



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
Instituto de Química – INQUI
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e doutorado



**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE OZONÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DO
ÓLEO DE NEEM**

PAOLA DIAS DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz

Campo Grande- 2017



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
Instituto de Química – INQUI
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e doutorado



SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE OZONÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DO ÓLEO DE NEEM

PAOLA DIAS DE OLIVEIRA

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

Orientador: Prof. Dr. Adilson Beatriz

Campo Grande - 2017

“Nós somos os que fazemos repetidas vezes.
Portanto, a excelência não é um ato, mas um hábito”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado forças e saúde durante toda essa caminhada;

À minha família, meus pais, Sebastião e Aldirene, minha irmã Paloma, meus avós Maria e João, Yolanda e José pelo apoio e carinho;

Ao meu orientador, Adilson Beatriz, pelos ensinamentos e dedicação;

À professora Dr. Ana Camila Micheletti pela ajuda nos ensaios biológicos;

Ao professor Dr. Lincon C.S. de Oliveira pelas análises térmicas;

À professora Dr. Gláucia Braz Alcântara pela ajuda nos espectros de RMN quantitativos;

Ao professor Dr. Eduardo José de Arruda pelo apoio;

Ao professor Dr. Roberto Gomes da Silva pelos saberes compartilhado;

À Nathalia pelo carinho, amizade e por todo o suporte;

Aos amigos, Daiane, Neimar, Rosane, Rosângela, Suely, Tairine e Tatiana pelos momentos de descontrações, apoio, carinho e ajuda.

Ao Adriano e Alisson pela obtenção dos espectros de RMN e pela amizade;

Ao Rafael pelas análises e ajuda na interpretação dos espectros de RMN quantitativos;

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

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ESPECTROS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Óleo de Neem	1
1.2 Reação de ozonólise.....	4
1.3 Óleos ozonizados	8
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Materiais	11
3.2 Método	12
3.2.1 Ozonólise no óleo de neem puro e com adição de água.....	12
3.2.2 Índice de acidez (EUROPEAN PHARMACOPUEIA, 2004a).....	12
3.2.3 Índice de iodo (II) (EUROPEAN PHARMACOPUEIA, 2004b).	13
3.2.4 Teste antimicrobiano	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Composição dos ácidos graxos do óleo de neem.....	15
4.2 Caracterização espectroscópica de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e RMN de ^{13}C	15
4.3 Análises físico-químicas e RMN de ^1H quantitativo (RMNq)	21
4.4 Análises térmicas	24
4.4.1 Calorimetria exploratória (DSC) - Curvas de resfriamento e aquecimento ...	24
4.5 Análises Termogravimétricas/ Termogravimetria derivada (TG/DTG)	28
4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana	31
5 CONCLUSÃO.....	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
7 ANEXOS	42

RESUMO

O Neem, *Azadirachta indica* A. Juss, possui elevadas propriedades bioativas e seu óleo apresenta em maior proporção os ácidos graxos oleico e linoleico, os quais possuem ligações duplas carbono-carbono, sendo, portanto, susceptíveis a modificação química por processos oxidativos. Dentre a mais comum, à reação de ozonólise para formar peróxidos, com excelente atividade antimicrobiana, efeitos de regeneração e reparo do tecido epitelial. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar a síntese e a caracterização química, incluindo estudos de comportamento térmico dos óleos de neem ozonizados e avaliar o seu potencial antimicrobiano. A reação de ozonólise foi realizada em diferentes tempos com e sem adição de água, com concentração de ozônio de $63 \text{ mgL}^{-1} \text{ O}_3/\text{O}_2$. As amostras foram submetidas às análises de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , IV, CG, índice de acidez, índice de iodo, análises térmicas de TG e DSC, teste da atividade antibacteriana e um estudo quantitativo do grau de insaturação das amostras pela técnica de RMN de ^1H quantitativo. Os produtos mostraram excelente atividade antimicrobiana de amplo espectro em comparação com outros óleos ozonizados relatados na literatura, com CIM $<0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para *E. faecalis* padrão e *E. faecium* clínico resistente à vancomicina e $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para *K. pneumoniae* multirresistente clínico (KPC), 2 mg mL^{-1} *S. aureus* padrão e 3 mg mL^{-1} para *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA). Este é o primeiro trabalho sobre a ação antimicrobiana do óleo de neem após o processo de ozonização.

Palavras-chave: Óleo de neem; Ozonídeos; Reação de ozonólise; Atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Neem, *Azadirachta indica* A. Juss, is endowed with relevant biological properties and its oil contains unsaturated fatty acids that are susceptible to structural modification by oxidative processes such as ozonolysis to form peroxides. Therefore, the aim of this work was the synthesis, physicochemical characterization, study of thermal behavior, and evaluation of antimicrobial potential of neem ozonated oils. The ozonolysis reaction was performed over different period of times, in presence or absence of water at an ozone concentration of 63 mg L⁻¹ O₃ / O₂. The samples were characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, IF, CG, acid and iodine values and, DSC and TG/DTG thermal analyses. Additionally, quantitative ¹H NMR spectroscopy was carried out to determine the unsaturation degree of samples. The products showed excellent broad-spectrum antimicrobial activity in comparison to other ozonated oils reported in the literature, with MIC of <0.5 mg mL⁻¹ for standard *E. faecalis* and clinical vancomycin resistant *E. faecium*, 5.0 mg mL⁻¹ for clinical multiresistant *K. pneumoniae* (KPC), 2 mg mL⁻¹ for standard *S. aureus*, and 3 mg mL⁻¹ for methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). This is the first report on the antimicrobial activity of neem oil after ozonation process.

Keywords: neem oil; ozonides; ozonolysis; antimicrobial activity

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Potencial de oxidação de alguns agentes oxidantes.....	5
Tabela 2 Composição dos ácidos graxos do óleo de neem puro.	15
Tabela 3 Determinação do índice de acidez (IA) e índice de iodo (II) das amostras de óleo de neem puro e ozonizado (% molar)..	24
Tabela 4 Valores de Concentração Inibitoria Mínima (CIM) obtidos de óleo de neem ozonizado.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Compostos isolados de várias partes do neem	2
Figura 2 Estrutura da Azadiractina isolada de <i>Azadirachta indica</i>	2
Figura 3 Ácidos graxos em forma de triacilglicerol majoritários no óleo de neem.....	4
Figura 4 Mecanismo da reação de ozonólise.....	7
Figura 5 Espectro de IV das seguintes amostras: a) óleo de neem puro; B) óleo de neem ozonizado por 12 h; C) óleo de neem ozonizado por 2 h em presença de água; D) óleo de neem ozonizado por 12 h em presença de água.....	16
Figura 6 Tipos de hidrogênio presentes nos ácidos graxos	17
Figura 7 Espectro de RMN de ^1H da região de -0,1 a 10 ppm para as seguintes amostras: ON-00 (óleo de neem puro); ON-02 (óleo de neem ozonizado por 2 h); ON-12 (óleo de neem ozonizado por 12 h).....	18
Figura 8 Espectros de RMN de ^{13}C das seguintes amostras: ON-00 (óleo de neem puro); ON-02 (óleo de neem ozonizado por 2 h); ON-12 (óleo de neem ozonizado por 12 h).....	19
Figura 9 Espectros de RMN de ^1H da região de -0,1 a 10 ppm para amostras ozonizadas na presença de água: (OAN-02) óleo de neem ozonizado por 2 horas; (OAN-06) óleo de neem ozonizado por 6 horas; (OAN-08) óleo de neem ozonizado por 8 horas; (OAN-12) óleo de neem ozonizado por 12 horas.	20
Figura 10 Espectros de RMN de ^{13}C das seguintes amostras ozonizadas na presença de água: (OAN-02) óleo de neem ozonizado por 2 horas; (OAN-06) óleo de neem ozonizado por 6 horas; (OAN-08) óleo de neem ozonizado por 8 horas; (OAN-12) óleo de neem ozonizado por 12 horas.	21
Figura 11 Espectro quantitativo de RMN de ^1H para determinação do índice de iodo..	23
Figura 12 Curvas de resfriamento das amostras do óleo de neem puro e ozonizados.....	25
Figura 13 Curvas de resfriamento das amostras do óleo de neem ozonizadas na presença de água	26

Figura 14 Curvas de aquecimento das amostras do óleo de neem puro e ozonizados. .	27
Figura 15 Curvas de aquecimento das amostras do óleo de neem ozonizadas com adição de água.	27
Figura 16 Curvas de TG/DTG em atmosfera de ar sintético para as amostras do óleo de neem puro e ozonizado.....	28
Figura 17 Curvas de TG/DTG em atmosfera de ar sintético para as amostras do óleo de neem ozonizado com adição de água.....	29
Figura 18 Curvas de TG/DTG em atmosfera de nitrogênio do óleo de neem puro e ozonizado.....	30
Figura 19 Curvas de TG/DTG em atmosfera de nitrogênio do óleo de neem ozonizado na presença de água.	31

ÍNDICE DE ESPECTROS

Figura E1 Espectro de IV do óleo de neem puro.	42
Figura E2 Espectro de IV do óleo neem ozonizado por 2 horas	42
Figura E3 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 4 horas.	43
Figura E4 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 6 horas.	43
Figura E5 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 8 horas.	44
Figura E6 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 10 horas.	44
Figura E7 Espectro de IV do óleo de neem puro ozonizado por 12 horas.	45
Figura E8 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água.	45
Figura E9 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água.	46
Figura E10 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água.	46
Figura E11 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 8 h com adição de água. .	47
Figura E12 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água.....	47
Figura E13 Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água.....	48
Figura E14 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem puro (ON-00).....	49
Figura E15 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem puro (ON-00).....	49
Figura E16 Espectro de RMN de ^1H do óleo ozonizado por 2 horas (ON-02).....	50
Figura E17 Espectro de RMN de ^{13}C ozonizado por 2 horas (ON-02).....	50
Figura E18 Espectro de RMN ^1H do óleo ozonizado por 4 horas (ON-04).....	51
Figura E19 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 4 horas (ON-04)	51
Figura E20 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 6 horas (ON-06).	52
Figura E21 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 6 horas (ON-06)	52
Figura E22 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 8 horas (ON-08)	53

Figura E23 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 8 horas (ON-08).	53
Figura E24 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 10 horas (ON-10).	54
Figura E25 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 12 horas (ON-12).	55
Figura E26 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 12 horas (ON-12).	55
Figura E27 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água (OAN-02).	56
Figura E28 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água (OAN-02).	56
Figura E29 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água (OAN-04).	57
Figura E30 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água (OAN-04).	57
Figura E31 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água (OAN-06).	58
Figura E32 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água (OAN-06).	58
Figura E33 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 8 horas com adição de água (OAN-08).	59
Figura E34 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 8 horas com adição de água (OAN-08).	59
Figura E35 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água (OAN-10).	60
Figura E36 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água (OAN-10).	60
Figura E37 Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água (OAN-12).	61
Figura E38 Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água (OAN-12).	61
Figura E39 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem (ON-00).	62

Figura E40 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 2 horas (ON-02).....	62
Figura E41 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 4 horas (ON-04).....	63
Figura E42 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 6 horas (ON-06).....	63
Figura E43 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 8 horas (ON-08).....	64
Figura E44 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 10 horas (ON-10).....	64
Figura E45 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 12 horas (ON-12).....	65
Figura E46 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água (OAN-02).	65
Figura E47 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água (OAN-04).	66
Figura E48 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água (OAN-06).	66
Figura E49 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 8 horas com adição de água (OAN-08).	67
Figura E50 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água (OAN-10).	67
Figura E51 Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água (OAN-12).	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.O.C.S	American Oil Chemists' Society
ATCC	American Type Culture Collection
CFU	Unidade Formadoras de Colônia
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DTG	Análise Térmica Diferencial
IA	Índice de Acidez
II	Índice de Iodo
IV	Infravermelho
mg	Miligrama
μg	Micrograma
mEq	Miliequivalentes
MHz	Megahertz
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ppm	Partes por milhão
$\text{RMN } ^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
$\text{RMN } ^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
RMN_q	Ressonância Magnética Nuclear quantitativo
RNA	Ácido Ribonucléico
TG	Termogravimetria
TMS	Tetrametilsilano

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óleo de Neem

O neem (*Azadirachta indica* A. Juss) pertence à família das *Meliaceae*, assim como a santa-bárbara ou cinamomo, cedro e mogno. É uma planta nativa da Índia, conhecida pelas suas propriedades medicinais, como bactericida, fungicida, nematicida, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, antiúlcera, hipoglicêmica, antimalária, espermicida, quimioterapêutico e hepatoprotetivo (OGBUEWU *et al*, 2011; BRASIL, 2013).

Por conta das suas propriedades medicinais, o neem tornou-se o centro de interesse da comunidade de desenvolvimento científico, onde teve reconhecimento pela Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, no qual foi publicado em 1992 um artigo intitulado, traduzido do inglês, “Neem- uma árvore para resolver problemas mundiais” (BISWAS, *et al*, 2002; IMMICH, 2006; ANÔNIMO, 1992). Assim, o neem tem despertado interesse em várias áreas, à medida que os compostos extraídos apresentam seletividade, não mutagênicos, rapidamente biodegradáveis, com baixa toxicidade e por gerar o mínimo distúrbio ao ecossistema (BRASIL, 2013).

Foi introduzido no Brasil em 1984 e é encontrado em quase todas as regiões do país, devido a fácil adaptação em solos de baixa fertilidade, climas quentes, longo período de seca, pH ácidos, altos teores de alumínio e solo pobre em nutrientes como, baixos teores de fósforo, cálcio, magnésio, potássio, zinco, de matéria orgânica, baixa capacidade de troca catiônica, soma e saturação de base (ARAÚJO, RODRIGUEZ E PAES, 2000; FORIM, 2006; GUMIERO, 2008; PARROTA, 2016).

Na região nordeste (bioma caatinga), além de fornecer frutos em escala industrial, é uma opção para a produção de madeira e nas regiões sul, noroeste do Paraná, sudeste com exceção na caatinga mineira, Centro Oeste e Norte há espécies no qual o cultivo do neem é prioritariamente a produção de sementes do fruto para a extração do óleo (ARAÚJO, RODRIGUEZ E PAES, 2010).

Dependendo das condições climáticas da região, principalmente temperatura e precipitação onde está o plantio, podem ser feitas até duas colheitas de frutos por ano. No geral, faz-se uma colheita de frutos, sendo que uma única árvore produz anualmente entre 30 e 50 kg de frutos (NEVES, 2008).

1. INTRODUÇÃO

Suas propriedade bioativas é oriundo de uma série de compostos isolado de diferentes partes da planta (Brasil, 2013) (OGBUEWU *et al*, 2011). Dentre os princípios ativos existentes, as azadiractinas são encontradas em maior quantidade e são a mais importante, usado como matéria-prima para fabricação de produtos medicinal, cosméticos, uso veterinário e principalmente como inseticida (NEVES, 2008; BEVILACQUA, SUFFREDINI E BERNARDI, 2008).

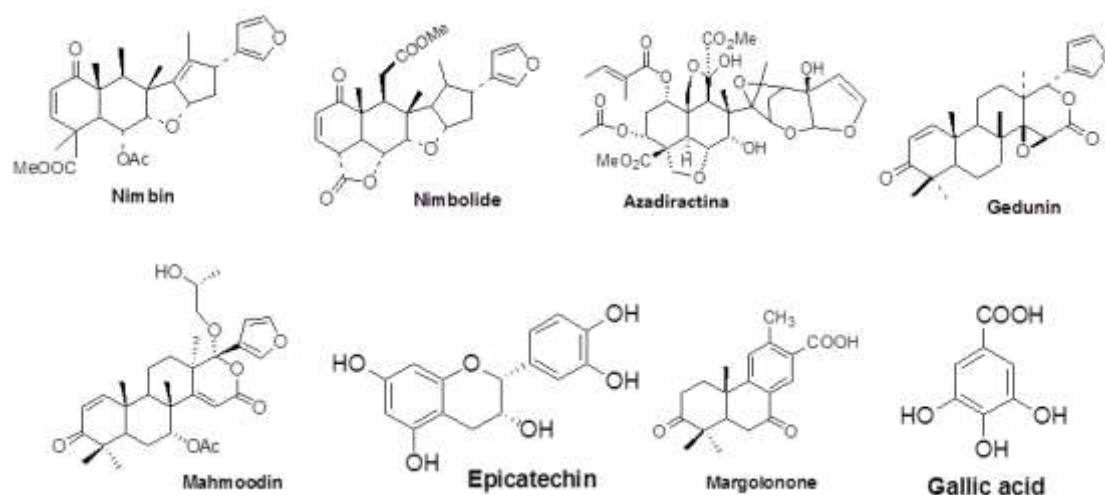


Figura 1. Compostos isolados de várias partes do neem
(Fonte: Brasil, 2013; SIDIQI *et al*, 2003)

Nos insetos, a azadiractina (**Figura 2**), age como reguladora no crescimento, causando ação deterrente, reguladora da alimentação, antiovopositora, reguladora de fecundidade e redução da aptidão física do inseto e também ajuda no controle de vários nematóides e fungos, reduzindo o crescimento de insetos em culturas e plantas (LOKANADHAN, MUTHUKRISHNAN E JEYARAMAN, 2012; HOULLOU *et al*, 2015; BITTENCOURT, 2006) .

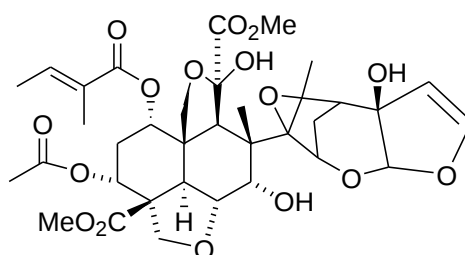


Figura 2. Estrutura da Azadiractina isolada de *Azadirachta indica*.

Esses compostos são encontrados em várias partes do neem, como as folhas e sementes (DELEITO E BORJA, 2008). O neem apresenta folhas verdes-escuras, flores de coloração branca e aromáticas; o fruto é uma baga ovalada, com 1,5 a 2,0 cm de comprimento que, quando maduro, apresenta polpa amarelada e casca branca, dura, contendo um óleo marrom no interior da semente (ARAÚJO, RODRIGUEZ E PAES, 2000).

As sementes são compostas por aproximadamente 40% de óleo, que, dependendo da forma de extração, pode conter uma elevada quantidade dos compostos metabólitos secundários. A extração do óleo extraído das sementes requer prensas e processos especiais, como prensagem e/ou extração por solvente (PAES *et al*, 2005; FREITAS, 2007; NEVES E CARPANEZZI, 2008).

A extração por prensagem é um dos métodos mais antigos e consiste na extração do óleo por prensas contínuas tipo parafuso. No final, obtêm-se o óleo bruto e uma parte sólida chamada de torta. Após a prensagem, o óleo passa por uma filtragem. O óleo obtido sem o uso de calor (prensagem a frio) é chamado de extravirgem (GIOIELLI, 1996; RAMALHO E SUAREZ, 2013).

Na extração com solvente, a torta obtida é extraída com solvente, comumente o hexano, que apresenta como principal vantagem, o baixo ponto de ebulição. O óleo obtido por esse processo necessita de etapas posteriores de refino para o seu consumo. A primeira, chamada de degomagem, consiste na retirada de fosfatídeos, proteínas e outras substâncias coloidais pela adição de água ao óleo bruto, que sofre leve aquecimento (aproximadamente 70 °C) por 20 a 30 min (RAMALHO E SUAREZ, 2013).

O óleo degomado é neutralizado com hidróxido de sódio (NaOH 5%) e centrifugado para separação do sabão formado (borra) do óleo. Em seguida, o óleo passa pela etapa de desodorização, pelo processo de arraste a vapor (RAMALHO E SUAREZ, 2013).

A última etapa, chamada de clarificação ou branqueamento, é onde são removidos os compostos solúveis (corantes) que conferem cor ao óleo por meio da adsorção destes na superfície de uma mistura de carvão ativado e de argilas naturais conhecidas como terra clarificante (RAMALHO E SUAREZ, 2013).

Maciel e colaboradores (2010) realizaram um estudo sobre a atividade inseticida *in vitro* do óleo de sementes de neem sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) e obtiveram eficiente atividade inseticida do óleo de sementes de A.

indica sobre as três fases de desenvolvimento de *L. longipalpis*.

O óleo de neem apresenta coloração marrom, sabor amargo e odor forte, rico em ácido graxos essenciais, como, o ácido oleico, linoleico, palmítico e esteárico, vitamina E e cálcio (BOADU *et al*, 2011; MAK-MENSAH E FIREMPONG, 2011). Devido a sua composição de ácidos graxos insaturados, graxos oleico (41,20%) e linoleico (18,60%), o óleo de neem é susceptível a modificação química estrutural por processos oxidativos, dentre a mais comum, a reação de ozonólise (OMONOV, KHARRAZ E CURTIS, 2011; ZANARDI *et al*, 2008).

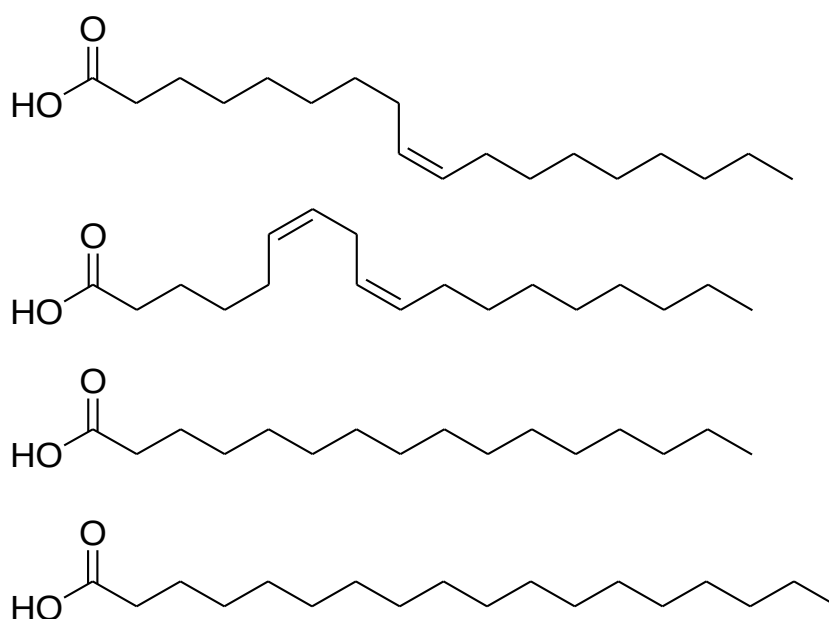


Figura 3. Ácidos graxos em forma de triacilglicerol majoritários no óleo de neem.

1.2 Reação de ozonólise

O ozônio foi descoberto em 1839, por Christian Friedrich Schonbein, quando trabalhava com uma pilha voltaica na presença de oxigênio e notou um cheiro pungente e coloração azulada (BOCCI, 2005). É um gás incolor, de odor pungente, facilmente detectável em concentrações muito baixas (0,01 a 0,05 mg/L), instável e parcialmente solúvel em água. Tem massa molecular igual a 48 Da, liquefaz-se a -112°C e possui ponto de congelamento de -251,4°C (SILVA *et al* 2011; ALMEIDA, 2013).

O ozônio é uma molécula simétrica possui um átomo de oxigênio na posição

1. INTRODUÇÃO

central com carga parcial positiva e dois átomos de oxigênio terminais com cargas parciais negativas (CLAYDEN, 2007). Possui um elevado potencial de oxidação (2,07 mV) e perde apenas para o flúor (3,06 mV) (SILVA *et al*, 2011). Na **Tabela 1** são mostrados os valores de potenciais de oxidação de diferentes oxidantes.

Tabela 1. Potencial de oxidação de alguns agentes oxidantes.

Agente oxidante	Potencial de oxidação (mV)
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

Fonte: Silva et al, 2011.

Após várias décadas de estudos, Schonbein em 1855 fez o primeiro relatório da reação de ozonólise, considerando-a como uma maneira limpa e eficiente de introduzir grupos contendo oxigênio (álcoois, aldeídos, cetonas ou ácidos) por clivagem oxidativa de ligações duplas C-C (IRFAN, GLASNOV E KAPPE, 2011).

Tem sido utilizado desde a Primeira Guerra Mundial, em 1914, quando foi usada para o tratamento de gangrena gasosa. Desde então, tem sido utilizado como modalidade terapêutica alternativa em diversas enfermidades (VILARINDO, ANDREAZZI E FERNANDES, 2013).

Edward Fisch foi o primeiro dentista a usar o ozônio em 1950, para tratar o cirurgião austríaco Ernst Payr, que se interessou pelo ozônio e começou uma linha de pesquisa dedicada ao seu uso em saúde. Nesse período, Joachim Hänsler, físico e médico alemão, junto com o médico alemão, Hans Wolff desenvolveu o primeiro gerador de ozônio com dosagem de ozônio-oxigênio para uso medicinal (HANSLER, 1996 *in* GALES *et al*, 2008).

Mais tarde, Werkmeister usou O₃ para no tratamento de úlceras cutâneas devido à aterosclerose, diabetes e radioterapia, envolvendo o ferimento em um saco de polietileno (o chamado sistema de ensacamento). Na primeira aplicação o gás foi

introduzido para apenas inflar o saco contendo uma pequena quantidade de água destilada. Ele variou a concentração de O_3 de 80 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$ e obteve bons resultados nos tratamentos (TRAVAGLI, ZANARDI & BOCCI, 2010).

Ozônio pode ser produzido a partir do ar, do oxigênio puro por descarga elétrica e da água altamente pura, gerado por métodos eletroquímicos, fotoquímicos ou radiação química, sendo o mais utilizado o princípio de descarga elétrica (conhecido por descarga por efeito corona) (DEZOTTI, 2008).

O oxigênio (O_2) é conectado por meio de um cilindro acoplado ao aparelho e sofre descargas elétricas, onde algumas moléculas de oxigênio se quebram e formam oxigênio atômico (O), que se unem novamente a molécula de oxigênio, originando a molécula de ozônio (O_3) (VILARINDO, ANDREAZZI E FERNANDES, 2013).

A utilização do gás ozônio como método terapêutico é justificado pelas suas propriedades viricidas, fungicidas e bactericidas, baseado no seu mecanismo de ação resultante da oxidação dos constituintes celulares, como proteínas, lipídios, enzimas da membrana celular e componentes citoplasmáticos, causando a morte dos microrganismos (VILARINDO, ANDREAZZI E FERNANDES, 2013; CHIATONE, 2010).

Esse mecanismo de destruição é o que diferencia o ozônio de outros agentes desinfetantes, como o cloro, por exemplo, que atua por difusão através da parede celular, agindo sobre os elementos vitais localizados no interior da célula, como enzimas, proteínas, DNA e RNA. Por apresentar um maior potencial de oxidação, o ozônio age diretamente na parede da célula, causando sua ruptura e morte em menor tempo de contato, podendo agir até 3,125 vezes mais rápido do que o cloro (CHIATONE, 2010).

Devido suas propriedades, o ozônio vem sendo utilizado no tratamento de efluentes, sanitização nas indústrias de alimentos, processo de branqueamento de celulose, no tratamento de água potável, na conservação de frutas e hortaliças pós-colheita e diversas outras áreas (COELHO *et al*, 2015).

O uso tópico do ozônio para tratamento de feridas deve ser complementado com curativos e limpeza. Existem diversas formas de aplicação, dentre elas, a água ozonizada, aplicada diretamente na ferida para tratamento de queimaduras, cicatrização, micoses, antiinflamatório, entre outros (OLIVEIRA, 2007).

A aplicação em *Bags* (sacos plásticos) é outra forma de aplicação do gás diretamente na pele, onde o membro afetado é revestido pelo *Bag* e o gás é inflado nele

por um tempo de 20 a 40 minutos com concentração de 10 a 40 g/ml para efeito cicatrizante. No entanto, se usado em elevadas concentração o efeito inverso pode ocorrer (OLIVEIRA, 2007).

Óleos ozonizados são excelentes opções para uso dermatológico, uma vez que sua obtenção é simples e estudos revelam sua eficiência para tratamentos contra diversas cepas bacterianas, sem toxicidade sobre o tecido humano (OLIVEIRA, 2007). Sua obtenção consiste na reação do ozônio com as insaturações, em uma das reações muito conhecida na química orgânica para oxidação de hidrocarbonetos insaturados, a reação de ozonólise. O mecanismo dessa reação tem sido amplamente investigado, principalmente pelo trabalho de Criegee desde a década de 1960 (GELETNEKY E BERGER, 1998; WOMACK *et al*, 2015; ORNUM, CHAMPEAU E PARIZA, 2006).

Apenas em 1975, Criegee propôs um mecanismo para a reação de ozonólise. Em solvente aprótico, a reação ocorre pela adição do ozônio (2) às insaturações (1) formando o malozonídeo (3). Esses são muito instáveis e decompõem em *zwitterion* (4) e aldeído (5). O composto 4 e 5 reagem por uma reação de cicloadição e forma os ozonídeos (6) e aldeídos como composto secundário (CRIEGGE, 1975; SEGA *et al*, 2010; WOMACK *et al*, 2015; OLIVEIRA E WOSCH, 2012; ALMEIDA *et al*, 2012). Em solventes próticos, ocorre a formação de alcóxihidroperóxido (7) e/ou peróxido hemiacetal (8) (OMONOV, KHARRAZ E CURTIS, 2011). Esses compostos são os principais responsáveis pelos efeitos dos óleos ozonizados (GUERRA-BLANCO *et al.*, 2015).

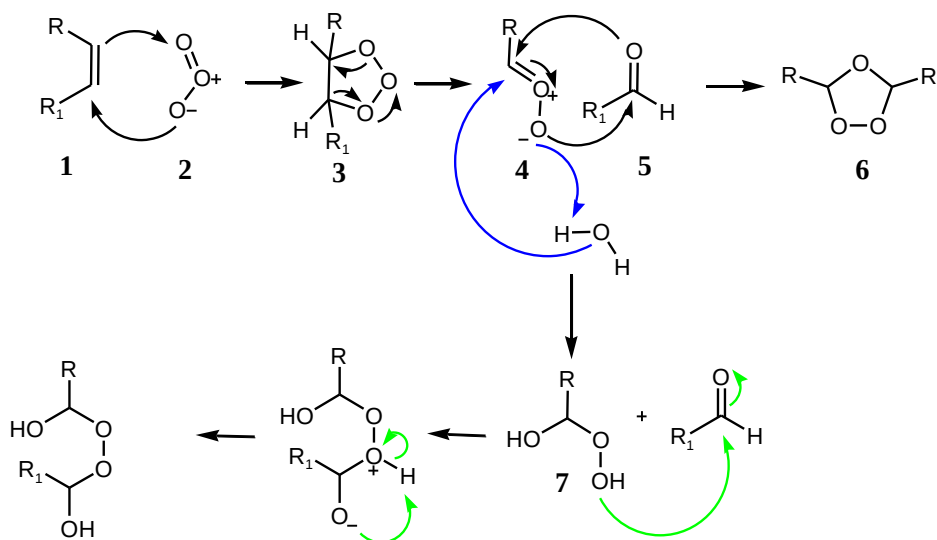


Figura 4. **Mecanismo da reação de ozonólise.**Dentre as várias aplicabilidades

do ozônio terapêutico, se destaca o uso dos óleos ozonizados, especialmente devidos a exposição corporal do ozônio e aplicação tópica (PALÁCIOS, 2010). Além disso, quando comparado a água ozonizada, que possui um tempo de meia-vida de 10 h a temperatura ambiente e cerca de 5 dias em baixas temperaturas, óleos ozonizados têm uma vida útil consideravelmente mais longa, permanecendo estável durante 2 anos a 4 °C (BOCCI, 2005).

1.3 Óleos ozonizados

Existe uma variedade de fármacos para o tratamento de diversas infecções de pele, que possui um preço elevado e frequentemente não muito eficientes, porque as infecções no tecido são causados na maioria das vezes por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à metilicina (TRAVAGLI, ZANARDI E BOCCI, 2010).

Vários fatores estão envolvidos na resistência desses patógenos multirresistentes, incluindo o uso abusivo de antibióticos, procedimentos invasivos (cirurgias, implantação de próteses médicas e outros) e a capacidade das bactérias de transmitir seu material genético com a informação de resistência a antibióticos (RODRIGUES, 2016).

O uso excessivo de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes a vários medicamentos (resistentes a dois ou mais antibióticos) tem impulsionado a pesquisa para o estudo de agentes antimicrobianos a partir de óleos essenciais (SECHI *et al.*, 2001).

Os custos dos tratamentos de patologias relacionadas à cicatrização aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo por objetivo acelerar o processo de cicatrização (MENDONÇA E COUTINHO-NETO, 2009).

O óleo ozonizado é o produto da reação do ozônio e o óleo vegetal, sendo considerado como medicamento 100% natural que pode se apresentar em diferentes formas: líquido oleoso, emulsões, cremes, pomada, supositórios, cápsula líquidas entre outros (PALÁCIOS, 2010).

Nos últimos anos, óleos ozonizados tem chamado atenção na área farmacêutica e cosmética devido à elevada atividade bacteriana, fungicida e efeitos terapêuticos (SADOWSKA *et al.*, 2008; CATALDO, 2013). A ozonização de óleos vegetais em

várias condições tem sido estudada para o tratamento de infecção de pele, como dermatites, acnes, úlceras, feridas, queimaduras, tratamento de asma, uso como laxativo, infecções intestinais, úlcera gastroduodenal e tratamento de infecções causadas por *Giardia lamblia* (ALMEIDA, 2012; MOUREU *et al.*, 2015).

Segundo Bocci (2005; 2006) o efeito de cicatrização dos óleos ozonizados, provavelmente, ocorre pela formação de peróxido de hidrogênio e produtos de oxidação lipídica quando os ozonídeos entram em contato com o exsudado do ferimento. Esses compostos possuem efeito de esterilização e aumento de oxigenação no qual acelera a cicatrização (BOCCI, 2006).

O óleo ozonizado de girassol (Oleozon) tem propriedades bactericidas notáveis como relatado por Lezcano *et al.* (1998) em um estudo preliminar, e atua diretamente no micro-organismo sem danificar o epitélio humano (SECHI *et al.*, 2001).

Kogawa e colaboradores (2015) realizaram um estudo com óleos ozonizados e encontraram atividade contra cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* (CIM= 5 mg mL⁻¹) para o óleo de linhaça e *Staphylococcus aureus* (CIM= ≤ 3 mg mL⁻¹) e CIM= 7 mg mL⁻¹ para os óleos de girassol e baru (Kogawa *et al.*, 2015).

Assim, é importante o estudo em diferentes tipos de óleos a fim de encontrar uma melhor atividade antimicrobiana, bem como, uma melhor eficiência na cura de feridas crônicas. Como discutido anteriormente, o estudo com o neem é promissor em várias áreas de estudos, no entanto, não existem relatos da ozonólise com este óleo.

2 OBJETIVOS

- Realizar a ozonólise do óleo de neem em diferentes tempos de reação;
- Caracterizar os ozonídeos por meio de técnicas físico-químicas e espectroscópicas;
- Realizar o estudo da estabilidade térmica das amostras obtidas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos ozonizados em várias cepas de bactérias padrão e clínica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O óleo de neem foi obtido comercialmente por extração a frio da empresa Vérés óleos vegetais.

O ozônio foi gerado por um ozonizador da marca Ozone & Life, utilizando um fluxo de $63 \text{ mg min}^{-1} \text{ O}_3/\text{O}_2$.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos a 300 MHz e de RMN de ^{13}C a 75 MHz, utilizando como solvente CDCl_3 em um espectrômetro Bruker DPX 300.

As análises quantitativas de RMNq ^1H foram realizadas por integração de sinais de hidrogênio, com relação ao sinal do padrão interno, bifenila e o valor de iodo foi determinado utilizando as equações apresentadas por Popescu e colaboradores (2015) o software ERETIC para interpretar os dados de RMN (Nunes, Oliveira e Alcantara, 2015).

Os espectros de IV foram obtidos por um espectrômetro da marca Bomen MB100 com transformada de Fourier.

As análises de DSC foram realizadas a uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e as temperaturas variando de -80 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, em atmosfera de N_2 a uma taxa de fluxo de 50 mL min^{-1} com um gás pungente. As análises de TGA foram realizadas com fluxo de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ em atmosferas de N_2 e Ar sintético com temperaturas de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ a $600 \text{ }^\circ\text{C}$.

As análises do perfil de ácidos graxos foram realizadas em cromatógrafo gasoso capilar- CGC AGilent 68650, series GC System, coluna capilar: DB-23 AGILENT (50% cianopropil) - Metilpolisiloxano, dimensões 60m, diametro interno: 0,25mm, filme: 0,25 μm . Condições de operação do cromatógrafo: fluxo coluna = $1,00 \text{ mL/min.}$; Velocidade linear = 24 cm/seg ; Temperatura do detector: 280°C ; Temperatura do injetor: 250°C ; Temperatura do forno: $110^\circ\text{C} - 5 \text{ min.}$; $110 - 215^\circ\text{C}$ (5°C/min), $215^\circ\text{C} - 24 \text{ min.}$; Gás de arraste: Hélio. O volume injetado foi de $1,0 \mu\text{L}$, de acordo com a AOCS (2009).

3.2 Método

3.2.1 Ozonólise no óleo de neem puro e com adição de água

Em uma proveta de 250 mL foi adicionado 50 mL do óleo e o ozônio foi borbulhado no tempo máximo de 12 horas de reação. As amostras foram identificadas como: ON-02, ON-04, ON-06, ON-08, ON-10 e ON-12 para 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de reação em temperatura ambiente. Nas amostras com tempo de reação superior a 8 h, foi adicionado 25 mL de diclorometano.

Para obtenção do óleo ozonizado com adição de água, foi utilizado a mesma quantidade do óleo de neem com adição de 10% (v/v) de água miliQ com agitação constante e temperatura ambiente até a amostra com 6 h de reação. As amostras com tempo superior foram realizadas a temperatura de 40 °C. As amostras foram identificadas como OAN-02, OAN-04, OAN-06, OAN-08, OAN-10 e OAN-12 para 2,4,6,8,10 e 12 horas de reação.

3.2.2 Índice de acidez (IA) (EUROPEAN PHARMACOPUEIA, 2004a).

Em um erlenmeyer, foram pesados 2,0 g de amostra e adicionado 25 mL da solução éter: álcool (2:1). Após agitação foi adicionado 2 gotas do indicador fenolftaleína e titulado com solução padronizada de hidróxido de potássio (KOH) 0,1M até coloração rósea. Os resultados foram obtidos por meio da fórmula:

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

Onde,

n1: o volume em mL da solução de KOH gasto na titulação da amostra;

M: molaridade da solução de KOH;

f: fator de correção da solução de KOH

m: quantidade em gramas da amostra.

3.2.3 Índice de iodo (II) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2004b).

Em um erlenmeyer contendo 0,25 gramas de amostra, foi adicionado, com uma pipeta volumétrica, 10 mL de ciclo-hexano (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e 20 mL de solução de iodo cloro (Reagente de Wijs). Após agitação, foi mantido em repouso ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado 10 mL da solução de iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água destilada, recentemente fervida e resfriada até atingir a temperatura ambiente e titulado com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1M, até uma fraca coloração amarela. Neste ponto adicionou-se de 1 mL de solução de amido indicador, e a titulação foi continuada até o desaparecimento da coloração azul escura.

O branco foi preparado com água destilada e o resultado foi obtido por meio da fórmula:

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

Onde,

$n1$: o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

$n2$: o volume em mL da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco;

m : quantidade em gramas da amostra.

3.2.4 Teste antimicrobiano

As cepas clínicas foram doadas pelo Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário da UFMS e os bioensaios foram realizados no Laboratório Sintmol – Biotecnologia, do Instituto de Química da UFMS.

Os testes foram realizados com as seguintes cepas de bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas aeruginosa* clínica (resistente a aztreonam, imipenem e meropenem), *Enterococcus faecalis* (NEWP 0012), *Enterococcus faecium* clínica (resistente à vancomicina), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* clínica (resistente a oxacilina e penicilina G) e *Klebsiella pneumoniae* ssp (KPC).

Os inóculos foram preparados em solução salina 0,85% e a concentração final foi lida em um dispositivo DensiChek Plus (bioMérieux) com valor de 0,5 na escala McFarland, equivalente a 10^4 UFC mol^{-1} .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram solubilizadas em ágar Mueller-Hinton com 2% de Tween-80%. As placas foram preparadas em diferentes concentrações (7, 5, 3, 2, 1, e 0,5 mg mL⁻¹). Alíquotas de 5 µL de cada inóculo foram aplicadas nas placas, que foram incubadas a 30 °C. Após 24 h, foi verificado a presença ou ausência de colônia (NCCLS, 1993; KOGAWA *et al.*, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição dos ácidos graxos do óleo de neem

Foi realizado o perfil da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa e os resultados encontram-se na **(Tabela 2)**. Os maiores componentes de ácidos graxos encontrados foram ácido oleico (41,50%), linoleico (19,79%), esteárico (18,11%) e palmítico (17,14%).

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, apresentando uma pequena variação na composição dos ácidos graxos. Essa diferença deve-se ao fato da variabilidade do solo, clima, variedade da planta, forma de extração, o que interfere na composição (CHAUDHARI *et al.*, 2013; PINTO E LANÇAS, 2010).

Tabela 2. Composição dos ácidos graxos do óleo de neem puro.

Composição em ácidos graxos (% m/m)		
C14:0	Mirístico	0.05
C15:0	Pentadecanóico	0.03
C16:0	Palmítico	17.14
C16:1	Palmitoléico	0.12
C17:0	Margárico	0.17
C17:1	<i>cis</i> -10-heptadecenóico	0.05
C18:0	Esteárico	18.11
C18:1 trans	Elaídico	0.11
C18:1	Oleico	41.50
C18:2 trans	t-linoleico	0.10
C18:2	Linoleico	19.79
C18:3	Linolênico	0.71
C20:0	Araquídico	1.50
C20:1	Eicosenóico	0.13
C22:0	Behênico	0.30
C24:0	Lignocérico	0.20

4.2 Caracterização espectroscópica de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e RMN de ^{13}C

Os espectros de IV relatam as mudanças dos grupos funcionais durante a reação de ozonólise (KOGAWA *et al.*, 2015). Com o aumento do tempo da reação, como esperado, houve o desaparecimento das bandas referentes às ligações duplas em 1650

cm^{-1} (estiramento C=C) e estiramento C-H sp^2 em 3009 cm^{-1} , presentes no óleo de neem puro. A banda do grupo éster em 1746 cm^{-1} dos triacilglicerídeos estão presente antes e depois da ozonólise, o que indica que não houve reação com os grupos acila (**Figura 5**).

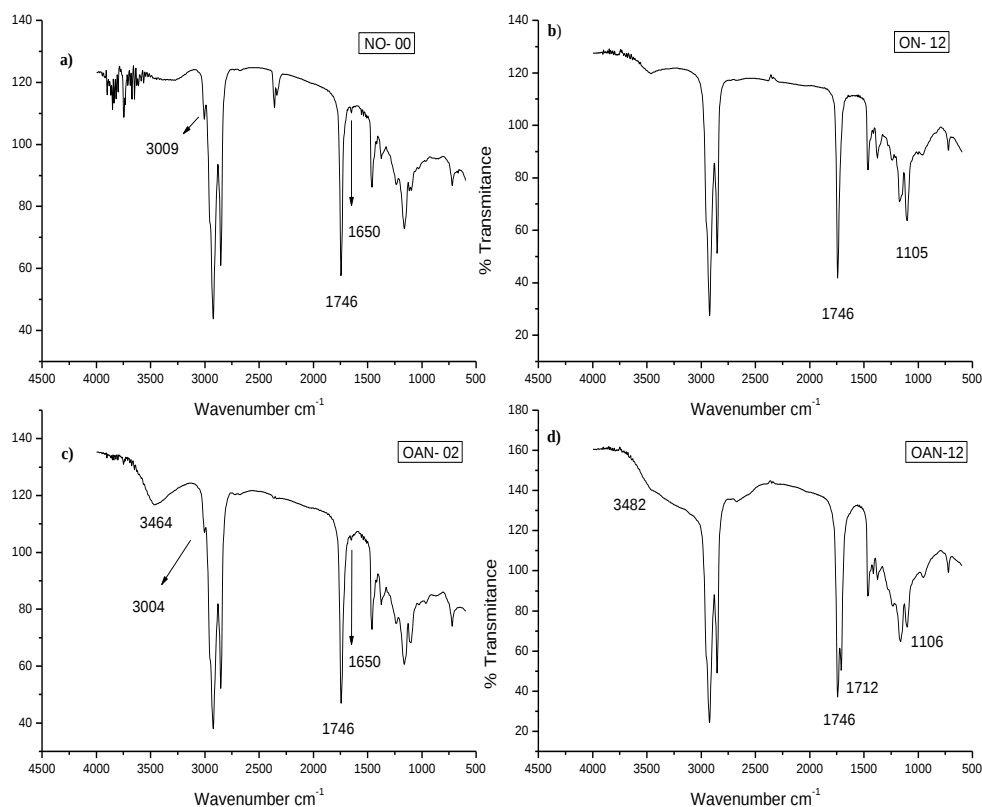


Figura 5. Espectro de IV das seguintes amostras: a) óleo de neem puro; B) óleo de neem ozonizado por 12 h; C) óleo de neem ozonizado por 2 h em presença de água; D) óleo de neem ozonizado por 12 h em presença de água.

Na amostra de óleo de neem ozonizada por duas horas (ON-02) (Figura E2 em anexo), nota-se o aparecimento de uma nova banda em 1105 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-O atribuído à formação dos ozonídeos. No entanto, as duplas ligações ainda estão presentes, desaparecendo na amostra ozonizada por 12 horas de reação (ON-12).

Nas amostras ozonizadas com água por 2 horas (OAN-02, Figura 5), apresenta bandas adicionais em 3464 cm^{-1} (estiramento O-H) referente à água adicionada no processo. A partir das amostras ozonizadas por 6 horas com adição de água (OAN-06) (Figura E10 em anexo), não há mais a presença de insaturações e a banda larga em 3482 cm^{-1} é referente ao estiramento O-H da formação do α -hidroxi-hidroperóxido.

As amostras ozonizadas por 8, 10 e 12 horas com adição de água (OAN-08,

OAN-10 e OAN-12) (em anexo), além da banda em 1746 cm^{-1} , possuem uma banda em 1710 cm^{-1} referente à carbonila de ácidos saturados, provenientes da oxidação dos aldeídos e decomposição dos ozonídeos pelo processo contínuo de ozonólise (OMONOV, KARRAZ & CURTIS, 2011).

No espectro de RMN de ^1H do óleo de neem puro observamos duplos dupletos em 4,10 e 4,25 ppm do grupo metileno do glicerol (α) e em 5,31 ppm referente ao grupo C-H central do glicerol (β). Esses sinais se mantiveram em todos os espectros das amostras dos óleos ozonizados com e sem adição de água, indicando que a reação ocorreu somente nas insaturações dos ácidos graxos (**Figura 8**).

Também foi observado sinais referentes aos hidrogênios olefínicos dos ácidos insaturados presente no óleo puro na região de 5,20 a 5,40 ppm (**G**) e sinais dos prótons adjacente à ligação dupla (**C**) em 1,99 ppm e em 2,74 ppm atribuídos aos hidrogênios alílicos internos (**A**) dos ácidos poli-insaturados (**Figura 7**). A **Figura 6** apresenta os principais tipos de hidrogênios observados no espectro de RMN de ^1H .

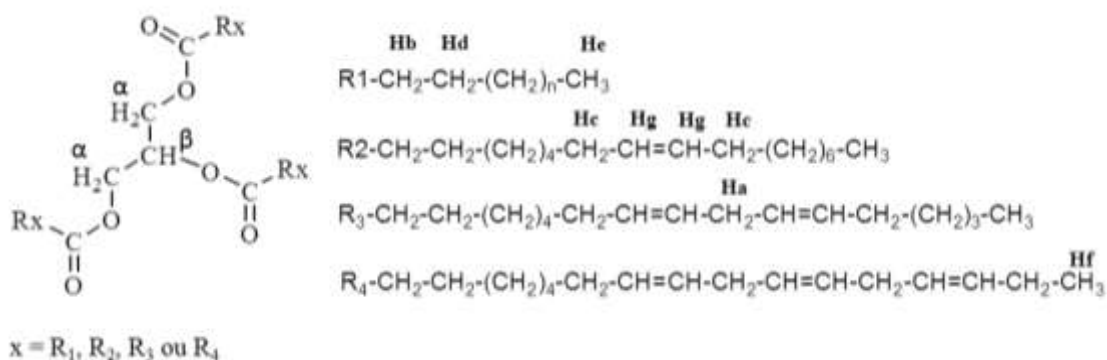


Figura 6. Tipos de hidrogênios presente nos ácidos graxos.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 7**) com duas horas de ozonólise (ON-02), apareceram multipletos em 5,14- 5,08 relacionados à formação dos ozonídeos resultantes da reação do ozônio com os ácidos monoinsaturados (**I**). No entanto, os sinais dos hidrogênios externos desses ácidos ainda estão presentes. Novos sinais apareceram em 5,54 – 5,58 ppm, relativos aos hidrogênios dos ozonídeos homoalílicos (**H**).

Também foi observado um simpleto em 9,7 ppm no espectro de RMN de ^1H relativo a formação de aldeídos como resultado da quebra do carbono 9 e 6 do ácido oleico e linoleico durante a reação de ozonólise.

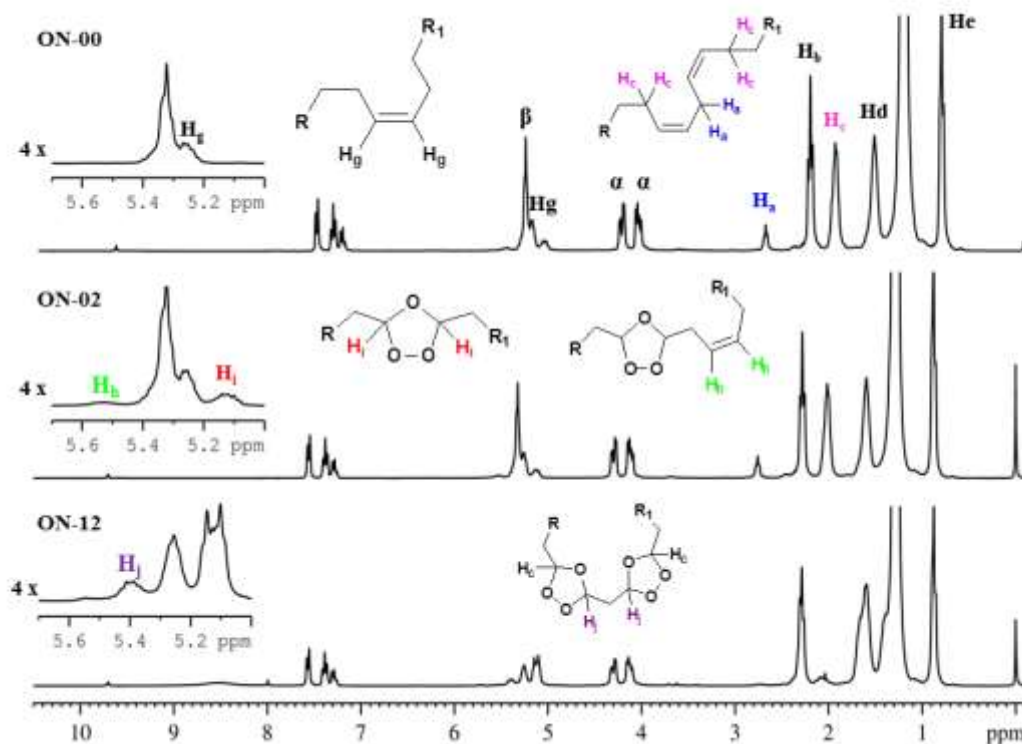


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H da região de -0,1 a 10 ppm para as seguintes amostras: ON-00 (óleo de neem puro); ON-02 (óleo de neem ozonizado por 2 h); ON-12 (óleo de neem ozonizado por 12 h).

Na amostra ON-12, os sinais das insaturações do ácido oleico e linoleico estão ausentes. Os hidrogênios dos ozonídeos apareceram em 5,14 e 5,08 ppm (**I, Figura 7**) e em 5,42 – 5,36 ppm referentes aos hidrogênios dos ozonídeos ligados ao grupo metileno (**J, Figura 7**).

No espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem puro (**Figura 8**), estão presentes os sinais referente ao grupo éster em 172 e 173 ppm, carbonos sp^2 da cadeia carbônica graxa em 127 a 130 ppm, carbonos do glicerol (CH_2 da posição 1 e 3) e (CH da posição central) caíram em 62 e 68 respectivamente. Os sinais entre 34 a 14 ppm referem-se aos demais carbonos presentes na estrutura. A partir da amostra ozonizada por 2 horas, já pode ser observado a formação de ozonídeos pelo aparecimento do sinal em 104 ppm.

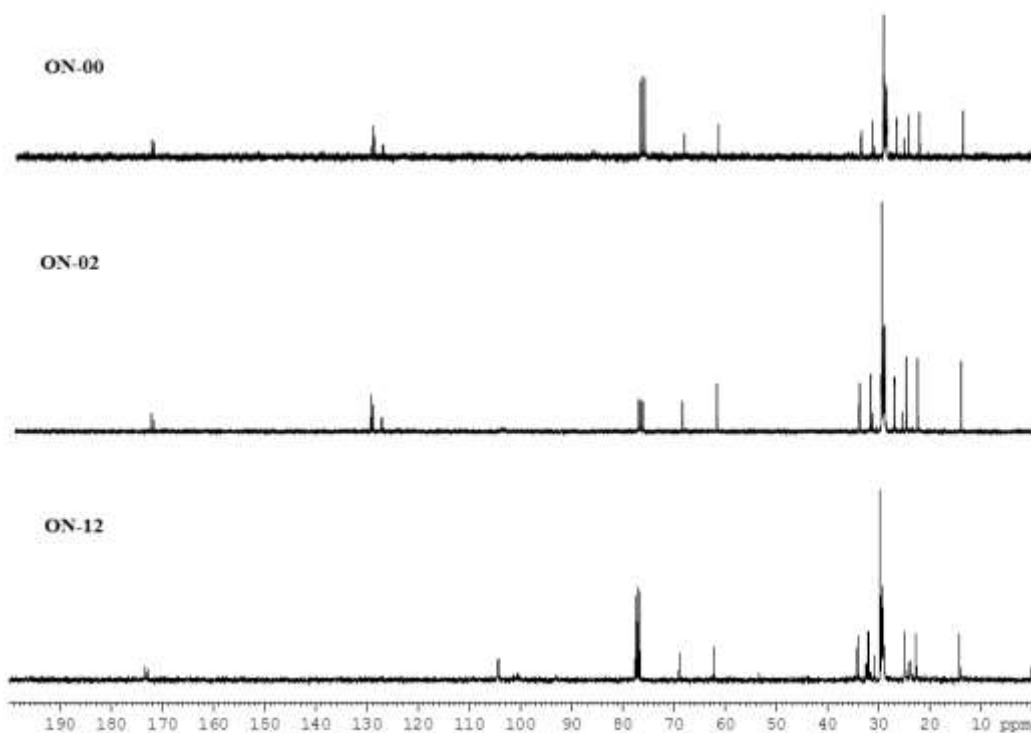


Figura 8. Espectros de RMN de ^{13}C das seguintes amostras: ON-00 (óleo de neem puro); ON-02 (óleo de neem ozonizado por 2 h); ON-12 (óleo de neem ozonizado por 12 h).

Os sinais da região de 127 a 130 ppm estão ausentes no espectro de RMN de ^{13}C da amostra ozonizada por 12 horas, confirmando assim, a reação completa do ozônio com as insaturações. Os outros sinais se mantiveram em todas as amostras, o que comprova que o ozônio reagiu somente com as olefinas.

Os espectros de RMN de ^1H das amostras de óleo com adição de água estão apresentados na **Figura 9**. No produto com 2 horas de reação (OAN-02), está presente um simpleto em 4,77 ppm, referente a água adicionada, que apresentou esse deslocamento devido as interações de hidrogênio com o éster da cadeia do ácido graxo. Esse sinal está ausente a partir de 4 horas de ozonólise.

Como se pode verificar, a reação de ozonólise na presença de água é mais rápida. Os sinais de olefinas desapareceram nas amostras a partir de 6 horas de reação nos óleos ozonizados com água e notou-se o aparecimento de um simpleto em 7,94 ppm atribuídos ao próton do α -hidro-hidroperóxido (**Figura 9**).

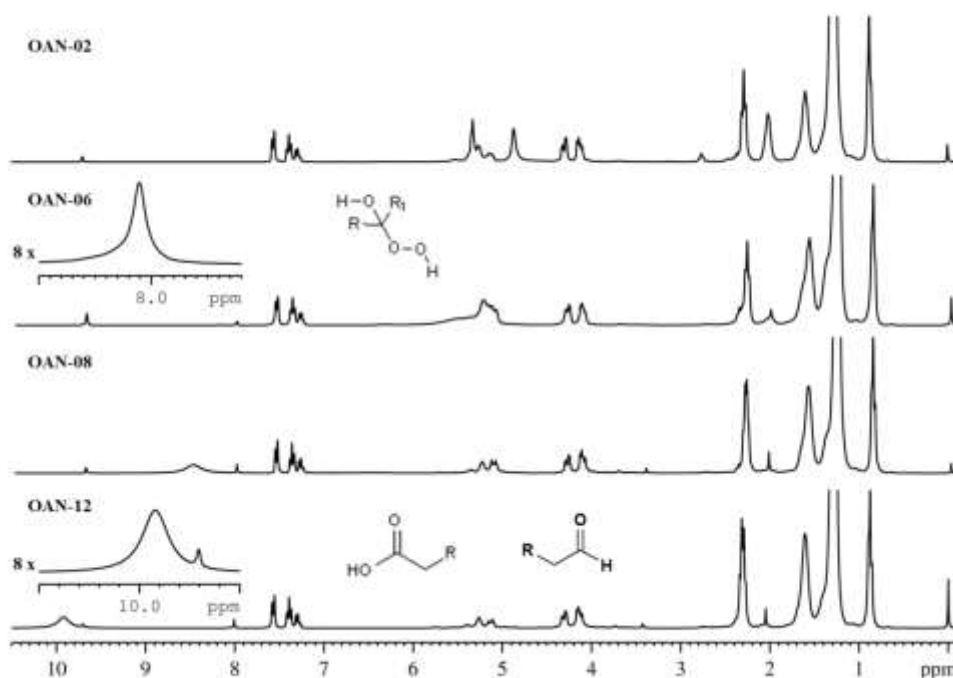


Figura 9. Espectros de RMN de ^1H da região de -0,1 a 10 ppm para amostras ozonizadas na presença de água: (OAN-02) óleo de neem ozonizado por 2 horas; (OAN-06) óleo de neem ozonizado por 6 horas; (OAN-08) óleo de neem ozonizado por 8 horas; (OAN-12) óleo de neem ozonizado por 12 horas.

Nos espectros das amostras ozonizadas por 10 e 12 horas com adição de água (OAN-10 e OAN-12) apareceram sinais em 8,69 ppm e 8,90 ppm. Esses sinais são referentes ao grupo hidroxila do ácido carboxílico originados da oxidação do aldeído e decomposição dos ozonídeos, como explicado anteriormente (Omonov & Karraz, 2011). Nos espectros de RMN de ^{13}C , apresentados na **Figura 10**, os sinais referentes ao carbono do grupo carboxila apareceram em torno de 179 ppm.

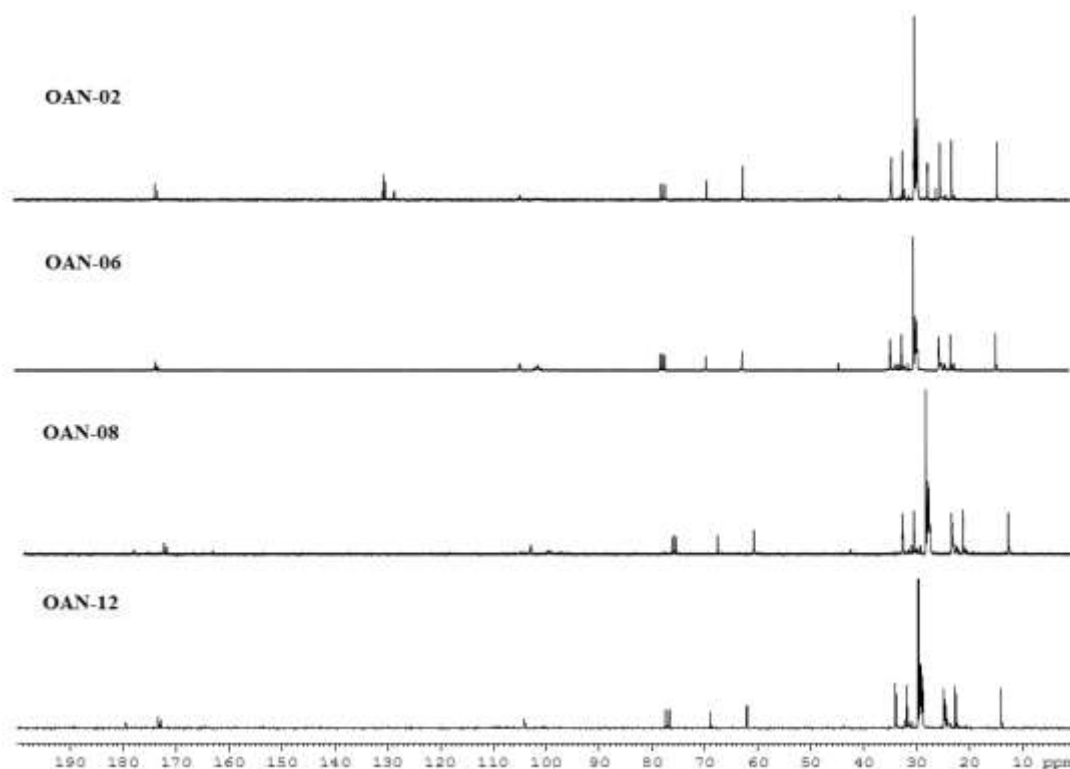


Figura 10. Espectros de RMN de ^{13}C das seguintes amostras ozonizadas na presença de água: (OAN-02) óleo de neem ozonizado por 2 horas; (OAN-06) óleo de neem ozonizado por 6 horas; (OAN-08) óleo de neem ozonizado por 8 horas; (OAN-12) óleo de neem ozonizado por 12 horas.

4.3 Análises físico-químicas e RMN de ^1H quantitativo (RMNq)

Foram realizadas análises de índice de acidez e índice de iodo para as amostras de óleo de neem puro e ozonizadas, cujos resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

Com o aumento do tempo de ozonólise observa-se um aumento gradual no índice de acidez, o que se pode atribuir à formação dos compostos peroxídicos (DÌAZ *et al.*, 2012). Nos óleos ozonizados na presença de água, o índice de acidez foi maior, o que está de acordo se levarmos em consideração a formação de ácidos carboxílicos pela quebra dos compostos peroxídicos e oxidação de aldeídos, como pode ser observado nos espectros de RMN de ^1H (DÌAZ *et al.*, 2012).

O índice de iodo pelo método de Wijs é uma técnica analítica utilizada para medir o índice de insaturação em óleos (CHOUDHARY, GROVER & JAVED, 2015). Essa técnica mede a quantidade de I_2 consumido em 100g de amostra e depende de vários fatores, principalmente a quantidade de duplas ligações carbono-carbono, condições de e tempo de armazenamento e processos de oxidação (SHIMAMOTO *et*

al., 2015). Com o aumento do tempo de reação de ozonólise, as insaturações dos ácidos graxos vão diminuindo à medida que reagem com o ozônio, levando, conseqüentemente, à diminuição do índice de iodo.

A determinação do índice de iodo realizado pela técnica de RMN de ^1H quantitativo foi realizada. Os valores foram obtidos levando em consideração a posição e a intensidade de sinais. Os grupos foram integrados e os valores das integrais foi o índice de iodo.

As integrais dos sinais de RMN de ^1H são proporcionais aos números de hidrogênios presentes em cada grupo funcional. A partir dos espectros de RMN de ^1H das amostras de óleo, o valor de iodo (II) foi determinado por meio da combinação das integrais, usando como padrão interno a bifenila. A relação foi feita de acordo com equação abaixo, segundo Popescu et al (2015).

$$II = \left(\frac{\frac{\beta}{2}}{\frac{[(F) + (E)]}{3}} \right) \cdot 86$$

Os sinais foram selecionados na região de 7,65 – 7,46 ppm para a bifenila, 5,39 – 5,29 ppm referente ao sinal (**β**), 1,0 – 0,71 ppm para o sinal (**E**). O sinal (**F**) da formula acima é referente ao CH_3 do ácido linolênico ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) e não foi observado nos espectros devido a sua baixa concentração no óleo e por isso foi considerado 0 (zero) em todos os cálculos (**Figura 11**).

A RMNq é considerada uma técnica simples, de curto tempo para aquisição dos experimentos de RMN de ^1H , sem qualquer necessidade de calibração externa e que apresenta dados robustos de quantificação, desde que sejam seguidos todos os parâmetros para a quantificação em RMN (MALZ & JANCKE, 2005).

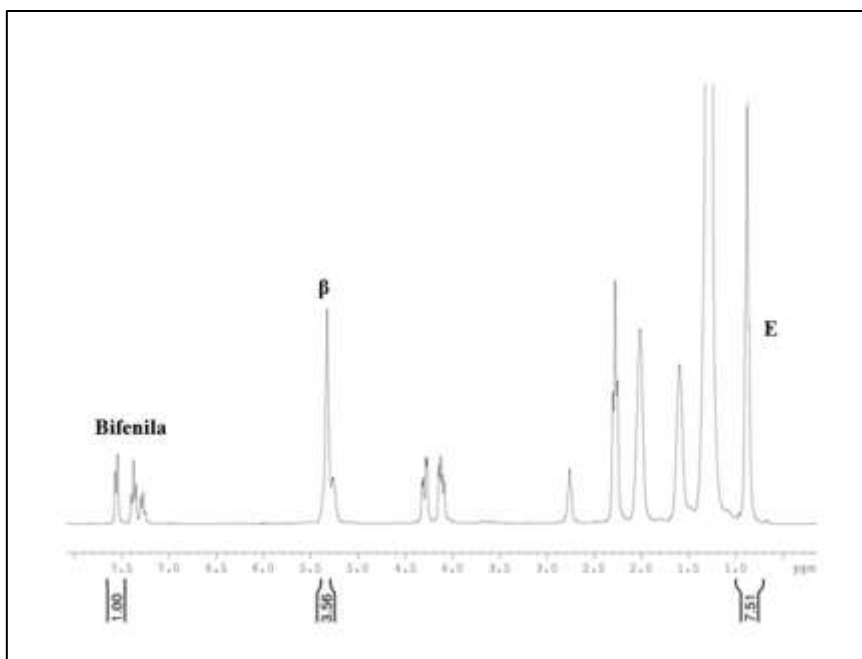


Figura 11. Espectro quantitativo de RMN de ^1H para determinação do índice de iodo.

Os resultados de índice de iodo pelos métodos de Wijs e $q\text{RMN}$ apresentaram uma diminuição de valores com o aumento do tempo da reação de ozonólise, pois o ozônio reagiu com as insaturações dos ácidos graxos (**Tabela 3**).

Com exceção da amostra OAN-06, os resultados de II por ambos os métodos foram similares entre si, cujas amostras ON-00 (óleo puro), ON-02, ON-04 e OAN-02 apresentaram índices de iodo pelo método de Wijs significativamente superiores que aqueles obtidos por RMN, muito provavelmente devido aos desvios oriundos do processo de titulação deste método.

Por outro lado, conforme houve a diminuição dos índices de iodo pela reação de ozonólise, a interferência de sinais coalescentes na mesma região de quantificação pelo método de RMN passou a ser observada, detectando-se um aumento dos valores de II comparativamente ao método de Wijs (amostras OAN-04 e OAN-06), provavelmente devido à formação de outras substâncias no decorrer da reação de ozonólise. Nesse sentido, em valores muito baixos de II houve uma convergência entre os resultados para ambos os métodos (amostras ON-06, ON-08 e ON-10), indicando que os desvios por Wijs parecem ser superiores aos por RMN, já que somente quando os desvios em RMN tornam-se importantes, ou seja, quando há a sobreposição de sinais, é que os resultados tornam-se significativamente equivalentes.

Tabela 3. Determinação do índice de acidez (IA) e índice de iodo (II) das amostras de óleo de neem puro e ozonizado (% molar).

Amostras*	II (RMN)	II (g de I ₂ /100 de amostra)	IA (mg of KOH g ⁻¹)
ON-00	60.00 ± 0.36 ^a	69.08 ± 0.72 ^b	6.47 ± 0.45
ON-02	46.63 ± 0.61 ^a	52.32 ± 0.59 ^b	10.37 ± 0.96
ON-04	34.34 ± 0.62 ^a	42.47 ± 0.68 ^b	16.32 ± 1.37
ON-06	22.54 ± 0.35 ^a	24.09 ± 1.63 ^a	21.59 ± 0.91
ON-08	15.49	16.71 ± 1.10	21.94 ± 0.99
ON-10	10.88 ± 0.71 ^a	9.36 ± 0.94 ^a	25.61 ± 0.89
ON-12	0.00	0.00	39.79 ± 0.95
OAN-02	34.45 ± 0.56 ^a	37.83 ± 0.27 ^b	17.26 ± 0.67
OAN-04	22.98 ± 0.83 ^a	21.06 ± 0.46 ^b	32.22 ± 0.31
OAN-06	17.85 ± 0.47 ^a	2.62 ± 0.48 ^b	60.08 ± 0.68
OAN-08	0.00	0.00	93.16 ± 0.71
OAN-10	0.00	0.00	139.84 ± 0.69
OAN-12	0.00	0.00	117.44 ± 0.60

* ON: Óleo de neem; OAN: Óleo de Neem ozonizado com água. ^{a b} O mesmo alfabeto não representa diferença significativa e alfabetos diferentes representam diferenças significativas entre os II obtidos por RMN e pelo método de Wijs. O Student's t-test foi aplicado para avaliar as diferenças significativas entre os II (P<0.05).

4.5 Análises térmicas

4.5.1 Calorimetria exploratória (DSC) - Curvas de resfriamento e aquecimento

Durante o processo de aquecimento e resfriamento das amostras de óleo de neem puro e ozonizadas foram observadas exo e endotermas largas referente às transições de fusão e de cristalização **Figuras 12 - 15**.

A cristalização de ácidos graxos insaturados ocorre em temperaturas em torno de -30 °C e os saturados em temperaturas mais elevadas, entre -10 a 15 °C (PIEZERANA *et al.*, 2015). Neste estudo, observamos uma temperatura de cristalização do óleo de neem puro em 7,29 °C, provavelmente referente ao ácido oleico que está em maior quantidade (**Figura 12**).

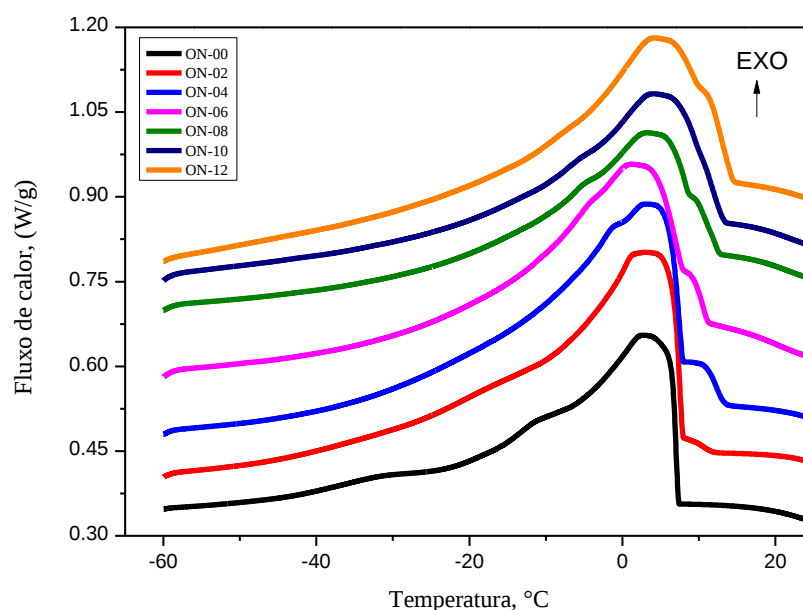


Figura 12. Curvas de resfriamento das amostras do óleo de neem puro e ozonizados.

O aumento de temperatura de cristalização dos insaturados também foi observado por Pierezana et al (2015), onde os ésteres derivados do óleo de *T. cattapa*, que possui 37,5% de ácido oleico e 22,6% de ácido linoleico, apresentaram ponto de cristalização em 5,95/4,09 °C (fase metílica/etílica) sendo justificado pela presença dos ácidos saturados, como o palmítico, que cristaliza a 23,2 °C, que pode influenciar no aumento da temperatura (**Figura 12**).

Com o aumento do tempo de ozonólise, os eventos exotérmicos sofreram um leve deslocamento que pode ser atribuído à formação de diferentes formas polimórficas ou à cristalização de diferentes frações de ácidos graxos. Os compostos peroxídicos formados na reação de ozonólise também podem influenciar na temperatura de cristalização e na forma assimétrica dos picos (**Figura 12**) (CHIVARO *et al.*, 2007).

Nas amostras OAN-02 e OAN-04, picos exotérmicos em -39,43 °C e -46,91 °C respectivamente estão presentes. Esse evento pode ter ocorrido devido à interação da água com os triacilgliceróis diminuindo a força de Van der Waals entre as cadeias de ácidos graxos. Assim, com a diminuição dessas interações, essas temperaturas de cristalização são referentes aos ácidos graxos insaturados (**Figura 13**).

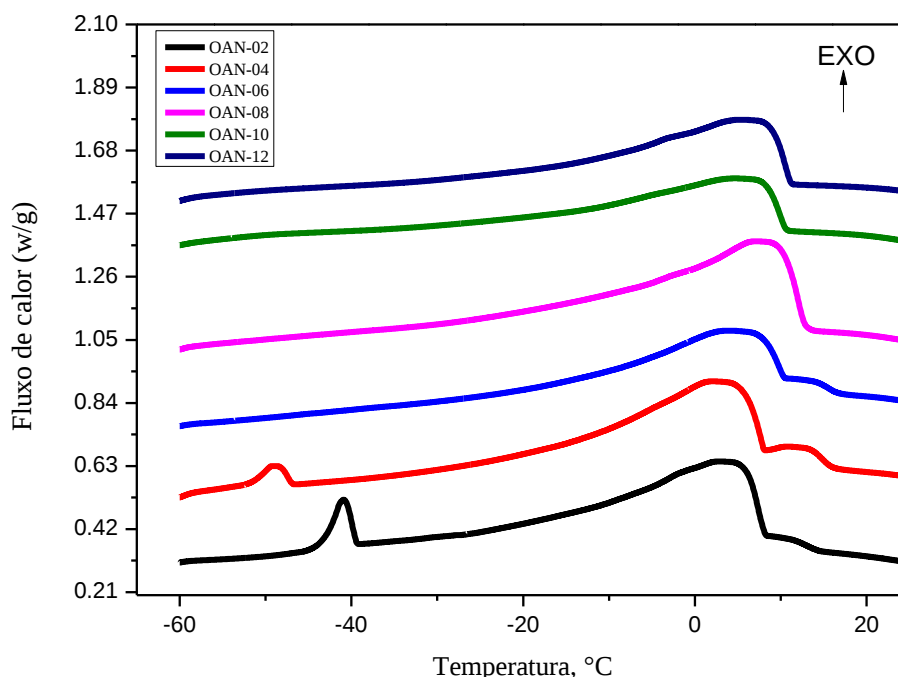


Figura 13. Curvas de resfriamento das amostras do óleo de neem ozonizadas na presença de água.

Características complexas, tais como, ombros não separáveis de picos nas curvas endotérmicas, foram notados, assim como nas análises de Tan e Man (2000). O óleo de neem puro apresentou ponto de fusão em 4,11 °C e 9,25 °C referente aos insaturados e saturados respectivamente. Conforme ocorreu o aumento do tempo de ozonólise, o ponto de fusão também se deslocou para valores maiores devido à saturação dos ácidos graxos, sendo a amostra com 12 horas de ozonólise, a temperatura de fusão em 12,29 °C (**Figura 14**).

À medida que o tempo de ozonólise aumentou, o ponto de fusão também se deslocou para valores mais elevados devido à saturação de ligações duplas de ácidos graxos com máximo de picos 8.29 °C, 8.58 °C, 8.83 °C, 9.60 °C e 10.28 °C para as amostras ON-04, ON-06, ON-08, ON-10 e ON-12, respectivamente. Para ON- 02 a curva DSC mostra um evento adicional com pico máximo em - 13.90°C, possivelmente atribuído a resíduos de ácidos graxos insaturados (**Figura 14**).

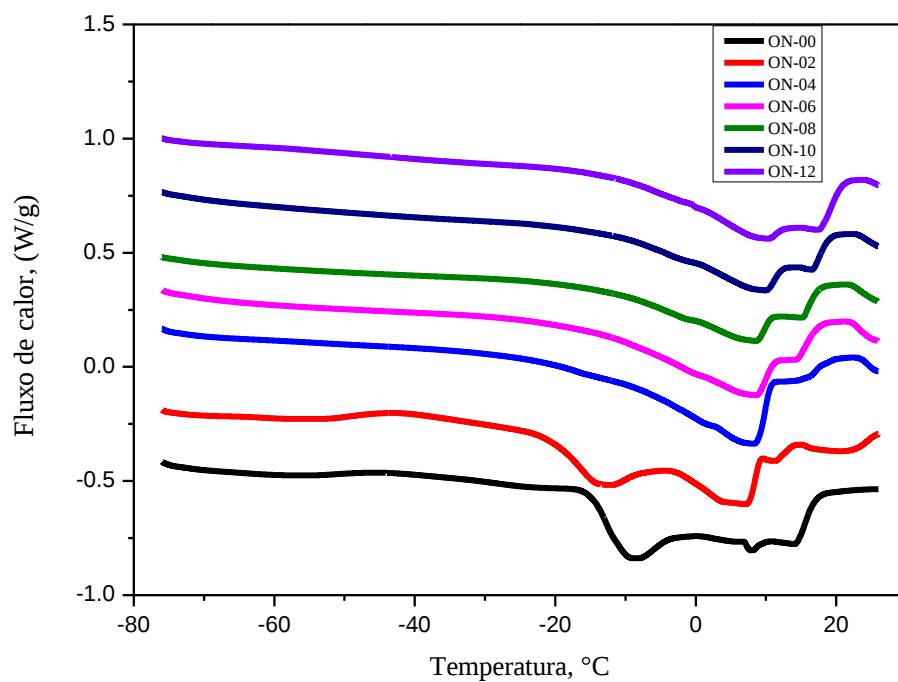


Figura 14. Curvas de aquecimento das amostras do óleo de neem puro e ozonizados.

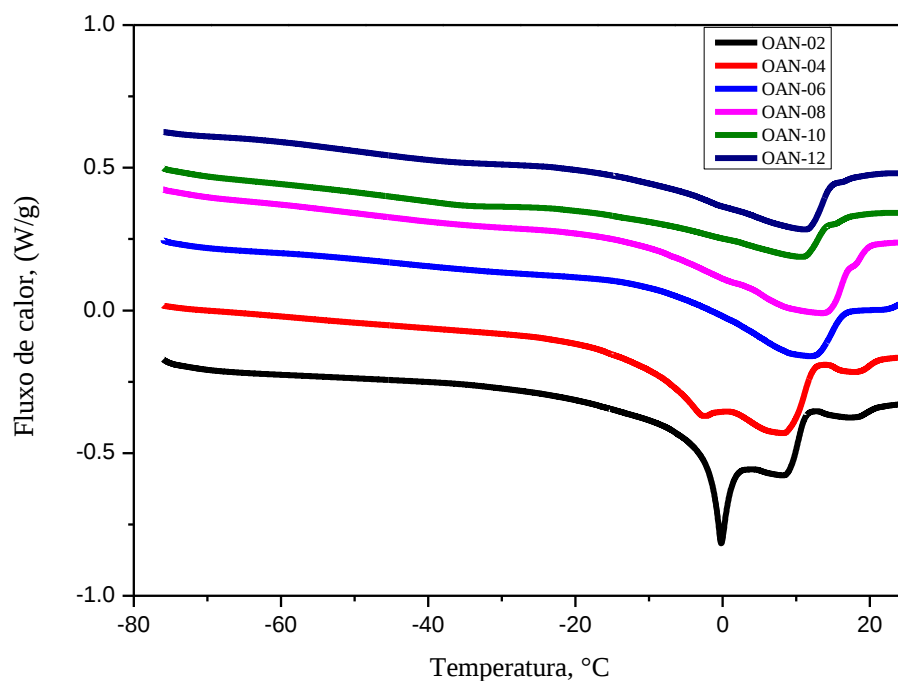


Figura 15. Curvas de aquecimento das amostras do óleo de neem ozonizadas com adição de água.

4.6 Análises Termogravimétricas/ Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas de TG/DTG para o óleo de neem ozonizado com e sem água foram realizadas em atmosfera de nitrogênio e ar sintético. A temperatura de decomposição de óleos vegetais em atmosfera oxidante de ar sintético está relacionada com o grau de insaturação e podem ocorrer em duas ou três etapas (POLITI, MATOS & SALES, 2013; GARCIA *et al.*, 2007).

Para o óleo de neem puro em atmosfera de ar sintético observou-se decomposição em duas etapas nas curvas de TG/DTG. O primeiro evento inicia em 240° C com perda de massa de 81,37 %, associada à oxidação dos ácidos insaturados, nesse caso o oleico e o linoleico, que estão em maiores quantidades. A segunda etapa, em 445,7 °C com perda de massa de 12,71 %, refere-se à oxidação dos ácidos graxos saturados (**Figura 16**) (BAGORIA, 2012; GARCIA *et al.*, 2007).

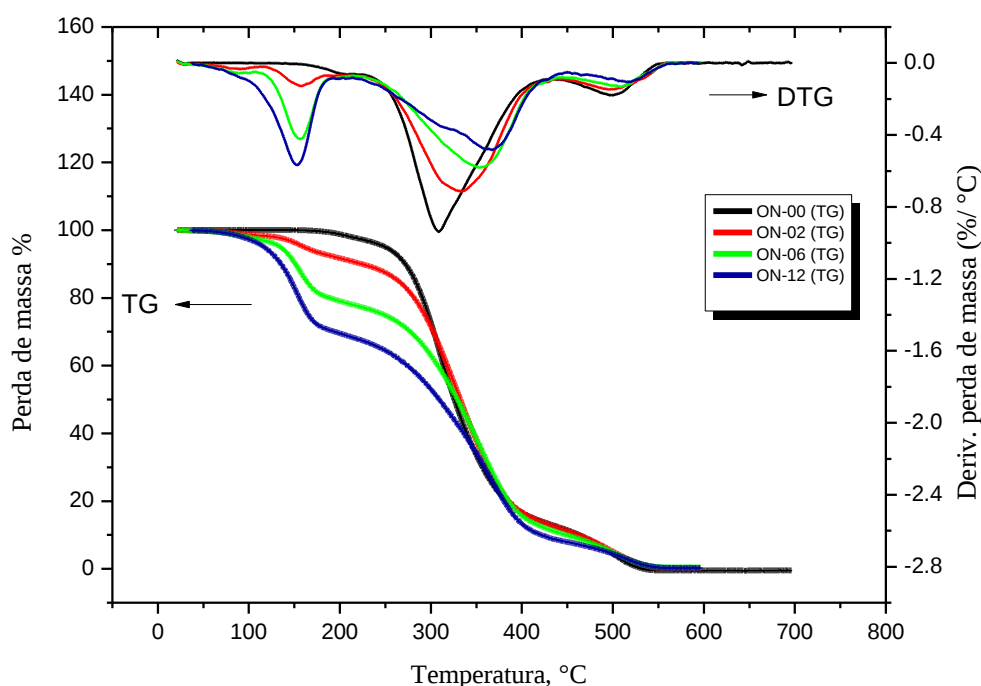


Figura 16. Curvas de TG/DTG em atmosfera de ar sintético para as amostras do óleo de neem ozonizado.

A partir de duas horas de ozonólise, as curvas de TG/DTG mostraram decomposição das amostras em 3 etapas, com temperatura inicial de decomposição em 125 °C com perda de massa de 5.16 %. Com o aumento da ozonólise, aumenta a

quantidade de massa perdida e isso é proveniente da atmosfera oxidante e da formação dos ozonídeos (**Figura 16**).

Como a amostra ON-12 não possui mais insaturações, os compostos formados são termicamente mais resistentes, o que o torna mais estável do que as amostras com tempo inferior de reação. Isso também foi observado nas amostras ozonizadas com água a partir de 8 horas de reação (**Figura 16**).

Nas amostras ozonizadas com água até 8 horas, tanto em atmosfera oxidante quanto em atmosfera de nitrogênio, foi observado uma diminuição da estabilidade térmica, proveniente da perda de água adicionada.

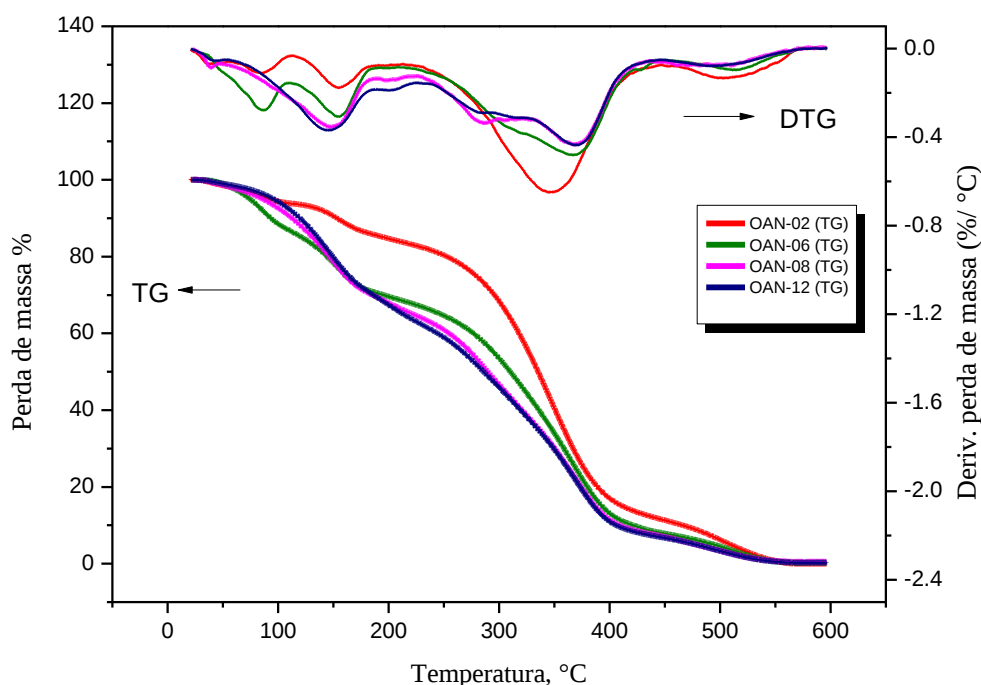


Figura 17. Curvas de TG/DTG em atmosfera de ar sintético para as amostras do óleo de neem ozonizado com adição de água.

Em atmosfera de nitrogênio, as amostras de óleo de neem puro se decompõem em uma única etapa enquanto as amostras ozonizadas se decompõem em duas etapas. Também foi observado o aumento da perda de massa com o aumento da ozonólise devido o incremento de O_3/O_2 na matriz do triacilglicerídeos (**Figura 18**).

Em atmosfera oxidante, as amostras de até 6 horas de reação com adição de água apresentaram estabilidade até 120 °C. Com o aumento da reação, a estabilidade

diminuiu, provavelmente devido à oxidação dos ácidos graxos e compostos peroxídicos, sendo as amostras OAN-08, OAN-10 e OAN-12 estáveis até 70 °C (**Figura 17**).

Em atmosfera de nitrogênio, as amostras OAN-02 e OAN-04 apresentaram a mesma temperatura inicial de decomposição, em 120 °C, com três etapas de decomposição. Com 6 horas de reação, a decomposição passa a ser em duas etapas, com início em 93 °C. A temperatura de decomposição das amostras OAN-08, OAN-10 e OAN-12 diminuíram para 70°C (**Figura 19**).

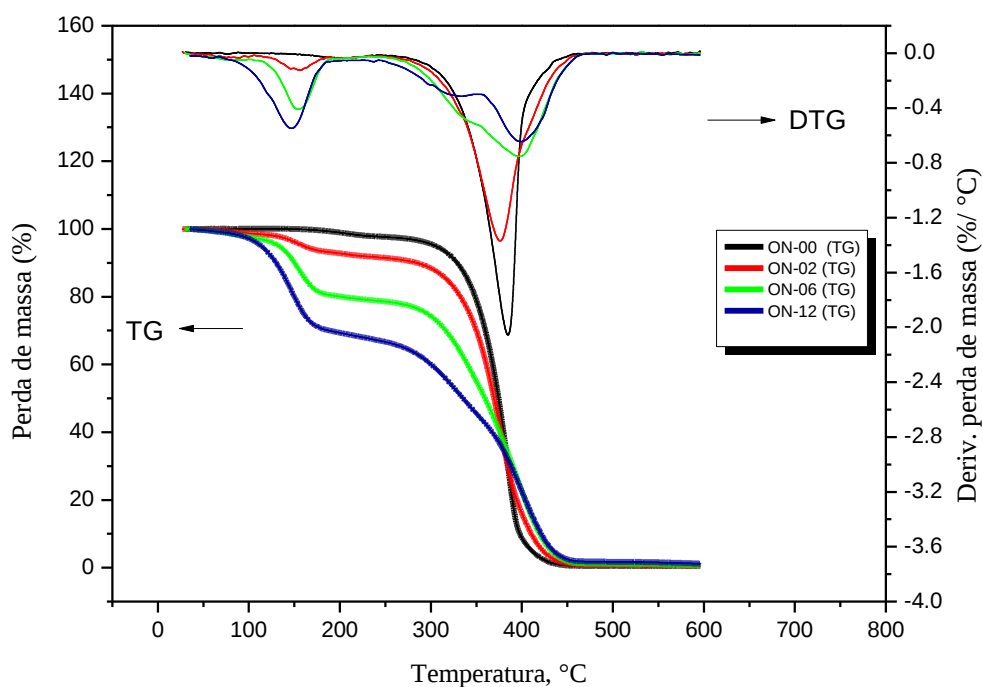


Figura 18. Curvas de TG/DTG em atmosfera de nitrogênio do óleo de neem puro e ozonizado.

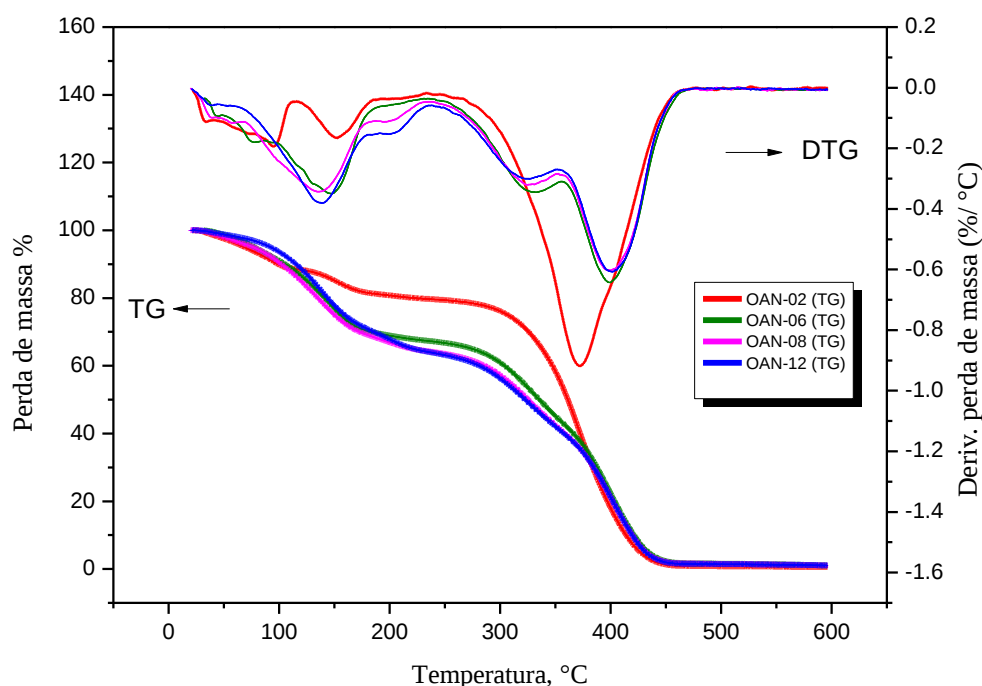


Figura 19. Curvas de TG/DTG em atmosfera de nitrogênio do: óleo de neem ozonizado na presença de água.

4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizados os testes com oito cepas de bactérias, dentre elas, 4 espécies de gram-positivas, *Enterococcus faecalis* (NEWP 0012), *Enterococcus faecium* clínico (resistente à vancomicina) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e clínico e 4 espécies de gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e clínica, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (KPC). Estes microrganismos são os maiores responsáveis por diversas infecções em pacientes saudáveis e imunocomprometidos (IORIO *et al.*, 2016).

As infecções causadas pelas bactérias Gram-negativas são as mais preocupantes, pois, sofrem modificações genéticas e dessa forma adquirem resistência aos antibióticos, tais como, *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC), que está gerando uma crise na saúde pública devido a sua ampla resistência aos antibióticos (PELEG & HOOPER, 2010; DE ROSA, 2015).

Os agentes β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, são uma classe de antibióticos bastante usada para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes.

No tratamento dessas infecções destacam-se dois antibióticos da classe das polimixinas, a polimixina B e a polimixina E (colistina) (RODRIGUES, 2016; ANDERSON, 2007).

Nos casos de infecção por microrganismos produtores de KPC, as polimixinas são praticamente a única alternativa terapêutica, no entanto, a toxicidade gerada ao indivíduo é um fator de limitação ao uso desses medicamentos. Além disso, a recomendação dada pelos órgãos de saúde é a utilização das polimixinas com mais um ou dois antibióticos, sendo, aminoglicosídeos (gentamicina ou amicacina), carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) ou tigeciclina (RODRIGUES, 2016).

Neste estudo, o óleo de neem ozonizado com e sem água apresentaram excelentes resultados contra cepas testadas quando comparado com os resultados da literatura, como pode ser observado na **Tabela 4**. A sensibilidade dos microrganismos aos produtos obtidos é representada pela concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) de cada microrganismo para cada antimicrobiano, que corresponde à menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento visível do microrganismo.

Tabela 4. Valores de Concentração Inibitoria Mínima (CIM) obtidos de óleo de neem ozonizado.

Amostras	CIM (mg mL ⁻¹)							
	Cepas de bactérias							
	<i>E. faecalis</i> (NEWP 0012)	<i>E. faecium</i> Clínica	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> clínica	<i>E. coli</i> ATCC	<i>P. aeruginosas</i> ATCC	<i>P. aeruginosas</i> clínica	<i>K. pneumoniae</i> ssp (KPC)
ON- 00	-	-	-	-	5	-	-	-
ON- 02	-	-	-	-	-	-	-	-
ON- 04	-	-	-	-	-	-	-	-
ON- 06	-	2	-	-	-	-	-	-
ON- 08	<0.5	<0.5	-	-	-	-	-	-
ON- 10	5	-	5	-	-	-	-	-
ON- 12	1	1	5	7	-	-	-	7
OAN- 02	5	2	2	7	7	-	-	-
OAN- 04	2	2	2	3	3	-	5	7
OAN- 06	<0.5	<0.5	3	3	3	-	5	5
OAN- 08	5	<0.5	2	5	5	5	7	-
OAN- 10	2	2	2	5	-	-	-	-
OAN- 12	7	-	7	5	-	-	-	-

* - : Não ativa nas concentrações testadas.

Os óleos ozonizados com adição de água apresentaram ação com o menor tempo de ozonólise, enquanto, os óleos ozonizados sem adição de água, com o mesmo tempo, não apresentaram atividade. Isso pode estar relacionada com a formação de uma maior quantidade de compostos peroxídicos, como os hidroperóxidos, formados nos óleos com adição de água.

As cepas de *E. faecalis* (ATCC), *E. faecium* clínica e *S. aureus* ATCC apresentaram maior sensibilidade aos óleos ozonizados, uma vez que, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis do que as Gram-negativas devido a composição da membrana plasmática (SILHAVY, KAHNE E WALKER, 2010).

As amostras ozonizadas por 12 horas sem adição de água (ON-12 e por 4 e 6 horas com adição de água (OAN-04 e OAN-06) apresentaram MIC de 7 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹ contra a *K. pneumoniae*, excelente resultado devido à alta resistência dessas bactérias e seu tratamento que leva a combinação de antibióticos (LANDMAN, 2008; De ROSA, 2015).

Muitos estudos descritos na literatura revelam atividade antibacteriana dos óleos ozonizados frente a diferentes cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como, *Mycobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *E. coli* e *P. aeruginosa.*, *E. faecalis* e *S. aureus* (SECHI *et al.*, 2011; DÍAZ *et al.*, 2001).

Sechi *et al.* (2011) encontraram valores de MIC de 9,5 mg mL⁻¹ para *E. faecalis* e *S. aureus* e 4,75 mg mL⁻¹ para *E. coli* e *P. Aeroginosas*. Moureu *et al.* (2015) encontraram valores 5 mg mL⁻¹ do óleo ozonizado com água e MICs de 1,23 a 10,0 mg mL⁻¹ contra *S. aureus*, 2,5 a 40,0 mg mL⁻¹ contra *E. coli*.

5. CONCLUSÃO

A reação de ozonólise do óleo de neem foi realizada no período de 2 a 12 horas com e sem adição de água. Os produtos formados foram confirmados pelas técnicas apropriadas de RMN de ^1H e ^{13}C e infravermelho. O grau de insaturação foi determinado pelo método de Wijs e pela técnica de RMN de ^1H quantitativo. As estabilidades das amostras foram determinadas pelas técnicas de DSC e TG/DTG. A reação de ozonólise é mais rápida na presença de água.

Os resultados dos testes antibacterianos do óleo de neem ozonizado são excelentes em comparação com os dados da literatura com MIC $<0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para *Enterococcus faecalis* ATCC clínico e *E. faecium* clínico e, além de apresentar atividade contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), e *S. aureus* padrão (2 mg mL^{-1}) *S. aureus* resistentes à meticilina (3 mg mL^{-1}). Os óleos ozonizados na presença de água foram mais bioativos do aqueles ozonizados na ausência de água com o mesmo tempo de reação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, N.R. **Síntese, Caracterização E Avaliação Da Atividade Antimicrobiana De Ozonídeos A Partir De Óleos Vegetais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

ANDERSON, K.F.; LONSWAY,D.R.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J.B. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **J. Clin. Microbio.**, v.45, n.8, p. 2723–2725, 2007.

ANÔNIMO., (1992) *Neem – A tree for solving global problems*. National Academy Press, Washington D.C., U.S.A.

ARAÚJO, L.V.C.; RODRIGUEZ, L.C.E.; PAES, J.B. Características físico-químicas e energéticas da madeira de nim indiano. **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 153-159, jun. 2000.

AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 6th Edn. American Oil Society. Champaign, 2009.

BAGORIA, R.; ARORA, S.; KUMAR, M. Thermal decomposition behavior of edible oils in different atmospheres. **Arch. Applied Scie. Res.**, v.4, n.6, p. 2382-2390, 2012.

BEVILACQUA, A.H.V.; SUFFREDINI, I.B.; BERNARDI, M.M. Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**, v. 26, n.2, p.157-60, 2008.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Curr. Sci.**, v. 82, n. 11, 2002.

BITTENCOURT, A.M. **O Cultivo Do Nim Indiano (*Azadirachta indica* A. Juss): Uma Visão Econômica**. 2008. Dissertação (Mestrado em ciências florestal)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BOADU, K.O.; TULASHIE, S.K.; ANANG, M.A.; KPAN, J.D. Production of natural insecticide from Neem leaves (*Azadirachta indica*). **Asian J. Plant Sci.**, v.1, n.4, p. 33-38, 2011.

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

- BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. **Arch Med Res.**, v.37, p.425–435, 2006.
- BRASIL, R.B. ASPECTOS BOTÂNICOS, USOS TRADICIONAIS E POTENCIALIDADES DE *Azadirachta indica* (NEEM). **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.9, n.1, p. 3255, 2013.
- CATALDO, F. Chemical and thermochemical aspects of the ozonolysis of ethyl oleate: Decomposition enthalpy of ethyl oleate ozonide. **Chem. Phys. Lipids**, v.175– 176, p.41– 49, 2013.
- CHAUDHARI, A.B. TATIYA, P.D.; HEDAOO, R.K.; KULKARNI, R.D.; GITE, V.V. Polyurethane Prepared from Neem Oil Polyesteramides for Self- Healing Anticorrosive Coatings. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 2013, n.52, p.10189–10197, 2013.
- CHIATTONE, P.V. **Ácido Ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)- Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel, Pelotas, 2010.
- CHIVARO, E., VITTADINI, E.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T.; CERRETANI, L.; BONOLI, M.; BENDINI, A.; LERCKER, G. Monovarietal extra virgin olive oils: correlation between thermal properties and chemical composition. **J. agric.. Food Chem.**, n.55, p.10779-10786, 2007.
- CHOUDHARY, M; KIRAN GROVER, M.K; JAVED, M. Effect of Deep-Fat Frying on Fatty Acid Composition and Iodine Value of Rice Bran Oil Blends. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n.85, p.211-218, 2015.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. *Advanced Organic Chemistry*, Oxford: New York, 2007.
- CRIEGEE, R. Mechanism of ozonolysis. **Angew. Chem. Int. Edit**, v.14, p.745–752, 1975.
- COELHO, C.C.S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R.S.; BEZERRA, V.S.; CABRAL, L.M.C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, v.19, n.4, p.369–375, 2015.
- DELEITO, C.S.R.; BORJA, G.E.M. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. **Pesq. Vet. Bras**, v.28, n.6, 2008.
- De Rosa, F.G; Corcione, S.; Cavallo, R.; Di Perri, G.; Bassetti, M. Critical issues for Klebsiella pneumonia KPC-carbapenemase producing K. pneumoniae infections: a critical agenda. **Future Microbiol.**, v.10, n.2,p.283–94, 2015.
- DEZOTTI, M. *Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos*. 1ª edição, Editora E- papers, v. 5 da Série Escola Piloto de Engenharia Química, 360P. p, 2008.
- DÍAZ, M., LEZCANO, I., MOLERO, J., HERNÁNDEZ, F. Spectroscopy of Ozonides with Biological Activity. **Ozone Sci. Eng.**, 23:35–40, 2001.

DÍAZ, M.F.; SÁNCHEZ, Y.; GÓMEZ, M.; HERNÁNDEZ, 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, 2012,

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

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

FORIM, M.R. **Estudo Fitoquímico do Enxerto de Azadirachta indica sobre a Melia azadirach: Quantificação de substâncias Inseticidas**. 2006. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, São Paulo, 2006.

FREITAS, L.S. **Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente uva e caracterização química dos compostos extraídos**. 2007. Tese (Doutorado em Química)- Universidade federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, 2007.

GARCIA, C.C.; FRANCO, P.I.B.M.; ZUPPA, T.O.; ANTONIOSI FILHO, A.; LELES, M.I.G. Thermal stability studies of some cerrado plants oils. **J. Therm. Anal Calorim.**, n.87, p.645-648, 2007.

GELETNEKY, C.; BER, S. The Mechanism of Ozonolysis Revisited by 17O-NMR Spectroscopy. **Eur. J. Org. Chem**, n. 8, p. 1625-1627, 1998.

GUERRA-BLANCO, P.; POZNYAK, T.; CHAIREZ, I.; BRITO-ARIAS, M. Correlation of structural characterization and viscosity measurements with total unsaturation: An effective method for controlling ozonation in the preparation of ozonated grape seed and sunflower oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**, v.17, p. 988-998, 2015.

GIOIELLI, L.A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Rev. bras. Farmacogn**, v. 5, n. 2, 1996.

GUMIERO, V.C. **Estudos do efeito de respostas de hipersensibilidade do extrato de nim (*Azadirachta indica*) sobre culturas de células de *Rubus fruticosus***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

HANSLER, J.W.H. Beitrag zum Unterschied zwischen HOT and Ozontherapie mit dem Ozonosan. Erfahr hk 1976. In: JORGE, R.A.; RODRÍGUEZ, Y.L.; RODRÍGUEZ, A.C.; RUIZ, J.A.A. Producción científica sobre aplicaciones terapêuticas del ozono em el Web of Science. **Acimed**, v.14, n.1, 2006.

HOULLOU, L.M.; SOUZA, R.A.; SANTOS, E.C.P.; SILVA, J.J.P.; BARBOSA, M.R.; SAUVÉ, J.P.G.; HARAND, W. Clonal Propagation Of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) ia Direct And Indirect In Vitro Regeneration. **Rev. Árvore**, v.39, n.3, p.439-445, 2015.

IMMICH, A.P.S. **Remoção de corantes de efluentes têxteis utilizando folhas de *Azadirachta indica* como adsorvente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2008.

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

IRFAN, M.; GLASNOV, T.N.; KAPPE, C.O. Continuous Flow Ozonolysis in a Laboratory Scale Reactor. **Org. Lett.**, v. 13, n.5, 2011.

IORIO, F.B.R.D., LIBERATORE, A.M.A., KOH, I.H.J., OTANI, C., CAMILO, F.F. Ozonated Mineral Oil: Preparation, Characterization and Evaluation of the Microbicidal Activity. **Ozone: Science & Engineering**, n. 38, p. 1-8, 2016.

KOGAWA, N.R.A.; ARRUDA, E.J.; MICHELETTI, A.C.; MATOS, M.F.C.; OLIVEIRA, L.C.S.; LIMA, D.P.; CARVALHO, N.C.P.; OLIVEIRA, P.D.; CUNHA, M.C.; OJEDAD, M.; BEATRIZ, A. Synthesis, characterization, thermal behavior, and biological activity of ozonides from vegetable oils. **RSC Adv.**, n. 5, p. 65427–65436, 2015.

LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D.A.; QUALE, J. Polymyxins Revisited. **Clin Microbiol Rev.**, v.21, n.3, p. 449–465, 2008.

LOKANADHAN, S.; MUTHUKRISHNAN, P.; JEYARAMAN, S. Neem products and their agricultural applications Agricultural applications of neem Products. **JBiopest**, n.5, p.72-76, 2012.

MACIEL, M.V; MORAIS, S.M; BEVILAQUA, C.M.L.; SILVA, R.A.; BARROS, R.S.; SOUSA, R.N.; SOUSA, L.C.; MACHADO, L.K.A.; BRITO, E.S.; SOUZA-NETO, M.A. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 1, p. 7-11, 2010.

MAK-MENSAH, E.E.; FIREMPONG, C.K. Chemical characteristics of toilet soap prepared from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil. **Asian J. Plant Sci.**, v.1 n. 4, p.1-7, 2011.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.**, v.84, n.3, p.257-62, 2009.

MOUREU, S.; VIOLLEAU, F.; HAIMOUD-LEKHAL, D.A.; CALMON, A. Ozonation of sunflower oils: Impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. **Chem. Phys. Lipids**, v.186, p.79–85, 2015.

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

NEVES, E.J.M. Importância dos Fatores Edafo-climáticos para o Uso do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em Programas Florestais e Agroflorestais nas Diferentes Regiões do Brasil. **Bol. Pesq. FI**, n.49, p. 99-107, jul/dez, 2004.

NEVES, E.J.M.; CARPANEZZI, A.A. O Cultivo do Nim para Produção de Frutos no Brasil. **Circular técnica**, 2008. Disponível em: [http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/315642/1/circtec162.pdf]. Acesso em: 05, março de 2017.

NOGALES, C.G.; FERRARI, P.H.; KANTOROVICH, E.O.; LAGE-MARQUES, J.L. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry. **J Contemp Dent Pract**, v.9, n.4, 2008.

OGBUEWU, I.P.; ODOEMENAM, V.U.; OBIKAONU, H.O.; OPARA, M.N.; EMENALOM, O.O.; UCHEGBU, M.C.; OKOLI, I.C.; ESONU, B.O.; ILOEJE, M.U. The Growing Importance of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in Agriculture, Industry, Medicine and Environment: A Review. **Res. J. Med. Plant**, v.5, n.3, p. 230-245, 2011.

OLIVEIRA, A.R.M.; WOSCH, C.L. Ozonólise: a busca por um mecanismo. **Quim. Nova**, v.35, n.7, p. 1482-1485, 2012.

OLIVEIRA, J.T.C. **Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em feridas**. 2007. Dissertação (Mestrado em enfermagem)- Universidade de São Paulo, 2007.

OMONOV, T.S.; KHARRAZ, E.; CURTIS, J.M. Ozonolysis of Canola Oil: A Study of Product Yields and Ozonolysis Kinetics in Different Solvent Systems. **J Am Oil Chem Soc**, v. 88, n. 5, p. 689–705, 2011.

ORNUM, S.G.V.; CHAMPEAU, R.M.; PARIZA, R. Ozonolysis Applications in Drug Synthesis. **Chem. Rev.**, v.106, 2990-3001, 2006.

PAES, J.B.; SOUZA, A.D.; LIMA, C.R.; SANTANA, G.M. Rendimento e Características Físicas dos Óleos de Nim (*Azadirachta indica*) e Mamona (*Ricinus communis*). **Floresta e Ambiente**, v. 22, n.1, 2015.

PALACIOS, D.A.B. P. **Ozonização e caracterização de óleos vegetais para uso dermatológico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, São Paulo, 2010.

PARROTA, J. A.; CHATURVEDI, A. N. *Azadirachta indica* A. Juss. In: FRANCIS, J. K.; LOWE, C. A. (Ed.). **Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y de las Indias Occidentales**. Rio Piedras: USDA, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, p. 65-72, 2016.

PELEG, A.Y.; HOOPER, D.C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **N. Engl. J. Med.**, v.13, n.19, p. 1804-1813, 2010.

PIEREZANA, L.; CABRAL, M.R.P.; MARTINS NETO, D.; STROPA, J.M.; OLIVEIRA, L.C.S.; SCHARF, D.R.; SIMIONATTO, E.L.; SILVA, R.C.L.; SIMIONATTO, E. Composição química e temperatura de cristalização de ésteres

obtidos de quatro óleos vegetais extraídos de sementes de plantas do cerrado. **Quim. Nova**, n.3, p.328-332, 2015.

PINTO, J.S.S.; LANÇAS, F.M. Hidrólise do óleo de *Azadirachta indica* em água subcrítica e determinação da composição dos triacilglicerídeos e ácidos graxos por cromatografia gasosa de alta resolução a alta temperatura e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. **Quim. Nova**, v. 33, n.2, p.394-397, 2010.

POLITI, J.R.S.; MATOS, P.R.R.; SALES, M.J.A. Comparative study of the oxidative and thermal stability of vegetable oils to be used as lubricant bases. **J. Therm Anal Calorim**, n.111, p.1437-1442, 2013.

POPESCU, R.; COSTINEL, D.; DINCA, O.R.; MARINESCU, A.; STEFANESCU, I.; IONETE, R.E. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v.48, p.84-90, 2015.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, n. 1, 2013.

RODRIGUES, A.P.F. **Eficácia e segurança de polimixinas no tratamento de infecções por microrganismos produtores de carbapenemase: revisão da literatura.** Graduação (Graduação em farmácia)- Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

SADOWSKA, J.; JOHANSSON, B.; JOHANNESSEN, E.; FRIMAN, R.; BRONIARZ-PRESS, L.; ROSENHOLM, J.B. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. **Chem. Phys. Lipids**, v. 151, p. 85–91, 2008.

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

SEGA, A.; ZANARDI, I.; CHIASSERINI, L.; GABBRIELLI, A.; BOCCI, V.; TRAVAGLI, V., Properties of sesame oil by detailed ¹H and ¹³C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value and viscosity measurements. **Chem. Phys. Lipid**, n.163, p.148-156, 2011.

SHIMAMOTO, G.G.; FAVARO, M.M.A.; TUBINO, M. Simple Methods via Mid-IR or ¹H NMR Spectroscopy for the Determination of the Iodine Value of Vegetable Oils. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.26, n.7, p.1431-1437, 2015.

SILHAVY1, T.J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, v.2, n.5, p.1-16, 2010.

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

SIDIQUI, B.S., AFSHAN, F., GULZAR, T., SULTANA, R., NAQVI, S.N, TARIQ, R.M. Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica* and their insecticidal activities. **Chem. Pharm. Bull**, v.51, n. 4, 2003.

TAN, C.P.; CHEMAN, Y.B. Differential Scanning Calorimetric Analysis of Edible Oils: Comparison of Thermal Properties and Chemical Composition. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 77, n. 2, 2000.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BOCCI, V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. **Hind. Publis.Corporation.**, v.10, p. 1-9, 2010.

VILARINDO, M.C.; ANDREAZZI, M.A.; FERNANDES, V.S. Considerações Sobre o Uso da Ozonioterapia na Clínica Veterinária. In VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica, 2013, Centro Universitário Cesumar, **Anais Eletrônicos**, Maringá, Paraná, 2013. Disponível em :
<http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2013/oit_mostra/Matheus_Carmo_Vilari ndo.pdf>. Acesso em: 04/jan. 2013.

WOMACK, C.C.; MARTIN-DRUMEL, M.A.; BROWN, G.G.; FIELD, R.W.; MCCARTHY, M.C. Observation of the simplest Criegee intermediate CH₂OO in the gas-phase ozonolysis of ethylene. **Phys. sciences**, v.1, n. 2, p.1-6, 2015.

ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V.; GABBRIELLI, A.; CHIASSERINI, L.; BOCCI, V. Physico-Chemical Characterization of Sesame Oil Derivatives. **Lipids**, v.43, p.877–886, 2008.

7. ANEXOS

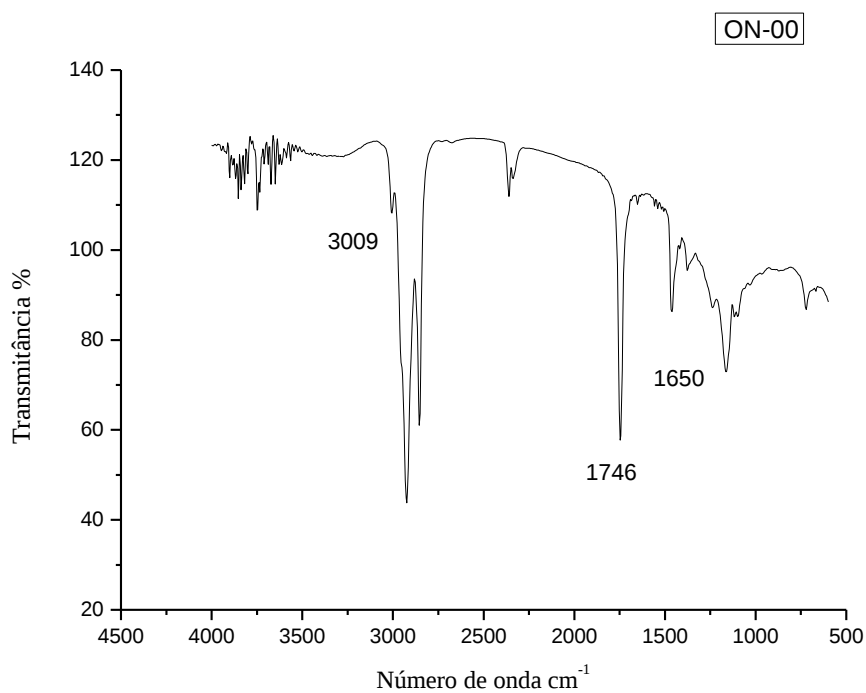


Figura E1. Espectro de IV do óleo de neem puro.

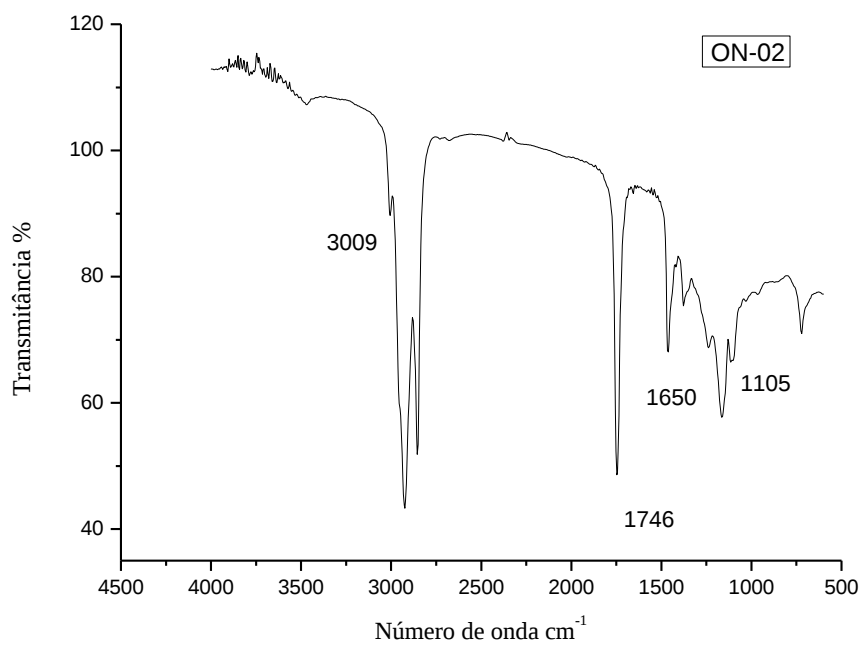


Figura E2. Espectro de IV do óleo neem ozonizado por 2 horas

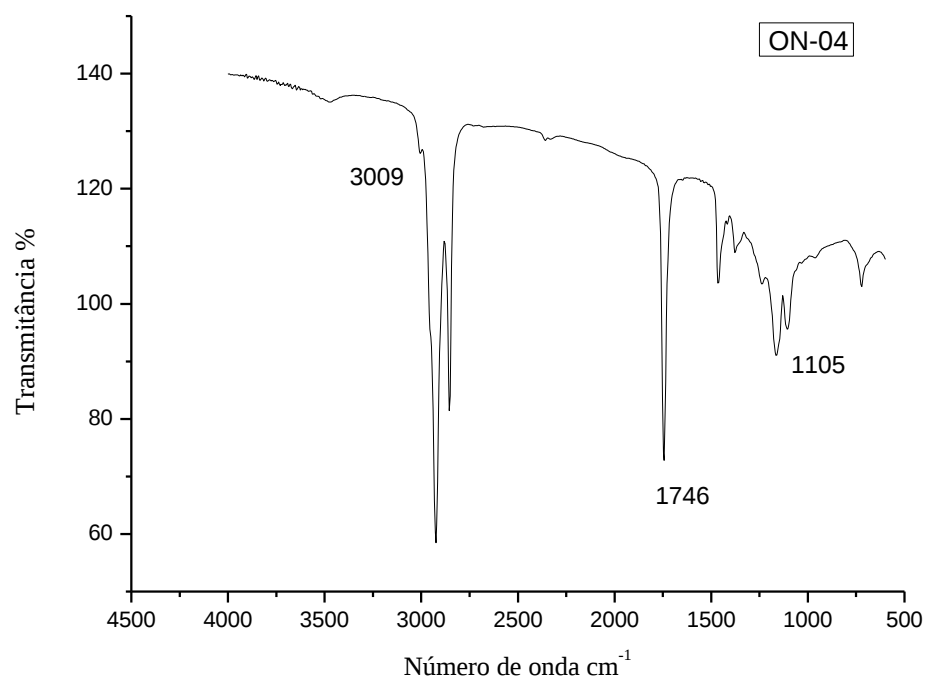


Figura E3. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 4 horas.

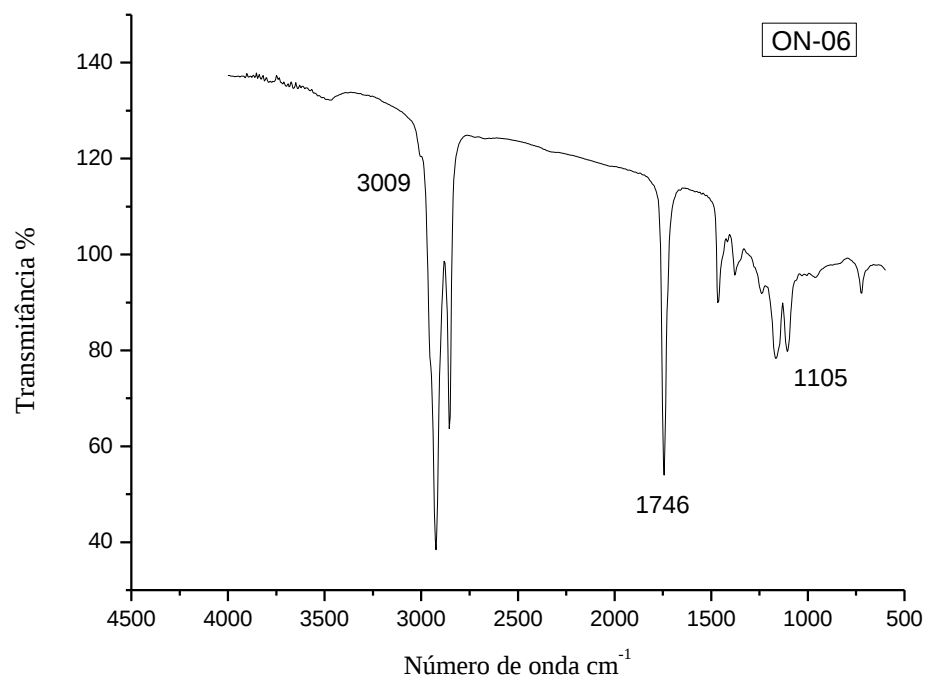


Figura E4. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 6 horas.

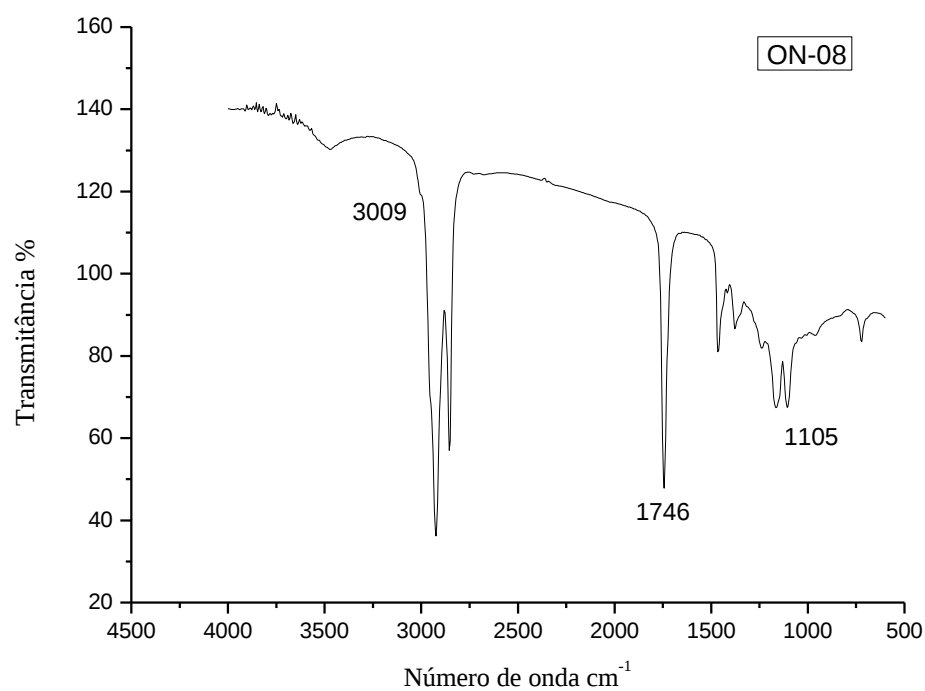


Figura E5. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 8 horas.

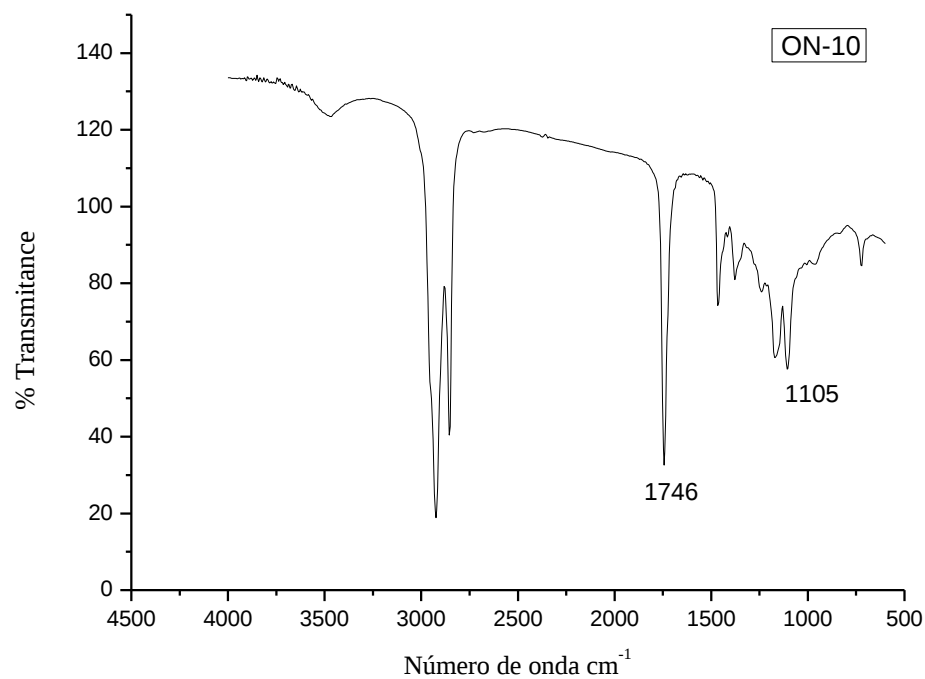


Figura E6. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 10 horas.

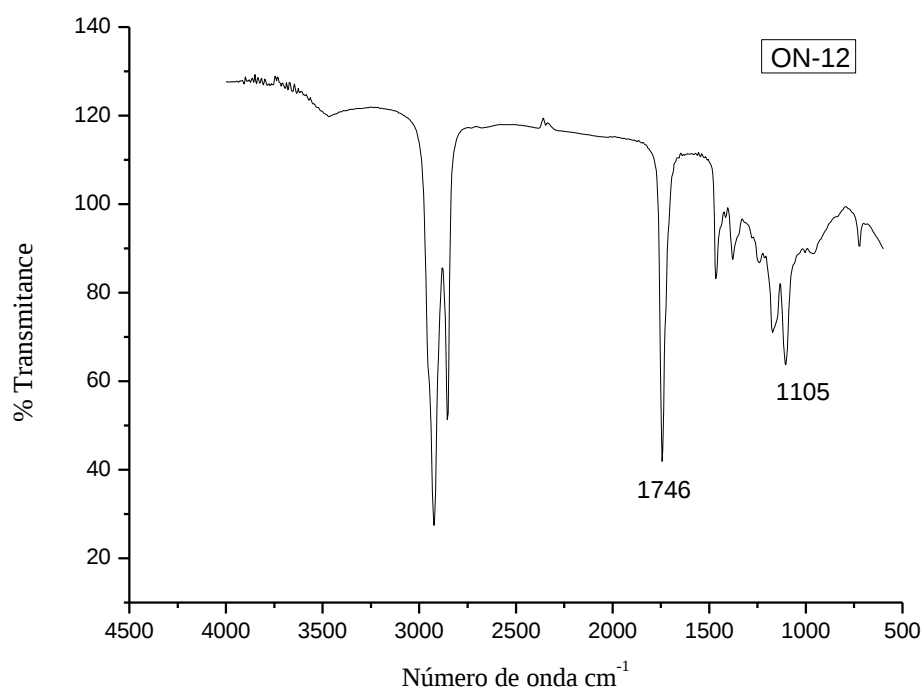


Figura E7. Espectro de IV do óleo de neem puro ozonizado por 12 horas.

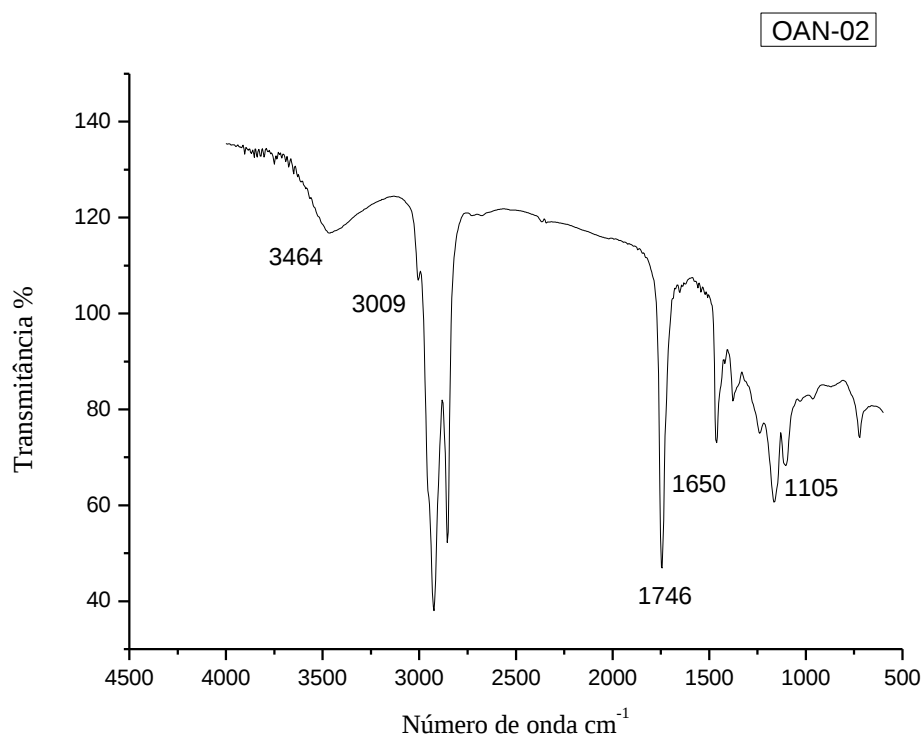


Figura E8. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água.

1006

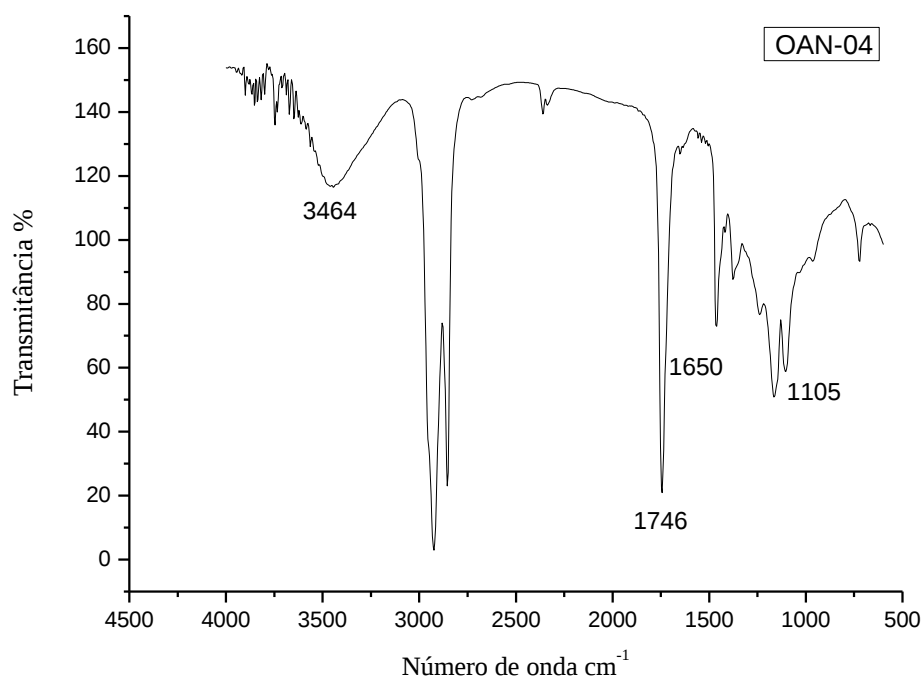


Figura E9. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água.

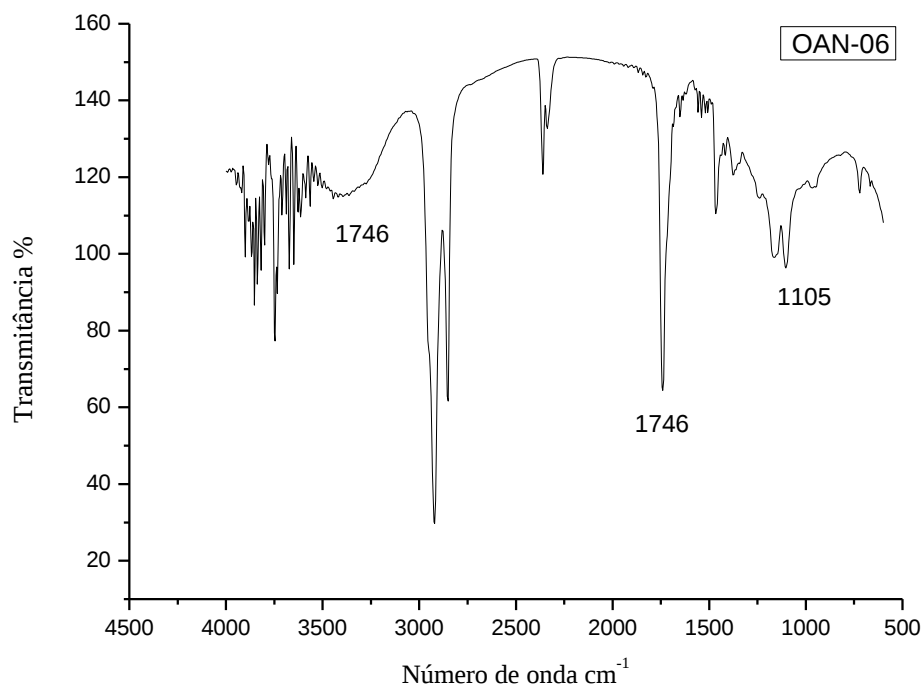


Figura E10. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água.

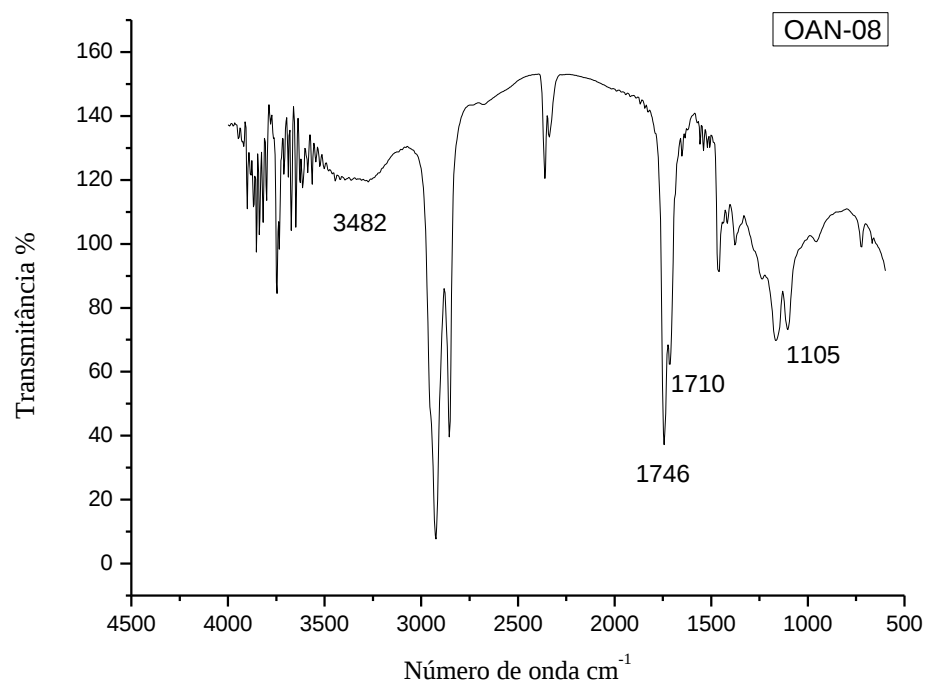


Figura E11. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 8 h com adição de água.

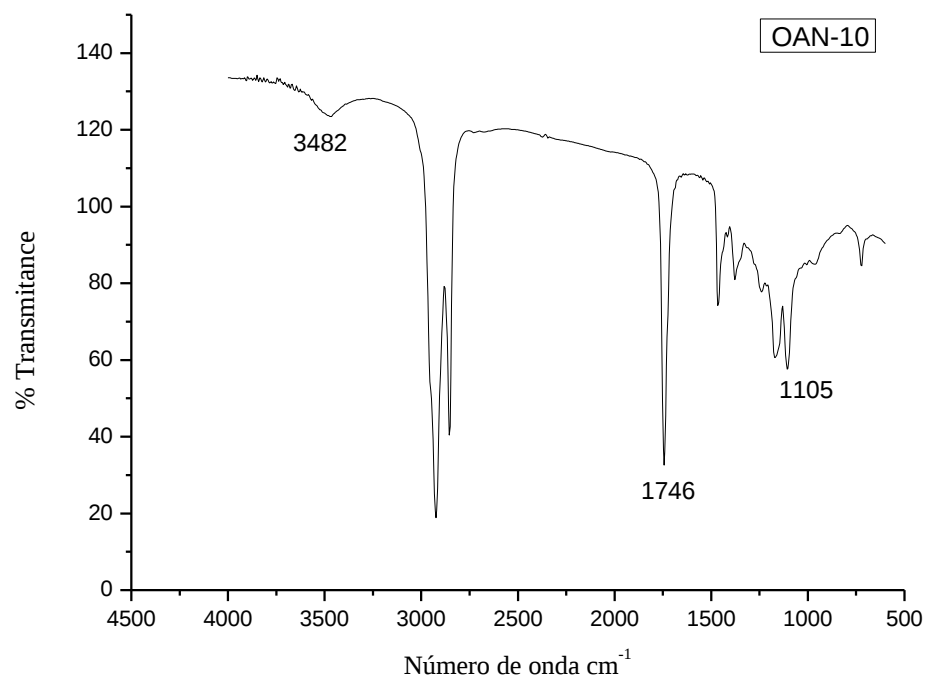


Figura E12. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água.

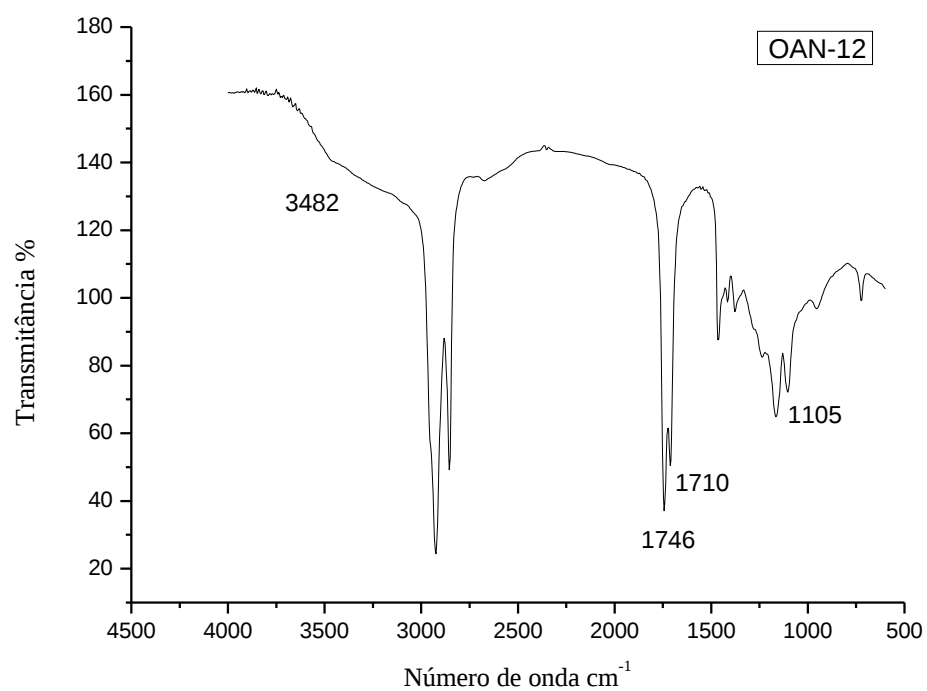


Figura E13. Espectro de IV do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água.

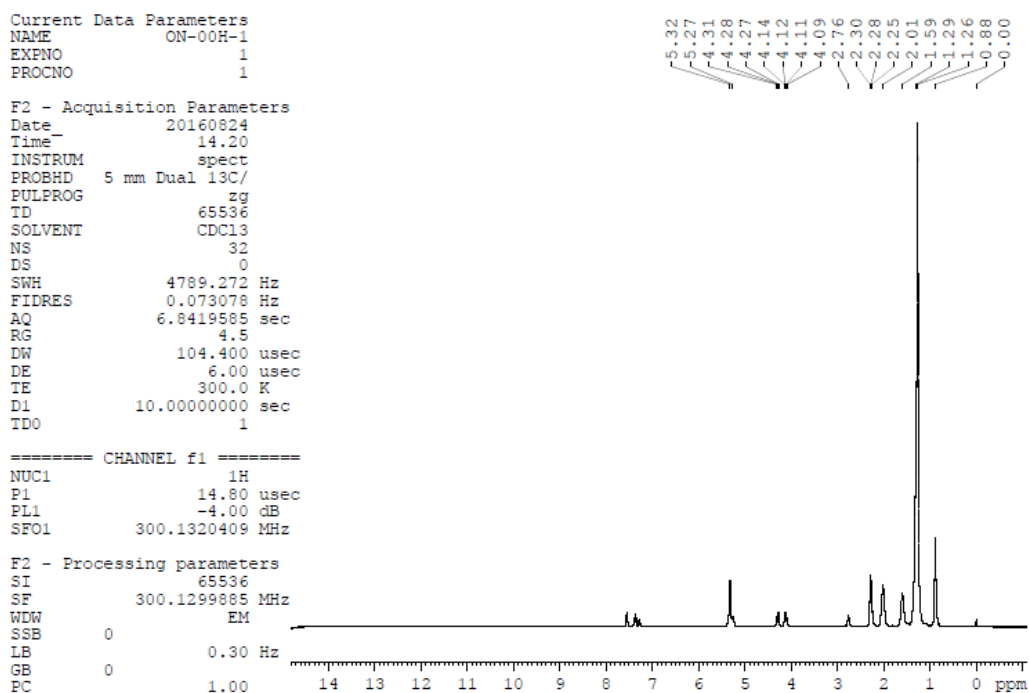


Figura E14. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem puro (ON-00).

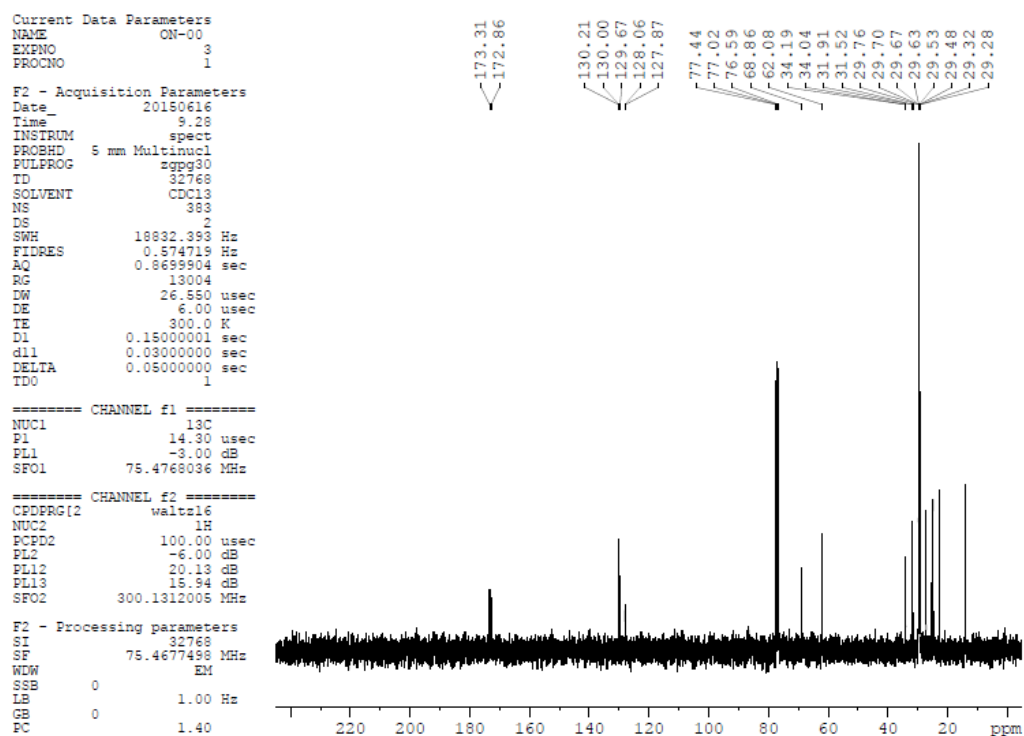


Figura E15. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem puro (ON-00).

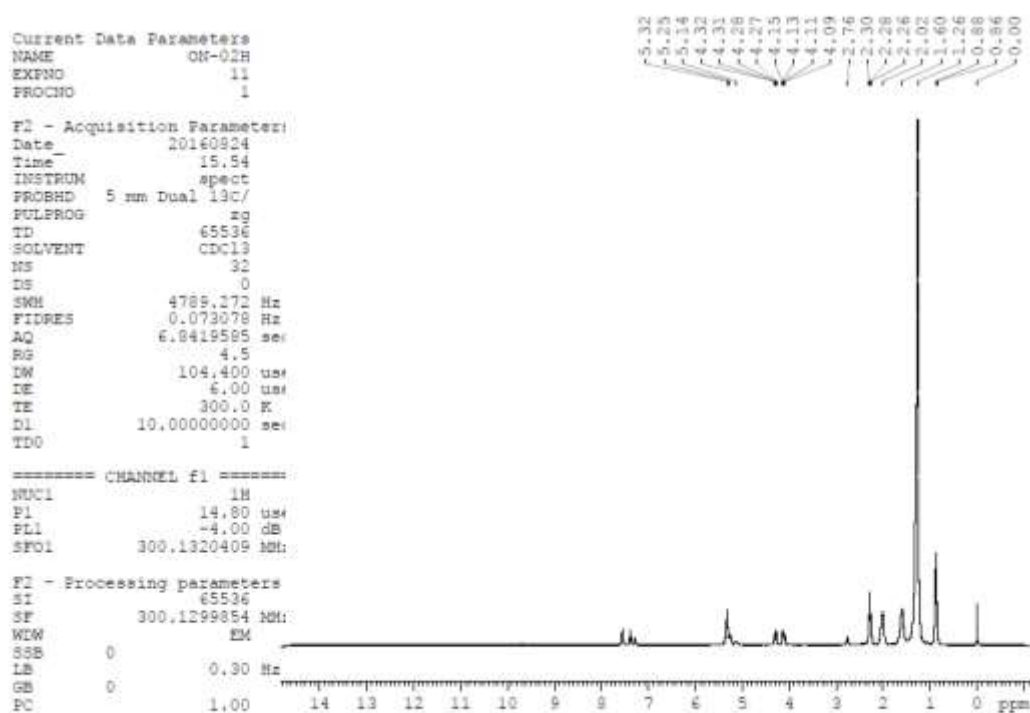


Figura E16. Espectro de RMN de ^1H do óleo ozonizado por 2 horas (ON-02).

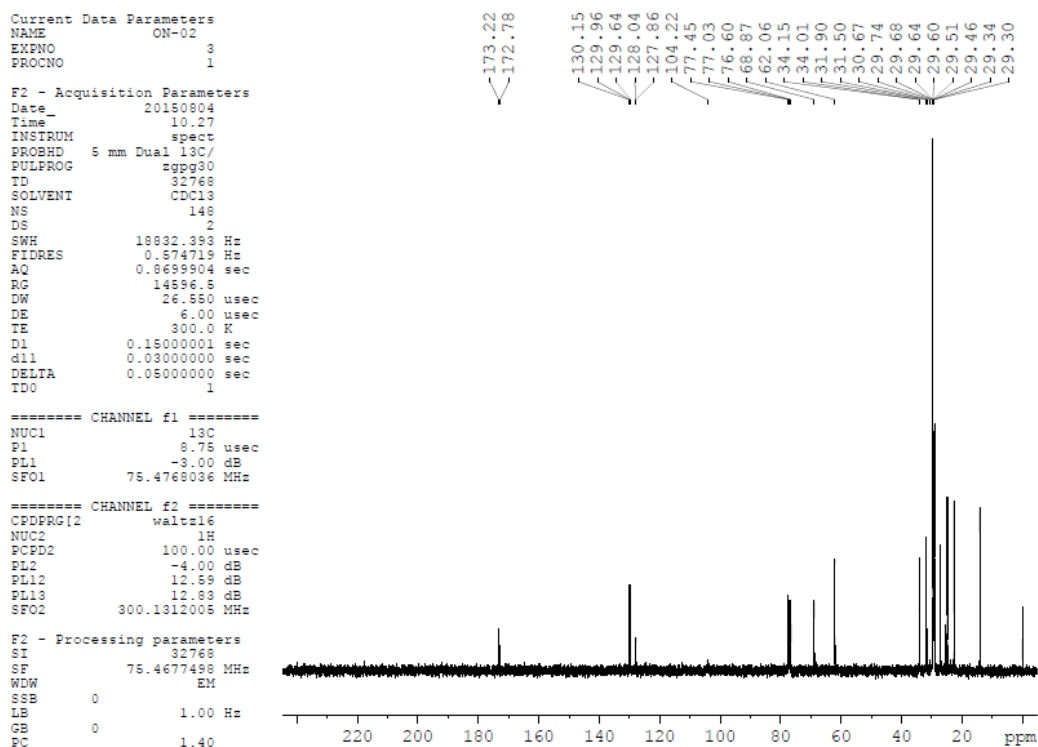


Figura E17. Espectro de RMN de ^{13}C ozonizado por 2 horas (ON-02).

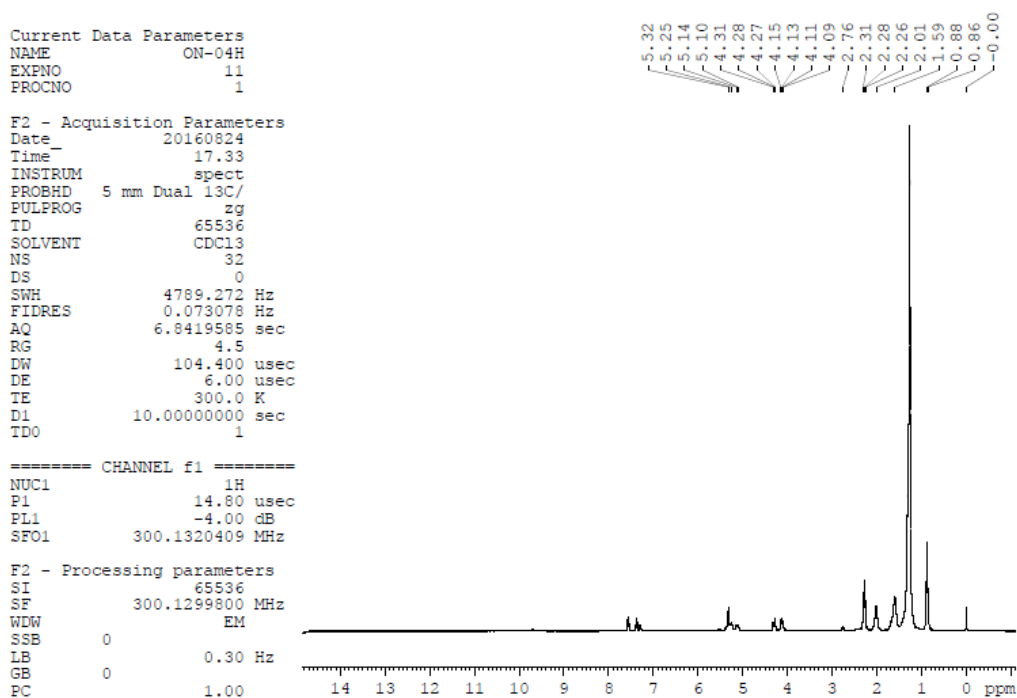


Figura E18. Espectro de RMN ^1H do óleo ozonizado por 4 horas (ON-04).

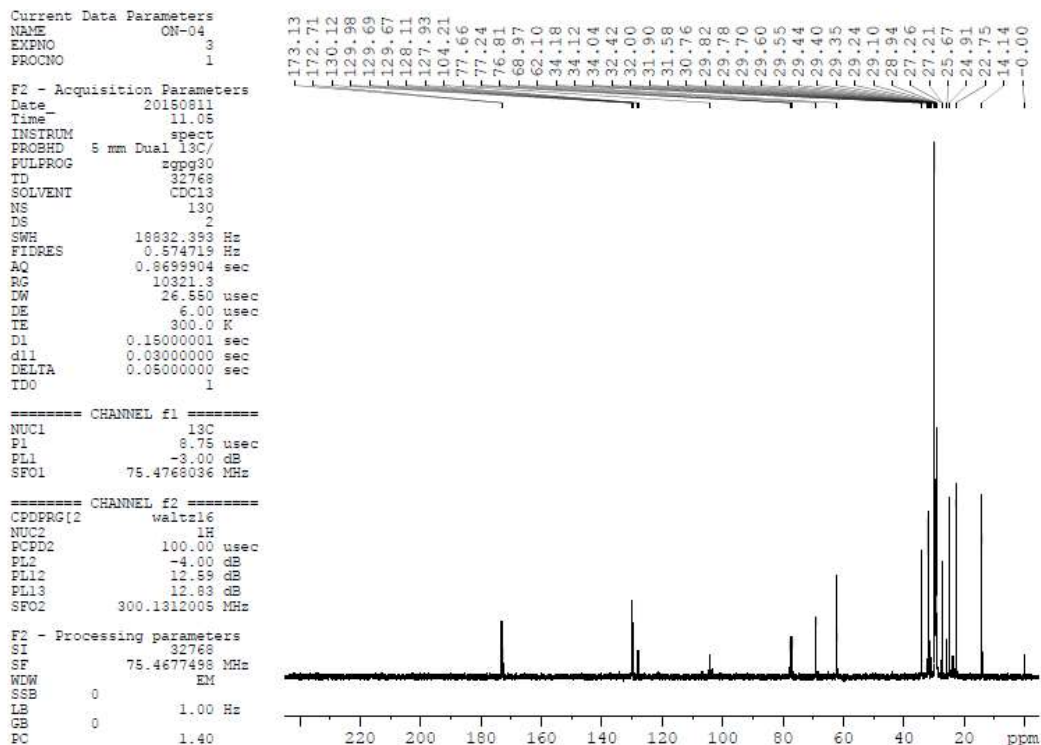


Figura E19. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 4 horas (ON-04).

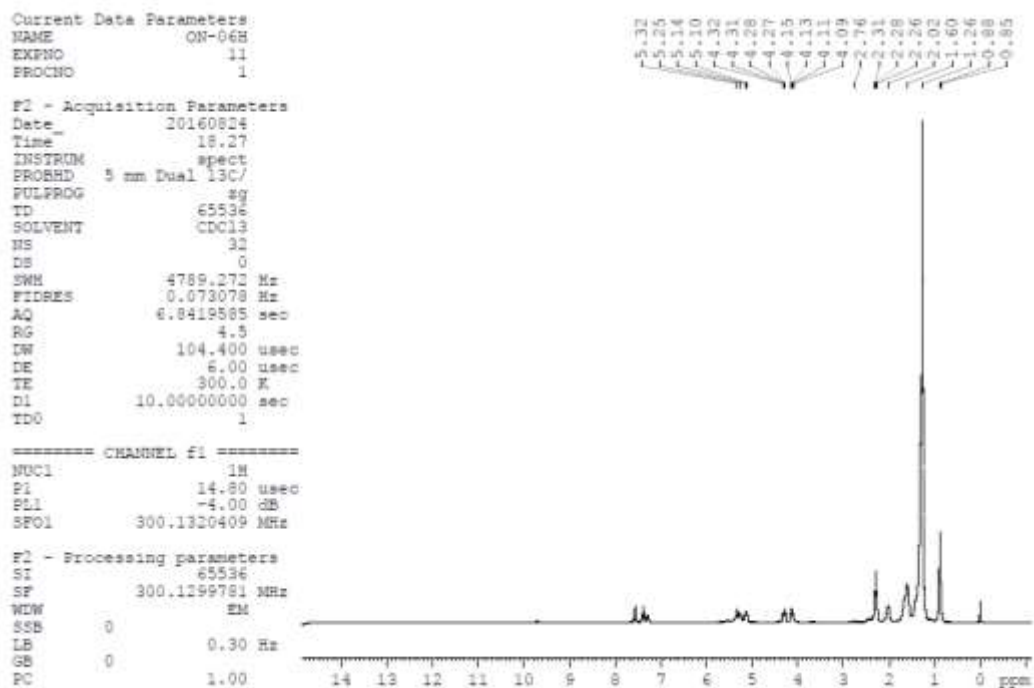


Figura E20. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 6 horas (ON-06).

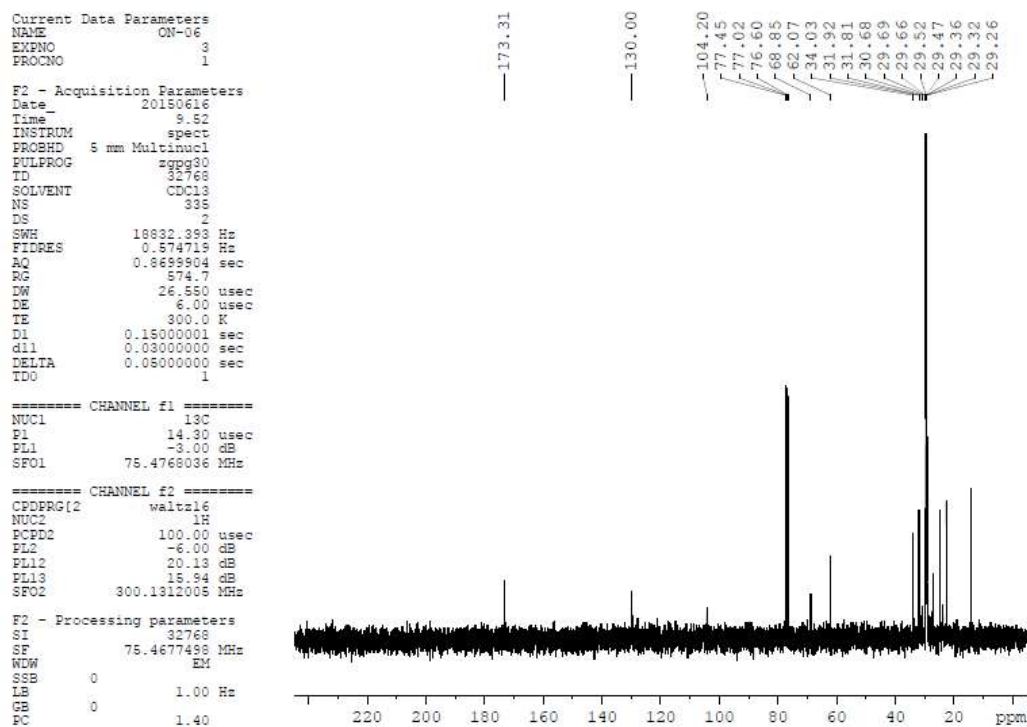


Figura E21. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 6 horas (ON-06)

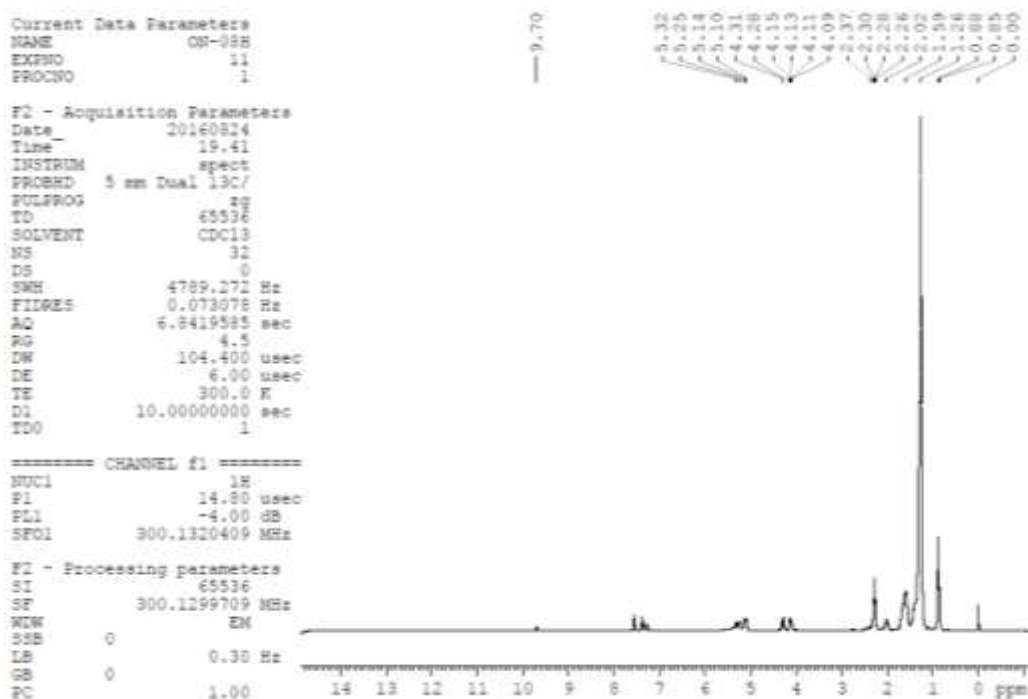


Figura E22. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 8 horas (ON-08)

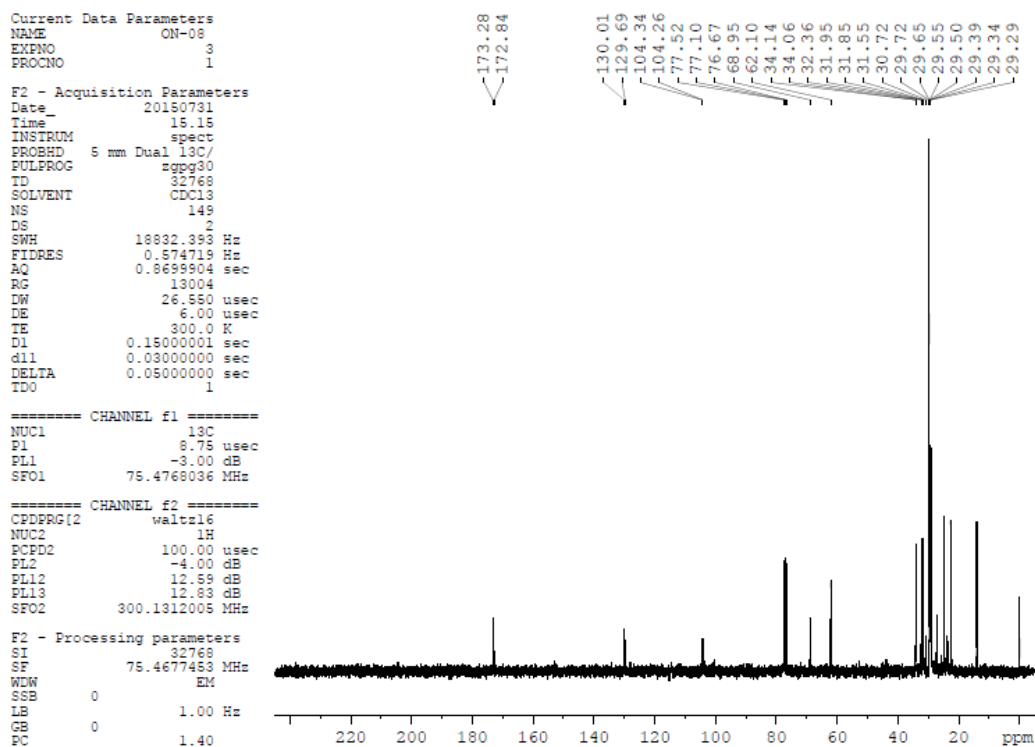
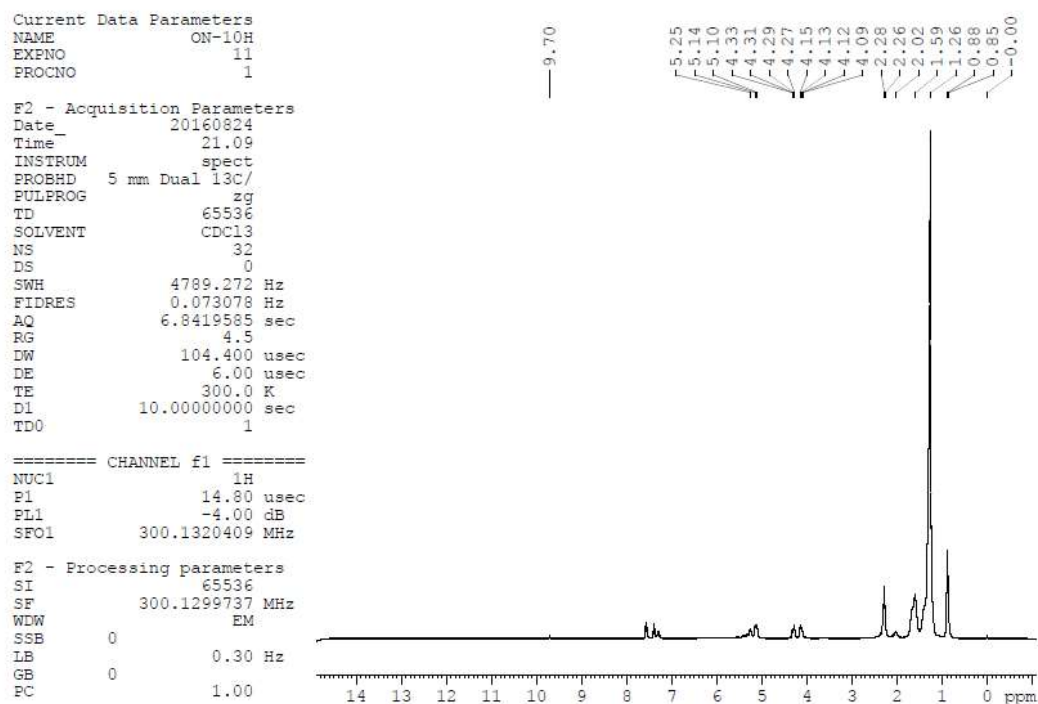


Figura E23. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 8 horas (ON-08).



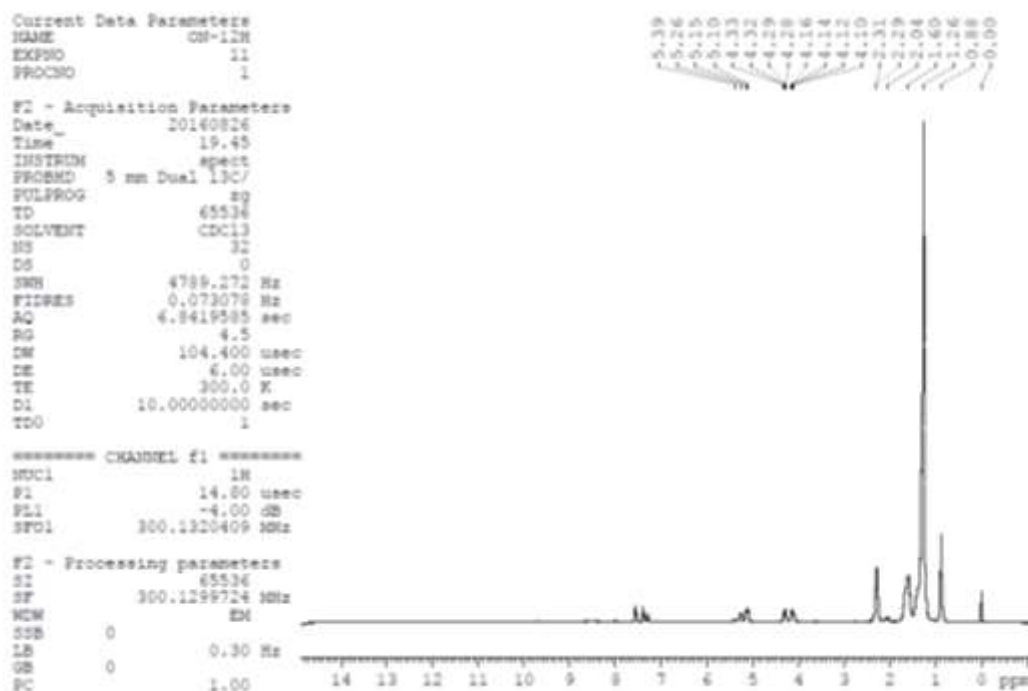


Figura E25. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 12 horas (ON-12).

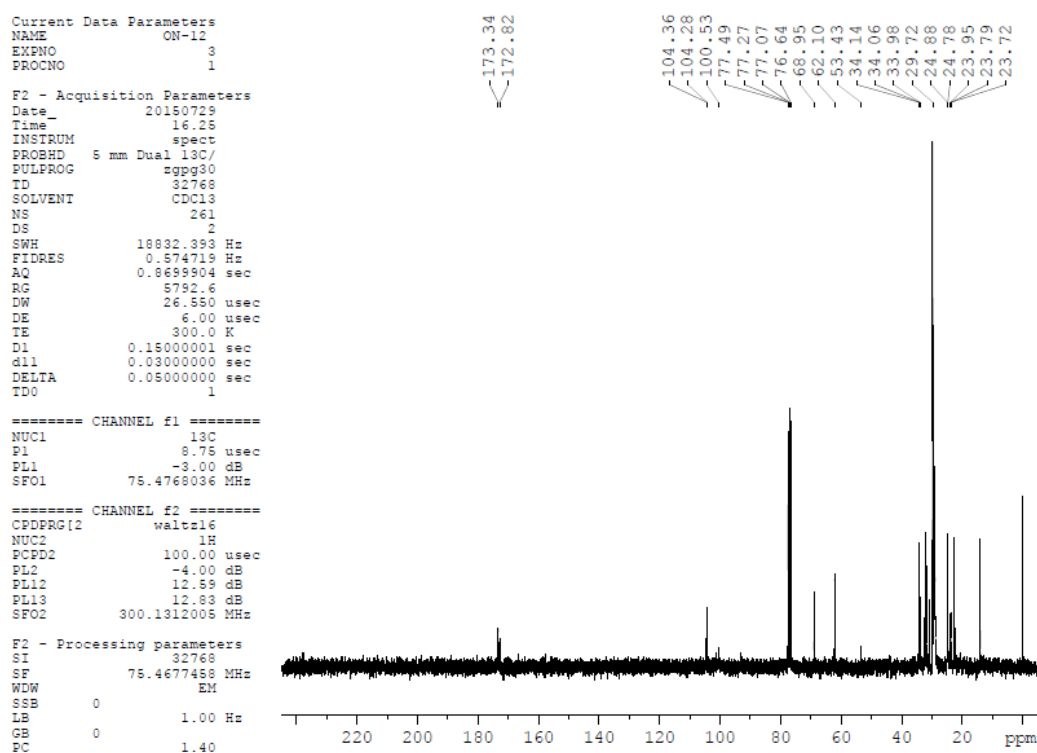


Figura E26. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 12 horas (ON-12).

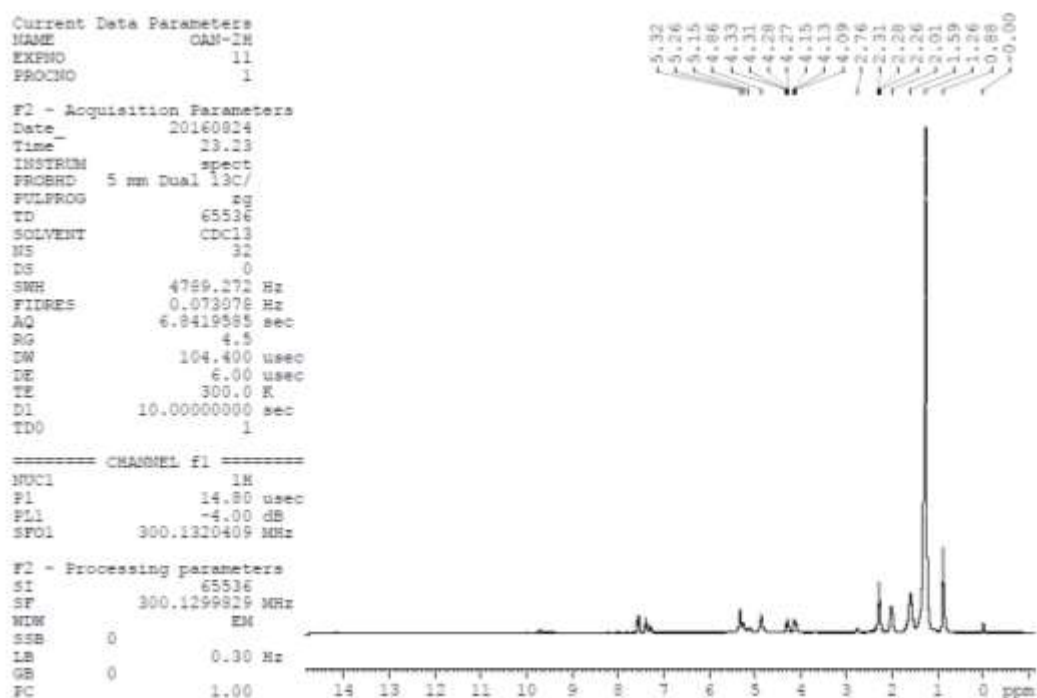


Figura E27. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água (OAN-02).

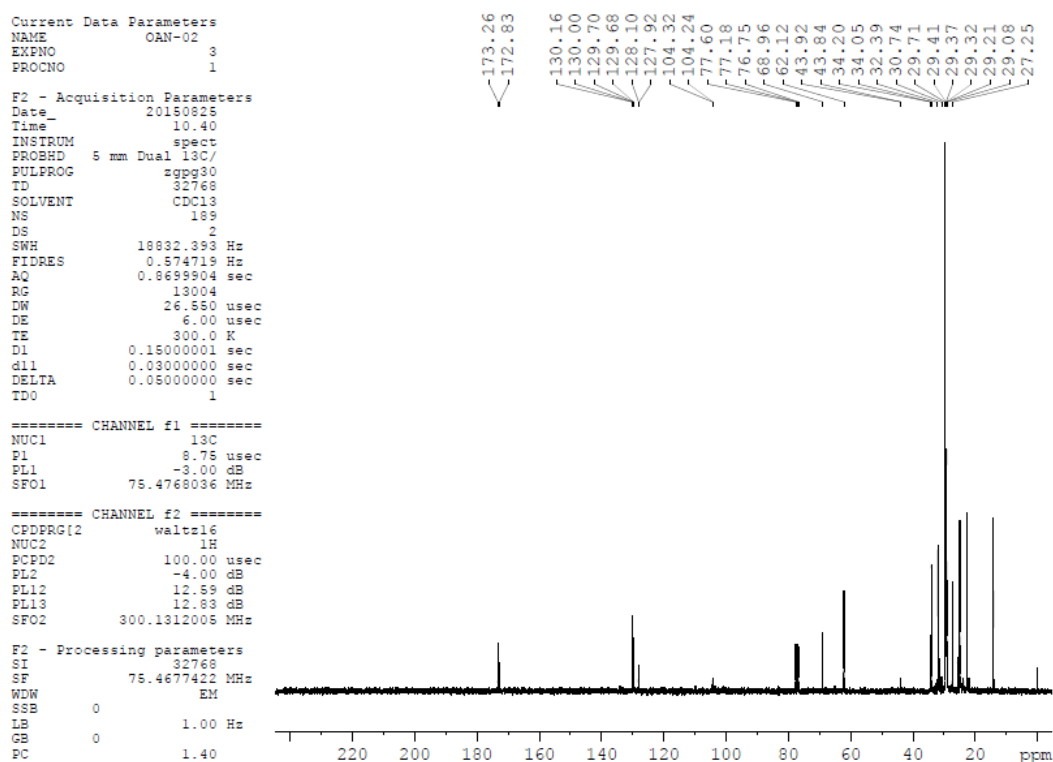


Figura E28. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água (OAN-02).

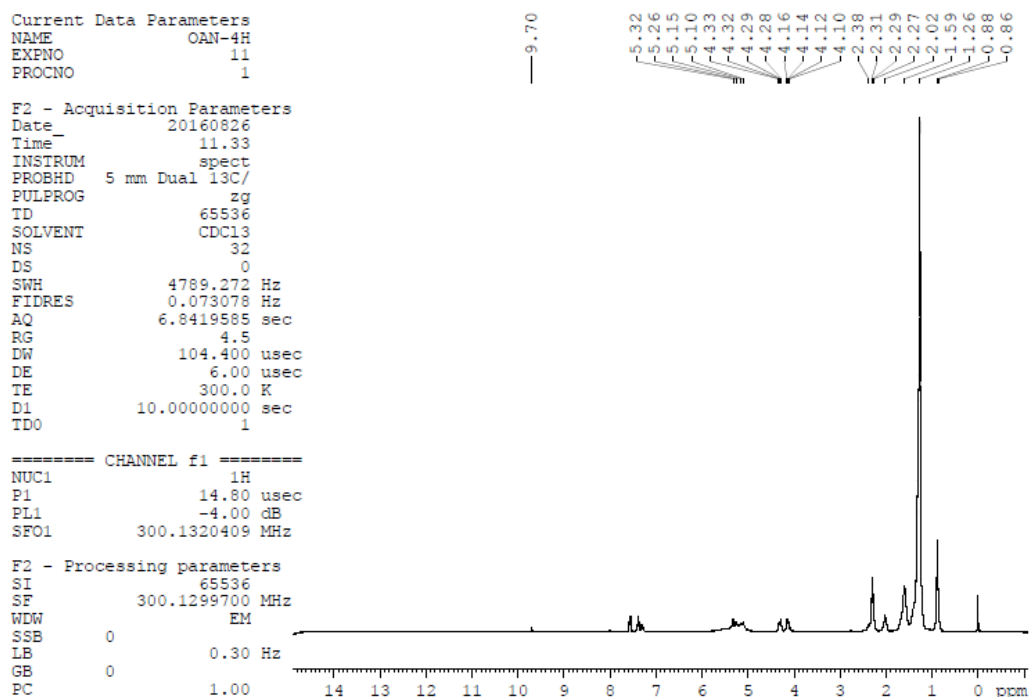


Figura E29. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água (OAN-04).

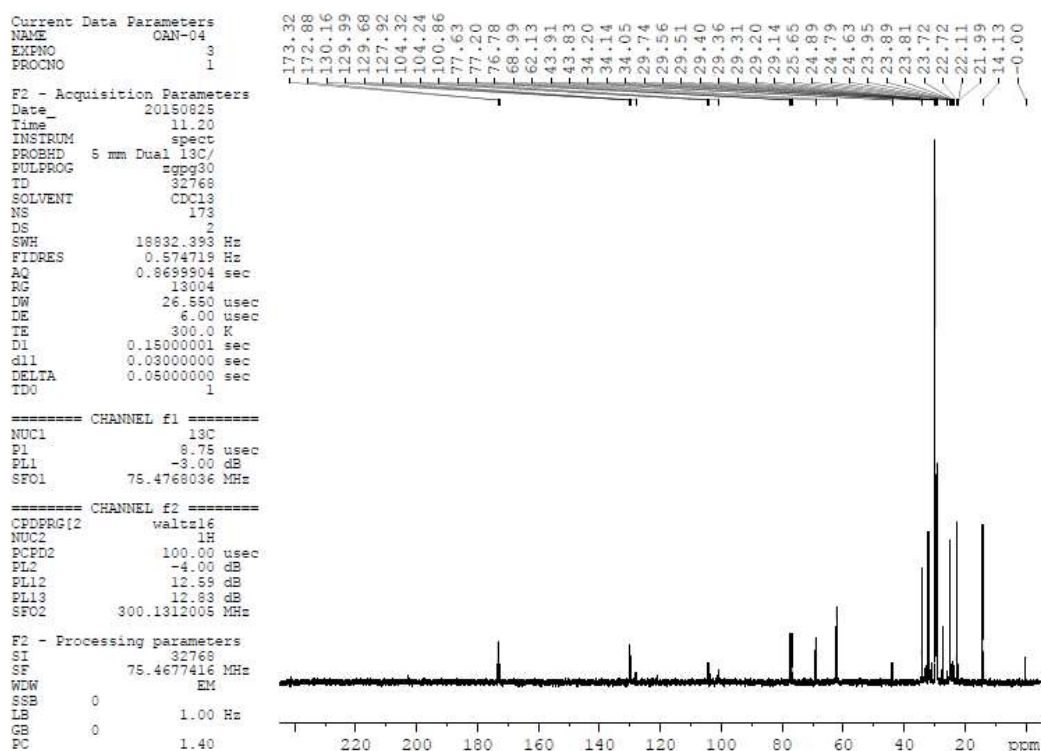


Figura E30. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água (OAN-04).

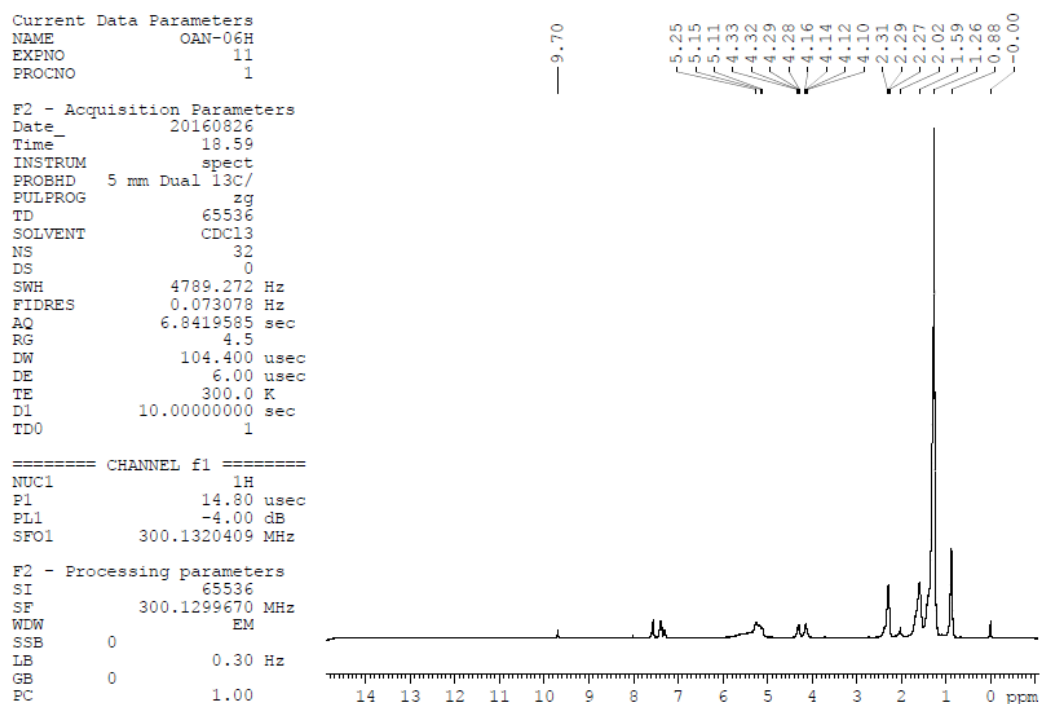


Figura E31. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água (OAN-06).

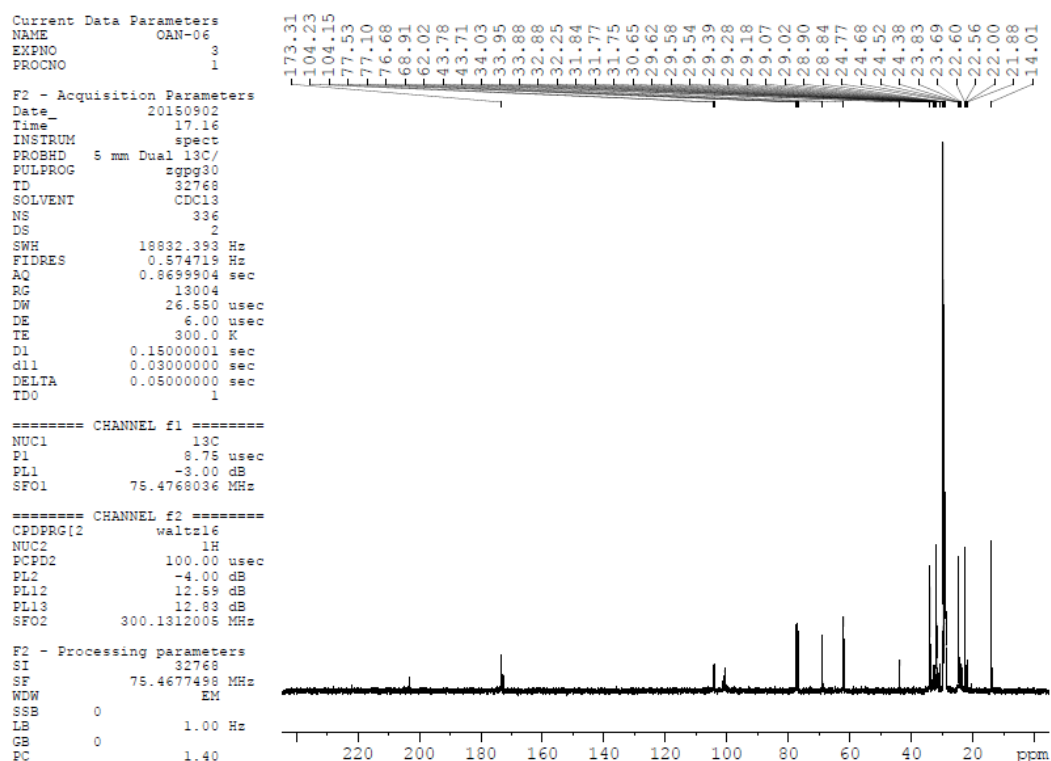


Figura E32. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água (OAN-06).

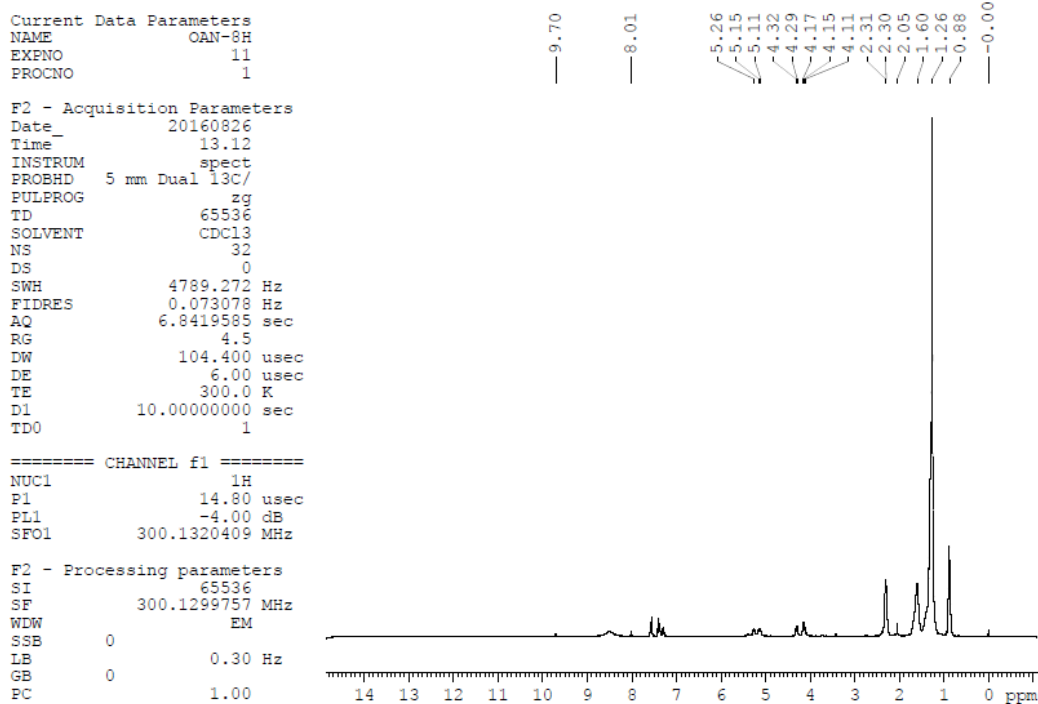


Figura E33. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 8 horas com adição de água (OAN-08).

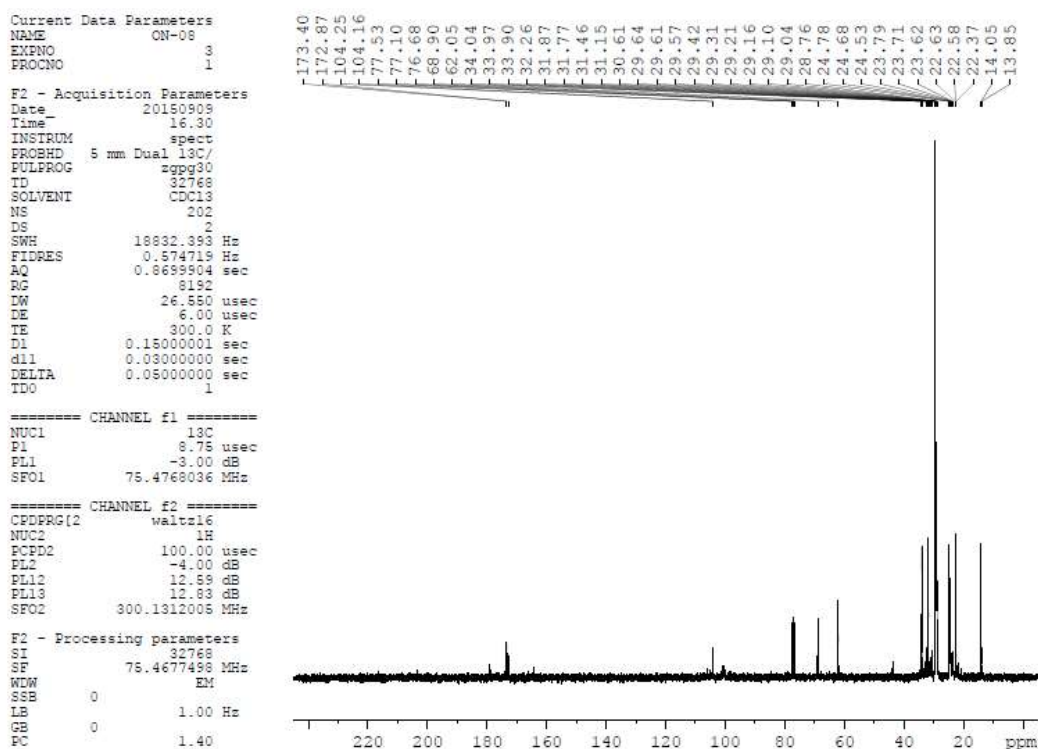


Figura E34. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 8 horas com adição de água (OAN-08).

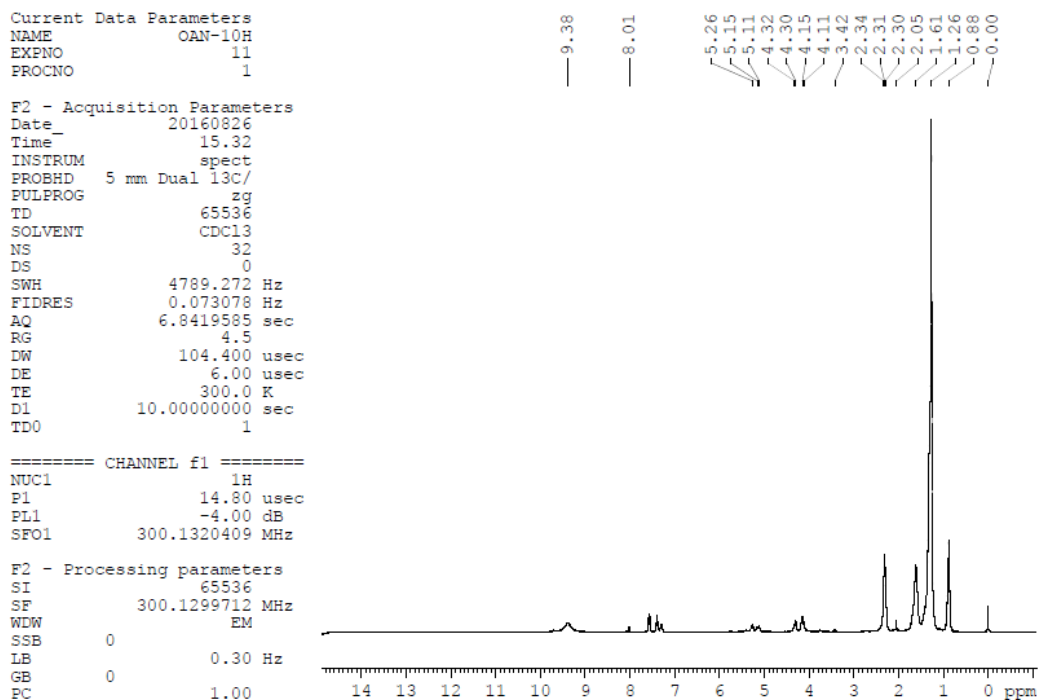


Figura E35. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água (OAN-10).

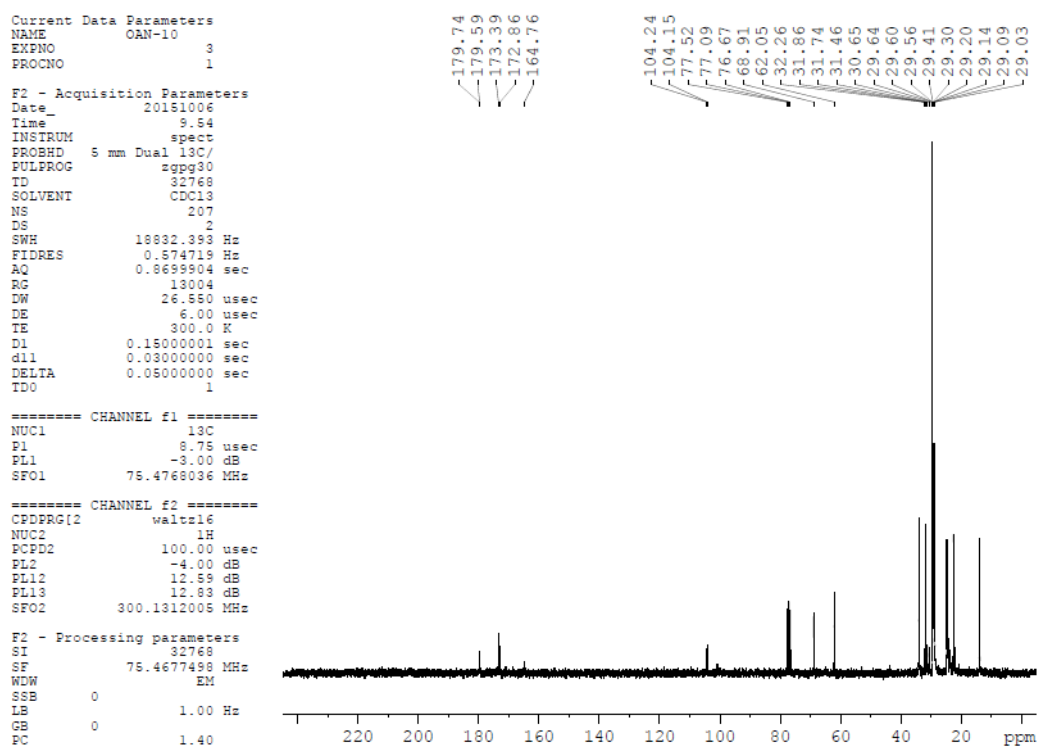


Figura E36. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água (OAN-10).

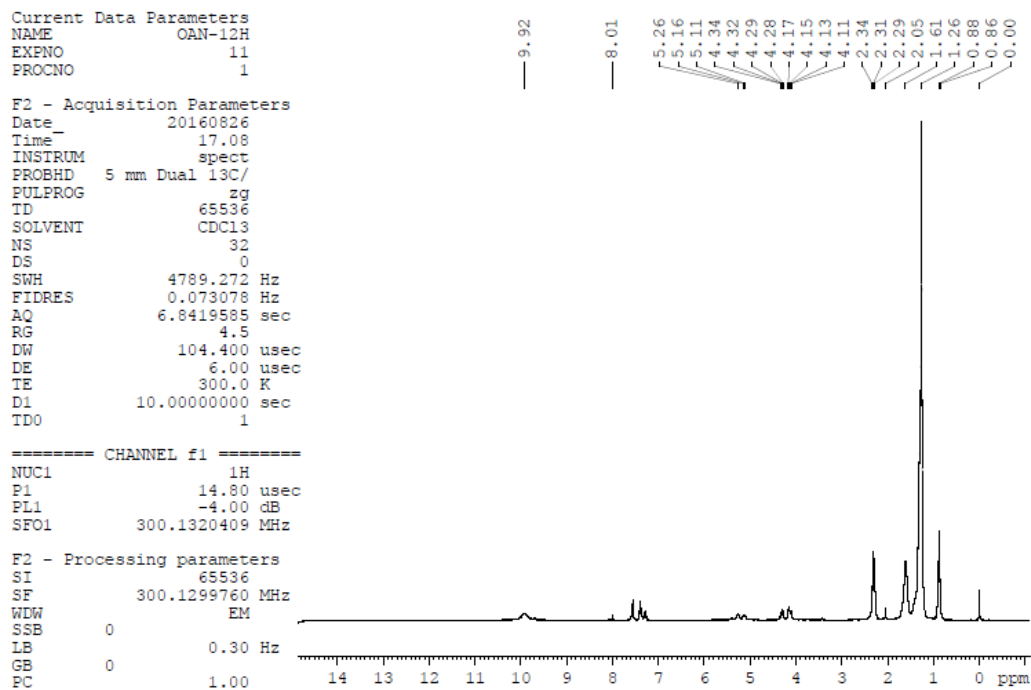


Figura E37. Espectro de RMN de ^1H do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água (OAN-12).

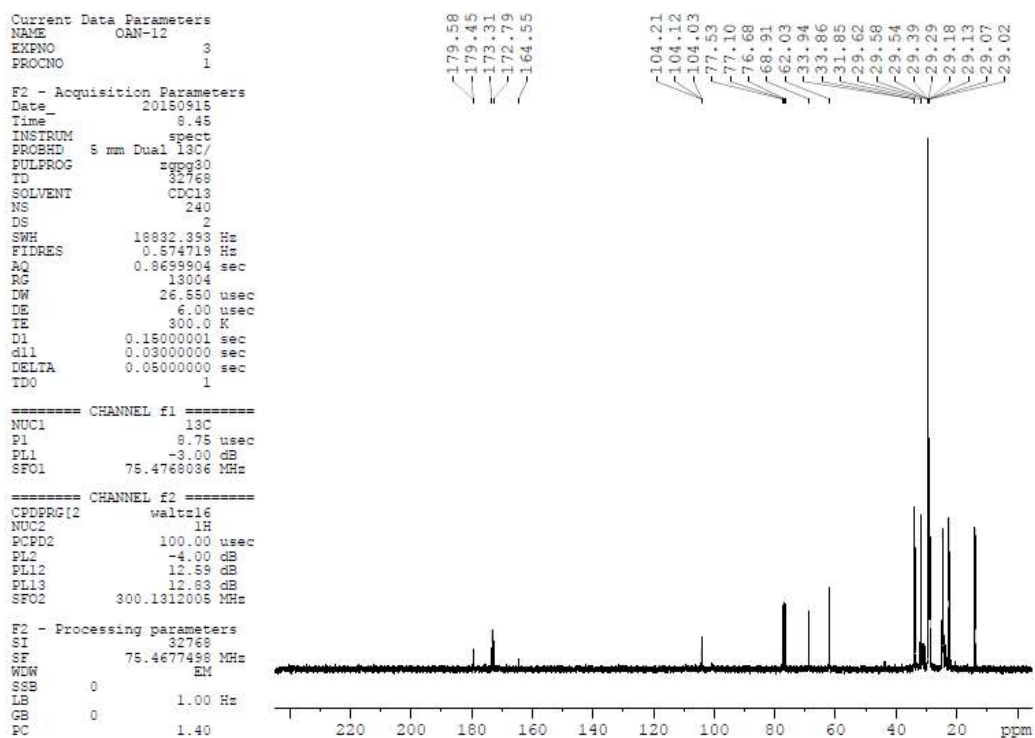


Figura E38. Espectro de RMN de ^{13}C do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água (OAN-12).

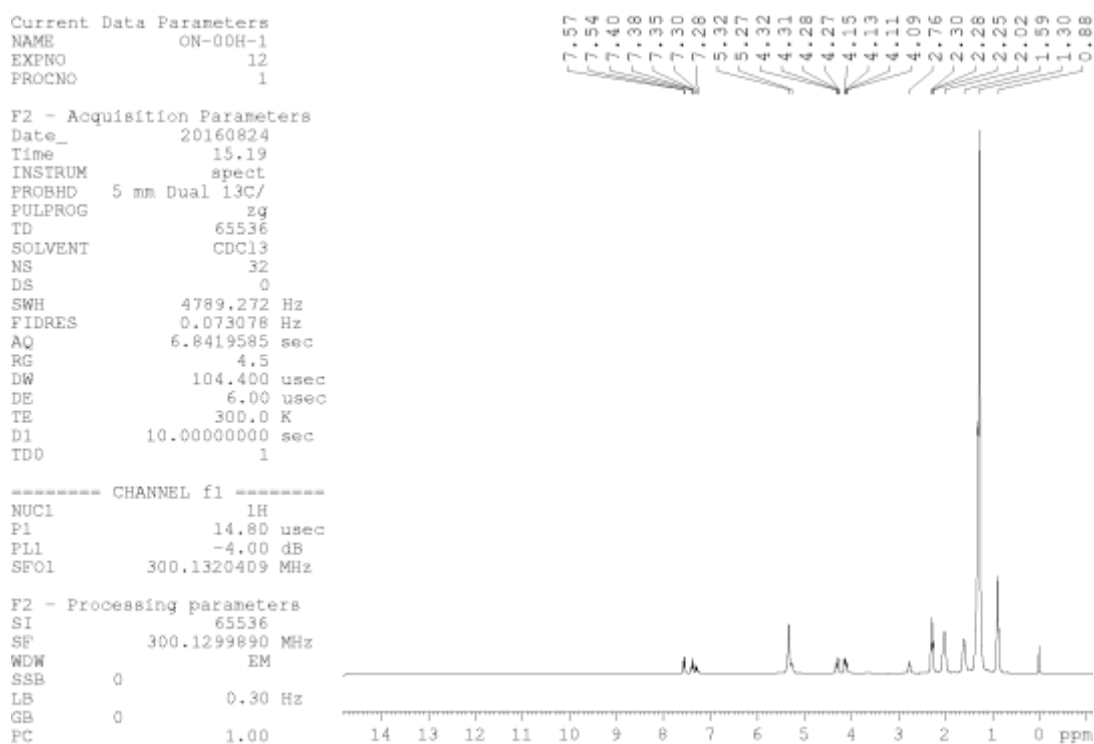
RMN de ^1H Quantitativo ^1H 

Figura E39. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem (ON-00).

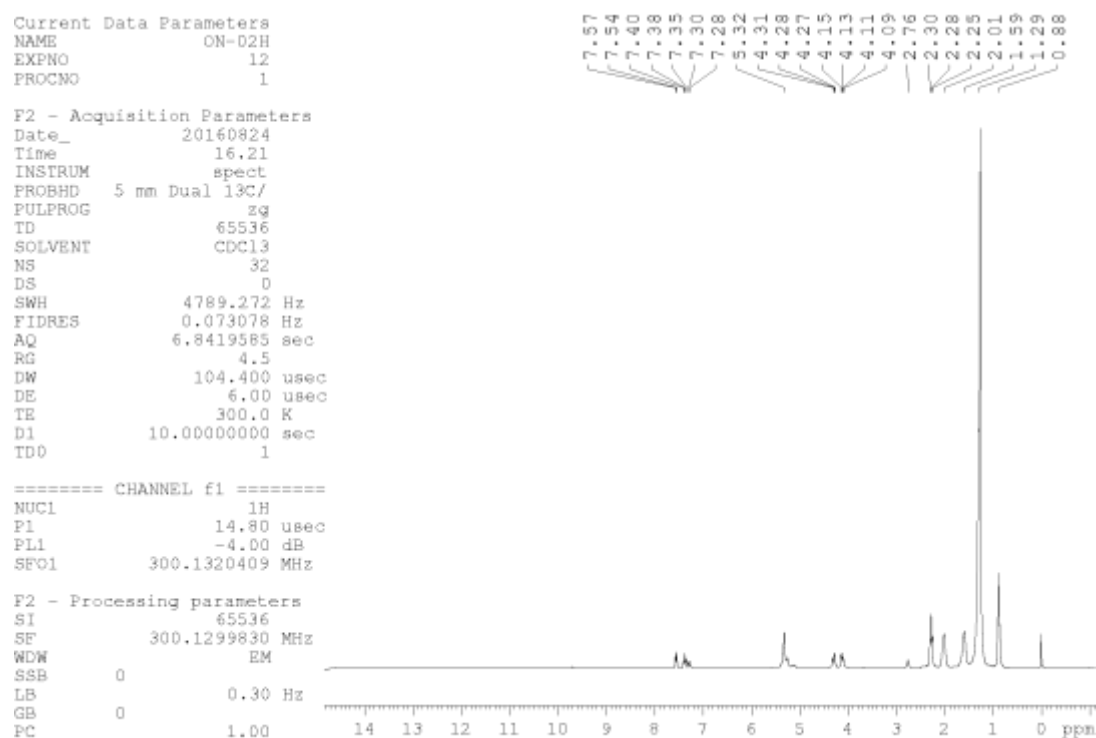


Figura E40. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 2 horas (ON-02).

7. ANEXOS

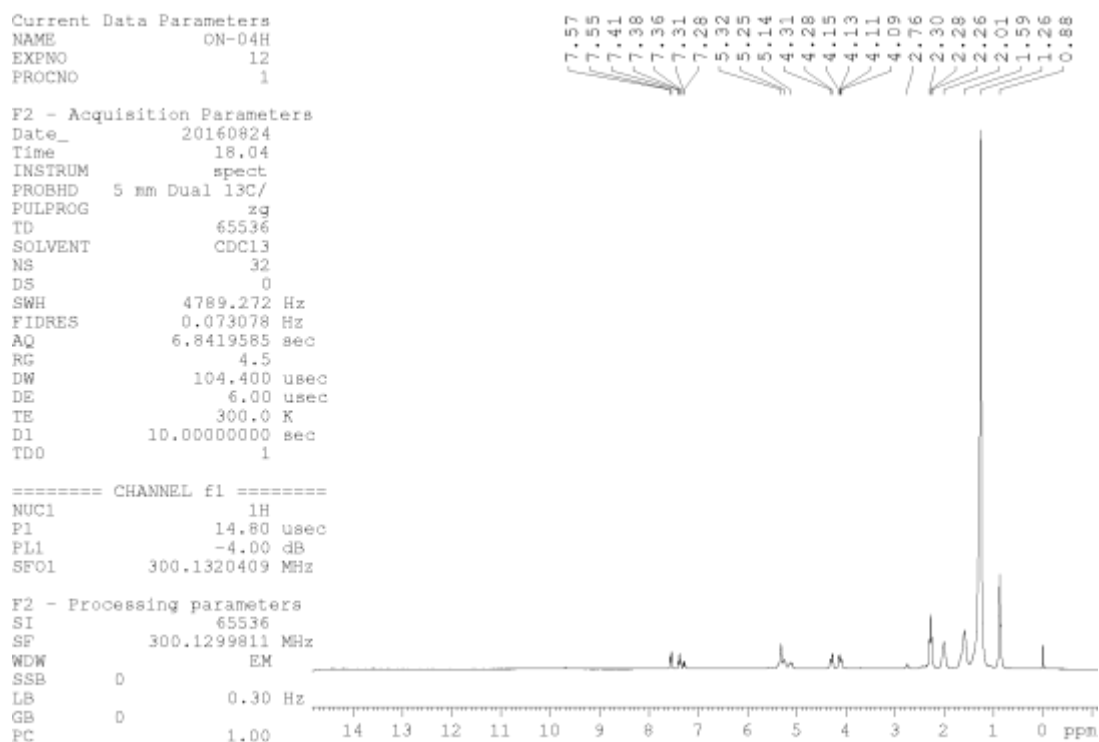


Figura E41. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 4 horas (ON-04).

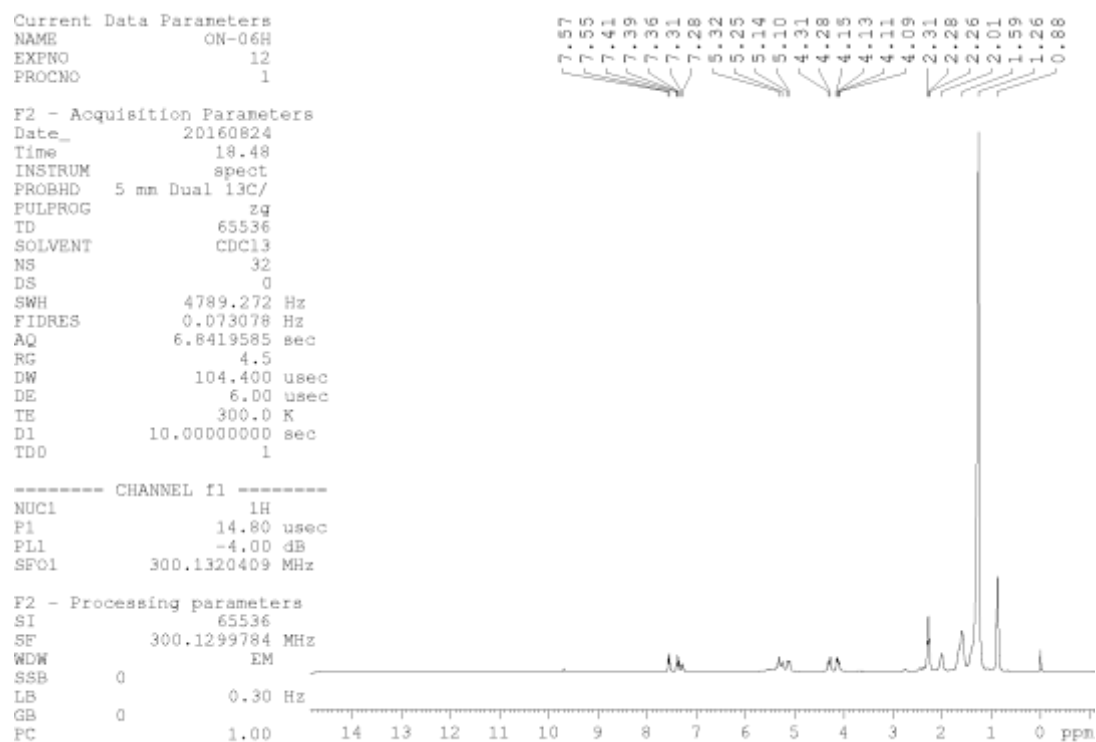


Figura E42. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 6 horas (ON-06).

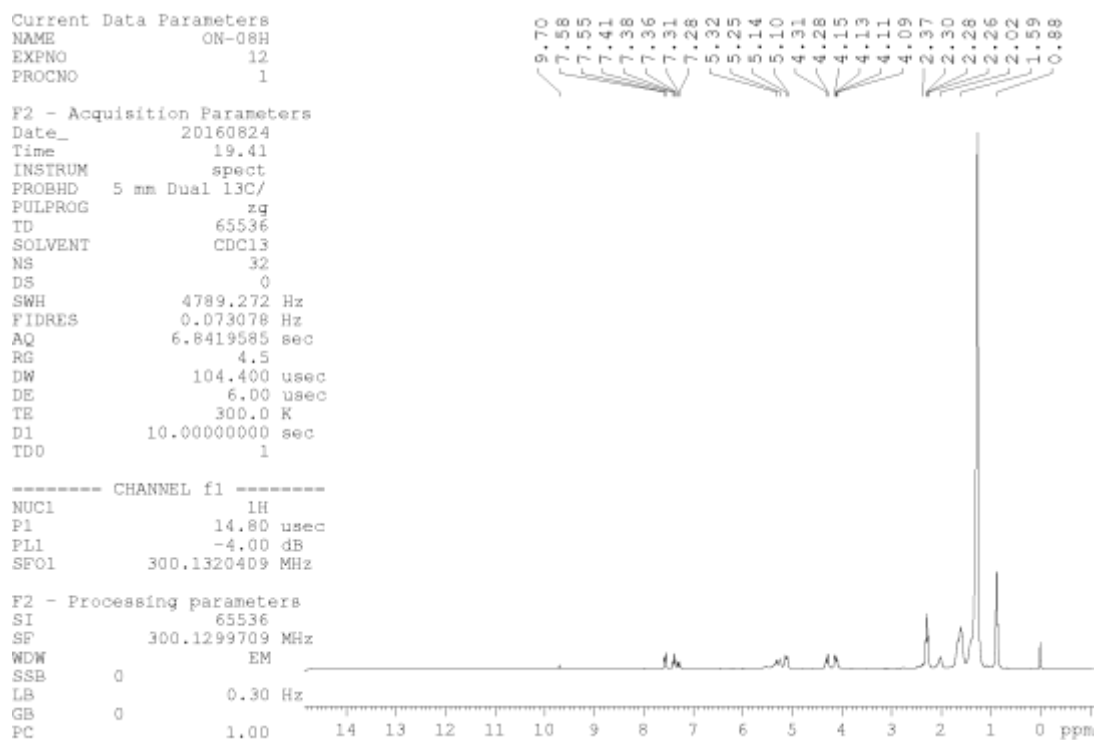


Figura E43. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 8 horas (ON-08).

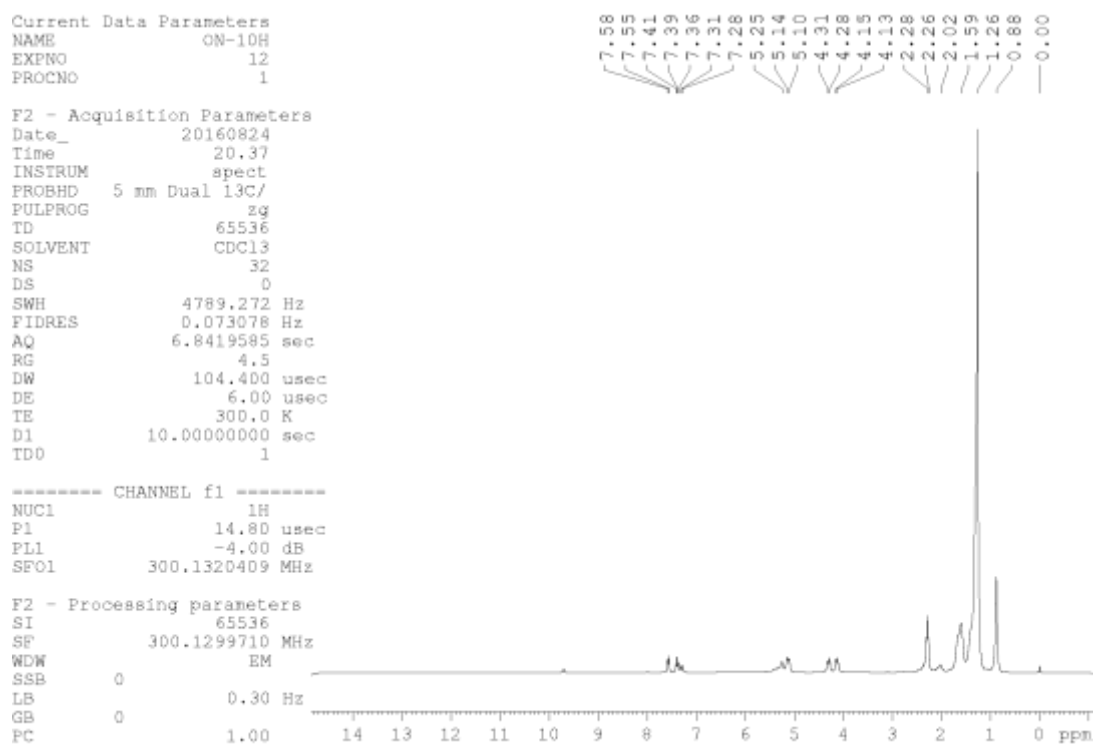


Figura E44. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 10 horas (ON-10).

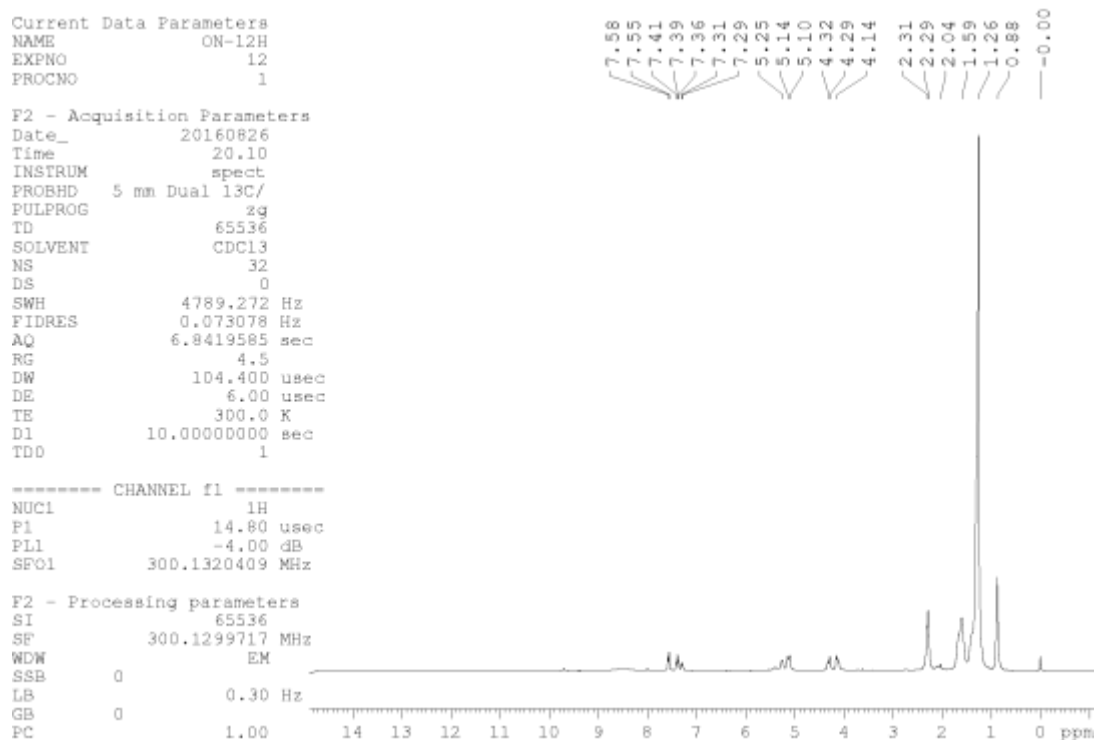


Figura E45. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 12 horas (ON-12).

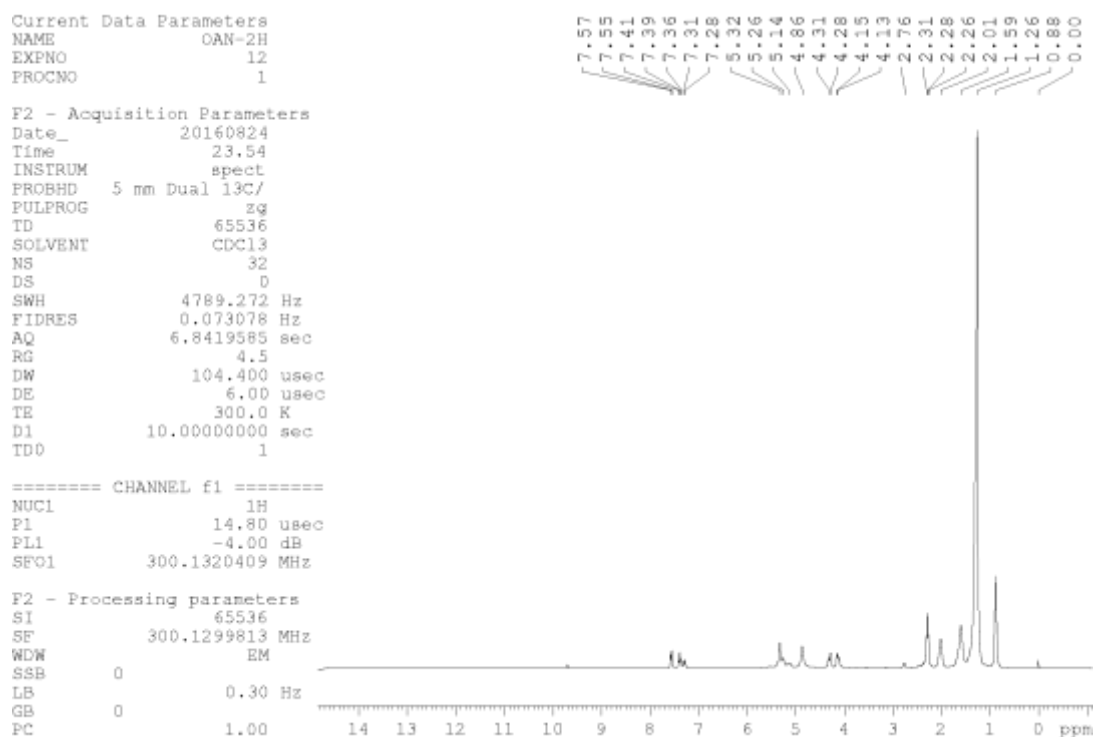


Figura E46. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 2 horas com adição de água (OAN-02).

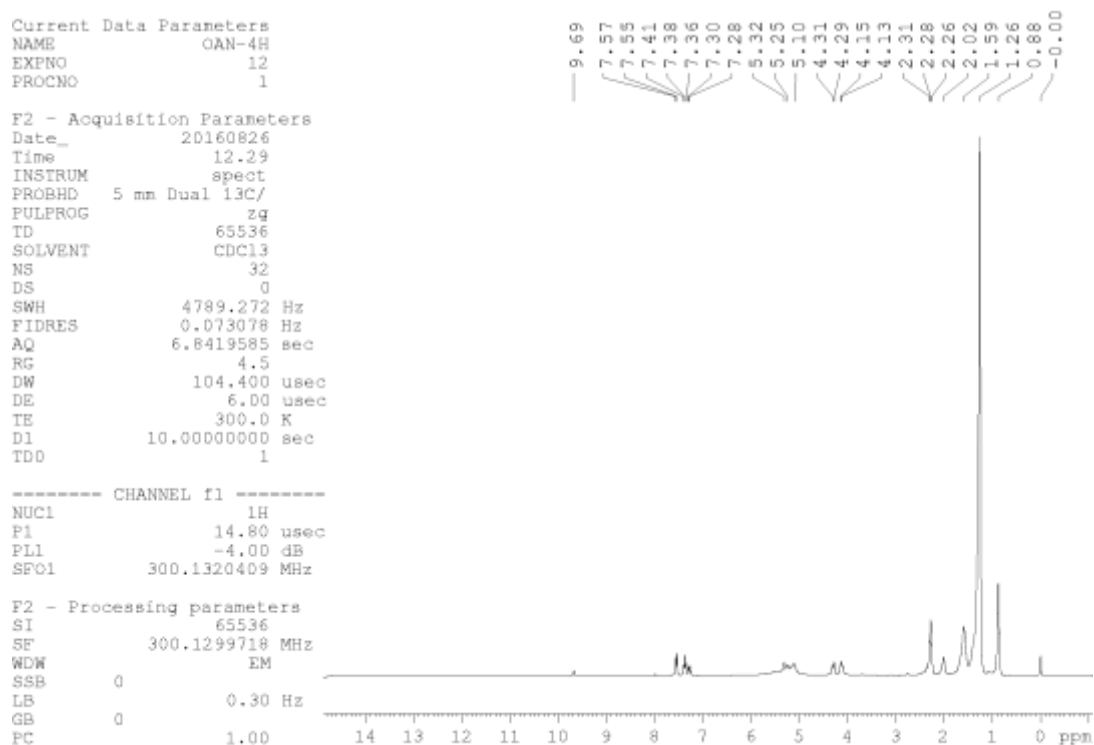


Figura E47. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 4 horas com adição de água (OAN-04).

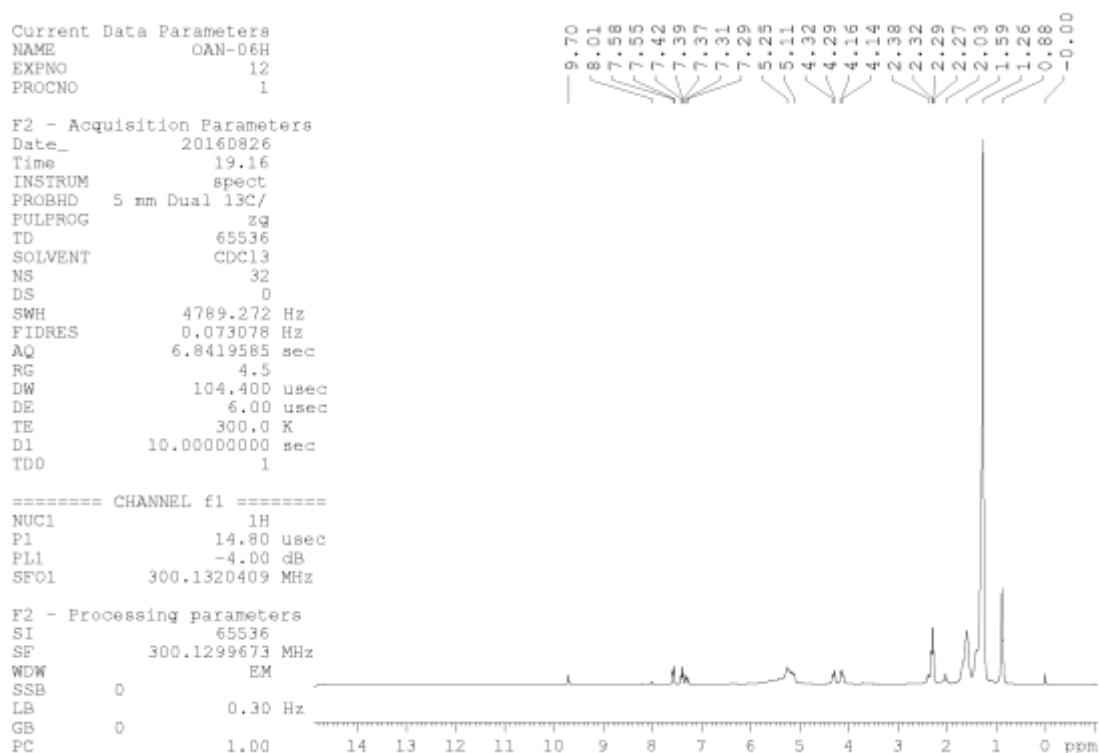


Figura E48. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 6 horas com adição de água (OAN-06).

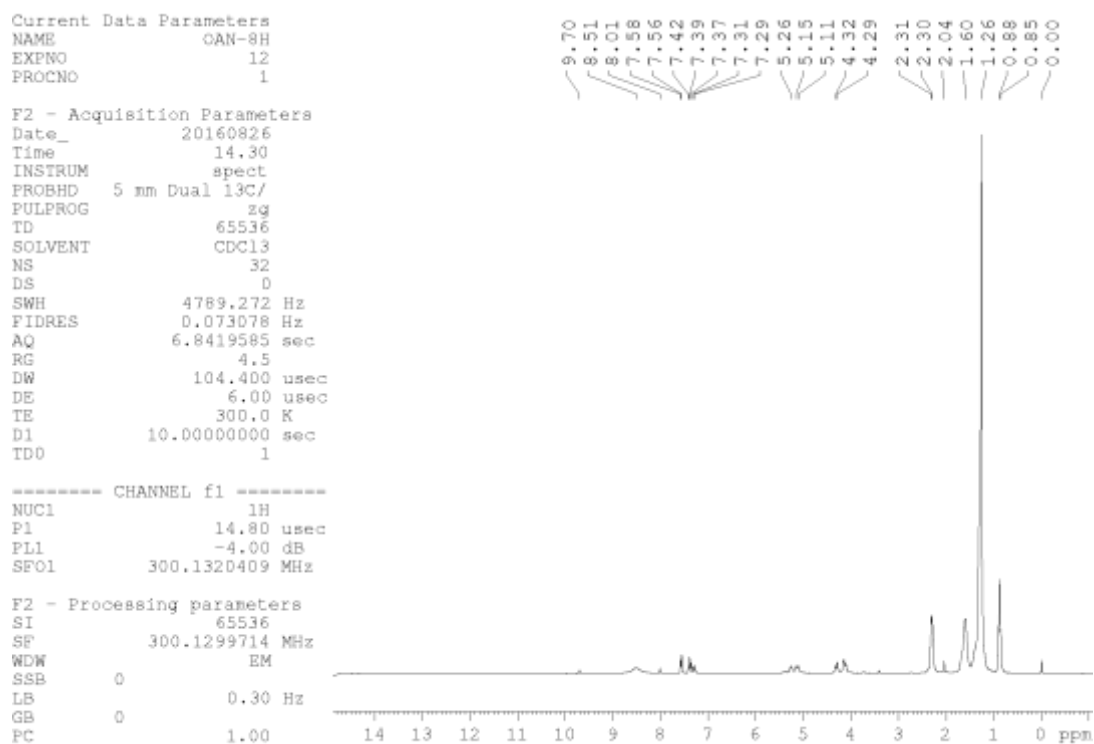


Figura E49. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 8 horas com adição de água (OAN-08).

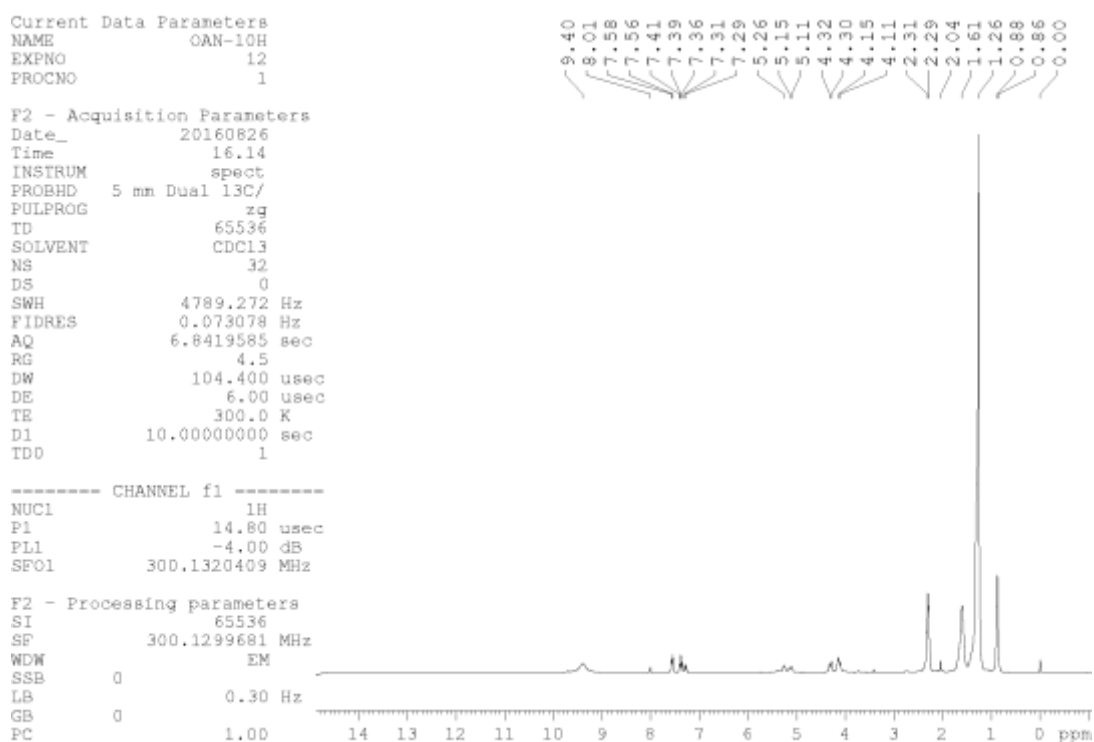


Figura E50. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 10 horas com adição de água (OAN-10).

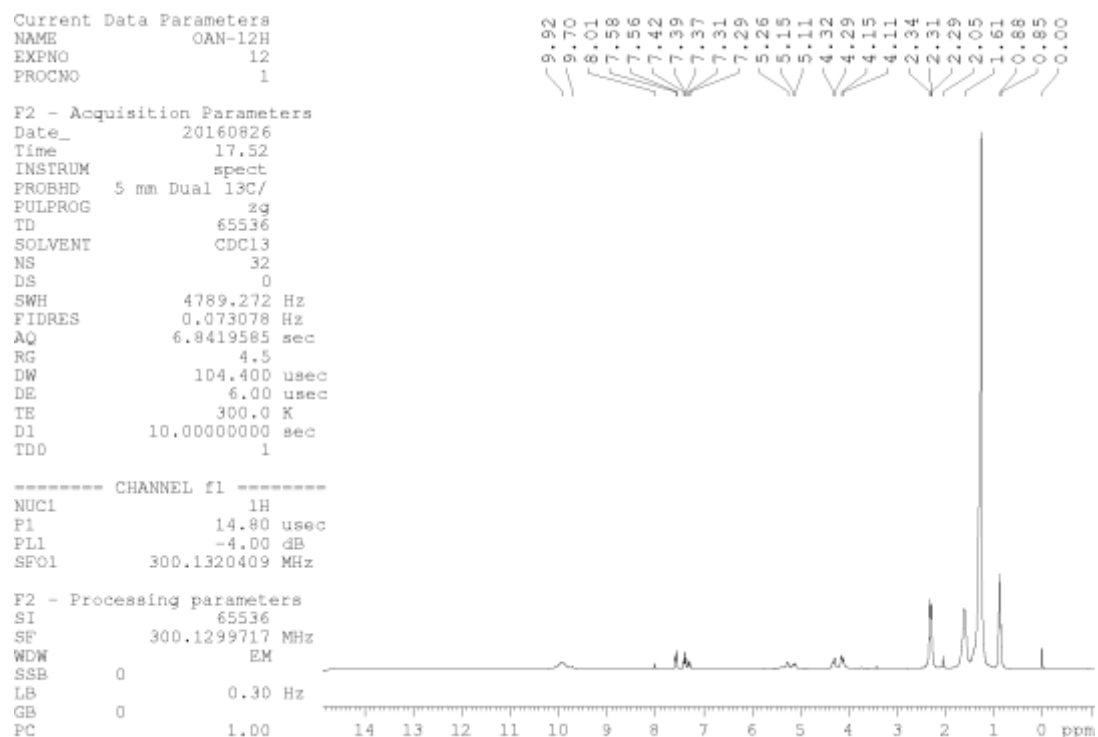


Figura E51. Espectro de RMN de ^1H quantitativo do óleo de neem ozonizado por 12 horas com adição de água (OAN-12).