

ARTICULO INVESTIGATIVO

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE GIRASOL Y OLIVA OZONIZADOS

OBTAINING AND CHARACTERIZING OZONATED SUNFLOWER AND OLIVE OIL

TRABAJO PRESENTADO EN EL EVENTO CNIC PRONAT 2022



Dania Hakim-Rodríguez ^{a,*} (0000-0001-9106-9502)
 Gabriela Guerra-Collazo ^a (0000-0003-3435-3763)
 Manuel Eduardo Cordero-Hernández ^a (0000-0002-1457-9717)
 Cheila Cabrera-Pérez ^a (0000-0002-7980-2764)
 Eliet Veliz-Lorenzo ^a (0000-0003-3253-4632)
 Lidia Asela Fernández García ^a (0000-0002-1043-5505)
 Gonzalo Cima Sotolongo ^a (0000-0001-8015-1674)

^a Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).

* dania.hakim@cnic.cu

Recibido: 22 de noviembre de 2022;

Aceptado: 28 de noviembre de 2022;

RESUMEN

Los aceites vegetales ozonizados debido a su capacidad antimicrobiana, son una alternativa importante para el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa en humanos y animales. El objetivo del estudio fue la obtención y caracterización de los aceites de girasol y de oliva ozonizados con niveles diferentes de concentración de compuestos peroxidicos. El primer intervalo de índice de peróxidos de 700-800 y el segundo con alto contenido de peróxidos de 1500 a 1900 mmeqO₂/kg. Ambos aceites fueron ozonizados en una columna de burbujeo estableciendo en todos los casos la misma velocidad superficial del gas. Los tiempos de reacción de aproximadamente de dos horas y media para IP de 700 a 800 y de cuatro horas para el intervalo de 1500 a 1900. El producto final se evaluó en términos de índice de peróxido, índice de acidez, viscosidad y concentración mínima inhibitoria. Se compararon los resultados tanto químico-físicos como microbiológicos de ambos aceites con respecto a las dosis de ozono aplicadas, considerando la composición química de cada uno de ellos. Las mayores diferencias se reportan en el intervalo de IP de 1500 a 1900 mmoleq/kg. Los aceites de girasol y oliva ozonizados en el intervalo de 700 a 800, mostraron efecto antimicrobiano similar frente a bacterias, mientras que frente a la levadura el valor de la CMI resultó menor para el aceite de girasol ozonizado, en el caso de estos aceites ozonizados con altos valores de IP, el aceite de girasol demostró una actividad antimicrobiana mayor.

Palabras claves: ozonización, aceites vegetales, caracterización química, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Ozonized vegetable oils, due to their antimicrobial capacity, are an important alternative for the treatment of infectious etiology diseases in humans and animals. The objective of the study was to characterize ozonized sunflower and olive oils with different concentration levels of peroxidic compounds. The first peroxides index range from 700-800 and the second with high peroxides content from 1500 to 1900 mmeqg O₂/kg. Both oils were ozonized in a bubbling column establishing in all cases the same surface gas velocity. The reaction times were approximately two and a half hours for IP from 700 to 800 and four hours for the 1500 to 1900 range. The final product was evaluated in terms of peroxide value, acid value, viscosity and minimum inhibitory concentration. Both the chemical-physical and microbiological results of oils were compared with respect to the ozone doses applied, considering the chemical composition of each one of them. The greatest differences in the IP range of 1500 to 1900 mmoleq/kg are reported. Sunflower and olive oils ozonized in the range of 700 to 800, showed similar antimicrobial effect against bacteria. While against yeast the MIC value was lower for ozonized sunflower oil. In the case of the ozonized oils with high IP values, sunflower oil showed a higher antimicrobial activity.

Keywords: D005, stability, stress, accelerated, long term.

INTRODUCCION

El ozono es un oxidante y germicida potente que es aplicado como desinfectante y oxidante en el tratamiento de agua potable y aguas residuales. También en varias aplicaciones médicas, como dermatología, ginecología, angiología, cardiología cosmetología entre otras (Menéndez *et al.*, 2008). Entre sus aplicaciones se encuentra la producción de aceites vegetales ozonizados, aplicados en un gran número de indicaciones médicas como germicida (Menéndez *et al.*; 2010, Yousefi *et al.*, 2019; Ugazio *et al.*, 2020), estimulantes del crecimiento tisular y antiinflamatorio (Guerra-Blanco *et al.*, 2017; Currò *et al.*, 2018).

La reacción del ozono con los compuestos insaturados de los aceites vegetales se produce a través del mecanismo de ozonización de Criegee, el cual se muestra en la Figura 1 (Criegee, 1975). El resultado de la reacción es la adición 1,3 dipolar formándose el molozónido o el 1,2,3-trioxolano, que se descompone rápidamente para dar un óxido de carbonilo y aldehídos. En el caso de disolventes no participantes, el óxido de carbonilo se recombina con el compuesto carbonilo para formar los ozónidos de Criegee (1,2,4-trioxolano). Se ha comprobado que cuando tiene lugar la ozonización de una emulsión acuosa de ácido oleico se produce predominantemente peróxido de hidrógeno, hidroxi-hidroperóxido y aldehídos (Ledea *et al.*, 2019).

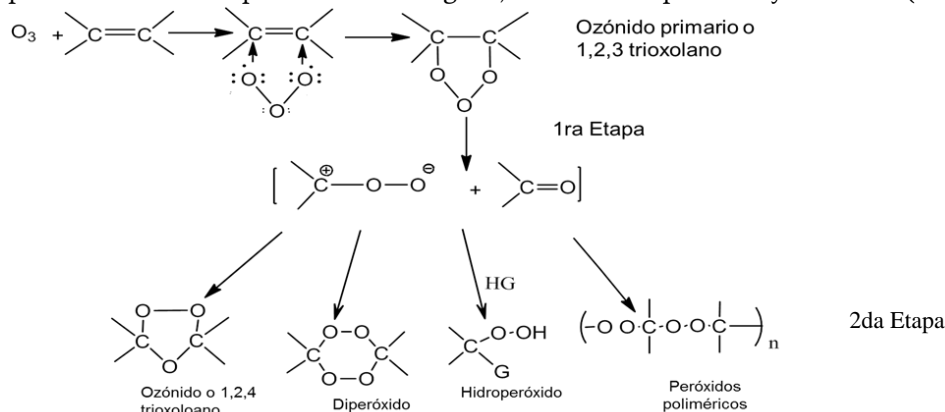


Fig. 1. Mecanismo de Criegee para la reacción del ozono con los compuestos insaturados.

Este mecanismo de acción del ozono con los dobles enlaces carbono-carbono de ácidos grasos insaturados presentes en los triglicéridos de aceites vegetales, da lugar a varios productos oxigenados, tales como ozónidos, hidroperóxidos, aldehídos, peróxidos, diperóxidos y polipéptidos (Ledea *et al.*, 2019; Guerra-Blanco *et al.*, 2021). Estos compuestos oxigenados confieren a los aceites favorables características, tales como las citadas propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales y para el tratamiento de heridas cutáneas con aplicaciones en las industrias cosmética y farmacéutica (Valacchi *et al.*, 2005; Ledea *et al.*, 2010; Guidoni *et al.*, 2019).

Dentro de los aceites vegetales más utilizados con estos fines se encuentra el aceite de oliva que presenta una alta proporción de ácido oleico (65-85%) y el aceite de girasol que es rico en ácido linoleico (48-74%) y oleico (14-39%); el aceite de oliva es el más utilizado aceite vegetal ozonizado en el campo farmacéutico (Ledea *et al.*, 2019; Radzimierska-Kaźmierczak *et al.*, 2021).

Los aceites de oliva y girasol ozonizados son efectivos contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra hongos y virus. Los ozónidos, peróxidos y aldehídos presentes en el aceite ozonizado son citotóxicos para los microorganismos y, por lo tanto, la acción de estos aceites ozonizados en la cicatrización de heridas está asociada con su efecto antimicrobiano (Rodrigues *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).

Existen diversas patentes que emplean como sustrato la ozonización de aceites vegetales, entre los que se encuentran, oliva, girasol, coco, cacao, aguacate, almendra, palma, sésamo, jojoba, entre otros para su uso en dermatología fundamentalmente (Martínez-Sánchez *et al.*, 2012).

La calidad del aceite de girasol está principalmente determinada por su composición (cantidad relativa de cada ácido graso: oleico, linoleico). Esta composición influye en las propiedades físico-químicas del aceite, determinando su aptitud para determinados usos (González, 2015).

El aceite de girasol, es el cuarto aceite vegetal producido globalmente y su crecimiento en los últimos años se estima en \$4,2 MT, equivalentes a un incremento del 28%. La importancia de este aceite para diferentes usos ha motivado el desarrollo de nuevas variedades en que se busca la modificación de la composición de sus triglicéridos con el fin de brindarles mayor estabilidad térmica (Garcés *et al.*, 2009; Agrositio, 2018).

Por otra parte, las propiedades terapéuticas y para la salud del aceite de oliva se conocen desde hace milenios, tanto que Hipócrates aconsejó el uso de jugo de oliva fresco para curar enfermedades mentales y en envolturas para curar úlceras. Desde el punto de vista dermatológico, el aceite de oliva también ha demostrado tener

actividad antimicrobiana en infecciones de piel quemada, frente a bacterias gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, bacterias gram negativas y diversas especies de hongos, incluida *Candida* spp (Karimi *et al.*, 2019, Alnemen *et al.*, 2022). Estas propiedades hacen del aceite de oliva un componente importante de algunas formulaciones tópicas que se utilizan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y micóticas.

El aceite de girasol, con predominio en su composición de ácidos grasos con una y dos insaturaciones, es más reactivo que el aceite de oliva con predominio de ácidos grasos monoinsaturados. Estos dos últimos son los aceites ozonizados más empleados internacionalmente para uso terapéutico y el criterio de selección se basa en que son los que tienen un mayor número de estudios que soportan sus aplicaciones médicas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2012).

La literatura internacional demuestra que la eficacia antibacteriana y antifúngica de los aceites vegetales ozonizados han sido demostrada ampliamente (De Almeida *et al.*, 2016; Zeng y Lu, 2018; Cho *et al.*, 2021), su uso en tratamientos cutáneos tópicos (dermatología) y su eficacia particular en la cicatrización de heridas, ha aumentado en los últimos años.

Dentro de los parámetros que caracterizan a los aceites ozonizados se encuentra índice de peróxido (IP). Su determinación es esencial para determinar los parámetros de calidad y establecer la dosis terapéutica de los aceites vegetales ozonizados. Se utiliza para la cuantificación de todos los compuestos peroxídicos formados durante la ozonización de los aceites vegetales (Gunaydin *et al.*, 2017, Martínez-Sánchez 2021). La actividad antimicrobiana de los aceites ozonizados se debe a la acción de estos compuestos peroxídicos sobre biomoléculas esenciales para la célula, como lípidos insaturados y proteínas. Sin embargo; no existen reportes en la literatura que demuestren o sugieran el papel que pueden desempeñar en esta acción, los mecanismos de defensa de las bacterias. Esta ampliamente reportado la relación directa que existe entre el valor de IP de los aceites ozonizados y la actividad antimicrobiana. Es decir que en la medida que la concentración de especies peroxídicas presentes en el aceite se incrementa por efecto de la ozonización, el valor de CMI de un amplio número de microorganismos es menor (Menéndez *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2009; Carrijo *et al.*, 2022).

Dentro de los estudios realizados sobre la aplicación clínica de los aceites vegetales ozonizados se reporta la obtención de aceites ozonizados con altos índices de peróxidos.

La capacidad antifúngica del aceite de oliva y del aceite de girasol, fue evaluado frente a la levadura *Candida Tropicalis*. En este caso ambos aceites fueron ozonizados con diferentes índices de peróxidos (aproximadamente desde 100 hasta 500 mmol-equiv/kg). Los resultados demostraron un efecto superior antifúngico del aceite de girasol ozonizado sobre el aceite de oliva ozonizado (Contreras *et al.*, 1989). A partir de estos resultados, fueron estudiados, ambos aceites ozonizados, con índices de peróxidos superiores (desde aproximadamente 700 hasta 2500 mmol-equiv/kg) y evaluados sus efectos antimicrobianos frente a distintas bacterias. Se demostró que la actividad antibacteriana fue similar en ambos aceites, excepto para la Concentración Mínima Bactericida de la *Pseudomonas aeruginosa*, donde el aceite de girasol ozonizado tuvo mejor comportamiento a valores menores de IP y el aceite de oliva ozonizado tuvo mejor comportamiento a valores mayores de IP (Díaz *et al.*, 2006).

Los antecedentes descritos demostraron la posibilidad de aplicación que tienen los aceites ozonizados con diferente contenido de peróxidos, por lo que el objetivo del presente trabajo es caracterizar el proceso de ozonización de los aceites de oliva y girasol, las principales características químico-físicas obtenidas y evaluar su capacidad germicida a diferentes valores de Índice de Peróxidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Aceites Vegetales empleados

El aceite de girasol refinado utilizado fue de calidad comestible, distribuido por Borges Agricultural & Industrial Edible Oils, S.A.U., Tárrega, España. El aceite de oliva refino utilizado fue El Aceite de Oliva familiar-Guillén, España.).

- Determinación del Índice de Peróxidos (IP).

Se basa en la capacidad de los peróxidos para liberar yodo de una disolución de yoduro de potasio en medio ácido. El contenido de peróxido es determinado por la valoración del yodo liberado con una disolución de tiosulfato de sodio y se define como: los milimol-equivalentes de oxígeno activo por kilogramo de muestra. (NC 85-04; Panreac, 1992; British Pharmacopeia, 2010).

- Determinación de Viscosidad (μ)

La determinación de este parámetro se basa en medir el tiempo necesario para que pase un determinado volumen de muestra a través de un capilar debidamente calibrado, como una medida de la fuerza de rozamiento interno del producto. El resultado se expresa en unidades de viscosidad de fuerza por unidad de área, es decir Pa.s. Se utiliza como medida de control de calidad del producto terminado

ya que este producto aumenta mucho la viscosidad y depende en gran manera del proceso productivo. (Mehlenbacher, 1970; USP 36, 2013)

- Determinación del Índice de Acidez (IA).

Determina los ácidos libres existentes. Este índice se define como el número de miligramos de hidróxido de potasio que se requieren para neutralizar los ácidos libres en un gramo de muestra, mediante la reacción del hidróxido de potasio con los ácidos. (Mitchel *et al.*, 1956; USP 36, 2013)

Para el desarrollo de estas determinaciones se emplearon como disolventes y reactivos: ácido acético glacial, cloroformo, yoduro de potasio, tiosulfato de sodio, etanol, éter, hidróxido de potasio, fenoltaleína de MERCK (Alemania).

- Proceso experimental

La instalación a escala de laboratorio (Anexo 1) consistió en una columna de burbujeo de vidrio enchaquetado de 100 mL de capacidad, que posee un difusor de vidrio poroso. El régimen de trabajo de la columna es semi-continuo. La misma se acopló a un termostato Frigomix U-2, para controlar la temperatura de la reacción a 20 ± 2 oC. La mezcla oxígeno-ozono se obtuvo en un ozonizador modelo AQOZO-LAB (Cuba), a partir de oxígeno embotellado en cilindros de 6m^3 de volumen, con un nivel de pureza del 95%. Se utilizó además una trampa de agua antes de la entrada del gas al reactor, para eliminar los óxidos de nitrógeno formados por las impurezas de nitrógeno que pudiera traer el oxígeno. Para realizar las mediciones de las concentraciones de entrada y de salida a la columna se empleó un medidor de ozono marca Anseros modelo OZOMAT (Alemania).

La velocidad superficial del gas en la columna de burbujeo se calculó empleando las ecuaciones 1 y 2

$$v_{sup} = \frac{Q_g}{A_{trans}} \quad (1)$$

$$A_{trans} = \frac{D_{react}^2 * \pi}{4} \quad (2)$$

Donde:

v_{sup} : velocidad superficial (m/h)

Q_g : flujo de gas (m^3/h)

A_{trans} : área transversal (m^2)

D_{react} : diámetro del reactor (m)

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las dimensiones de la columna de burbujeo y de sus condiciones de operación

Tabla 1. Dimensiones y condiciones de operación de la columna de burbujeo para la ozonización a escala de laboratorio

Datos de la columna de burbujeo	Valores
Flujo de gas (m^3/h)	0,03
Concentración de ozono (g/m^3)	50
Diámetro (m)	0,03
Área transversal (m^2)	$0,71 \cdot 10^{-3}$
Volumen efectivo (m^3)	$0,9 \cdot 10^{-4}$
Velocidad superficial (m/h)	42,4

Ozonización de aceite de girasol y aceite de oliva.

Las cinéticas de ozonización para ambos aceites se controlaron tomando muestras a intervalos de 30 min, lo que permitió conocer el momento en el que se alcanzó el valor de índice de peróxido establecido. Para este parámetro se establecieron dos intervalos de 700 a 800 y de 1500 a 1900 mmoleq/kg.

Determinación de la cantidad de ozono consumido

El proceso de absorción de ozono en cada uno de los aceites se realizó monitoreando de forma continua las concentraciones de ozono a la salida del reactor CO_{3s} , garantizando que la concentración de ozono inicial a la entrada del reactor CO_{3o} se mantenga constante.

El área de la superficie comprendida entre las curvas $CO_{3s} = f(t)$ y la línea correspondiente a la concentración de ozono a la entrada, es proporcional a la cantidad de ozono consumido en la reacción (Georgiev *et al.*, 2015).

Actividad antimicrobiana:

Se determinó la actividad antimicrobiana de los aceites de girasol y oliva ozonizados a diferentes índices de peróxidos frente a la cepa de levadura *Candida albicans* ATCC 10231, así como frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) por la técnica de difusión de agar (CLSI, 2022). Cada ensayo fue realizado por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es conocido que la eficiencia de la transferencia de masa se incrementa en la medida en que el flujo de gas es mayor, hecho que se debe a que en la medida que aumenta la velocidad superficial aumenta también la retención de gas. Como resultado de la mayor retención de gas en el dispositivo de contacto, se obtiene mayor área interfacial y con ello aumenta el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (kLa) (Singh y Majumder, 2011). Este aumento no es desmedido porque la burbuja de gas debe lograr su agotamiento en su ascenso por la columna líquida, lo que está en correspondencia con la obtención de una elevada eficiencia de contacto entre fases.

En este trabajo, se empleó una velocidad superficial del gas de trabajo de 0.012 m/s (42,4 m/h), para difusores porosos con diámetro de poro de 100µm, por tanto, el régimen hidrodinámico que se establece es homogéneo (Chaumant *et al.*, 2006). El régimen homogéneo se caracteriza por que se logra una distribución uniforme de las pequeñas burbujas formadas en el difusor, que son de tamaño similar en toda la columna de contacto.

Este régimen está asociado fundamentalmente al trabajo con difusores porosos que logran la dispersión de las burbujas sin coalescencia, es decir, sin interacción entre ellas, con un movimiento vertical fundamentalmente, esto además influye en que se logre una adecuada retención de gas en la columna, que posibilita el agotamiento de las burbujas de gas ozono en el proceso de transferencia de masa y reacción química que se verifica en el aceite. Este régimen, que logra grandes áreas interfaciales, es el más deseable para aplicaciones industriales (Kazakis *et al.*, 2007).

Cálculo de la dosis de ozono aplicada (DOA) en reactor semi continuo y de la eficiencia del reactor.

La dosis de ozono aplicada en el sistema reaccionante es un parámetro importante, que en este tipo de columnas trabajando en régimen semi continuo, garantiza la cantidad de moles de ozono de entrada de forma tal que puedan obtenerse los productos de reacción al nivel deseado de forma eficiente. Es decir, la selección del valor de dosis de ozono a aplicar depende de las características del sustrato que se pretende ozonizar y de los resultados que se persiguen.

$$DOA = \frac{CO_{3o} * QG}{VL} * tr$$

$$\% \text{ eficiencia} = \frac{(CO_{3o} - CO_{3s})}{CO_{3o}} * 100$$

Donde:

DOA: g/L

tr (h): tiempo de reacción

VL (L): volumen de líquido

CO_{3o} (mg/L): concentración de ozono en el gas a la entrada del reactor

CO_{3s} (mg/L): concentración de ozono en el gas a la salida del reactor

QG (L/h): Flujo de gas ozono

La presencia de una elevada concentración de triglicéridos insaturados en los aceites de girasol y oliva, superior al 98%, facilita la transferencia de masa del ozono de la fase gas a la líquida y su agotamiento en reacciones rápidas que se verifican cerca de la interfase gas-líquido (Beltrán, 2003) lo que permitió obtener, entre otros aspectos, valores de eficiencia de reacción elevados en todos los casos superiores al 95%.

Ozonización de aceite de girasol y aceite de oliva con IP entre 700-800.

Tabla 2. Resultados de las variables de caracterización químico-física y de las condiciones de ozonización para los aceites ozonizados.

IP: 700-800	Aceite girasol	Aceite oliva
Dosis de ozono aplicada (g/L)	41,83	46,66
IP (mmolequív /kg muestra)	775,76	758,18
IA (mg KOH/kg muestra)	1,96	1,96
Viscosidad (Pa.s)	0.085	0.072
Eficiencia de contacto de la c. burbujeo (%)	95,6	96,6
Temperatura de reacción (°C)	18,7	18,0

Como se muestra en la tabla 2, en las ozonizaciones realizadas se logró llegar a los intervalos de índice de peróxido que se habían definido inicialmente en este estudio. Se realizó, como parte de la caracterización físico-química, de ambos aceites ozonizados, la determinación de los valores de índice de acidez y viscosidad los cuales muestran una correspondencia con el índice de peróxido presente en cada muestra.

Ambos aceites ozonizados mostraron índice de peróxidos similares de 775,76 y 758,18 mmol-equiv/kg, respectivamente. El aceite de girasol y oliva ozonizados alcanzaron un valor de viscosidad de 0.085 y 0.072 Pa.s, respectivamente. El aumento de los valores de índice de peróxidos observado ha sido bien documentado en estudios anteriores en que se ha podido establecer las diferentes compuestos químicos presentes en los aceites ozonizados, tales como: ozónidos, hidroperóxidos, ácidos, aldehídos, compuestos peroxídicos poliméricos y otras especies peroxídicas (Menendez *et al.*, 2008; Martínez-Sánchez, 2021). Por lo que se ha evidenciado la formación de sustancias peroxídicas producto de la reacción del ozono con los compuestos insaturados a través del conocido mecanismo de Criegee (Criegee, 1975).

Al comparar los valores de IP y viscosidad obtenidos para cada aceite, se observa que en el aceite de girasol se obtuvo un valor de viscosidad algo superior que en el de oliva para dosis de ozono aplicada similares. Esto podría explicarse atendiendo a que el aceite de girasol tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que el aceite de oliva, al tener como ácido graso mayoritario el ácido linoleico, es por ello que para similares cantidades de ozono absorbido la formación de oligómeros sea mayor lo que contribuye al aumento de la viscosidad en este aceite.

Se obtuvo el mismo valor de índice de acidez para ambos aceites al finalizar la ozonización. En la Figura 1 se presentan los resultados.

La determinación de la cantidad consumida durante la ozonización de los dobles enlaces, se utilizó como forma alternativa de evaluación de la eficiencia del proceso de ozonización de los aceites vegetales (Georgiev *et al.*, 2015). En este método se considera despreciable la cantidad de ozono que puede estar disuelto, ya que en los sistemas de ozonización de aceites vegetales hay un ataque preferencial y a altas velocidades del ozono a los dobles enlaces C-C de los triglicéridos y esta reacción es selectiva y rápida, ocurre en la interfase gas-líquido, por tanto el ozono no se transfiere al seno del líquido. En los dos intervalos de ozonización IP (700-800) e IP (1500-1900) no se agotan todos los dobles enlaces del sistema por tanto puede despreciarse la posibilidad de que haya ozono disuelto.

En el intervalo de IP entre 700 y 800 mmoleq/kg, al evaluar el área bajo la curva la cantidad de moles totales de ozono consumido fue de $9,04 \cdot 10^{-4}$ para el aceite de girasol y $9,28 \cdot 10^{-4}$ en el caso del aceite de oliva, como se puede observar la cantidad de ozono que se consume es similar en ambos casos lo que permite afirmar que el fenómeno principal que ocurre en estos sistemas es el consumo de ozono en reacciones químicas rápidas en la interfase gas-líquido, a partir de las que se generan los compuestos peroxídicos.

La evaluación de la eficiencia de contacto del proceso de ozonización en la columna de burbujeo sirve para corroborar la cantidad de ozono que se consumió por reacción química, en ambos experimentos. En la ozonización de aceite de girasol se obtuvo 95,6 % y en la de aceite de oliva el 96,6 %, de eficiencia, valores altos muy cercanos, que demuestran que existe un adecuado contacto entre las fases en la columna de burbujeo. En

estos sistemas la velocidad del gas empleada permitió una buena retención de gas, además de que se consumió casi todo el ozono que se suministró a la entrada de la columna con una concentración de 80 mg/L.

De acuerdo con lo reportado en la literatura (Besagni *et al.*, 2017; Paul y Pakzad, 2022), el sistema de ozonización de aceites imprime cierto límite a la velocidad de ascenso de las burbujas, debido a que es un sistema donde la viscosidad es más elevada que la de los sistemas acuosos. En el caso del aceite ozonizado, este valor de la viscosidad aumenta durante todo el proceso debido a la formación de oligómeros (Ledea *et al.*, 2019). Por tanto, esto posibilita una mayor retención de gas en la columna y un mayor agotamiento de las burbujas, es decir aumenta la velocidad de transferencia de masa, lo que permite obtener altos valores de eficiencia de transferencia.

Finalmente, si se considera que esta concentración de ozono es alta y que las experiencias se realizan en una columna de laboratorio de 90 mL de volumen de aceite, puede considerarse muy eficiente el contacto logrado entre fases, lo que implica una adecuada transferencia del ozono de la fase gaseosa a la interfase gas-líquido y su consumo en reacciones químicas rápidas que, como se ha planteado, posibilitan la formación de compuestos peroxídicos en los aceites oxidados con ozono.

IP: 1500-1900	Aceite de girasol	Aceite de oliva
Dosis de ozono aplicada (g/L)	108,44	107,32
IP (mmoleq/kg muestra)	1871,82	1557,82
IA (mg KOH/kg muestra)	20,02	22,83
Viscosidad (Pa.s)	0.80	0.77
Eficiencia de la columna de burbujeo (%)	96	96
Temperatura de reacción (°C)	21,80	21,90

Ozonización de aceite de girasol y aceite de oliva a altos valores de IP.

Con el objetivo de obtener valores de IP superiores a 1000 mmoleq/ kg se aplicaron mayores dosis de ozono. En estas condiciones, se obtuvo un aumento de los valores de índice de peróxido e índice de acidez respecto a los valores de las experiencias anteriores y se logró alcanzar los intervalos de índice de peróxido planteados en el estudio. Los valores de índice de acidez y viscosidad muestran una correspondencia con el índice de peróxido presente en cada muestra (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de las variables de caracterización químico-física y de las condiciones de ozonización para aceites ozonizados a altos valores de IP.

Al finalizar las ozonizaciones, se obtuvieron para la misma dosis de ozono aplicada, valores de índice de peróxidos de 1557,82 mmoleq/kg para el aceite de oliva y de 1871,82 mmoleq/kg para el aceite de girasol. Los índices de acidez tuvieron ligeras diferencias resultando 20,02 y 22,83 mg KOH/kg respectivamente, se observa el comportamiento de estos parámetros en la Figura 1. En el caso de la viscosidad se obtuvo para el aceite de girasol ozonizado un valor de 0.80 Pa.s y para el aceite de oliva 0.77 Pa.s.

El aumento del valor de la viscosidad en el aceite de girasol respecto al valor del aceite de oliva se debe a que, bajo condiciones similares de ozonización, se obtuvo un índice de peróxidos más elevado. Se ha demostrado que en este proceso el aumento de la viscosidad está asociado a la formación de diferentes especies poliméricas entre las que se encuentran los oligómeros y dímeros (Ledea *et al.*, 2019). En otras palabras, durante la ozonización de aceites tiene lugar la formación de condensados de mayor peso molecular producido por la unión de dímeros y oligómeros, lo que tiene una relación directa con las condiciones en que ocurre el proceso, es decir está directamente vinculado a la composición del aceite vegetal, al tipo de reactor y a la velocidad superficial del gas empleada, que son condiciones que definen la transferencia de masa entre las fases gas y líquido.

Con respecto a este aspecto, es importante destacar que en general en los experimentos del estudio se observó que el aumento de la viscosidad ocurrió de forma progresiva y mantenida durante todo el proceso. El aceite de girasol es rico en triglicéridos trilinoleína (LLL) y oleodilinoleína (LLO) que tienen seis y cinco dobles enlaces y el aceite de oliva tiene como triglicéridos mayoritarios el trioleína (OOO) y palmitodioleína (POO) con tres y cuatro insaturaciones respectivamente, por lo que pueden reaccionar con varias moléculas de ozono a la vez, lo que trae la formación de dímeros y oligómeros peroxídicos (Ledea, *et al.*, 2019).

La eficiencia de contacto en el proceso para alcanzar altos valores de IP fue la misma para ambos aceites, 96%. En cuanto a los moles de ozono consumido también se obtuvo el mismo valor de $1,45 \cdot 10^{-3}$ moles totales. Las dos determinaciones reafirman lo discutido con anterioridad, primero la alta selectividad del ataque del ozono y además el elevado consumo del gas que se obtiene en el sistema durante todo el tiempo del proceso, lo que permite decir que hay una adecuada coherencia en los resultados alcanzados.

A modo de resumen en la Figura 2 se muestran las tendencias del índice de peróxidos e índice de acidez con las dosis de ozono aplicadas en cada caso.

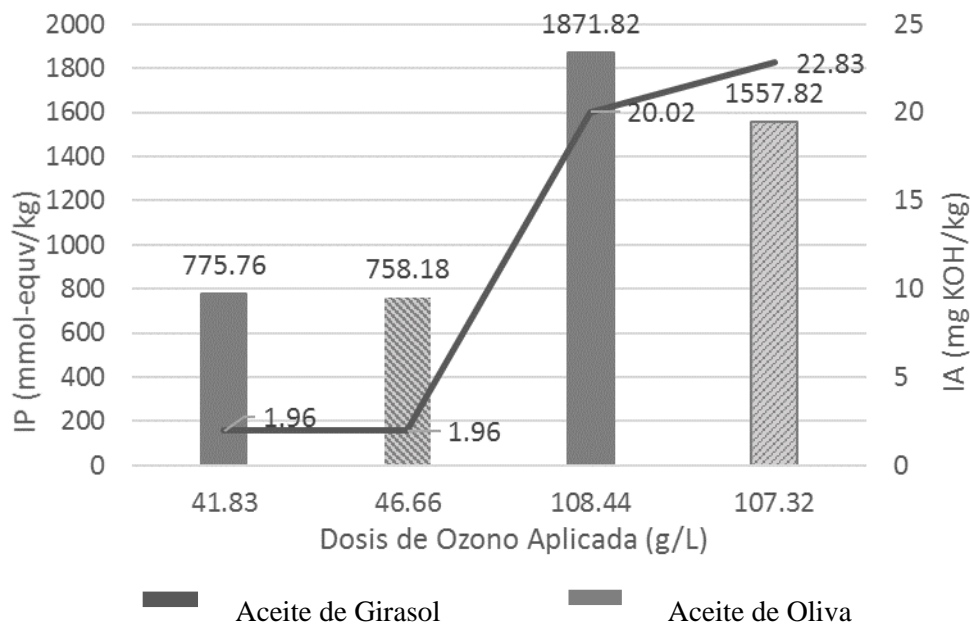


Fig. 2. Comportamiento del IP e IA según la dosis de ozono aplicada.

En la Figura 2 se representa el comportamiento del índice de peróxido según la dosis de ozono aplicada para cada experimento.

Los aceites ozonizados con IP entre 700 y 800 mostraron valores similares en el IP final además de tener el mismo valor de acidez, lo que implica que a dosis de ozono aplicadas similares se obtienen aceites ozonizados con características físico-químicas también similares, menos en el caso de la viscosidad en que el aceite de girasol, aceite con mayor cantidad de insaturaciones, alcanzó un valor de viscosidad mayor que el aceite de oliva, lo que induce a pensar que en este aceite los poliperóxidos están en mayor concentración y son los que más tributan al valor del IP alcanzado.

Por otra parte, en el intervalo de IP de 1500 a 1900, los valores de peróxidos son superiores en el aceite de girasol que en el de oliva lo que es resultado de la mayor concentración de dobles enlaces presentes en el aceite de girasol como se explicó anteriormente, esto implica también que a estas dosis de ozono aplicadas superiores aumente en el caso del girasol el valor de la viscosidad. En cuanto al índice de acidez se observa que es ligeramente menor en el aceite de girasol que en el de oliva, esto pudiera deberse que al tener mayor concentración de dobles enlaces ante los que el ozono tiene una alta selectividad, ocurra menos la oxidación de peróxidos y por tanto se obtenga menor concentración de ácidos en el aceite.

La figura 3 representa la dependencia de la dosis de ozono aplicada con el valor de Índice de Peróxidos alcanzado, en ella se observa que el aceite de girasol alcanza mayor concentración de compuestos peroxídicos que el de oliva a dosis de ozono aplicadas similares, es decir que en las mismas condiciones se obtiene mayor concentración de ingredientes activos en el aceite de girasol, lo que está directamente relacionado con las características de la composición química de este aceite.

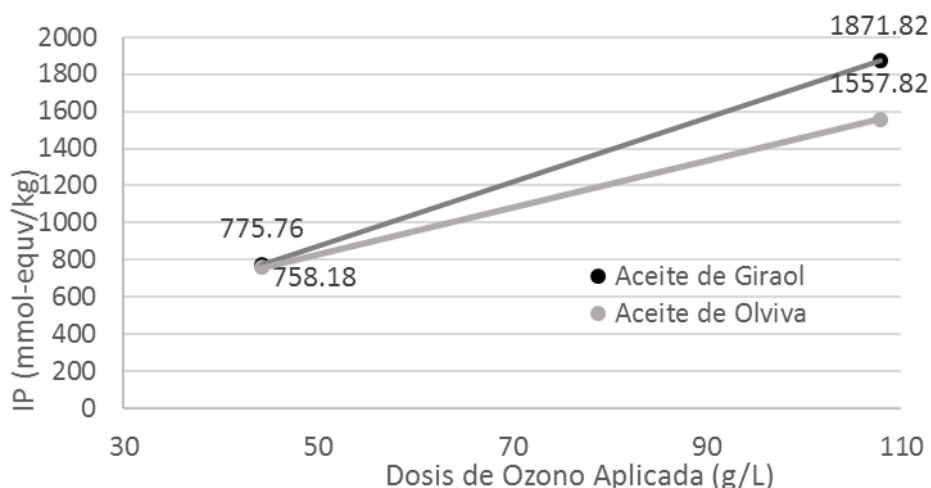


Fig. 3. Comportamiento del IP con la DOA.

Análisis microbiológico

La tabla 4 muestra los valores de CMI obtenidos en la evaluación de una bacteria Gram +, una Gram – y una levadura.

Tabla 4. Valores de CMI obtenidos por los aceites ozonizados oliva y girasol a s dos intervalos de IP

Microorganismo	CMI (mg/ml)			
	IP 700-800		1500-1900	
	Ac. girasol	Ac. oliva	Ac. girasol	Ac. oliva
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram +	4.45	4.45	1.24	2,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram -	9.8	8.9	2.25	4.45
<i>Candida albicans</i>	2.25	4.45	1.24	2.25

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la actividad antimicrobiana a medida que aumenta el índice de peróxido (tabla 4). En el caso de los aceites ozonizados entre 700-800 mmol-equiv/kg, tanto oliva como girasol, no mostraron diferencias significativas en los valores de CMI de las bacterias evaluadas bajo las condiciones experimentales seleccionadas, en el caso de la levadura se obtuvo un valor menor CMI en el caso del aceite de girasol. En un estudio anterior otros autores llegaron al mismo resultado evaluando *Candida tropicalis* (Contreras *et al.*, 1989). El análisis de los resultados para los aceites ozonizados a alto índice de peróxido mostró que los mejores resultados, para todos los microorganismos, fueron obtenidos con el aceite de girasol.

A través del tiempo, varios autores han demostrado la relación existente entre el aumento del índice de peróxido y el aumento de la actividad germicida de los aceites (Fernández *et al.*, 2006; Carrijo *et al.*, 2022). En este aspecto, la literatura reporta (Díaz *et al.* 2009) valores de CMI para tres especies bacterianas, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 10536, y *P. aeruginosa* ATCC 27853 entre 4,5 y 19 mg/mL al ozonizar aceite de girasol a índices de peróxidos que variaron entre 359 y 1052 mmol-eq/kg de muestra, demostrando que la relación entre IP y la inactivación de los microorganismos está relacionada, lógicamente, con la concentración de compuestos activos, presentes en el aceite, con actividad germicida demostrada. Es importante destacar que en estas comparaciones se debe considerar que, aunque las cepas coinciden en género y especie, no son las mismas que las empleadas en este trabajo. Las diferencias entre los valores de estos estudios pudieran estar marcados, además, por las diferencias fisiológica existentes entre las cepas.

Estos resultados permiten asegurar que, como se ha observado, los aceites ozonizados han demostrado poseer una gran efectividad frente a un gran número de microorganismos lo que, unido a su naturaleza oleosa, le confieren grandes potencialidades para la preparación de formulaciones farmacéuticas y cosméticas que pueden ser empleadas en el tratamiento de varias patologías.

CONCLUSIONES

A partir de la ozonización de aceite de girasol y aceite de oliva, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se obtuvo una alta eficiencia del proceso de ozonización en la columna de burbujeo del 96%, logrando los valores de índices de peróxidos deseados. Se pudo constatar que bajo las mismas condiciones de trabajo la cantidad de ozono consumido es la misma para ambos aceites. Al incrementar la dosis de ozono aplicada hubo un aumento de la concentración de compuestos peroxídicos formados, que inciden tanto en el valor del índice de peróxido, como en el de la viscosidad de los aceites. En estas condiciones el valor de ambos parámetros fue mayor en el aceite de girasol que en el de oliva, demostrando la influencia de la diferencia en la composición de triglicéridos de los dos aceites. Los dos aceites ozonizados mostraron una marcada actividad germicida frente a *P. aeruginosa*, *E. coli* y *C. albicans*. En el intervalo de IP 700-800 el valor de CMI fue el mismo frente a las bacterias, en el caso de la *C. albicans* el aceite de girasol tuvo mayor actividad. En el intervalo de IP de 1500 a 1900 el aceite de girasol tuvo mejores resultados que el de oliva frente a los tres microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

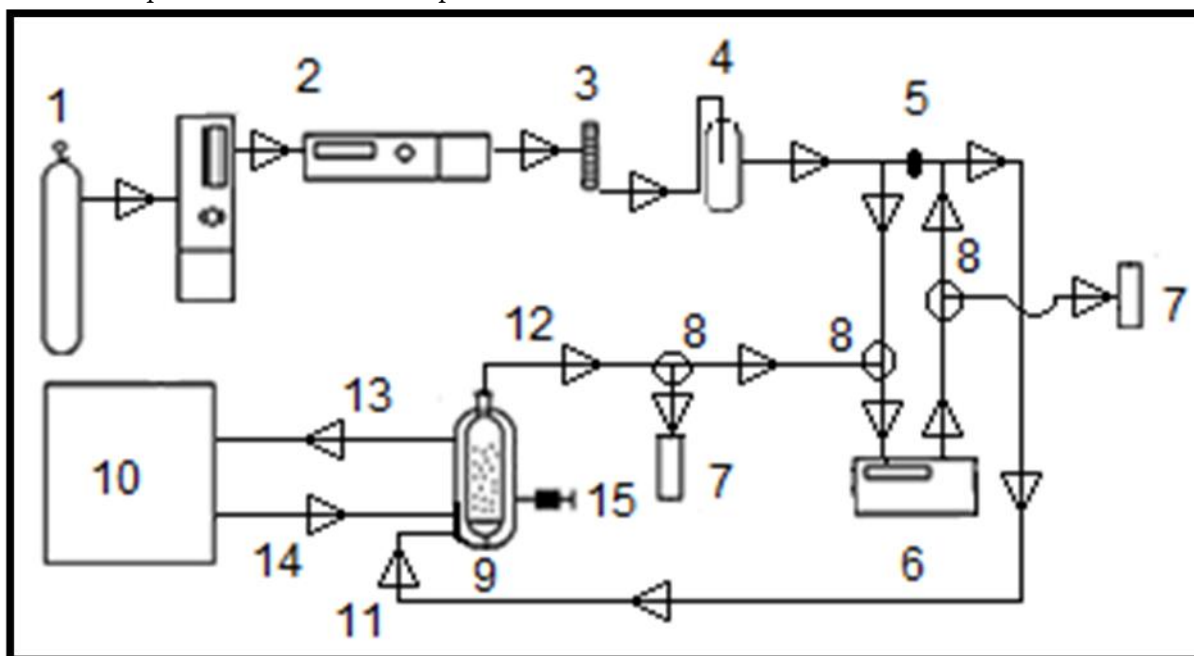
- Agrositio. (2018). "El mercado mundial de aceites vegetales: situación actual y perspectivas." Edic. 1887. Retrieved 2/5, 2019.
- Alnemer, F., Aljohani, R., Alajlan, A., Aljohani, M., Alozaib, I., Masuadi, E., ... & Al Jasser, M. I. (2022). The use of olive oil for skin health in a Saudi population: A cross-sectional study. *Dermatology Reports*, 14(1).
- Beltrán, F. J. (2003). *Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems*. crc Press.
- Besagni, G., Inzoli, F., De Guido, G., & Pellegrini, L. A. (2017). The dual effect of viscosity on bubble column hydrodynamics. *Chemical Engineering Science*, 158, 509-538.
- British Pharmacopeia, Great Britain 2010.
- Carrijo, B. N., Pires, R. H., Costa, G. B., Guiotto, F. G., Rodrigues, V. S., & Ferreira, J. C. (2022). Ozone gas and ozonized sunflower oil as alternative therapies against *Pythium insidiosum* isolated from dogs. *Ozone: Science & Engineering*, 44(4), 398-406.
- Chaumat, H., Billet, A., & Delmas, H. (2006). Axial and Radical Investigation of Hydrodynamics in a bubble Column; Influence of Fluids Flow Rates and Sparger Type. *Intern. J. of Chem. Reactor Eng.*, 4, A25.
- Cho, K. H., Kang, D. J., Nam, H. S., Kim, J. H., Kim, S. Y., Lee, J. O., & Kim, B. J. (2021). Ozonated sunflower oil exerted protective effect for embryo and cell survival via potent reduction power and antioxidant activity in HDL with strong antimicrobial activity. *Antioxidants*, 10(11), 1651.
- Contreras, R., Gómez, M., Menéndez, S., Molerio J., Roura G., Fernández D., Eng L. (1989). Efecto de la sustitución del aceite de oliva por aceite de girasol sobre la actividad antimicrobiana de aceites ozonizados. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 20, 1- 2-3, 121-124,
- Criegee, R. " *Mecanismo de la ozonólisis. Angewandte Chemie*" (Int. Ed. 14, Engl. 1975), pág. 745.
- Currò, M., Russo, T., Ferlazzo, N., Caccamo, D., Antonuccio, P., Arena, S., ... & Impellizzeri, P. (2018). Anti-inflammatory and tissue regenerative effects of topical treatment with ozonated olive oil/vitamin E acetate in balanitis xerotica obliterans. *Molecules*, 23(3), 645.
- De Almeida, N.R.; Beatriz, A.; de Arruda, E.J.; de Lima, D.P.; de Oliveira, L.C.S.; Micheletti, A.C. (2016) Ozonized vegetable oils: Production, chemical characterization and therapeutic potential. In *Vegetable Oil: Properties, Uses and Benefits*; Nova Science Publishers, Hauppauge: New York, NY, USA, pp. 129–160.
- Díaz, M., R. Hernández, G. Martínez, G. Vidal, M. Gómez, H. Fernandez, and R. Garcés. (2006). "Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil." *Journal of Brazilian Chemical Society* 17 (2):403–407.
- Díaz Gómez, M. F., Ledea Lozano, O. E., Gómez Regüíferio, M., Garcés Mancheño, R., Alaiz Barragán, M. S., & Martínez Force, E. (2009). Estudio comparativo de la ozonización de aceites de girasol modificados genéticamente y sin modificar. *Química Nova*, 32, 2467-2472.
- Fernández Torres, I., Curtiellas Piñol, V., Sánchez Urrutia, E., & Gómez Regueíferos, M. (2006). In vitro antimicrobial activity of ozonized theobroma oil against *Candida albicans*. *Ozone: Science and Engineering*, 28(3), 187-190.
- Garcés, R., Martínez-Force, E., Salas, J. J., & Venegas-Calderón, M. (2009). Current advances in sunflower oil and its applications. *Lipid Technology*, 21(4), 79-82.
- Georgiev, V. F., Batakliiev, T. T., Anachkov, M. P., & Rakovski, S. K. (2015). Study of ozonated olive oil: monitoring of the ozone absorption and analysis of the obtained functional groups. *Ozone: Science & Engineering*, 37(1), 55-61.

- González, L. (2015). Protocolo de calidad para aceite de girasol. Ministerio de la Agroindustria. Argentina. <https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar>
- Guerra-Blanco, P., Poznyak, T., Pérez, A., Gómez y Gómez, Y. M., Bautista-Ramírez, M. E., & Chairez, I. (2017). Ozonation degree of vegetable oils as the factor of their anti-inflammatory and wound-healing effectiveness. *Ozone: Science & Engineering*, 39(5), 374-384.
- Guerra-Blanco, P., Chairez, I., Poznyak, T., & Brito-Arias, M. (2021). Kinetic Analysis of Ozonation Degree Effect on the Physicochemical Properties of Ozonated Vegetable Oils. *Ozone: Science & Engineering*, 43(6), 546-561.
- Guidoni, M., de Christo Scherer, M. M., Figueira, M. M., Schmitt, E. F. P., De Almeida, L. C., Scherer, R., ... & Fronza, M. (2019). Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52.
- Gunaydin, Y., H. Sevin y D. Tanyolac (2017). "Ozonated olive oil with a high peroxide value for topical applications: In-vitro cytotoxicity analysis with L929 cells." *Ozone: Science and engineering* 10 (1080).
- Karimi, Z., Behnamoghdam, M., Rafiei, H., Abdi, N., Zoladl, M., Talebianpoor, M. S., & Khastavaneh, M. (2019). Impact of olive oil and honey on healing of diabetic foot: a randomized controlled trial. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 12, 347.
- Kazakis, N. A., Papadopoulos, I. D. and Mouza, A. A. (2007). Bubble Columns with Fine Sparger Operating in the Pseudo-Homogeneous Regime: Gas Hold Up Prediction and a Criterion for the Transition to the Heterogeneous regime. *Chem. Eng. Sc.*, 62, 3092-3103.
- Ledeza Lozano, O. E., Piñol, V. C., Mirabal, J. M., Mancheño, R. G., Gómez, M. F. D., Martínez-Force, E., ... & Torres, I. F. (2010). Evidencias del mecanismo oxidante en la actividad antibacteriana del aceite de girasol ozonizado. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41.
- Ledeza-Lozano, O. E., Fernández-García, L. A., Gil-Ibarra, D., Tena, N., Garcés Mancheño, R., Martínez-Force, E., & Salas, J. J. (2019). Characterization of different ozonized sunflower oils I. Chemical changes during ozonation. *Grasas y Aceites*. 70 (4)
- Martínez-Sánchez, G., L. Re y R. Horwat (2012). "Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados." *Revista española de ozonoterapia* 2(1): 121-139.
- Martínez-Sánchez, G. (2021). Scientific rationale for the medical application of ozonized oils, an up-date. *Ozone Therapy Global Journal*, 11(1), 239-272.
- Mehlenbacher V. C. *Análisis de Grasas y Aceites* Ed. Urmo, 1970
- Menendez Cepero, S., Álvarez, R. G., Lozano, O. E. L., Rosales, F. H., Fernández, O. S. L., & Gómez, M. D. (2008). *El Ozono: Aspectos Básicos y sus Aplicaciones Clínicas*. Editorial CENIC.
- Menéndez, S., L. Falcón, and Y. Maqueira. (2010). "Therapeutic Efficacy of Topical OLEOZON in Patients Suffering from Onychomycosis." *Mycoses* 54: 272-277.
- Mitchel J. M, Kolthoff J. M, Proskauer E.S. Weissberger A., *Organic Analysis.*, Ed. Inter Sci, 1956
- Monteiro, C. G. J., Gama, M. S., Moura, B. F., Cabral-Oliveira, G. G., Mattos-Guaraldi, A. L., Lima, C. J., & Lins, R. X. (2021). In Vitro antimicrobial activity of ozonated sunflower oil against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from endodontic infection. *Ozone: Science & Engineering*, 43(4), 378-383.
- Norma Cubana NC 85-04:81, Aceites y grasas comestibles, métodos de ensayo, Comité Estatal de Normalización, 1985.
- Norma Cubana NC 85-04:81, Aceites y grasas comestibles, métodos de ensayo, Comité Estatal de Normalización, 1985.
- Panreac, *Métodos Analíticos en Alimentaria: Aceites y Grasas, Métodos oficiales de Análisis*. Ed. Montplet y Esteban, S.A. 1992.
- Paul, M. M., & Pakzad, L. (2022). Bubble size distribution and gas holdup in bubble columns employing non-Newtonian liquids: A CFD study. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-Ed 32. Febrero (2022).
- Radzimińska-Kaźmierczak, M., Śmigielski, K., Sikora, M., Nowak, A., Plucińska, A., Kunicka-Styczyńska, A., & Czarnecka-Chrebelska, K. H. (2021). Olive Oil with Ozone-Modified Properties and Its Application. *Molecules*, 26(11), 3074.
- Rodrigues De Almeida Kogawa, N., E. Jose De Arruda, A. C. Micheletti, M. De Fatima Cepa Matos, L. C. S. De Oliveira, D. Pires De Lima, N. C. Pereira Carvalho, P. Dias De Oliveira, M. De Castro Cunha, M. Ojeda, and A. Beatriz. (2015). "Synthesis, Characterization, Thermal Behavior, and Biological Activity of Ozonides from Vegetable Oils." *The Royal Society of Chemistry* 5 (80):65427-36. doi:10.1039/C5RA02798E.
- Singh, M. y Majumder, S., (2011). Co-and Counter-Current Mass Transfer in Bubble Column. *Int J. of Heat and Mass Transf.*, 54, 2283-2293.

- Ugazio, E., Tullio, V., Binello, A., Tagliapietra, S., & Dosio, F. (2020). Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules*, 25(2), 334
- USP 36, (401) Fats and Fixed Oils, 2013.
- Valacchi, G., V. Fortino, and V. Bocci. (2005). "The Dual Action of Ozone on the Skin." *British Journal of Dermatology* 153:1096–1100.
- Wang, X., Liao, D., Ji, Q. M., Yang, Y. H., Li, M. C., Yi, X. Y., ... & Zhai, W. H. (2022). Analysis of Bactericidal Effect of Three Medical Ozonation Dosage Forms on Multidrug-Resistant Bacteria from Burn Patients. *Infection and Drug Resistance*, 15, 1637.
- Yousefi, S., Pooryousef Miandoab, M., & Aramideh, S. (2019). Antibacterial Properties of Ozonated Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) and Sesame (*Sesamum Indicum* L.) Oils on *Staphylococcus Aureus*. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 13(2), 132-136.
- Zeng, J., & Lu, J. (2018). Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *International immunopharmacology*, 56, 235-241.

ANEXOS

Anexo 1. Esquema de la instalación experimental



Leyenda:

1. Cilindro de oxígeno.
2. Ozonizadores.
3. Flujómetro.
4. Trampa de agua
5. Válvula
6. OZOMAT
7. Destruyores de ozono gaseoso
8. Válvula de tres vías
9. Reactor
10. Termostato
11. Entrada de la mezcla de oxígeno/ozono
12. Salida de la mezcla de oxígeno/ozono
13. Salida de agua al reactor
14. Entrada de agua del reactor

CONTRIBUCCION AUTORAL

Dania Hakim-Rodríguez: Conceptualización, investigación, metodología, análisis formal e interpretación de los resultados, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

Gabriela Guerra-Collazo: Conceptualización, investigación, metodología, validación.

Manuel Eduardo Cordero-Hernández: Conceptualización, investigación, metodología, validación.

Cheila Cabrera-Pérez: Conceptualización, investigación, metodología, validación.

Eliet Veliz-Lorenzo: Conceptualización, investigación, metodología, validación.

Lidia Asela Fernández García: Conceptualización, investigación, metodología, análisis formal e interpretación de los resultados, revisión crítica de la versión final y su aprobación, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).

Gonzalo Cima Sotolongo: Conceptualización, investigación, metodología, validación.