuto}^{-1}$  de ozônio.

Os óleos vegetais foram expostos ao ozônio de forma direta por meio de um difusor durante um período de 4 horas, enquanto o óleo de coco foi ozonizado por 6 horas. Todo o procedimento foi conduzido em temperatura controlada de 25°C em uma capela de exaustão da marca Quimis modelo 216.11, visando minimizar os riscos de inalação do gás ozônio, obedecendo às normas internacionais de segurança.

Após ozonização, os óleos foram avaliados quanto à sua esterilidade, sendo retirado 0,1mL de cada óleo e inoculado em placas de Petri contendo meio ágar triptecaseína de soja (TSA, Oxoid<sup>®</sup>), incubado a 37 °C por 24/48 horas, quando foi verificada a ausência de crescimento bacteriano. Foi considerado estéril o óleo que não apresentou nenhuma colônia. Os óleos ozonizados foram mantidos sob refrigeração (8°C).

Figura 5 – Gerador de ozônio O&amp;L 1,5 RM



Fonte: Acervo do autor (2019)

Os cálculos para determinação da ação antibacteriana de cada um dos óleos vegetais, bem como a variação da carga microbiana serão efetuados com base na equação 1 (KUME *et al.*, 2021):

$$Contagem\ microbiana_{\text{óleo\ essencial}}(\%) = \frac{(Contagem_{0,39\%} - Contagem_{0,0\%})}{Contagem_{0,0\%}} \times 100 \dots\dots(1)$$

#### 4.3 EFICIÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS OZONIZADOS

Na suspensão de linhagem de *Acinetobacter baumannii* ATCC17978, na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, foi utilizado o teste de sensibilidade bacteriana aos respectivos óleos ozonizados e *in natura*, baseado na diluição dos óleos em placas de microdiluição (Figura 6) para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), de acordo com a metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (CLSI, 2012,2020).

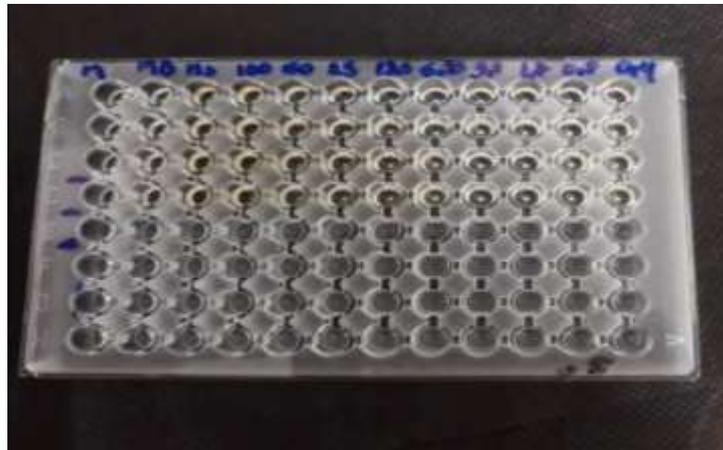
Inicialmente, realizou-se a diluição dos óleos. Para tal fim, foram distribuídos 50 µL de caldo BHI nas cavidades das microplacas. Nos primeiros poços foram adicionados 50 µL dos óleos, obtendo-se uma diluição de 50% (1/2). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas nos 6 poços subsequentes, retirando-se 50 µL do poço de maior concentração para o seguinte, até a obtenção da concentração 0,781% (1/128). Assim, a série de diluições obtidas corresponderam a 50% (1/2), 25% (1/4), 12,5% (1/8), 6,25% (1/16), 3,125% (1/32), 1,562% (1/64) e 0,781% (1/128). Em seguida, foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana (turbidez a 0,5 da escala de Mac-Farland) em cada cavidade com as diluições dos óleos (em triplicata). O

experimento foi controlado por séries de diluições de DMSO com suspensões bacterianas e de óleos isentos de suspensões bacterianas (controles positivos); no controle negativo, foi verificada a viabilidade da linhagem com inoculação da suspensão bacteriana em caldo BHI; os experimentos realizados em triplicata.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em condições de aerobiose. Ao término desse período, determinou-se a CIM, que foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para se determinar a CIM, foi adicionado, em cada poço, o corante 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), no volume de 50µL, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração. Pela hidrogenação do TTC, é produzida nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusível – o trifênil formazan. Isto tornou possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor (SYLVESTER, 2011).

Figura 6 – Placa de microdiluição de 96 poços utilizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos vegetais *in natura* e ozonizados frente a *Acinetobacter baumannii* ATCC17978



Fonte: Autoria própria (2019)

Para se determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), uma alíquota (100µL) da CIM e de duas concentrações anteriores e de duas posteriores a esta, além do controle positivo, foram inoculadas em meio ágar sangue, sem antimicrobianos; o experimento foi realizado em triplicata. Após incubação a 37°C por 24 horas, em aerobiose, foi avaliado o crescimento bacteriano, sendo considerada a CBM a menor concentração do óleo que apresentou cultivo negativo ou média de 0,1 UFC (FAVRE *et al.*, 2003).

#### 4.4 CINÉTICA BACTERICIDA DOS ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS E *IN NATURA*

Foi empregada a metodologia descrita por Allahghadri *et al.* (2010). Os óleos foram adicionados em tubos de 40 mL de cada óleo na diluição determinada por CBM a cada 5mL de caldo de BHI, contendo suspensão bacteriana de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo, em seguida, incubados a 37°C. Amostras (0,1 mL) foram retiradas a cada 10 minutos por um período de 480 min. As amostras foram imediatamente lavadas com tampão de fosfato estéril, pH 7,0, centrifugadas a 10.000 rpm, ressuspendidas em tampão e, depois, foram espalhadas em cultura ágar BHI e incubadas durante 24h a 37°C. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata. As colônias microbianas foram contadas após o período de incubação.

Após contagem das colônias, foi avaliada a variação da carga microbiana a fim de observar qual óleo apresentou a maior variação negativa (redução) na contagem microbiana. Segundo esta análise, quanto maior a variação negativa, maior a eficácia do óleo essencial. Nesse contexto, a variação percentual da contagem microbiana consistiu na relação proposta na relação constante da equação 1.

Esta relação foi empregada para todos os óleos avaliados e para todas as concentrações empregadas. Conforme essa relação, variações negativas mostram diminuição na contagem microbiana e variações positivas mostram aumento da contagem microbiana à medida que a concentração do respectivo óleo vegetal aumenta. Para a análise bioestatística, foi observada a metodologia proposta por Zar (2009).

#### 4.5 CROMATOGRAFIA A GÁS PARA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS VEGETAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS

Existem diversas técnicas de separação para identificação e quantificação dos elementos químicos presentes nos óleos vegetais tais como cromatografia a gás, cromatografia a líquido, eletroforese capilar, entre outras (MENDES, 2015). São técnicas que permitem a valiação da qualidade dos óleos ofertados pelo mercado, constatar a veracidade das informações constantes nos rótulos dos óleos comestíveis e detectar possíveis adulterações ou fraudes na sua composição (MENDES *et al.*, 2015).

Entre as técnicas, a cromatografia a gás (ou cromatografia gasosa), neste estudo, é aplicada no processo de ozonização de óleos vegetais de canola, coco e dendê e cujas características e peculiaridades estão descritas a seguir.

A cromatografia gasosa separa e analisa misturas de substâncias voláteis e possibilita que “uma mistura volatilizada de compostos (fase gasosa) elui por um tubo capilar pela passagem forçada de um gás de arraste, sem interação química com este gás (geralmente  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $He$  ou  $Ar$ )” (MENDES, 2015, p. 39).

Na aplicação da técnica, uma amostra (de óleo, nesta pesquisa) é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás (denominado fase móvel ou gás de arraste). O fluxo de gás com a amostra é conduzido por um tubo contendo uma fase estacionária (denominada coluna cromatográfica, com controle de temperatura), onde ocorre a separação da mistura (associada à volatilidade do soluto em fase móvel, pressão do vapor, estrutura do composto e temperatura). A parede interna do tubo é revestida por um filme com polaridade variável, com o qual os compostos da mistura têm maior ou menor interação ou “afinidade” (MENDES, 2015), o que explica a maior ou menor rapidez com que os componentes da mistura percorrem o tubo, ou melhor, os diferentes tempos que consomem para percorrer todo o tubo (Figura 7).

Figura 7 – Esquema de separação em cromatografia a gás



\*A\* representa um analito com maior afinidade com a fase estacionária e \*B\* um analito com menor afinidade. \*B\* percorre a coluna em um tempo menor.

Fonte: Mendes (2015)

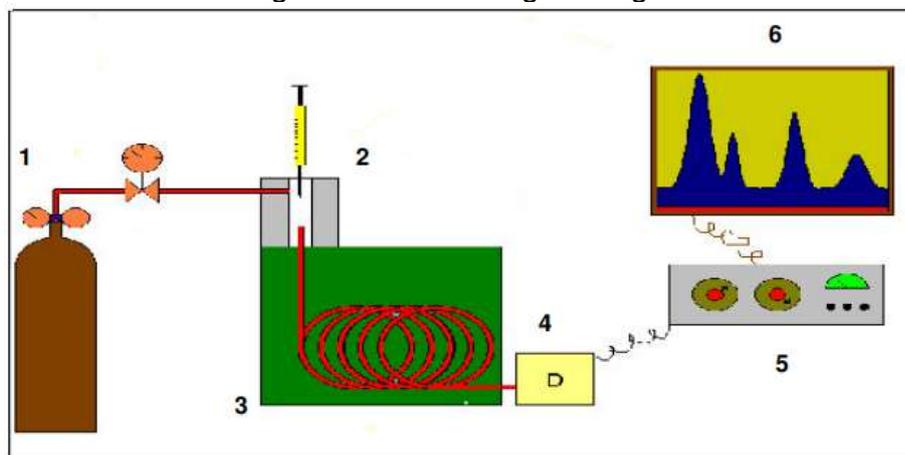
A diferença entre os tempos com que os componentes percorrem o tubo torna possível identificar cada elemento ao sair do tubo capilar e, por exemplo, analisar ácidos graxos e outros componentes, que são separados no interior da coluna. A quantificação desses componentes (ou níveis de concentração) é realizada por comparação a um parâmetro (padrão) injetado no equipamento: comparam-se o tempo de retenção do padrão e sua área com o tempo de retenção e área da amostra; os valores obtidos na comparação são empregados para se calcular a concentração de determinado elemento ou composto.

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste, passam por um detector que gera um sinal elétrico (pico) proporcional à quantidade de material fracionado, isto é, o detector indica qual substância sai da coluna e em que quantidade (quantificação). Esse sinal elétrico é registrado em um cromatograma, em que a quantidade das substâncias é registrada em picos proporcionais à sua massa.

A seguir, esses registros passam por um processo de tratamento de sinal (ou eletrônica de tratamentos), que o “purifica”, reduz ruídos e amplifica o sinal para facilitar a análise. Finalmente, o registro de sinal faz a análise e avaliação dos dados obtidos em todo o processo.

O cromatógrafo empregado foi descrito conforme a Figura 8, contendo: um reservatório de gás com controle de vazão / pressão (cilindro contendo gás de arraste sob pressão), um injetor ou vaporizador de amostra (bloco conectado à coluna cromatográfica e ao cilindro de alimentação de gás de arraste para introduzir a amostra na coluna), uma coluna cromatográfica e forno de coluna.

Figura 8 – Cromatógrafo a gás



1 - Reservatório de gás e controles de vazão / pressão.

2 - Injetor (vaporizador) de amostra.

3 - Coluna cromatográfica e forno da coluna

4 - Detector.

5 - Eletrônica de tratamento (amplificação) de sinal.

6 - Registro de sinal (registrador ou computador).

Fonte: Adaptada de Magalhães (2019)

#### 4.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos foram tabulados e avaliados seguindo os seguintes critérios:

1. Análise descritiva das concentrações mínima inibitórias e bactericida de cada um dos óleos essenciais de acordo com os tratamentos (*in natura* e ozonizado);
2. Teste de Mann-Whitney para comparar a contagem microbiana e a variação da contagem microbiana referente aos óleos avaliados de acordo com o tipo de tratamento (*in natura* x ozonizado);
3. Teste de Kruskal-Wallis para comparar a contagem microbiana e a variação da contagem microbiana de acordo com o tipo de óleo essencial;
4. Gráficos de linha para análise da contagem microbiana e da variação da contagem microbiana de acordo com o tratamento (*in natura* e ozonizado) e de acordo com o tipo de óleo essencial;
5. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ );
6. Software utilizado: Minitab 17 (Minitab Inc.).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS OZONIZADOS E SEM OZONIZAÇÃO

Existem óleos com especificidades físico-químicas que são mais bem adequados como agentes bactericidas sobre micro-organismos. Foram analisados dois grupos de óleos essenciais, sendo um submetido à ozonização e outro *in natura*. Nas amostras de óleo de canola ozonizado (a) e sem ozônio (b) (Figura 9), o óleo de canola ozonizado (Tabela 1) apresentou ácidos graxos totais em concentração de  $100\text{g}/100\text{g} \pm 0,02$  LQ (limites de quantificação), segundo a metodologia aplicada, sendo este valor igualmente obtido pelo óleo de canola não ozonizado (Tabela 2).

A densidade do óleo de canola determinada foi de  $0,916 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,0002$  LQ quando submetido à ozonização e de  $0,917 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,0002$  LQ para o óleo não ozonizado.

O parâmetro acidez obtido pela quantificação do ácido oleico não foi detectável pela metodologia empregada (menor que 0,1 LQ), tanto para o ensaio ozonizado quanto para o não ozonizado.

Verificou-se, para o índice de iodo em óleo ozonizado, o valor de  $99,5 \text{ mgI}_2/\text{g} \pm 0,1$  LQ, enquanto, para o não ozonizado, o mesmo índice apresentou resultado de  $110,1 \text{ mgI}_2/\text{g} \pm 0,1$  LQ.

Os resultados obtidos na análise dos peróxidos para o grupo ozonizado foram da ordem de  $125,7 \text{ mEq}/\text{Kg Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \pm 0,2$  LQ, em contraste ao grupo não ozonizado, cujo parâmetro não foi passível de detecção **\*\*ND**  $\pm 0,2$  LQ.

O índice de saponificação para o óleo de canola ozonizado exibido pelos resultados da análise foi de  $149,9 \text{ mg KOH}/\text{g} \pm 0,1$  LQ e para o não ozonizado foi da ordem de  $190,3 \text{ mg KOH}/\text{g} \pm 0,1$  LQ.

Tabela 1 – Caracterização físico-química de óleo de canola ozonizado

Ensaio	Unidades	Limites de quantificação	Resultados	Análises		Métodos
				Início	Final	
Ácidos Graxos Totais	g/100g	0,02	100	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. CR-0090-08
Densidade (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	0,0002	0,916	22/02/2018	22/02/2018	FCC 9th ed. 2014/FQ-0301-02
Acidez	% Ác. Oleico	0,1	*<LQ	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0105-09
Índice de Iodo	mg I <sub>2</sub> /g	0,1	99,5	20/02/2018	20/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0111-11
Índice de Peróxidos	mEq/Kg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2	125,7	19/02/2018	19/02/2018	AOCS Cd 8-53
Índice de Saponificação	mg KOH/g	0,1	149,9	01/03/2018	01/03/2018	AOAC 20th ed. FQ 0099-06

\*\*\* Não detectado.

Fonte – Autoria própria (2019)

Tabela 2 – Caracterização físico-química de óleo de canola não ozonizado

Ensaio	Unidades	Limites de quantificação	Resultados	Análises		Métodos
				Início	Final	
Ácidos Graxos Totais	g/100g	0,02	100	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. CR-0090-08
Densidade (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	0,0002	0,917	22/02/2018	22/02/2018	FCC 9th ed. 2014/FQ-0301-02
Acidez	% Ác. Oleico	0,1	*<LQ	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0105-09
Índice de Iodo	mg I <sub>2</sub> /g	0,1	110,1	20/02/2018	20/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0111-11
Índice de Peróxidos	mEq/Kg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2	**ND	19/02/2018	19/02/2018	AOCS Cd 8-53
Índice de Saponificação	mg KOH/g	0,1	190,3	01/03/2018	01/03/2018	AOAC 20th ed. FQ 0099-06

\* Não detectado.

\*\* ND: Não detectado.

Fonte – Autoria própria (2019).

Figura 9 – Amostra de óleo de canola ozonizado (a) e não ozonizado (b)



Fonte: Autoria própria (2019).

Nas amostras de óleo de coco ozonizado (a) e sem ozônio (b) (Figura 10), observou-se em óleos de coco que o índice de ácidos graxos totais para o tratamento ozonizado (Tabela 3) e não ozonizado (Tabela 4) apresentaram resultados de  $100\text{g}/100\text{g} \pm 0,02 \text{ LQ}$ .

Para o quesito densidade no grupo ozonizado e *in natura* observam-se os valores de  $0,934 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,0002 \text{ LQ}$  e  $0,928 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,0002 \text{ LQ}$  respectivamente.

O parâmetro acidez não foi detectável ( $*** < \text{LQ}$ ) em ambos os tratamentos.

Na determinação do índice de iodo o resultado encontrado para o óleo de coco ozonizado apresentou valores da ordem de  $7,1 \text{ mgI}_2/\text{g} \pm 0,1 \text{ LQ}$  e para não ozonizado  $16,7 \text{ mgI}_2/\text{g} \pm 0,1 \text{ LQ}$ .

O índice de peróxido  $422,4 \text{ mEq}/\text{Kg Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \pm 0,2 \text{ LQ}$  foi obtido pelo grupo ozonizado de óleo de coco; em contrapartida, não foi possível detectar, pela metodologia proposta, valores para o grupo não ozonizado ( $\text{ND} \pm 0,2 \text{ LQ}$ ).

Para o caractere índice de saponificação, o óleo de coco obteve o resultado de  $204 \text{ mg KOH}/\text{g} \pm 0,1 \text{ LQ}$  no grupo ozonizado e de  $246 \text{ mg KOH}/\text{g} \pm 0,1 \text{ LQ}$  para o grupo não ozonizado.

Tabela 3 – Caracterização físico-química de óleo de coco ozonizado

Ensaio	Unidades	Limites de quantificação	Resultados	Análises		Métodos
				Início	Final	
Ácidos Graxos Totais	g/100g	0,02	100	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. CR-0090-08
Densidade (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	0,0002	0,934	22/02/2018	22/02/2018	FCC 9th ed. 2014/FQ-0301-02
Acidez	% Ác. Oleico	0,1	*<LQ	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0105-09
Índice de Iodo	mg I <sub>2</sub> /g	0,1	7,1	20/02/2018	20/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0111-11
Índice de Peróxidos	mEq/Kg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2	422,4	19/02/2018	19/02/2018	AOCS Cd 8-53
Índice de Saponificação	mg KOH/g	0,1	204	01/03/2018	01/03/2018	AOAC 20th ed. FQ 0099-06

\* Não detectado.

Fonte – Autoria própria (2019)

Tabela 4 – Caracterização físico-química de óleo de coco não ozonizado

Ensaio	Unidades	Limites de quantificação	Resultados	Análises		Métodos
				Início	Final	
Ácidos Graxos Totais	g/100g	0,02	100	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. CR-0090-08
Densidade (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	0,0002	0,928	22/02/2018	22/02/2018	FCC 9th ed. 2014/FQ-0301-02
Acidez	% Ác. Oleico	0,1	*<LQ	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0105-09
Índice de Iodo	mg I <sub>2</sub> /g	0,1	16,7	20/02/2018	20/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0111-11
Índice de Peróxidos	mEq/Kg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2	**ND	19/02/2018	19/02/2018	AOCS Cd 8-53
Índice de Saponificação	mg KOH/g	0,1	246	01/03/2018	01/03/2018	AOAC 20th ed. FQ 0099-06

\* Não detectado.

\*\* ND: Não detectado.

Fonte – Autoria própria (2019)

Figura 10 – Amostra de óleo de coco ozonizado (a) e não ozonizado (b)



Fonte: Autoria própria (2019).

Pela análise dos ácidos graxos totais em óleo de dendê (Figura 11), os valores encontrados (Tabelas 5 e 6) para ambos os grupos analisados foram de  $100\text{g}/100\text{g} \pm 0,02$  LQ.

A densidade do óleo de dendê ozonizado apresentou o resultado de  $0,892\text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,0002$  LQ, enquanto o não ozonizado demonstrou valores de  $0,893\text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0,0002$  LQ.

Tanto para o ensaio ozonizado quanto para o não ozonizado a determinação da acidez obtida pela quantificação do ácido oleico não foi detectável pela metodologia empregada (menor que 1LQ).

O índice de iodo analisado obteve os valores determinados de  $51\text{ mgI}_2/\text{g} \pm 0,1$ LQ para o grupo ozonizado; já para o grupo não ozonizado o valor encontrado foi de  $55\text{ mgI}_2/\text{g} \pm 0,1$ LQ.

Os índices de peróxidos do óleo de dendê no grupo ozonizado apresentaram valores de  $434,8\text{ mEq}/\text{Kg Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \pm 0,2$  LQ, não sendo possível detectar valores para o grupo não ozonizado (\*\*ND  $\pm 0,2$  LQ).

A determinação do índice de saponificação do óleo de dendê proporcionou resultados de  $174\text{ mg KOH}/\text{g} \pm 0,1$  LQ para o óleo submetido à ozonização e de  $186\text{ mg KOH}/\text{g} \pm 0,1$  LQ para os não ozonizados.

Tabela 5 – Caracterização físico-química de óleo de dendê ozonizado

Ensaio	Unidades	Limites de quantificação	Resultados	Análises		Métodos
				Início	Final	
Ácidos Graxos Totais	g/100g	0,02	100	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. CR-0090-08
Densidade (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	0,0002	0,892	22/02/2018	22/02/2018	FCC 9th ed. 2014/FQ-0301-02
Acidez	% Ác. Oleico	0,1	*<LQ	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0105-09
Índice de Iodo	mg I <sub>2</sub> /g	0,1	51	20/02/2018	20/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0111-11
Índice de Peróxidos	mEq/Kg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2	434,8	19/02/2018	19/02/2018	AOCS Cd 8-53
Índice de Saponificação	mg KOH/g	0,1	174	01/03/2018	01/03/2018	AOAC 20th ed. FQ 0099-06

\* Não detectado.

Fonte – Autoria própria (2019)

Tabela 6 – Caracterização físico-química de óleo de dendê não ozonizado

Ensaio	Unidades	Limites de quantificação	Resultados	Análises		Métodos
				Início	Final	
Ácidos Graxos Totais	g/100g	0,02	100	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. CR-0090-08
Densidade (20°C)	g/cm <sup>3</sup>	0,0002	0,893	22/02/2018	22/02/2018	FCC 9th ed. 2014/FQ-0301-02
Acidez	% Ác. Oleico	0,1	*<LQ	22/02/2018	22/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0105-09
Índice de Iodo	mg I <sub>2</sub> /g	0,1	55	20/02/2018	20/02/2018	AOAC 20th ed. FQ-0111-11
Índice de Peróxidos	mEq/Kg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,2	**ND	19/02/2018	19/02/2018	AOCS Cd 8-53
Índice de Saponificação	mg KOH/g	0,1	186	01/03/2018	01/03/2018	AOAC 20th ed. FQ 0099-06

\* Não detectado.

\*\* ND: Não detectado.

Fonte – Autoria própria (2019)

Figura 11 – Amostra de óleo de dendê ozonizado (a) e não ozonizado (b)



Fonte: Autoria própria (2019)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A Tabela 7 evidencia as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas para cada um dos óleos avaliados *in natura* e ozonizados. Verificou-se que em todos os casos, os óleos *in natura* apresentaram concentrações mínimas inibitórias e bactericidas superiores aos óleos ozonizados. Esse resultado mostra que o tratamento com ozônio aumenta o efeito antimicrobiano do óleo vegetal, pois é necessária menor concentração desse óleo para que o efeito antimicrobiano seja observado de forma efetiva. Dentre os óleos essenciais avaliados, destaca-se o óleo de dendê que, por sua vez, apresentou as menores concentrações mínimas inibitórias quando comparados com os demais óleos essenciais avaliados no estudo.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para cada de óleos vegetais *in natura* e ozonizados

Óleo vegetal	Tratamento	CIM <sup>1</sup>	CBM <sup>1</sup>
Canola	<i>In natura</i>	50%	50%
	Ozonizado	25%	25%
Coco	<i>In natura</i>	25%	50%
	Ozonizado	12,5%	25%
Dendê	<i>In natura</i>	25%	50%
	Ozonizado	6,25%	12,5%

CIM<sup>1</sup>: concentração inibitória mínima e CBM<sup>1</sup>: concentração bactericida mínima.

Fonte – Autoria própria (2019)

Na Tabela 8 são apresentados os resultados da contagem microbiana do *Acinetobacter baumannii* submetido aos óleos vegetais *in natura* e ozonizados nas suas respectivas concentrações mínimas bactericidas.

Tabela 8 – Média±desvio padrão (Mediana) do *Acinetobacter baumannii* submetido aos óleos vegetais *in natura* e ozonizados

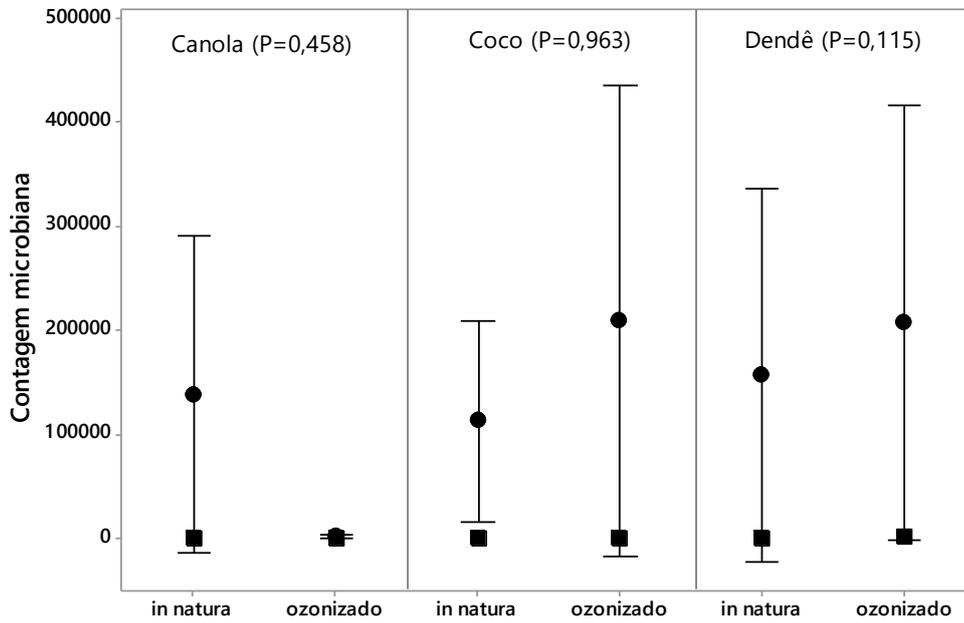
Óleos vegetais	<i>In natura</i>	Ozonizado	Valor p <sup>1</sup>
Canola	1,3.10 <sup>5</sup> ±3,6.10 <sup>5</sup> (9,4.10 <sup>2</sup> )	1,7.10 <sup>3</sup> ±2,9.10 <sup>3</sup> (2,6.10 <sup>2</sup> )	0,458
Coco	1,1.10 <sup>5</sup> ±2,8.10 <sup>5</sup> (5,7.10 <sup>2</sup> )	2,1.10 <sup>5</sup> ±5,3.10 <sup>5</sup> (5,3.10 <sup>2</sup> )	0,963
Dendê	1,5.10 <sup>5</sup> ±3,9.10 <sup>5</sup> (2,2.10 <sup>2</sup> )	2,0.10 <sup>5</sup> ±4,6.10 <sup>5</sup> (2,8.10 <sup>3</sup> )	0,115
Valor P <sup>2</sup>	0,351	0,298	

<sup>1</sup> Valor referente ao teste de Mann-Whitney a  $p < 0,05$ . <sup>2</sup> Valor p referente ao teste de Kruskal-Wallis a  $P < 0,05$ .  
Fonte – Autoria própria (2019)

Os resultados da Tabela 8 evidenciam que a comparação entre as contagens microbianas dos óleos *in natura* e ozonizados não apresentou diferenças significativas, já que todos os valores p resultantes foram superiores ao nível de significância adotado para o teste comparativo. Além disso, a comparação entre os diferentes óleos vegetais *in natura* também não apresentou diferenças significativas quanto à contagem microbiana ( $p=0,351$ ). Resultado semelhante foi verificado na comparação entre os óleos ozonizados quanto à contagem microbiana, ou seja, não houve diferenças significativas entre as contagens de micro-organismos quando os diferentes tipos de óleos ozonizados foram comparados ( $p=0,298$ ). Esse resultado pressupõe que nem o tratamento (*in natura* e ozonizado), e nem o tipo de óleo (canola, coco e dendê) influenciaram de forma significativa na redução da carga microbiana.

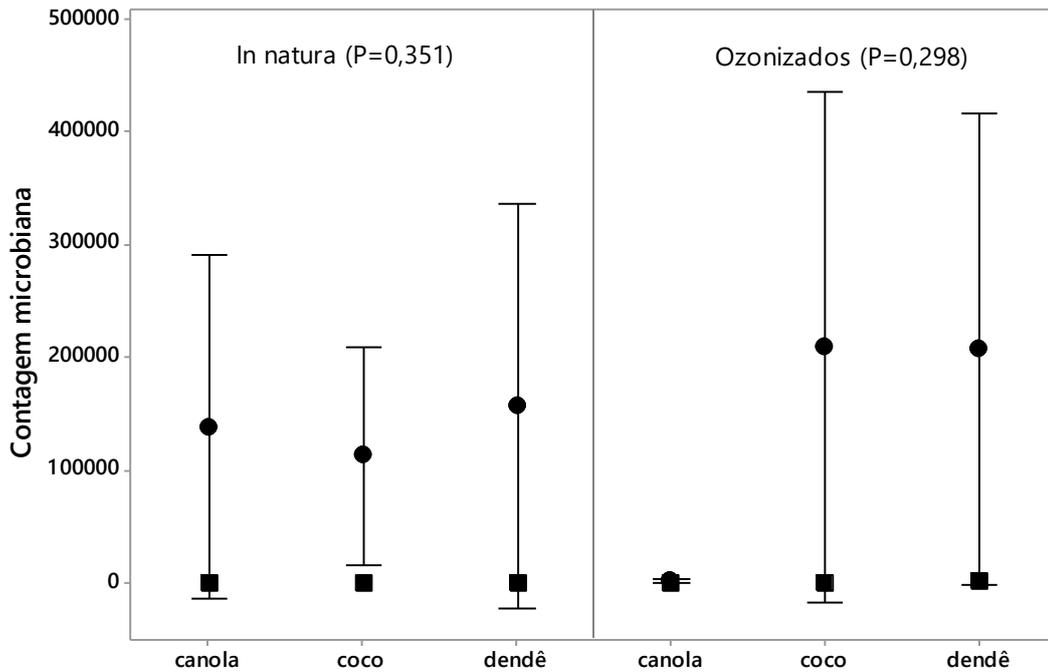
Na Figura 12 estão representados os intervalos de confiança para cada um dos óleos de acordo com os tratamentos estudados e, na Figura 13, os intervalos de confiança de acordo com os tipos de óleos vegetais.

Figura 12 – Intervalos de confiança (95%) da contagem microbiana de acordo com os tratamentos estudados



Nota: Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.  
 Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 13 – Intervalos de confiança (95%) da contagem microbiana de acordo com os tipos de óleos vegetais

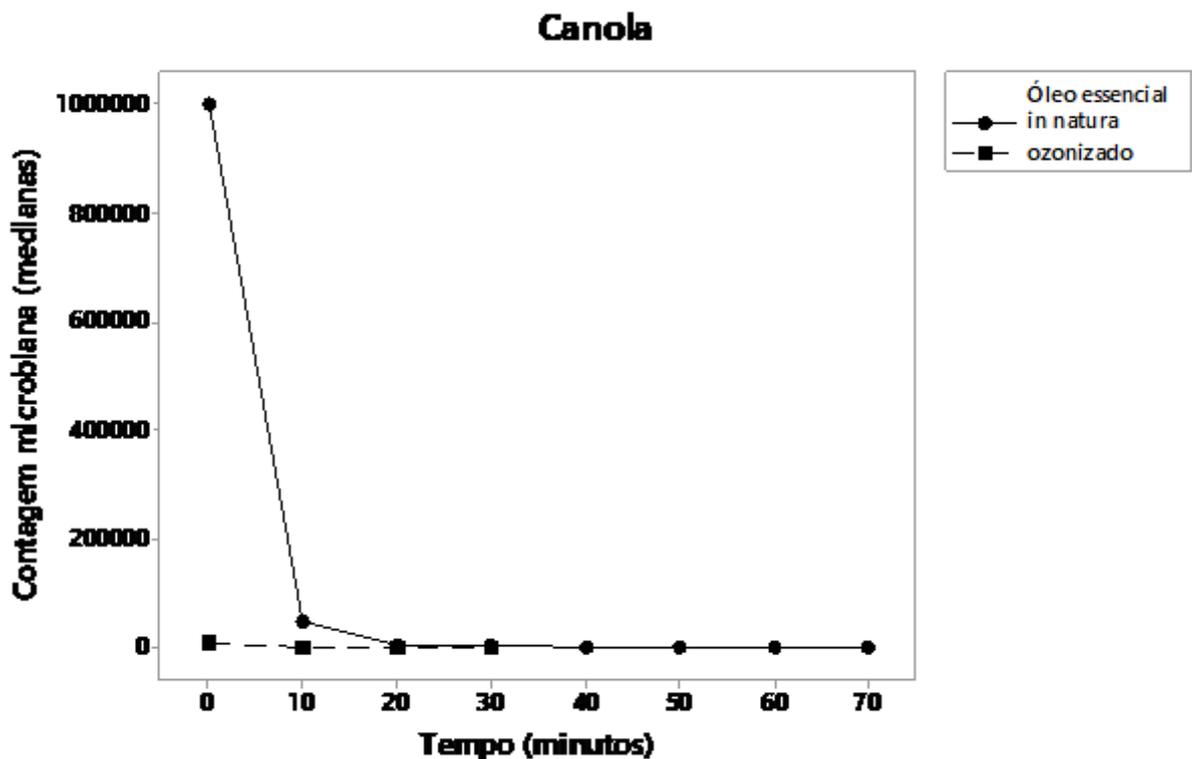


Nota: Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.  
 Fonte: Autoria própria (2019)

De acordo com o comportamento dos dados de ambas as Figuras 12 e 13, é possível reiterar a ausência de diferenças significativas na contagem microbiana de acordo com o tratamento e de acordo com o tipo de óleo vegetal, pressupondo que a ozonização não reduzira, de forma significativa, a carga microbiana.

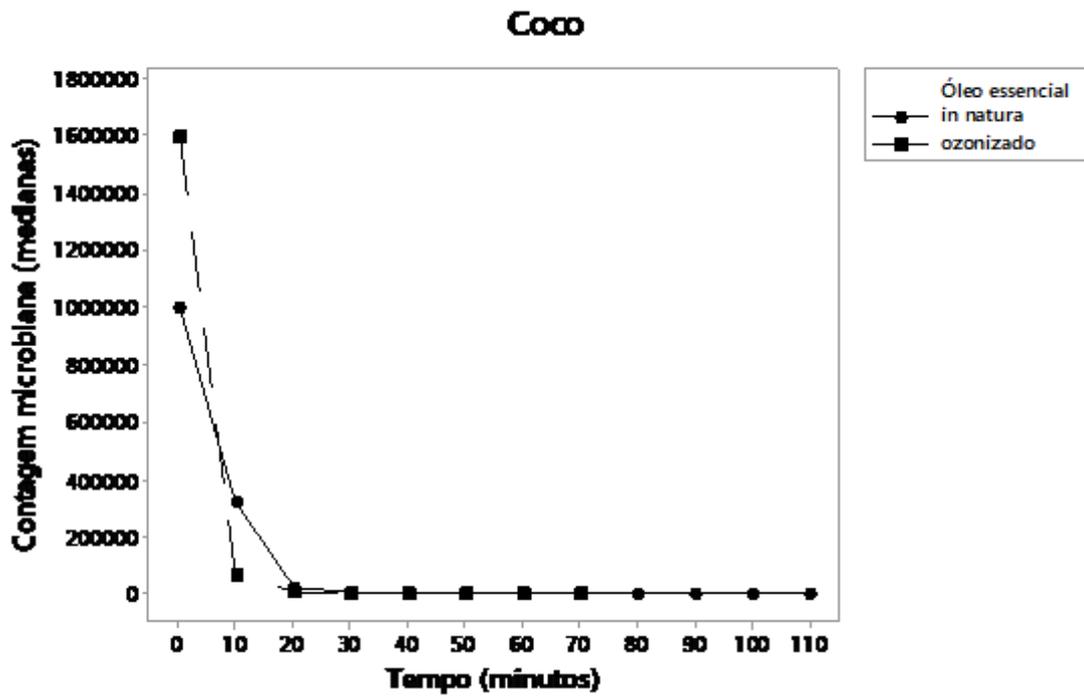
As Figuras 14, 15 e 16 evidenciam o comportamento da contagem microbiana de cada um dos óleos de acordo com os tempos avaliados de exposição aos tratamentos.

Figura 14 – Contagem microbiana de *Acinetobacter baumannii* para o óleo de canola *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição



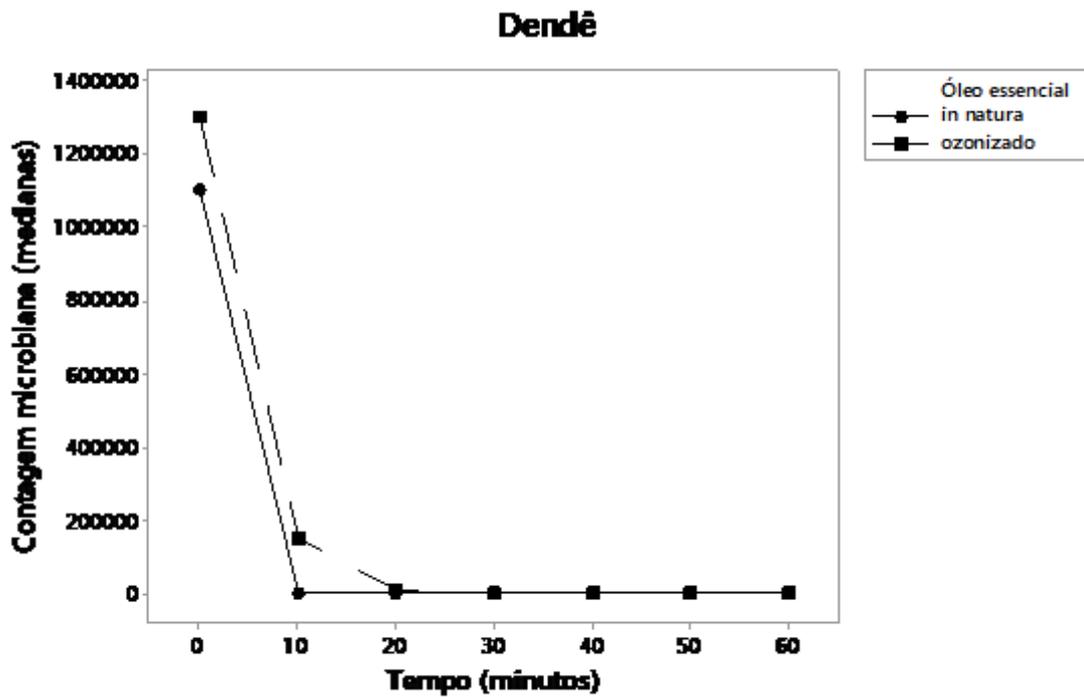
Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 15 – Contagem microbiana de *Acinetobacter baumannii* para o óleo de coco *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição



Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 16 – Contagem microbiana de *Acinetobacter baumannii* para o óleo de dendê *in natura* e ozonizado de acordo com os tempos de exposição



Fonte: Autoria própria (2019)

De acordo com as Figuras 14, 15 e 16, em todos os óleos vegetais avaliados, a contagem microbiana atingiu valores nulos em tempos inferiores nos óleos ozonizados quando comparados aos óleos *in natura*. Vale destacar que, apesar de não haver diferenças significativas na contagem microbiana na comparação entre os tratamentos (*in natura* e ozonizado), o tempo de redução da carga microbiana até atingir o valor nulo foi inferior nos óleos ozonizados. Este resultado indica que a ozonização do óleo vegetal acelera a morte microbiana, evidenciando que a ozonização apresenta certo potencial antimicrobiano pelo fato de atingir o valor nulo de micro-organismos em tempos inferiores quando comparados ao óleo *in natura*. Somente no óleo de dendê em que os tempos de redução microbiana foram semelhantes.

A variação percentual da contagem microbiana foi determinada por meio de estatísticas descritivas (Tabela 9) a fim de observar quais óleos vegetais obtiveram maior eficácia na redução da contagem microbiana.

Tabela 9 – Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos óleos vegetais avaliados

Óleos vegetais (CBM <i>in natura</i> /CBM ozonizado)	Tratamentos		Valor p <sup>1</sup>
	<i>In natura</i>	Ozonizado	
Canola (50%/25%)	-85,5±16,2 (-93,5)	-95,1±5,2 (-96,2)	0,246
Coco (50%/25%)	-27,4±163,0 (-71,6)	-69,9±66,7 (-93,8)	<b>0,012</b>
Dendê (50%/12,5%)	-74,7±30,8 (-85,9)	-90,4±6,1 (-91,0)	0,194
Valor p <sup>2</sup>	0,058	0,134	

Valor p<sup>1</sup> referente ao teste de Mann-Whitney a p<0,05. Valor p<sup>2</sup> referente ao teste de Kruskal-Wallis a p<0,05.

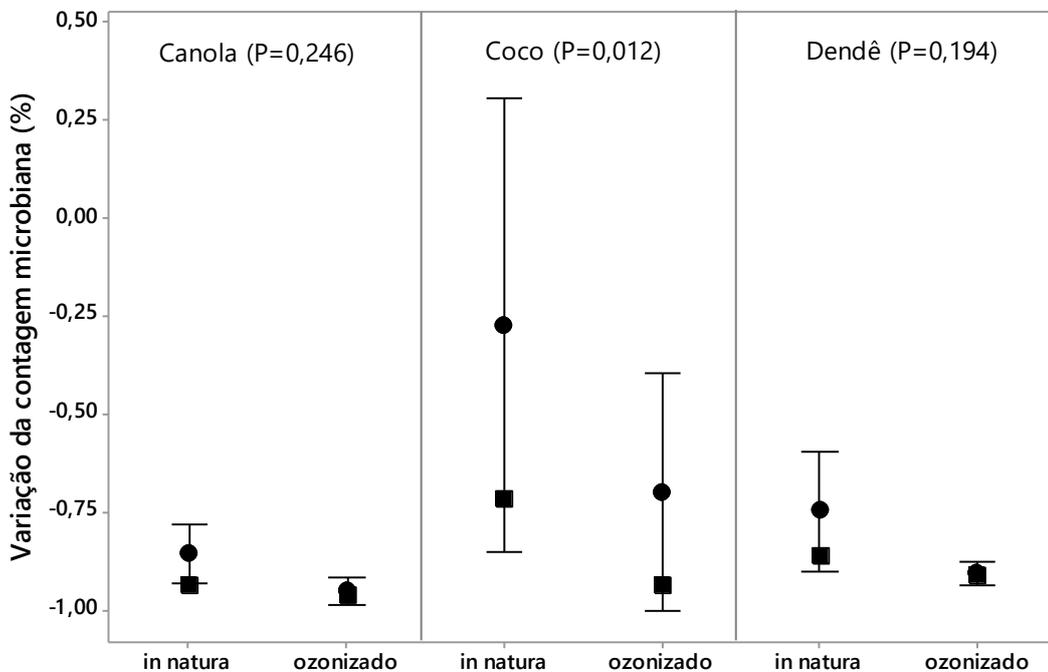
Fonte – Autoria própria (2019)

A comparação da variação da contagem microbiana entre os tratamentos *in natura* e ozonizado (Tabela 9) resultou em um caso de existência de diferenças significativas: óleo de coco (p=0,012). Neste óleo essencial, a queda da contagem microbiana foi significativamente superior no tratamento com óleo ozonizado. Para os demais óleos, a redução da contagem microbiana comparando os tratamentos *in natura* e ozonizado não foi significativa, já que todos os valores p resultaram superiores a 0,05.

Na comparação da variação da contagem microbiana dos diferentes tipos de óleos essenciais (Figuras 17 e 18), verificou-se ausência de diferenças significativas, o que sugere que o tipo de óleo essencial também não influencia, de forma significativa, na variação (queda) da contagem microbiana ao longo do tempo de exposição. Apesar da ausência de diferenças significativas na variação da contagem microbiana dos óleos essenciais *in natura*, o óleo de canola (-93,5%) foi o que apresentou maior queda da contagem microbiana, seguido do óleo de dendê (-85,9%) e do óleo de coco (-71,6%). Para os óleos ozonizados, o óleo essencial de canola também se destacou com a maior queda microbiana (-96,2%), seguido do óleo de coco (-93,8%) e do óleo de dendê (-91,0%).

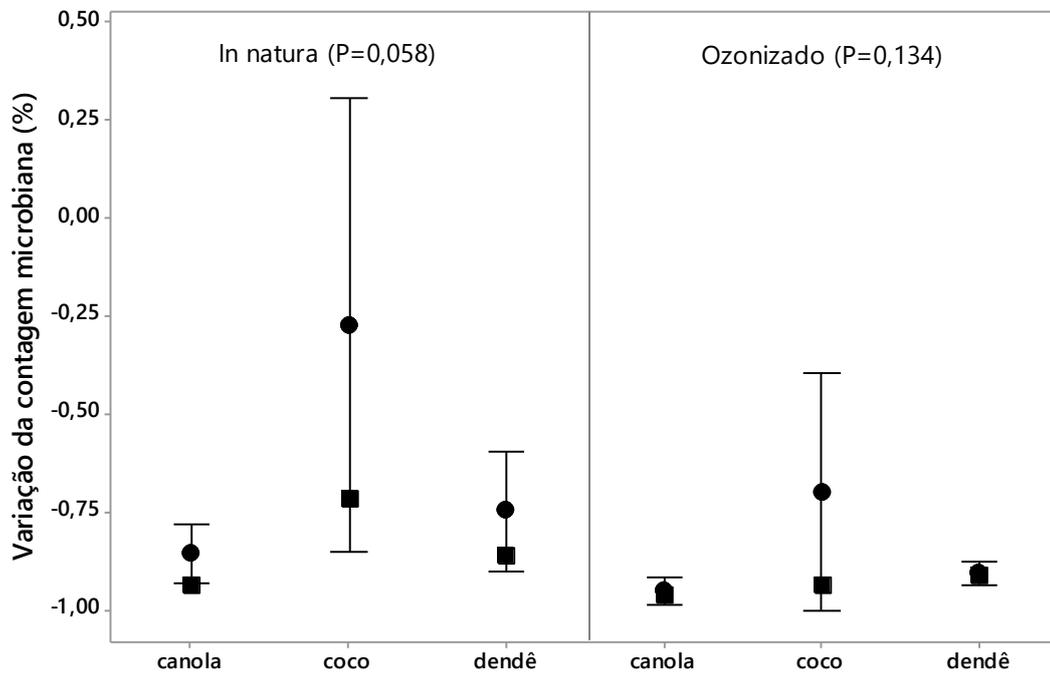
Diante deste resultado é possível pressupor que a ozonização aumentou o potencial antimicrobiano do óleo de coco já que o processo de ozonização aumentou a queda da carga microbiana de -71,6% para -93,8%. Para este óleo essencial é possível pressupor que a ozonização foi significativamente eficaz em reduzir a carga microbiana.

Figura 17 – Variação percentual da contagem microbiana dos óleos essenciais de acordo com os tratamentos *in natura* e ozonizado



Nota: Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.  
Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 18 – Variação percentual da contagem microbiana de acordo com o tipo de óleo vegetal



Nota: Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.  
Fonte: Autoria própria (2019)

## 5 DISCUSSÃO

Por décadas, a medicina ortodoxa tem fornecido uma variedade de agentes anti-infecciosos, no entanto alguns deles tornaram-se pouco eficazes pelo aparecimento de patógenos resistentes a antibióticos e quimioterápicos (TRAVAGLI *et al.*, 2011). Os óleos vegetais *in natura* e ozonizados representam uma interessante abordagem do ponto de vista farmacêutico para o manejo de uma variedade de patologias em humanos e animais (YIN; ABDULLAH; PHIN, 2013; JOSÉ *et al.*, 2014; PEÑA-JIMÉNEZ *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2018; VIOTTO *et al.*, 2020).

Em alguns países, os óleos *in natura* e ozonizados são oferecidos como uso alternativo dos recursos disponíveis, caracterizados por serem fontes naturais e renováveis, obtidos por meio de tecnologia simples, de baixo custo e com ampla atividade biológica com efeitos colaterais reduzidos (ALMEIDA *et al.*, 2012; DIAZ *et al.*, 2012).

Há mais de um século, o ozônio é conhecido por ser um excelente desinfetante que, no entanto, teve de ser usado por muito tempo com cautela devido a suas propriedades oxidantes. Apenas nas últimas décadas, foi possível dosar sua concentração exata e incorporar, permanentemente, o gás em compostos como os óleos vegetais e essenciais, nos quais o ozônio gasoso reage quimicamente com substratos insaturados levando à formação de derivados ozonídeos terapeuticamente ativos (TRAVAGLI *et al.*, 2010; VALACCHI *et al.*, 2012). A atividade farmacológica dos óleos ozonizados depende do nível de ozonização e da composição do óleo (BOCCI *et al.*, 2009; DIAZ *et al.*, 2012).

No processo de ozonização dos óleos, o ozônio reage com ligações duplas carbono-carbono de ácidos graxos insaturados, formando ozonídeos ou anéis 1,2,4-trioxolano e peróxidos como os produtos mais importantes, responsáveis pela atividade antimicrobiana e pela estimulação das propriedades capazes de reparar e regenerar tecidos. Os óleos vegetais ozonizados podem ser líquidos ou semissólidos à temperatura ambiente. Os óleos ozonizados, contendo anéis 1,2,4-trioxolano formados em cadeia de ácidos graxos insaturados, podem ser considerados como um princípio ativo e um veículo ao mesmo tempo, aumentando a absorção e a penetração na pele (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Após a ozonização, as moléculas geradas apresentam propriedades oxidativas que proporcionam mecanismos antibacterianos ao óleo ozonizado, cujos

compostos, em contato com bactérias, interagem com a parede celular e membrana plasmática, gera alterações na permeabilidade da célula e danos citoplasmáticos irreversíveis que impedem a síntese proteica, inibindo o crescimento celular e, em decorrência, acarretando a morte bacteriana (PIETROCOLA *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2021).

As propriedades antimicrobianas terapêuticas do ozônio se devem à formação de compostos oxidados, como o peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos, aldeídos e ozonídeos, formados quando os ácidos graxos poli-insaturados presentes em óleos vegetais fazem contato com ozônio (KON; RAI, 2012). Segundo Captain (2018), é importante realizar a ozonólise de diferentes tipos de óleos a fim de se obter um produto de amplo espectro antimicrobiano e com eficiência melhorada para finalidades terapêuticas. Captain (2018) destacou que o valor de peróxido deve ser mantido entre 300 e 2000 mmol-equiv/Kg. Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, verificou-se que os óleos ozonizados de dendê (Tabela 5) e de coco (Tabela 3) apresentaram valores para peróxido 434,8 miliequivalentes/kg e de 422,4 miliequivalentes/kg, respectivamente, posicionando-se dentro da faixa recomendada, enquanto o óleo de canola (Tabela 1) foi inferior (125,7 miliequivalentes/kg).

A análise dos índices de peróxidos dos óleos avaliados entre os grupos ozonizados mostrou a formação de peróxidos para todas as amostras, revelando que a ozonização oxida as gorduras e causa sua deterioração, pois os valores obtidos são mais elevados do que os recomendados pela ANVISA (miliequivalentes/kg amostra) (TOFANINI, 2004; SANTOS; GRECA, 2013). Desta maneira, estes óleos ozonizados não se destinam ao consumo, porém, são extremamente eficazes no controle *in vitro* de *A. baumannii* (Tabelas 1, 3 e 5).

Hammer, Carson e Riley (1999) obtiveram resultados semelhantes quando compararam a composição química e atividade microbiológica de óleos de girassol e de oliva ozonizados, empregando diferentes ensaios volumétricos, Técnica Cromatográfica Líquida (TLC), difusão em Ágar, métodos de microdiluição e macrodiluição, para diferentes micro-organismos. Verificaram um acréscimo nos valores de peróxido e ácido em ambos os óleos, sendo maiores no óleo de girassol ozonizado. Para esses autores, quando os valores de peróxido são elevados, os óleos ozonizados apresentam alta viscosidade, que obstrui o acesso à dupla ligação do reagente brometo de iodo. Por esse motivo, a determinação do valor de iodo não é exata para essa medição. Os óleos de oliva e girassol ozonizados apresentam

atividade antimicrobiana semelhante contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, exceto contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, em que o óleo de girassol com baixo teor de peróxido apresentou melhor atividade antimicrobiana, enquanto o óleo ozonizado foi melhor para alto valor de peróxido.

O ozônio age de forma distinta dependendo do ambiente em que é aplicado, sujeito a diferentes classificações de acordo com seu comportamento predominante. Umidade, oxigenação e temperatura interferem na ação do ozônio, sendo diretamente proporcional à sua eficácia (GARCIA; ALLEN; CARDOSO, 2010). Segundo Captain (2018), como os ozonídeos e o peróxido são os ingredientes ativos principais, o triozone permanece estável e entra em contato com o exudato da lesão. Isso, então, lentamente se desgasta e gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e produtos de oxidação lipídica (LOPs). Dessa forma se explica a prolongada atividade desinfetante e estimulatória. O óleo ozonizado ajuda a controlar o sangramento, a assepsia da lesão, a inibir a proliferação de organismos potencialmente infecciosos, a melhorar o metabolismo e a regeneração de tecidos estimulatórios.

A eficácia clínica e segurança do óleo ozonizado tópico foram avaliadas em dois casos com infecção por *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) *in vitro* e em lesões na pele. As taxas de morte, *in vitro*, por óleo ozonizado para *S. aureus* MRSA foram superiores quando comparadas com o grupo controle de óleo *in natura*. Quase 100% de MRSA foram eliminados por óleo ozonizado após 15min de exposição. Nas ocorrências de infecção de pele por MRSA, as lesões foram totalmente sanadas com ozonioterapia (SONG *et al.*, 2018).

Resultados semelhantes foram obtidos quanto ao controle *in vitro* de *Acinetobacter baumannii* em todos os óleos vegetais avaliados, os valores da contagem microbiana foram nulos em tempos inferiores nos óleos ozonizados quando comparados aos óleos *in natura*. Assim, 100% de *A. baumannii* foram eliminados em 20 minutos quando expostos aos óleos de canola e coco ozonizados, e em 10 minutos frente ao óleo de dendê ozonizado (Figuras 14, 15 e 16).

A ozonização pode ocorrer em diferentes óleos, que podem ser usados para o controle de micro-organismos, no entanto o óleo de oliva tem sido um dos mais utilizados, devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados, enquanto o óleo de coco apresenta alto nível de ácido láurico e ácido cáprico. Os dois óleos apresentam a

capacidade de cicatrização de feridas e de reduzir a infecção (SALSABILA; MOULYDIA; BISMO, 2018).

Batool *et al.* (2018) usaram o óleo de canola para avaliação do efeito bactericida frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados mostraram efeitos inibitórios do óleo contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas não foi capaz de inibir o *Staphylococcus aureus*. Resultados semelhantes de atividade antibacteriana foram obtidos com o emprego de óleo de canola *in natura* e ozonizado contra *A. baumannii* (Tabela 9).

Em alguns países, o óleo de dendê é utilizado para fins terapêuticos na medicina tradicional. Todas as partes da planta podem ser usadas medicinalmente. As folhas são espremidas e o suco obtido é colocado em feridas para melhorar a cicatrização. A seiva dessa planta também é administrada como laxante. A cinza da casca da fruta é empregada para preparar um sabão aplicado em infecções da pele. As raízes pulverizadas são adicionadas às bebidas para tratamento de gonorreia, de menorragia e de bronquite (SYAHMI *et al.*, 2010; BELAY *et al.*, 2011). Estas características terapêuticas foram determinantes na escolha do óleo de dendê para avaliar a atividade antibacteriana frente a *A. baumannii*.

A atividade *in vitro* de dendê foi testada contra um vasto número de isolados clínicos que incluíam estirpes bacterianas, bem como fungos e a levedura *C. albicans*. Os resultados mostraram uma atividade de amplo espectro do extrato de dendê, que foi mais eficaz contra bactérias Gram-positivas do que bactérias Gram-negativas (VIJAYARATHNA *et al.*, 2012). Explica-se esse fato porque as estruturas do envelope celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas diferem significativamente. Bactérias Gram-negativas têm uma membrana externa em torno da parede celular, o que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipopolissacarídica. A parede celular de bactérias Gram-positivas sem esta membrana pode ser permeada mais facilmente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) e, assim, os constituintes do extrato de dendê podem atingir vários alvos moleculares, incluindo a membrana citoplasmática, força motriz do próton (PMF), fluxo de elétron e coagulação do conteúdo celular (YIN; ABDULLAH; PHIN, 2013; RAJOO *et al.*, 2013).

Os extratos alcoólicos do extrato de folhas de dendê evidenciaram atividade do espectro antibacteriano para todas as bactérias testadas, inibindo-as, e se mostraram especialmente eficazes contra *S. aureus* com concentração mínima

inibição (CIM) de 6,25mg/mL. Observadas em microscópios eletrônicos de varredura e transmissão, as células bacterianas apresentaram alterações como desorganização estrutural da membrana celular após 12h e colapso total das células 36 horas após a exposição ao extrato (CHONG *et al.*, 2008; SYAHMI *et al.*, 2010; RAJOO *et al.*, 2013).

Quanto aos extratos e ao óleo de coco, estudos *in vitro* identificaram que possuem atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marscens*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio sp* e *Listeria. Monocytogenes* (ESQUENAZI *et al.*, 2002; HANDAYANI; SULISTYO; RAHAYU, 2009; SIA; YIM; LAI, 2010; AKINYELE *et al.*, 2011; VERMA *et al.*, 2012).

O extrato de coco apresenta atividade contra o vírus herpes simplex tipo 1 humano, resistente ao Aciclovir, porém, é inativo para os fungos *Candida albicans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Cryptococcus neoformans* (SALSABILA; MOULYDIA; BISMO, 2018; VENKATARAMAN; RAMANUJAM; VENKATASUBBU, 1980). Segundo Venkataraman *et al.* (1980), o extrato de coco mostrou atividade antifúngica contra *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. violaceum*. Os resultados desta pesquisa apontaram atividade antibacteriana dos óleos de coco *in natura* e ozonizados frente a *Acinetobacter baumannii*, sendo a concentração inibitória mínima de 25% e de 12,5% para os óleos *in natura* e ozonizado, respectivamente, enquanto a concentração bactericida mínima foi de 50% e 25% (Tabela 9). O tempo necessário de exposição ao óleo para inativação total foi de 30 minutos para o óleo *in natura* e de 20 minutos para o ozonizado (Figuras 15).

A capacidade de os extratos e do óleo coco matarem ou inibirem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em concentrações baixas e tempo mínimo de contato estabelece a eficiência dos metabólitos secundários desta planta como uma fonte potencial de um antimicrobiano com ação de amplo espectro. Este antimicrobiano de origem natural pode ser administrado no tratamento de patógenos com resistência a múltiplas drogas (AKINPELU *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciaram que, em todos os casos, os óleos apresentaram atividade antibacteriana, embora os óleos de dendê *in natura* e ozonizado tenham apresentado as menores concentrações inibitórias e bactericidas

mínimas frente a *A. baumannii*, quando comparadas com os óleos de coco e de canola (Tabela 9), o que evidencia sua eficácia no controle desta espécie bacteriana.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- os óleos de dendê, coco e canola apresentaram atividade antibacteriana frente a *Acinetobacter baumannii*;
- a ozonização potencializa a atividade antibacteriana dos óleos, evidenciada nos resultados da CIM e CBM que foram menores quando óleos ozonizados foram empregados;
- o óleo de dendê ozonizado foi o mais eficaz no controle de *A. baumannii*, pois apresentou CIM de 6,25% e CBM de 12,5%, sendo necessários 10 minutos para inativação de 100%;
- os óleos ozonizados apresentaram maior queda na contagem microbiana quando comparados com os óleos *in natura*;
- a ozonização potencializa a atividade antimicrobiana dos óleos vegetais.
- os resultados pressupõem que nem o tratamento (*in natura* e ozonizado), nem o tipo de óleo (canola, coco e dendê) influenciam, de forma significativa, na redução da carga microbiana.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens, **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, n. 2, p. 113-123, 2001 Feb. doi: 10.1016/s0378-8741(00)00335-4.
- AKINPELU, D.A.; ALAYANDE, K. A.; AIYEGORO, O. A.; AKINPELU, O. F.; OKOH, A. I. Probable mechanisms of biocidal action of *Cocos nucifera* husk extract and fractions on bacteria isolates. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 5, v. 116, n. 2015, 14 Apr. 2015. doi:10.1186/s12906-015-0634-3.
- AKINYELE, T. A.; OKOH, O. O.; AKINPELU, D. A.; OKOH, A. I. *In-vitro* antibacterial properties of crude aqueous and n-hexane extracts of the husk of *Cocos nucifera*. **Molecules.**, v. 16, n. 3, p. 2135-2145, 2011 Mar. 3. doi: 10.3390/molecules16032135.
- ALBERTI, C.; BRUN-BUISSON, C.; BURCHARDI, H.; MARTIN, C.; GOODMAN, S.; ARTIGAS, A.; SICIGNANO, A.; PALAZZO, M.; MORENO, R.; BOULMÉ, R.; LEPAGE, E.; LE GALL, R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med.**, v. 28, n. 2, p. 108-121, 2002 Feb. doi: 10.1007/s00134-001-1143-z. Epub 2001 Dec 4.
- ALLAHGHADRI, T.; RASOOLI, I.; OWLIA, P.; NADOOSHAN, M. J.; GHAZANFARI, T.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. D. A. Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. **J. Food Sci.**, v. 75, n. 2, p. H54-H61, 2010 March. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01467.x.
- ALLEN, D. M.; HARTMAN, B. J. *Acinetobacter* species. In: BENNET, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J.; MANDELL, G. L **Principles and practice of infectious diseases**. 7<sup>th</sup> ed. Canadá: Elsevier, 2010. p. 2881-2885.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 3. ed. Salvador: EDUFBA, 2011. 221 p. ISBN 978- 85-232-1216-2.
- ALMEIDA, N. R.; BEATRIZ, A.; MICHELETTI, A. C.; ARRUDA, E. J. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review. **Orbital Elec. J. Chem.**, Campo Grande, MS, v. 4, n. 4, p. 313-326, Oct./Dec. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v4i4.467>.
- ALVAREZ, M.; O'BRIEN, R. T. Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. **Appl Environ Microbiol.**, v. 44, n. 5, p. 1064–1071, 1982 Nov. doi: 10.1128/AEM.44.5.1064-1071.1982. PMID: 6295277; PMCID: PMC242149.
- ALVAREZ, R.; MENENDEZ, S.; PEGUERA, M.; TURRENT, J. Treatment of primary pioderma with ozonized sunflower oil. In: Second International Symposium on Ozone Applications, 24-26 Mar. 1997. **National Center for Scientific Research**, Havana, Cuba, 1997, p. 73.

AMORIM, E. O. C.; TRIBST, A. A. L.; AUGUSTO, P. E. D.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *E. coli* and *B. subtilis* spores in ozonized cassava starch. **Food Sci. Technol.**, Campinas, v. 33, n. 2, p. 289-294, Apr./June 2013. Epub May 17, 2013.

ANDRADE, G. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R.; GATTO, I. R. H.; RAMOS, R. R. Efficacy of essential oils in in vitro control of *Acinetobacter Baumannii*. **Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering**, v. 8, p. 11-22, 2020.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica Nº 1/2010**: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por micro-organismos multirresistentes. Anvisa, 2010.

ANZOLIN, A. P.; SILVEIRA-KAROSS, N. L.; BERTOL, C. D. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? **Med Gas Res.**, v. 10, n. 1, p. 54-59, Mar. 2020. doi: 10.4103/2045-9912.279985.

AOAC – American of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the AOAC**. Methods 932.06, 925.09, 985.29, 923.03. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

APIC - Advanced Programmable Interrupt Controller. Association for professionals in infection control and epidemiology. **Guide to the elimination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii***: transmission in healthcare settings. An APIC Guide, 2010. ISBN: 1-933013-48-6.

ARANA, I.; SANTORUM, P.; MUELA, A.; BARCINA, I. Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. **J Appl Microbiol.**, v. 86, n. 5, p. 883-888, 1999 May. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00772.x.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos** – teoria e prática. 7. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2019. 666 p. ISBN: 9788572696074.

ARROYO, L. A.; MATEOS, I.; GONZÁLEZ, V.; AZNAR, J. In vitro activities of tigecycline, minocycline, and colistin-tigecycline combination against multi- and pandrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* group. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p.1295-1296, Mar. 2009. doi: 10.1128/AAC.01097-08.

ASASE, A.; AKWETEY, G. A.; ACHEL, D. G. Ethnopharmacological use of herbal remedies for the treatment of malaria in the Dangme West District of Ghana. **J Ethnopharmacol.**, v. 129, n. 3, p. 367-376, 2010 Jun 16. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.001. Epub 2010 Apr 9.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S.; BUBB, W. Antioxidants from palm (*Elaeis guineensis*) fruit extracts. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 12, n. S37 (Suppl.), Feb 2003.

BARAN, G.; ERBAY, A.; BODUR, H.; ONGÜRÜ, P.; AKINCI, E.; BALABAN, N.; CEVIK, M. A. Risk factors for nosocomial imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Int J Infect Dis.**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2008 Jan. doi: 10.1016/j.ijid.2007.03.005. Epub 2007 May 21.

BARTHUS, R. C. **Aplicação de métodos quimiométricos para análises de controle de qualidade de óleos vegetais utilizando espectroscopias no infravermelho e Raman.** 1999. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 1999. 89 p.

BASSEGIO, D.; ZANOTTO, M. D. Growth, yield, and oil content of Brassica species under Brazilian tropical conditions. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 79, n. 2, Apr./June 2020.

BATOOL, N.; ARSHAD, M.; FAYYAZ-UL-HASSAN, F.; ILYAS, N.; SHAHZAD, A. Physicochemical and antimicrobial properties of canola (*Brassica napus L.*) seed oil. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 31, n. 5, p. 2005-2009, Sept. 2018.

BELAY, G.; TARIKU, Y.; KEBEDE, T.; HYMETE, A.; MEKONNEN, Y. Ethnopharmacological investigations of essential oils isolated from five Ethiopian medicinal plants against eleven pathogenic bacterial strains. **Phytopharmacology**, v. 1, n. 5, p. 133-143, Jan. 2011.

BIERHALS, C. G. **Avaliação da capacidade de formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii* e perfil transcricional de genes envolvidos nesse processo.** 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia do Ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. 101 p.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 13. N. 1.p. 42-51, 2015 Jan. doi: 10.1038/nrmicro3380. Epub 2014 Dec 1.

BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Med Res Rev**, v. 29, n. 4, p. 646-682, 2009 July. doi: 10.1002/med.20150.

BOSSCHE, G. V.; WUSTMANN, U.; KRIETEMEYER, S. Ozone disinfection dynamics of enteric viruses provide evidence that infectious titer reduction is triggered by alteration to viral colloidal properties. **Microbiol Res.**, v. 149, n. 4, p. 351-70, 1994 Nov. doi: 10.1016/S0944-5013(11)80083-2.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira.** 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2, 546 p.

\_\_\_\_\_. Senado Federal. **Projeto de Lei N.º 9.001**, de 01 de novembro de 2017. Autoriza a prescrição da ozonioterapia como tratamento médico de caráter complementar em todo o território nacional. Brasília: Senado Federal, 2017a.

\_\_\_\_\_. Senado Federal. **Projeto de Lei do Senado Nº 227**, de 2017. Autoriza a prescrição da ozonioterapia em todo o território nacional. Brasília: Senado Federal, 2017b. (Parte integrante do Avulso do PLS nº 227 de 2017).

\_\_\_\_\_. Conselho Federal de Farmácia (CFF). Resolução nº 685, de 30 de janeiro de 2020. Regulamenta a atribuição do farmacêutico na prática da ozonioterapia. **Diário Oficial da União**, de 07/05/2020, ed. 86, seção: 1, p. 267, 2020.

BREIJ, A.; DIJKSHOORN, L.; LAGENDIJK, E.; VAN DER MEER, J.; KOSTER, A.; BLOEMBERG, G.; WOLTERBEEK, R.; VAN DEN BROEK, P.; NIBBERING, P. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10732, May 20, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0010732.

BRODOWSKA, A. J.; ŚMIGIELSKI, K. Ozonation – an alternative decontamination method for raw plant materials. **Biotechnol Food Sci**, v. 77, n. 1, p. 37-43, 2013.

CAJAMARCA, S. M. N. **Ozonização como método alternativo na conservação de morango produzido em sistema orgânico**. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015. 86 f.

CAMPOS-GALVÃO, Maria Emilene Martino. **Caracterização do mecanismo de sinalização por quorum sensing em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis**. 2012. Tese (*Doctor Scientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012. 80 p.

CAPTAIN, J. Ozonated water, ozonated oil and its products [abstract]. Proceedings of the 5th WFOT Meeting; 2016 November 18-20, Mumbai, India. **J Ozone Ther.**, v. 2, n. 2, p. 1-3, Mar. 4, 2018. doi: 10.7203/jo3t. 2.2.2018.11153.

CARVALHO, M. M. L.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; BATIGÁLIA, F.; RODERO, A. B.; BOER, N. C. P.; ZÂNGARO, R. A.; RAMOS, R. R. Comparative analysis of *in vitro* antibacterial effectiveness of ozonized and non-ozonized vegetable oils on *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, 2020, v. 8, p: 41-48. doi: <https://doi.org/10.12970/2308-8044.2020.08.05>.

CAUDURO, L. L. N. **Mortalidade bruta e atribuível às infecções hospitalares causadas pela bactéria *Acinetobacter baumannii* resistente a antimicrobianos carbapenêmicos**: uma revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais. 2015. Tese (Doutorado em Epidemiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. 140 p.

CHIATTONI, P.; TORRES, L.; ZAMBIAZI, R. Aplicação do ozônio na indústria dos alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n. 3, p. 341-349, jul./set. 2008.

CHONG, K. H.; ZURAINI, Z.; SASIDHARAN, S.; DEVIB, P. V. K.; LATHA, L. Y.; RAMANATHAND, S. I. Antimicrobial of *Elaeis guineensis* leaf. **Pharmacologyonline**, n. 3, p. 379-386, 2008.

CHUANG, Y. C.; SHENG, W. H.; LI, S. Y.; LIN, Y. C.; WANG, J. T. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with acinetobacter bacteremia. **Clin Infect Dis.**, v. 52, n. 3, p. 352-360, 2011 Feb. 1. doi: 10.1093/cid/ciq154. Epub 2010 Dec 30.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; twenty second informational supplement. 30<sup>th</sup> ed. Supplement M100-22, v. 32, n. 3 (Replaces M100-S21, v. 31, v. 1). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Jan. 2012.

\_\_\_\_\_. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 30<sup>th</sup> ed. Supplement M100 (Replaces M100, 29<sup>th</sup> ed.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Jan. 2020.

COELHO, M. J. A. N. V. ***Acinetobacter baumannii* uma realidade hospitalar**. 2012. Dissertação (Mestrado em Gestão e Economia da Saúde) – Faculdade de Economia de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2012. 133 p.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Coord.). **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. Campinas: Unicamp, 1995. 279 p. (Serie Manuais).

COOPER, B. S.; STONE, S. P.; KIBBLER, C. C.; COOKSON, B. D.; ROBERTS, J. A.; MEDLEY, G.; DUCKWORTH, G. J.; LAI, R.; EBRAHIM, S. Systematic review of isolation policies in the hospital management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review of the literature with epidemiological and economic modelling. **Health Technology Assessment**, Winchester, England, v. 7, n. 39, p. 1-194, 31 Dec. 2003. doi: 10.3310/hta73902003; 7(39):1-194.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999 Oct. PMID: 1051590. PMCID: PMC88925.

CURVELO, F. M.; ALMEIDA, D. T.; NUNES, I. L.; FEITOSA, Sabrina. Qualidade do óleo de palma bruto (*Elaeis guineensis*): matéria-prima para fritura de acarajés. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.70, n.4, 2011.

DAVIS, K. A.; MORAN, K. A.; MCALLISTER, C. K.; GRAY, P. J. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 8, p. 1218-1224, 2005 Aug. doi: 10.3201/1108.050103.

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.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 403-407, Mar./Apr. 2006.

DIAZ, M. F.; SANCHEZ, Y.; GOMEZ, M.; HERNANDEZ, F.; VELOSO, M. C. C.; PEREIRA, P. A. P.; MANGRICH, A. S.; ANDRADE, J. B. Physicochemical characteristics of ozonated sunflower oils obtained by different procedures. **Grasas Aceites**, v. 63, n. 4, p. 466-474, December 2012. doi: 10.3989/gya.073212.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 939-951, Dec. 2007.

DRABICK, J. J.; BHATTACHARJEE, A. K.; HOOVER, D. L.; SIBER, G. E.; MORALES, V. E.; YOUNG, L. L.; BROWN, S. L.; CROSS, A. S. Covalent polymyxin B conjugate with human immunoglobulin G as an antiendotoxin reagent. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 42, n. 3, p. 583-588, Mar. 1998. doi: 10.1128/AAC.42.3.583.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, SP, v. 7, 2006.

ENIG, M. G. Coconut oil: an anti-bacterial, anti-viral ingredient for food, nutrition and health. **AVOC Lauric Symposium**, Manila, Philippines, Oct. 17, 1997.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B. F.; ROZENTAL, S.; SIKLVA, A. J. R.; ALVIANO, C. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn (Palmae) husk fiber extract. **Res Microbiol.**, v. 153, n. 10, p. 647-52, 2002 Dec. doi: 10.1016/s0923-2508(02)01377-3.

ESTEVEZ, R. L.; DUARTE, J. B.; CHAMBO, A. P. S.; CRUZ, M. I. F. A cultura da canola (*Brassica napus* var. oleifera). **Scientia Agraria Paranaensis – SAP**, Mal. Cdo. Rondon, v. 13, n. 1, P. 1-9, jan./mar. 2014.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. **Crit. Care.**, v. 11, n. 3, p.134, 2007 May 31. doi: 10.1186/cc5911.

FAVRE, B.; HOFBAUER, B.; HILDERING, K. S.; RYDER, N. S. Comparison of in vitro activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 10, p. 4817-4819, 2003 Oct.

FINCH, G. R.; BLACK, E. K.; LABATIUK, C. W.; GYUREK, L.; BELOSEVIC, M. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. **Appl Environ Microbiol.**, v. 59, n. 11, p. 3674-3680, 1993 Nov.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. **Relatório técnico**: atividades do laboratório de pesquisa em infecção hospitalar para caracterização molecular de cepas bacterianas encaminhadas pela Rede de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

FOURNIER, P. E.; RICHET, H. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. **Clin Infect Dis.**, v. 42, n. 5, p. 692–699, 1 Mar. 2006. doi: 10.1086/500202. Epub 2006 Jan 26.

FRIEDMAN, M. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. **J Agric Food Chem.**, v. 63, n. 15, p. 3805-3822, 2015 Apr. 22;. doi: 10.1021/acs.jafc.5b00778. Epub 2015 Apr. 9.

GARCIA, G.; ALLEN, A. G.; CARDOSO, A. A. Development of a sensitive passive sampler using indigo trisulfonate for the determination of tropospheric ozone. **J Environ Monit**, v. 12, n. 6, p. 1325-1329, 2010 June. doi: 10.1039/b920254d. Epub 2010 Apr. 8.

GARCÍA-GARMENDIA, J. L.; ORTIZ-LEYBA, C.; GARNACHO-MONTERO, J.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J.; PÉREZ-PAREDES, C.; BARRERO-ALMODO, A. E.; GIL-MINER, M. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, n. 7, p. 939-946, 2001 Oct. 1. doi: 10.1086/322584. Epub 2001 Aug. 22.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. National nosocomial infections surveillance system. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis.**, v. 41, n. 6, p. 848-854, 2005 Sept. 15. doi: 10.1086/432803. Epub 2005 Aug. 16.

GOH, S. H.; HEW, N. F.; NORHANOM, A. W.; YADAV, M. Inhibition of tumour promotion by various palm-oil tocotrienols. **Int J Cancer**, v. 57, n. 4, p. 529-531, 1994 May 15. doi:10.1002/ijc.2910570415.

GOMES, D. B. C.; GENTELUCI, G. L.; CARVALHO, K. R.; MEDEIROS, L. M.; ALMEIDA, V. C.; CASTRO, E. A. R.; VILLAS BÔAS, M. H. S. *Acinetobacter baumannii* multirresistentes: emergência de resistência à polimixina no Rio de Janeiro. **Vigil. sanit. debate**, v. 4, n. 3, p. 28-34, 2016. doi: 10.22239/2317-269X.00732.

GONZAGA, T. N.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Utilização de gás ozônio na desinfecção de resíduos de serviços de saúde. **Revista interdisciplinar de Estudos em Saúde (RIES)**, Caçador, v. 7, n. 2, p. 125-139, 2018.

GUIMARÃES, N. M.; OLIVEIRA, I. F.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Eficácia de óleos vegetais *in natura* e ozonizados no controle de *Sporothrix schenckii*. **International Journal of Development Research**, v. 10, n. 11, p. 41970-41974, Nov. 2020.

GUNDAROVA, R. A.; KHOROSHILOVA-MASLOVA, I. P.; BORDIUGOVA, G. G.; ILATOVASKAIA, L. V.; LAPINA, I. M. Experimental validation of using ozonized physiological solutions in intraocular infection. **Vestn Oftalmol.**, v. 112, n. 5, p.:9-11, Sep./Oct. 1996. PMID: 9148568.

GUNSTONE, F. [ed.]. **Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses**. 1<sup>st</sup> ed. [s.l.]: Blackwell Publishing, 2002. 337 p.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

HAMMER, K.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. **J Appl Microbiol.**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999 Jun. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x.

HANDAYANI, R.; SULISTYO, J.; RAHAYU, R. D. Extraction of coconut oil (*Cocos nucifera* L.) through fermentation system. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 10, n. 3, p.151-157, July 2009. doi: 10.13057/biodiv/d100309.

HART CASARES, M.; ESPINOSA RIVIERA, F.; HALLEY POSADA, M. C.; MARTINEZ BATISTA, M. L.; MONTES DE OCA MÉNDEZ, Z. Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". **Rev. cubana Med.**, Ciudad de la Habana, Cuba, v. 49, n. 3, p. 218-227, jul./sep. 2010.

HEIDARI-SOURESHJANI, R.; OBEIDAVI, Z.; REISI-VANANI, V.; DEHKORDI, E. S.; FATTAHIAN, N.; GHOLIPOUR, A. Evaluation of antibacterial effect of sesame oil, olive oil and their synergism on *Staphylococcus aureus* in vitro. **Advanced Herbal Medicine**, v. 3, n. 3, p. 13-19, Summer 2017.

HIGGINS, P. G.; LEHMANN, M.; WISPLINGHOFF, H.; SEIFERT, H. gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 12, p. 4592–4594, 2010 Dec. doi: 10.1128/JCM.01765-10. Epub 2010 Sep 29.

HOMENTA, H.; PRAWIRO, S. R.; SARDJONO, T. W.; NOORHAMDANI, A. S. The 38.8 kDa Pili subunit hemagglutinin protein of *Acinetobacter baumannii* is an adhesin protein that can activate s-IgA production. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 1 ver. IV, p. 26-33, Jan. 2014.

HORTON, J.; PANKEY, G. A. Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. **Med Clin North Am.**, v. 66, n. 1, p. 135-142, 1982. doi:10.1016/S0025-7125(16)31447-X.

HOWARD, A.; O'DONOGHUE, M.; FEENEY, A.; SLEATOR, R. D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243-250, 2012 May 1. doi: 10.4161/viru.19700.

JAWAD, A.; SEIFERT, H.; SNELLING, A.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 36, n. 7, p. 1938-1941, July 1998: doi: 10.1128/JCM.36.7.1938-1941.1998.

JOSÉ, M.; CYRIAC, M. B.; PAI, V.; VARGHESE, I.; SHANTARAM, N. Antimicrobial properties of *Cocos nucifera* (coconut) husk: an extrapolation to oral health. **J Nat Sc Biol Med**, v. 5, n. 2, p. 359-364, 2014.

KADRE, M.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 30 Nov. 2001. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x.

KARAGEORGOPOULOS, D. E.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, I.; FALAGAS, M. E. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. **J Antimicrob. Chemother**, v. 62, n. 1, p. 45-55, 24 April 2008. doi:10.1093/jac/dkn165.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, Nov. 2001.

KIM, B. N.; PELEG, A. Y.; LODISE, T. P.; LIPMAN, J.; LI, J.; NATION, R.; PATERSON, D. L. Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species. **Lancet Infect Dis.**, v. 9, n. 4, p. 245-255, Apr. 1, 2009. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70055-6.

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**, v. 62, n. 9, p. 1071–1087, 1999 Sept. doi: 10.4315/0362-028x-62.9.1071.

KIM, U. J.; KIM, H. K.; AN, J. H.; CHO, S. K.; PARK, K. H.; JANG, H. C. Update on the Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. **Chonnam Med J.**, v. 50, n. 2, p. 37-44, Aug. 2014.

KO, K. S.; SUH, J. Y.; KWON, K. T.; JUNG, S. I.; PARK, K. H.; KANG, C. I.; CHUNG, D. R.; PECK, K. R.; SONG, J-H. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p.1163-1167, 29 Aug 2007. doi: 10.1093/jac/dkm305.

KOLLEF, M. H.; FRASER, V. J. Antibiotic resistance in the intensive care unit. **Ann Intern Med.**, v. 134, n. 4, p. 298-314, 2001 Feb. 20. doi: 10.7326/0003-4819-134-4-200102200-00014.

KOMANAPALLI, I. R.; LAU, B. H. Inactivation of bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 49. N. 6, p. 766-769, 1998 Jun. doi 10.1007/s002530051244.

KON, K. V.; RAI, K. M. Plant essential oils and their constituents in coping with multidrug-resistant bacteria. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, n. 10, p. 775-90, 2012.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI, G.; PRADO, L. F. A.; SPAZIANI, A. O.; KAIRALA, R. C.O. M.; SILVA, F. S.; ZANGARO, R. A. *In vitro* inactivation of pathogenic bacteria by the use of ozone in different exposure times. **Rev Cubana Med Trop.**, v. 701, p. 34-44, 2018.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect Dis.**, v. 6, n. 130, p. 130-137, 16 Aug. 2006.

KRZYMINSKA, S.; FRACKOWIAK, H.; KAZNOWSKI, A. *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex strains induce caspase-dependent and caspase-independent death of human epithelial cells. **Curr Microbiol.**, v. 65, n. 3, p. 319-329, 2012 Sept. doi: 10.1007/s00284-012-0159-7. Epub 2012 June 9.

KUME, J. E. P.; ANDREANI JUNIOR, R.; DI TANNO, M. F. P.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Uso de óleos essenciais *in natura* e ozonizados no controle *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, e4710111233, 3 Jan. 2021. (CC BY 4.0). ISSN 2525-3409.

LAGACÉ-WIENS, P.; RUBINSTEIN, E. Adverse reactions to  $\beta$ -lactam antimicrobials. **Expert Opin. Drug Saf.**, v. 11, n. 3, p. 381–399, 2012 May.

LANÇAS, F. M.; MCNAIR, H. M. Cromatografia em fase gasosa. **Química Nova**, p. 6-13, jan. 1983.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HASSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: **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.

LEE, J. C.; KOERTEN, H.; VAN DEN BROEK, P.; BEEKHUIZEN, H.; WOLTERBEEK, R.; VAN DEN BARSELAAR, M.; VAN DER REIJDEN, T.; VAN DER MEER, J.; VAN DE GEVEL, J.; DIJKSHOORN, L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. **Res Microbiol.**, v. 157, n. 4), p. 360-366, 2006 May. doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.011.

LEGNANI, P. P.; LEONI, E.; BARALDI, M.; PINELLI, G.; BISBINI, P. Evaluation of disinfection treatment systems for municipal wastewater reclamation and reuse. **Zentralbl Hyg Umweltmed**, v. 198, n. 6, p. 552-566, 1996 Jul. PMID: 9353542.

LEGNANI, P. P.; LEONI, E.; BARALDI, M.; PINELLI, G.; BISBINI, P. Evaluation of disinfection treatment systems for municipal wastewater reclamation and reuse. **Zentralbl Hyg Umweltmed**, v. 198, n. 6, p. 552-566, 1996 Jul. PMID: 9353542.

LEZCANO, I.; NUÑEZ, N.; GUTIÉRREZ, M.; MOLERO, J.; REQÜEIFEROS, M. G.; DÍAZ, W. Actividad *in vitro* del aceite de girasol ozonizado (OLEOZON) frente a diferentes especies de bacterias. **Revista CENIC, Ciencias Biológicas**, n. 29, p. 46-49, 1998.

LIAU, K. M.; LEE, Y. Y.; CHEN, C. K.; RASOOL, A. H. G. An open-label pilot study to assess the efficacy and safety of virgin coconut oil in reducing visceral adiposity. **ISRN Pharmacology**, v. 2011, ID 949686, 2011. 7 p. doi:10.5402/2011/949686. Epub 2011 Mar 15.

LIM, S. M.; WEBB, S. A. Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I: Organisms and mechanisms of antibiotic resistance. **Anaesthesia**, v. 60, n. 9, p. 887-902, 2005 Sept. doi: 10.1111/j.1365-2044.2005.04220.x. PMID: 16115251.

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World J Clin Cases**, v. 2, n. 12, p. 787-814, 2014 Dec. 16;. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.787.

LINCHETA, L. F.; CEPERO, S. M.; SIMON, R. D.; OTAÑO, E. G.; DUQUE, S. M.; GARCIA, M. A. Aceite ozonizado en dermatologia. Experiencia de 9 años. **Revista CENIC Ciências Biológicas**, v. 29, n. 3, p. 192-195, 1998.

LIU, J.; ZHANG, P.; TIAN, J.; LI, L.; LI, J.; TIAN, J.H.; YANG, K. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2015, n. 10, art. n. CD008474, 27 Oct. 2015.

LOGANES, C.; BALLALI, S.; MINTO, C. Main properties of canola oil components: a descriptive review of current knowledge. **The Open Agriculture Journal**, v. 10, suppl 1: M5, p. 69-74, 2016.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiol.**, v. 37, n. 2, p. 119-127, 2014 Apr. Epub 2014 Apr. 1. PMID: 24858639.

LUNA, C. M.; ARUJ, P. K. Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. **Respirology**, v. 12, n. 6, p. 787-791, 2007 Nov. doi: 10.1111/j.1440-1843.2007.01147.x.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 53, n. 308, p. 463-470, jul./ago. 2006.

MAGALHÃES, L. **Cromatografia**: etapas da cromatografia gasosa [Internet], 19 out. 2019. Química geral. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/cromatografia>. Acesso em: 19 out 2019.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. **Clin Infect Dis.**, v. 46, n. 8, p. 1254-1263, 2008 Apr. 15. doi: 10.1086/529198.

MARCHAIM, D.; CHOPRA, T.; BOGAN, C.; BHEEMREDDY, S.; SENGSTOCK, D.; JAGARLAMUDI, R.; MALANI, A.; LEMANEK, L.; MOSHOS, J.; LEPHART, P. R.; KU, K.; HASAN, A.; LEE, J.; KHANDKER, N.; BLUNDEN, C.; GEFFERT, S. F.; MOODY, M.; HIRO, R.; WANG, Y.; AHMAD, F.; MOHAMMADI, T.; FARUQUE, O.; PATEL, D.; POGUE, J. M.; HAYAKAWA, K.; DHAR, S.; KAYE, K. S. The burden of multidrug-resistant organisms on tertiary hospitals posed by patients with recent stays in long-term acute care facilities. **Am J Infect Control.**, v. 40, n. 8, p. 760-765, 2012 Oct. doi: 10.1016/j.ajic.2011.09.011. Epub 2012 Jan. 30.

MARTÍ, S.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; CATEL-FERREIRA, M.; JOUENNE, T.; VILA, J.; SEIFERT, H.; DÉ, E. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 5, p. 4-5, 11 Jan. 2011.

MARTINS, A. F.; KUCHENBECKER, R. S.; PILGER, K. O.; PAGANO, M.; BARTH, A. L. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. **Am J Infect Control.**, v. 40, n. 2, p. 108-112, 2012 Mar. doi: 10.1016/j.ajic.2011.03.010. Epub 2011 July 23.

MATTAPPALIL, A.; MERGENHAGEN, K.A. Neurotoxicity with antimicrobials in the elderly: A review. **Clin. Ther.**, v. 36, n.11. p. 1489–1511, 2014 Nov. 1. doi: 10.1016/j.clinthera.2014.09.020.

MENDES, T. O. **Métodos multivariados para a elucidação de informações analíticas em amostras complexas**. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2015. 119 p.

MENDES, T. O.; ROCHA, R. A.; PORTO, B. L. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; ANJOS, V. C.; BELL, M. J. V. Quantification of extra-virgin olive oil adulteration with soybean oil: a comparative study of NIR, MIR, and Raman spectroscopy associated with chemometric approaches. **Food Anal. Methods**, Juiz de Fora (Brazil), v. 8, n. 9. p. 2339-2346 ref.40, Oct. 2015. doi: 10.1007/s12161-015-0121-y.

MOHAMMAD, B.; NAJAFI, M. B. H.; KHODAPARAST, M. H. H. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. **Food Control**, n. 20, n. 1, p. 27-30, 2009.

MOHAMMADI, T.; HATAMI, M.; MIRZAEI SISAABAD, Y.; HOOSHIARI, A.; NEJATIAN, M. Formulation of blend oil containing canola and sesame oils without synthetic antioxidants. **Iran J Nutr Sci & Food Technol.**, v. 9. N. 3, p. 83-92, Autumn 2014.

MORETTO, E.; ALVES, R. F. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Varela. 1998. 150 p.

MORRIS, G.; MENÉNDEZ, S. Oleozon in gynecology. In: Second International Symposium on Ozone Applications, 4-26 March 1997. **Anais...** Cira Garcia Central Clinic, Ozone Research Center, National Center for Scientific Research, Havana, Cuba, 1997, p. 76.

MOULTRIE, D.; HAWKER, J.; COLE, S. Factors associated with multidrug-resistant Acinetobacter transmission: an integrative review of the literature. **AORN J.**, v. 94, n. 1, p. 27-36, 2011 Jul. doi: 10.1016/j.aorn.2010.12.026.

MOURA, M. E. B.; CAMPELO, S. M. A.; BRITO, F. C. P.; BATISTA, O. M. A.; ARAÚJO, T. M. E.; OLIVEIRA, A. D. S. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Rev. bras. enferm.**, v. 60, n. 4, p. 416-421, July/Aug. 2007.

NASCENTE, E. P.; CHAGAS, S. R.; PESSOA, A. V. C.; MATOS, M. P. C.; ANDRADE, M. A.; PASCOAL, L. M. Potencial antimicrobiano do ozônio: aplicações e perspectivas em medicina veterinária. **PUBVET**, v. 13, n. 9, N. a412, p.1-14, set. 2019.

NASKAR, S.; MAZUMDER, U. K.; PRAMANIK, G.; BALA, A.; HALDAR, P. K.; ISLAM, A.; GUPTA, M. Comparative in vitro antioxidant activity of different parts of *Cocos nucifera* (Linn.) on reactive oxygen and nitrogen species. **Int J Pharm Pharm Sci.**, v. 3, suppl. 3, p. 104-07, 19 Mar. 2011.

NATHAN, C. Antibiotics at the crossroads. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 899-902, 2004 Oct. 21. doi: 10.1038/431899a. PMID: 15496893

OLIVEIRA, M. A.; BEZERRA, P. R. P.; NÓBREGA, P. F.; MEDEIROS, R. M.; MATIAS, W. N.; MEDEIROS, V. M. Avaliação da toxicidade do óleo de *Cocos nucifera* L. frente a *Artemia salina* Leach. de uma amostra natural e outra industrializada na cidade de Sousa-PB. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, Cajazeiras, v. 1, n. 2, p. 291-304, nov./dez. 2014.

OLUBA, O.; ONYENEKE, C.; OJIEH, G.; EIDANGBE, G.; OROLE, R. Effects of palm oil supplementation on lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in cholesterol – fed rats. **The Internet Journal of Cardiovascular Research**, v. 6, n. 1, 2009. 6 p.

PANZA, V.; PIGHIN, D.; LÁINEZ, V.; POLLERO, R. J.; MALDONADO, S. Storage lipids and proteins of *Euterpe edulis* seeds. **Biocell**, v. 33, n. 2, p. 99-106, 2009 Aug. PMID: 19886037.

PAULK, S.; GENG, C.-A.; YANG, T.-H.; YANG, Y.-P.; CHEN, J.-J. Phytochemical and health-beneficial progress of Turnip (*Brassica rapa*). **Journal of Food Science**, v. 84, n. 1, p. 19-30, 2019.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev.**, v. 21, n. 3, p. 538-582, 2008 July. doi: 10.1128/CMR.00058-07.

PEÑA-JIMÉNEZ, F.; ZAMORA-RODRÍGUEZ, Z.; HERNÁNDEZ-ACO, R.; FLEITAS-GONZÁLEZ, E.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; HERNÁNDEZ-ROSADO, A. Utilización de aceites ozonizados para el tratamiento de heridas en bovinos de engorda. **Abanico Veterinario**, v. 7, n. 2, p. 60-67, mayo/ago. 2017.

PIETROCOLA, G.; CECI, M.; PREDI, F.; POGGIO, C.; COLOMBO, M. Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. **J Clin Exp Dent.**, v. 10, n. 11, p. e1103-1108, 2018.

PIMENTEL, J. D.; LOW, J.; STYLES, K.; HARRIS, O. C.; HUGHES, A.; ATHAN, E. Control of an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit and a surgical ward. **J Hosp Infect.**, v. 59, n. 3, p. 249-253, Mar. 2005. doi: 10.1016/j.jhin.2004.09.021.

PINA, E.; FERREIRA, E.; MARQUES, A.; MATOS, B. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. **Rev Port Saúde Pública**, v. tema n. 10, p. 27-39, Nov. 2010.

PREGNOLATTO, W.; PASCUET, N. S. (coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 1020 p.

PRYOR, W. A.; UPPU, R. M. A kinetic model for the competitive reaction of ozone with amino acid residues in proteins in reverse micelles. **J Biol Chem.**, v. 268, n. 5, p. 3120-3126, 1993 Feb. 15.

RAJOO, A.; SASIDHARAN, S.; JOTHY, S. L.; RAMANATHAN, S.; MANSOR, S. M. Ultrastructural study of *Elaeis guineensis* (oil palm) leaf and antimicrobial activity of its methanol extract against *Staphylococcus aureus*. **Trop J Pharmaceut Res**, v. 12, n. 3, p. 419-423, 12 June 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i3.22>.

RAMOS, R. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; FERNANDES, A. U.; BAPTISTA, M. S. Ação fotodinâmica de derivados da protoporfirina IX sobre *Trichophyton rubrum*. **An Bras Dermatol.**, v. 91, n. 2, p. 135-140, 2016,

RARO, O. H. F.; GALLO, S. W.; FERREIRA, C. A.S.; OLIVEIRA, S. D. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, MG, v. 50, n. 2, p167-172, Mar./Apr. 2017. doi: 10.1590/0037-8682-0329-2016.

REBMANN, T.; ROSENBAUM, P. A. Preventing the transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an executive summary of the association for professionals in infection control and epidemiology's elimination guide. **Am J Infect Control.**, v. 39, n. 5, p. 439-441, 2011 June. doi: 10.1016/j.ajic.2010.08.015. Epub 2011 Mar 21.

RENSI, A. M. V.; NAVARRO, B. C. A.; ANDREANI, G.; ZANGARO, R. A.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; LIMA, J. C. Avaliação do efeito de óleos ozonizados de girassol e coco no controle *Propionibacterium acnes*. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB, 2014. **Anais...**, 2014. p. 1164-1166.

RIBEIRO, I. D. A. **Caracterização de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura da canola (*Brassica napus* L.)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2019. 82 p.

ROBERTS, S. A.; FINDLAY, R.; LANG, S. D. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **J Hosp Infect.**, v. 48, n. 3, p. 228-32. doi:10.1053/jhin.2001.0985.

SALSABILA, N.; MOULYDIA, F.; BISMO, S. Formulation of oleozon with *Phaleria macrocarpa* and *Cinnamomum burmanii* extract for diabetic wound treatment. **IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.**, v. 334, n. 1, p. 012069, Mar. 2018. doi:10.1088/1757-899X/334/1/012069.

SANTOS, F. M. T.; GRECA, I. M. Metodologias de pesquisa no ensino de ciências na América Latina: como pesquisamos na década de 2000. **Ciência & Educação**, Bauru, SP, v. 19, n. 1, p. 15-33, 2013. ISSN 1516-7313.

SANTOS, V. S. **Estruturação de óleo de palma e emulsões utilizando óleo de palma totalmente hidrogenado e lecitina de soja**. 2014. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2014.

SAWADAISHI, K.; MIURA, K.; OHTSUKA, E.; UEDA, T.; SHINRIKI, N.; ISHIZAKI, K. Structure – and sequence – specificity of ozone degradation of supercoiled plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 14, n. 3, p. 1159-1169, 1986 Feb. 11. doi: 10.1093/nar/14.3.1159.

SCOTT, P.; DEYE, G.; SRINIVASAN, A.; MURRAY, C.; MORAN, K.; HULTEN, E.; FISHBAIN, J.; CRAFT, D.; RIDDELL, R.; LINDLER, L.; MANCUSO, J.; MILSTREY, E.; BAUTISTA, C. T.; PATEL, J.; EWELL, A.; HAMILTON, T.; GADDY, C.; TENNEY, M.; CHRISTOPHER, G.; PETERSEN, K.; ENDY, T.; PETRUCCELLI, B.. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. **Clin Infect Dis.**, v. 44, n. 12, p. 1577-8415, 2007 June 15. Epub 2007 May 8.

SEBENY, P. J.; RIDDLE, M. S.; PETERSEN, K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clin Infect Dis.**, v. 47, n. 4, p. 444-449, 2008 Aug. 15. doi: 10.1086/590568.

SECHI L, A.; PINNA, A.; PUSCEDDU, C.; FADDA, G.; CARTA, F.; ZANETTI, S. Molecular characterization and antibiotic susceptibilities of ocular isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 3031-3033, 1999 Sept. doi: 10.1128/JCM.37.9.3031-3033.1999.

SEFIDGAR, A. A.; TAGHIZADEH ARMAKI, M.; POURNAJAF, A.; ARDEBILI, A.; OMIDI, S.; ABDIAN, AsIA. Evaluation of antimicrobial activity of alcoholic and aqueous extracts from common hop (*Humulus lupulus*) and oak (*Quercus castaneifolia*). **Arak Medical University Journal (AMUJ)**, v. 17, n. 93, p. 39-46, 2015.

SHINRIKI, N.; ISHIZAKI, K.; IKEHATA, A.; YOSHIZAKI, T.; NOMURA, A.; MIURA, K.; MIZUNO, Y. Degradation of nucleic acid with ozone. **Biochim Biophys Acta**, v. 655, n. 3, p. 323-328, 1981 Oct. 27. doi: 10.1016/0005-2787(81)90041-1.

SIA, C. M.; YIM, H. S.; LAI, C. M. Commercial virgin coconut oil: assessment of antimicrobial potential. **As J Food Ag-Ind.**, v. 3, n. 6, p. 567-579, 2010.

SIEGEL, J. D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings. **Am J Infect Control**, v. 35, n. 10, suppl. 2, p. S165-193, Dec. 2007. doi: 10.1016/j.ajic.2007.10.006.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, abr./jun. 2011.

SMANI, Y.; DOMINGUEZ-HERRERA, J.; PACHON, J. Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Infect Dis.**, v. 203, n. 8, p. 1110-1119, 2011 Apr. 15. doi: 10.1093/infdis/jiq159.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 14-38, 2012.

SONG, M.; ZENG, Q.; XIANG, Y.; GAO, L.; HUANG, J.; HUANG, J.; WU, K.; LU, J. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n 2, p. 2449-2455, Nov. 24 2018. doi:10.3892/mmr.2017.8148.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; BARBOSA FILHO, J, M. Orégano (*Origanum vulgare* L. *Lamiaceae*): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 1999 Oct.

SYAHMI, A. R. M.; VIJAYARATHNA, S.; SASIDHARAN, S.; LATHA, L. Y; KWAN, Y. P.; LAU, Y. L.; SHIN, L. N.; CHEN, Y. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis jacq.* (oil palm leaf) methanol extract. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 8111-8121, 2010 Nov. 10. doi: 10.3390/molecules15118111.

SYLVESTER, P. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods Mol. Biol.**, n. 716, p. 157-168, 2011.

THANOMSUB, B.; ANUPUNPISIT, V.; CHANPHETCH, S.; WATCHARACHAIPONG, T.; POONKHUM, R.; SRISUKONTH, C. Effects of ozone on cell growth and structural changes in bacteria. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 193-199, 2002 Aug. doi: 10.2323/jgam.48.193.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRAN, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 248-255, May 2010.

TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P. J. Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. **Food Chemistry**, Oxford, England, v. 113, n. 4, p. 1119-1126 ref. 37, 15 Apr. 2009. 10.1016/j.foodchem.2008.08.085.

TOFANINI, A. J. **Controle de qualidade de óleos comestíveis**. 2004. Monografia (Bacharelado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004. 47 p.

TORRES, H. A.; VÁZQUEZ, E. G.; YAGÜE, G.; GÓMEZ, J. G. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: clinical update and new highlights. **Rev Esp Quimioter.**, v. 23, n. 1, p.:12-19, 28 Feb. 2010. Spanish. PMID: 20232019.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TRAVAGLI V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G; BOCCI, V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, art. ID 610418, 12 May 2010. 9 p. doi:10.1155/2010/610418.

UGAZIO, E.; TULLIO, V.; BINELLO, A.; TAGLIAPIETRA, S.; DOSIO, F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. **Molecules**, v. 25, n. 2, 334, 2020 Jan. 14. doi:10.3390/molecules25020334.

UIEARA, M. **Lipídios** – Apostila do Curso de Química Orgânica e Biológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, s.d.

VALACCHI, G.; LIM, Y.; BELMONTE, G.; MIRACCO, C.; ZANARDI, I.; BOCCI, V.; TRAVAGLI, V.. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair Regen.**, v. 19, n. 1, p. 107-115, Jan./Feb. 2011. doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00649.x.

VALACCHI, G.; STICOZZI, C.; PECORELLI, A.; CERVELLATI, F.; CERVELLATI, C.; MAIOLI, E. Cutaneous responses to environmental stressors. **Ann NY Acad Sci**, v. 1271, n. 1, p. 75-81, 2012 Oct. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06724.x.

VANEGAS-MÚNERA, J. M.; RONCANCIO-VILLAMIL, G.; JIMÉNEZ-QUICENO, J. N. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistência y diagnóstico. **Rev CES Med**, v. 28, n. 2, p. 233-246, 2 jul./dic. 2014.

VELANO, H. E.; NASCIMENTO, L. C.; BARROS, L. M.; PANZERI, H. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 1, p. 18-22, jan./mar. 2001. ISSN 1517-7491.

VENKATARAMAN, S.; RAMANUJAM, T. R.; VENKATASUBBU, V. S. Antifungal activity of the alcoholic extract of coconut shell-*Cocos nucifera* Linn. **J Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 3, p. 291-293, 1980 Sept. doi: 10.1016/s0378-8741(80)81007-5.

VERMA, V.; BHARDWAJ, A.; RATHI, S.; RAJA, R. B. A potential antimicrobial agent from *Cocos nucifera* mesocarp extract; development of a new generation antibiotic. **ISCA J Biological Sci.**, v. 1, n. 2, p. 48-54, June 2012. ISSN 2278-3202.

VIJAYARATHNA, S.; ZAKARIA, Z.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; KANWAR, J. R.; SASIDHARAN, S. The antimicrobial efficacy of *Elaeis guineensis*: characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 4860-4877, 26 Apr. 2012. doi: 10.3390/molecules17054860.

VILLERS, D.; ESPAZE, E.; COSTE-BUREL, M.; GIAUFFRET, F.; NININ, E.; NICOLAS, F.; RICHET, H. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. **Ann Intern Med.**, v. 129, n. 3, p. 182-189, 1998 Aug. 1. doi: 10.7326/0003-4819-129-3-199808010-00003.

VIOTTO, C. M. B. W.; VIOTTO, L. H.; ZÂNGARO, R. A.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; RAMOS, R. R. Treatment of diabetic lower limb wounds with ozonized sunflower

oil and collagenase. **Journal of Endocrinology and Diabetes Mellitus**, 2020, v. 8, p. 11-23; 2020.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1048–1054, 2011 Dec. doi: 10.1002/iub.534. Epub 2011 Oct. 18.

WANG, L.; SHAO, H.; LUO, X.; WANG, R.; LI, Y.; LI, Y.; LUO, Y.; CHEN, Z. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and wheat quality. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147613, Jan. 26, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0147613.

WANTUIL, S. **Óleo de palma**: os impactos provocados no meio ambiente e os desafios de uma produção sustentável. 2016. Dissertação (Mestrado em Geografia e Meio Ambiente) – Departamento de Geografia e Meio Ambiente, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUCRJ), Rio de Janeiro, 2016. 120 p.

WHO – World Health Organization. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. OIE - World Organization for Animal Health. **Antimicrobial resistance** - a manual for developing national action plans. Feb. 2016; version 1. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204470/1/9789241549530\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204470/1/9789241549530_eng.pdf?ua=1). Accessed on: Nov. 22, 2018.

\_\_\_\_\_. **Global action plan on antimicrobial resistance** [Internet], 2015. 28 p. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en>. Accessed on: Nov. 21, 2018).

WILLIAMSON, D. A.; CARTER, G. P.; HOWDEN, B. P. Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: agents, action, and resistance patterns. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 3, p. 827-860, July 2017.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis.**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004 Aug. 1. doi: 10.1086/421946. Epub 2004 Jul. 15. Erratum in: **Clin Infect Dis.**, v. 39, n. 7, p. 1093, 2004 Oct. 1. Erratum in: **Clin Infect Dis.**, v. 40, n. 7, p. 1077, 2005 Apr. 1. PMID: 15306996.

WYSOK, B.; URADZINSKI, J.; GOMOLKA-PAWLICKA, M. Ozone as an alternative disinfectant - a review. **Pol J Food Nutr Sci.**, v. 15/56, n. 1, p. 3-8, 2006.

YAMAYOSHI, T.; TATSUMI, N. Microbicidal effects of ozone solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Drugs Exp Clin Res.**, v. 19, n. 2, p. 59-64, 1993.

YIN, N. S.; ABDULLAH, S.; PHIN, C. K. Phytochemical constituents from leaves of *Elaeis guineensis* and their antioxidant and antimicrobial activities. **Int J Pharmaceut Sci**, v. 5, p. 137-140, 2013.

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

ZANZARINI, T. J.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Efeito do gás ozônio na descontaminação de canetas de bisturi elétrico. **Revista IberoAmericana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p.112-120, jun./jul. 2019. doi: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.004.0009>.

ZAR JH. **Biostatistical analysis**. 5<sup>th</sup> ed. Essex: Prentice Hall/Person, 2009. 960 p.