

Determinação da concentração de ozônio em diferentes tipos de soluções aquosas para uso na prática clínica*Determination of ozone concentration in different types of aqueous solutions for use in clinical practice**Determinación de la concentración de ozono en diferentes tipos de soluciones acuosas para uso en la práctica clínica***Resumo**

Objetivou-se determinar as concentrações de ozônio em água bidestilada não estéril (ABDNE), água monodestilada não estéril (AMDNE), água para injeção estéril (AIE) e solução fisiológica a 0,9% (SF 0,9%), utilizando-se o método DPD. As soluções ozonizadas foram obtidas por micro borbulhamento do gás ozônio, durante 15min, provocado a partir de baixo fluxo de oxigênio medicinal (¼L/min), a uma concentração de 56mg/L. A determinação das concentrações de ozônio foi baseada na reação de coloração oxidativa de N,N'-dietil-p-fenilediamina (DPD). AIE apresentou maior valor de ozônio (9,94 ppm). ABDNE mostrou concentração nos 5, 10 e 15 minutos de ozonização, respectivamente, de 6,14 ppm, 7,84 ppm e 8,34 ppm. Nos tempos subsequentes, houve instabilidade e alternância da concentração. Ensaio de medição de ozônio na SF foram realizados utilizando o mesmo método, com resultados de: 8,08 ppm; 9,36 ppm e 9,08 ppm, aos 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. A AIE mostrou-se a mais adequada para o alcance de concentração próxima a 10 ppm. Estudos acerca de dosagem e concentrações do ozônio, bem como, de seus subprodutos, devem ser realizados a fim de embasar a tomada de decisão acerca das doses seguras para aplicação desta modalidade do ozônio terapêutico.

Descritores: Ozônio; Terapias Complementares; Enfermagem Baseada em Evidências.

Abstract

The aim of this study was to determine the ozone concentrations in non-sterile double-distilled water (ABDNE), non-sterile monodistilled water (AMDNE), water for sterile injection (IEA) and 0.9% saline solution (SF 0.9%), using if the DPD method. The ozonized solutions were obtained by micro bubbling the ozone gas for 15 minutes, caused by a low flow of medicinal oxygen (¼L / min), at a concentration of 56mg / L. The determination of ozone concentrations was based on the oxidative staining reaction of N, N'-diethyl-p-phenylenediamine (DPD). EIA presented higher ozone value (9.94 ppm). ABDNE showed concentration in the 5, 10 and 15 minutes of ozonation, respectively, of 6.14 ppm, 7.84 ppm and 8.34 ppm. In the subsequent times, there was instability and alternation of concentration. Ozone measurement tests in SF were performed using the same method, with results of 8.08 ppm, 9.36 ppm and 9.08 ppm, at 5, 10 and 15 minutes, respectively. The EIA proved to be the most suitable for reaching a concentration close to 10 ppm. Studies on ozone dosage and concentrations, as well as on their by-products, should be carried out to support decision-making about safe doses for the application of this therapeutic ozone modality.

Descriptors: Ozone; Complementary Therapies; Evidence-Based Nursing.

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar las concentraciones de ozono en agua bidestilada no estéril (ABDNE), agua monodestilada no estéril (AMDNE), agua para inyección estéril (IEA) y solución salina al 0,9% (SF 0,9%), utilizando si el método DPD. Las soluciones ozonizadas se obtuvieron microburbujeando el gas ozono durante 15 minutos, provocado por un bajo flujo de oxígeno medicinal (¼L / min), a una concentración de 56mg / L. La determinación de las concentraciones de ozono se basó en la reacción de tinción oxidativa de N, N'-dietil-p-fenilediamina (DPD). El EIA presentó mayor valor de ozono (9,94 ppm). ABDNE mostró concentración en los 5, 10 y 15 minutos de ozonización, respectivamente, de 6.14 ppm, 7.84 ppm y 8.34 ppm. En los tiempos posteriores, hubo inestabilidad y alternancia de concentración. Las pruebas de medición de ozono en SF se realizaron utilizando el mismo método, con resultados de: 8.08 ppm; 9,36 ppm y 9,08 ppm, a los 5, 10 y 15 minutos, respectivamente. El EIA resultó ser el más adecuado para alcanzar una concentración cercana a las 10 ppm. Se deben realizar estudios sobre dosis y concentraciones de ozono, así como sobre sus subproductos, con el fin de apoyar la toma de decisiones sobre dosis seguras para la aplicación de esta modalidad terapéutica de ozono.

Descriptores: Ozono; Terapias Complementarias; Enfermería Basada en Evidencias.

Karyta Jordana Santos de Paula¹

ORCID: 0000-0002-3968-8098

Wilfredo Milquiades Irrazabal Urruchi²

ORCID: 0000-0002-3990-0335

Márcia Helena de Souza Freire¹

ORCID: 0000-0003-3941-3673

¹Universidade Federal do Paraná. Paraná, Brasil.

²Instituto Brasileiro de Ozônio e Suas Aplicações. São Paulo, Brasil.

Como citar este artigo:

Paula KJS, Urruchi WMI, Freire MHS. Determinação da concentração de ozônio em diferentes tipos de soluções aquosas para uso na prática clínica. Glob Acad Nurs. 2021;2(1):e64. <https://dx.doi.org/10.5935/2675-5602.20200064>

Autor correspondente:

Karyta Jordana Santos de Paula
E-mail: karytajordana@gmail.com

Editor Chefe: Caroliny dos Santos Guimarães da Fonseca
Editor Executivo: Kátia dos Santos Armada de Oliveira

Submissão: 30-01-2021**Aprovação:** 08-02-2021

Introdução

O ozônio (O_3) é uma molécula alotrópica do oxigênio (O_2) e encontra-se na atmosfera em estado gasoso, possui odor característico, à temperatura ambiente é incolor, no estado líquido é de cor azul escuro, e a temperatura de fusão é de $-192,5^\circ C$. É produzido a partir das moléculas de O_2 que sofrem descargas elétricas, formando na natureza a Camada de Ozônio, cuja função é a proteção da vida contra a radiação eletromagnética solar, funcionando como um filtro¹⁻².

Em 1896, foi criado o primeiro gerador de ozônio, por Nikola Tesla (1856 – 1943), utilizando-se de descarga elétrica de alta voltagem que transforma o a molécula de Oxigênio (O_2) em O_3 . Ele patenteou e constituiu a primeira empresa de geradores de ozônio de uso medicinal. Em 1957, o médico alemão Dr. Hansler, construiu um gerador de ozônio médico com a possibilidade de obtenção de doses precisa da mescla oxigênio-ozônio, no qual os geradores atuais se baseiam¹⁻².

Por ser uma molécula gasosa, dissolve-se rapidamente em água, plasma e fluídos extracelulares, na dependência da temperatura e da qualidade da água, devido as impurezas, orgânicas e inorgânicas provocarem alteração do potencial hidrogeniônico (pH) do meio e a decomposição do ozônio². O mecanismo de ação do O_3 é sustentado na ação de seus subprodutos (peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, radical hidroxila, entre outros) que se formam após contato com biomoléculas¹.

A grande solubilidade do ozônio na água permite sua reação imediata com quaisquer compostos solúveis e biomoléculas presentes nos fluidos, o que é explicado por ser o terceiro agente oxidante mais forte, depois flúor e persulfato. A alta solubilidade e instabilidade do O_3 garantem seu consumo total, não acarretando produtos tóxicos ao organismo vivo³.

Uma abordagem relativamente nova é representada pelo uso tópico de O_3 e seus derivados como mediadores de espécies reativas de oxigênio (ROS)⁴. À medida que o O_3 reage, os produtos derivados do contato com a matéria orgânica causam um estresse oxidativo agudo e transitório capaz de acionar vias intra e extracelulares que levam a respostas biológicas positivas¹. Além de possuir ação direta em fatores de transcrição que estimulam a produção de enzimas antioxidantes, o O_3 danifica a parede celular bacteriana e a membrana citoplasmática, causando um efeito bactericida, germicida, fungicida, sem desencadear mecanismos de resistência⁵, em vista dessas propriedades tem sido aplicado de maneira crescente na prática clínica integrativa, tanto para humanos como para animais.

Estudo desenvolvido por pesquisadores europeus, reforça os mecanismos de ação do O_3 já elucidados e, demonstra ser altamente eficaz na redução dos danos teciduais mediados pela inflamação e pelo estresse oxidativo⁶.

Em muitos países do mundo a Ozonioterapia ou Terapia Oxigênio-Ozônio, tem sido utilizada em grande escala pela medicina veterinária, humana e odontologia. Na área da odontologia, foram demonstrados sucessos com o gerenciamento de cicatrização de feridas, cárie dentária,

líquen plano oral, gengivite e periodontite, halitose, osteonecrose da mandíbula, dor pós-cirúrgica, placa e biofilmes, canais radiculares, hipersensibilidade à dentina, distúrbios da articulação temporomandibular e clareamento dentário⁷⁻⁹.

Incluem-se para um processo terapêutico com ozônio diversas formas e vias de administração e, as soluções aquosas possuem grande potencial terapêutico, contudo, apresentam o desafio da instabilidade do O_3 nas soluções. O ozônio tem uma meia-vida mais longa no estado gasoso do que em solução aquosa. Por esta razão, deve ser preparada imediatamente antes do uso e, não pode ser armazenada por longos períodos de tempo¹⁰, além de requerer atenção à temperatura do ambiente de preparo, pois quanto mais baixa a temperatura maior será o tempo de vida do gás O_3 ².

Exposto à temperatura entre 0 a $30^\circ C$ a solubilidade do O_3 na água é 13 vezes maior que a de O_2 e, é progressivamente mais solúvel em água com temperaturas mais baixas. A decomposição do ozônio é mais acelerada em temperaturas mais altas. Soluções aquosas com impurezas, orgânicas e/ou inorgânicas, provocam variação no pH e, portanto, a saturação final de O_3 dependerá da qualidade da água¹¹⁻¹³.

Mesmo com a expansão global da Ozonioterapia, sobretudo em território brasileiro, se convive com a lacunas de conhecimentos entre as evidências geradas por pesquisa e a prática. E, considera-se que para o desenvolvimento de pesquisas clínicas relativas ao tratamento de lesões de pele e mucosas humanas há de se obter concentrações seguras do O_3 em meio aquoso, para que os resultados sejam fidedignos e aplicáveis à prática clínica.

Desta forma, a questão norteadora deste estudo é “Qual a melhor solução aquosa ozonizada para uso clínico?”, traçando como objetivo: determinar as concentrações do ozônio em água destilada não estéril, água bidestilada não estéril, água para injeção estéril e solução fisiológica a 0,9%, utilizando-se o método *N,N'*-dietil-p-fenilediamina (DPD).

Metodologia

Os procedimentos deste estudo foram realizados em um ambiente da indústria do gerador de ozônio utilizado, durante o mês de agosto de 2020, na cidade de São José dos Campos, interior do estado de São Paulo, Brasil. O presente artigo faz parte da fase pré-clínica de um estudo clínico randomizado, que tem como objetivo avaliar a efetividade da água ozonizada para a mucosite oral, em pacientes pós transplantados de medula óssea. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, sob parecer n.º 4.018.509, do hospital público de ensino cenário da pesquisa, que é referência nacional para transplantes de medula óssea.

Materiais

As soluções utilizadas foram a Água para Injeção Estéril - AIE (JP Indústria Farmacêutica®), Água Monodestilada Não Estéril - AMDNE (Asfer®), Água Bidestilada Não Estéril - ABDNE (Quantica W®) e Solução Fisiológica a 0,9% - SF 0,9% (JP Indústria Farmacêutica®). As



diferentes soluções aquosas foram utilizadas para determinação de concentração de ozônio.

Equipamentos

O conjunto elaborado para obter-se soluções ozonizadas nas concentrações necessárias, constitui-se de:

- Cilindro de oxigênio medicinal (OZONE & LIFE®);
- Válvula reguladora de fluxo com manômetro (OZONE & LIFE®);
- Aparelho gerador de ozônio, o qual possui registro na ANVISA, sob nº 8150910000, marca OZONE & LIFE®, modelo O&L1.5 RM, que gera concentrações entre 1 e 72mg/L de ozônio;
- Torre ozonizadora de líquidos (OZONE & LIFE®);
- Kit-7423 Vacu-vials®;
- Fotômetro NDUV portátil (Anseros®-Ozone Analyzer GM-RTI);
- Espectrofotômetro.

A utilização da torre ozonizadora de líquidos tem a finalidade de produzir microbolhas que aumentam a superfície de contato do O₃ com a solução aquosa. Os difusores de bolhas possuem dispositivo poroso para quebrar o gás em pequenas bolhas na parte inferior da coluna de água, permitindo que as bolhas reduzidas subam lentamente até o topo da coluna e, assim, dissolvendo-se na água¹⁴. A torre ozonizadora também permite manter a segurança no processo de ozonização devido ser um sistema fechado e vedado de borbulhamento, possuindo um catalisador acoplado para decomposição do O₃ excedente.

Geração de Ozônio

O O₃ foi produzido a partir de O₂ puro através de um gerador OZONE & LIFE®, modelo O&L1.5 RM. Sua produção foi provocada com baixo fluxo de O₂ medicinal (¼ L/min). E, diferentes soluções ozonizadas foram obtidas borbulhando-as a uma concentração de 56mg/L. No experimento padronizou-se o volume das soluções em 500ml (mililitros), borbulhando-as continuamente à uma mistura de gás oxigênio - ozônio (O₂/O₃), com tempo de exposição máxima de 30 minutos.

Anteriormente ao início dos testes, foi examinada a calibração do gerador do ozônio utilizando o fotômetro NDUV portátil (Anseros®-Ozone Analyzer GM-RTI), o qual objetiva monitorar o O₃ na fase gasosa em condições secas ou umidificadas, garantindo a concentração do gás produzida pelo gerador.

Preparo das soluções aquosas para determinação de ozônio

Nenhum método único é consistentemente utilizado pela comunidade científica ou indústria para avaliar as concentrações de O₃ em soluções aquosas, dificultando as comparações e a padronização das exposições. São citados regularmente na literatura cinco métodos para mensurar o O₃, muitas vezes utilizando diferentes unidades de medida e

com pouca ou nenhuma explicação sobre os motivos que levaram à escolha de um determinado. Entre eles, estão:

- Método iodométrico tamponado neutro¹⁵;
- Método iodométrico tamponado neutro modificado¹⁶;
- Método de titulação iodométrica¹⁷;
- Método colorimétrico DPD¹⁸;
- Potencial de oxidação/redução¹⁹;

No entanto, ainda existem desvantagens significativas que limitam sua aplicação²⁰.

Neste estudo, a determinação das concentrações de ozônio foi baseada na reação de coloração oxidativa de *N,N'*-dietil-p-fenilediamina (DPD) através das reações fenton em soluções aquosas, cujos resultados são expressos em partes por milhão (ppm) ou miligramas/litro (mg/L) de O₃²¹⁻²². Este é um método candidato à padrão de análise de soluções aquosas, devido a facilidade de realização e calibração para determinações absolutas²³.

Após a ozonização da solução e antes da análise da amostra de 25ml da solução em questão, adicionaram-se cinco gotas do reagente químico (A-7400). A solução ativadora A-7400, contém iodeto de potássio e quando adicionado à amostra antes da análise, o O₃ reage com o iodeto e, há liberação de iodo. Por conseguinte, o iodo livre reage com o reagente na ampola do kit, gerando uma solução de coloração rósea²⁴.

É relevante apontar que o método DPD é mais específico, porém requer o uso de materiais tóxicos e forma um complexo róseo instável, cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de O₃ e, portanto, requer rápida determinação. Conforme instruções do fabricante, em um minuto, realizou-se a leitura da solução de reação para medir o valor de absorvância em 415 nm (nanômetro), utilizando-se um fotômetro dedicado - SAMs (*Single Analyte Meters*).

As análises da concentração do O₃ deram-se nos seguintes tempos de exposição das soluções ao O₃: 05, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A temperatura do ambiente do experimento apresentou 11°C de variação durante o período da análise, cerca de sete horas, correspondendo ao espectro de valores entre 19°C e 30°C.

Resultados e Discussão

Apresentam-se, na sequência, os resultados e discussão dos experimentos com as soluções aquosas utilizadas e para melhor explanação dos achados, categorizou-se a discussão em duas partes: a) Tempo de saturação (Tsat) e b) Concentração de saturação (Csat).

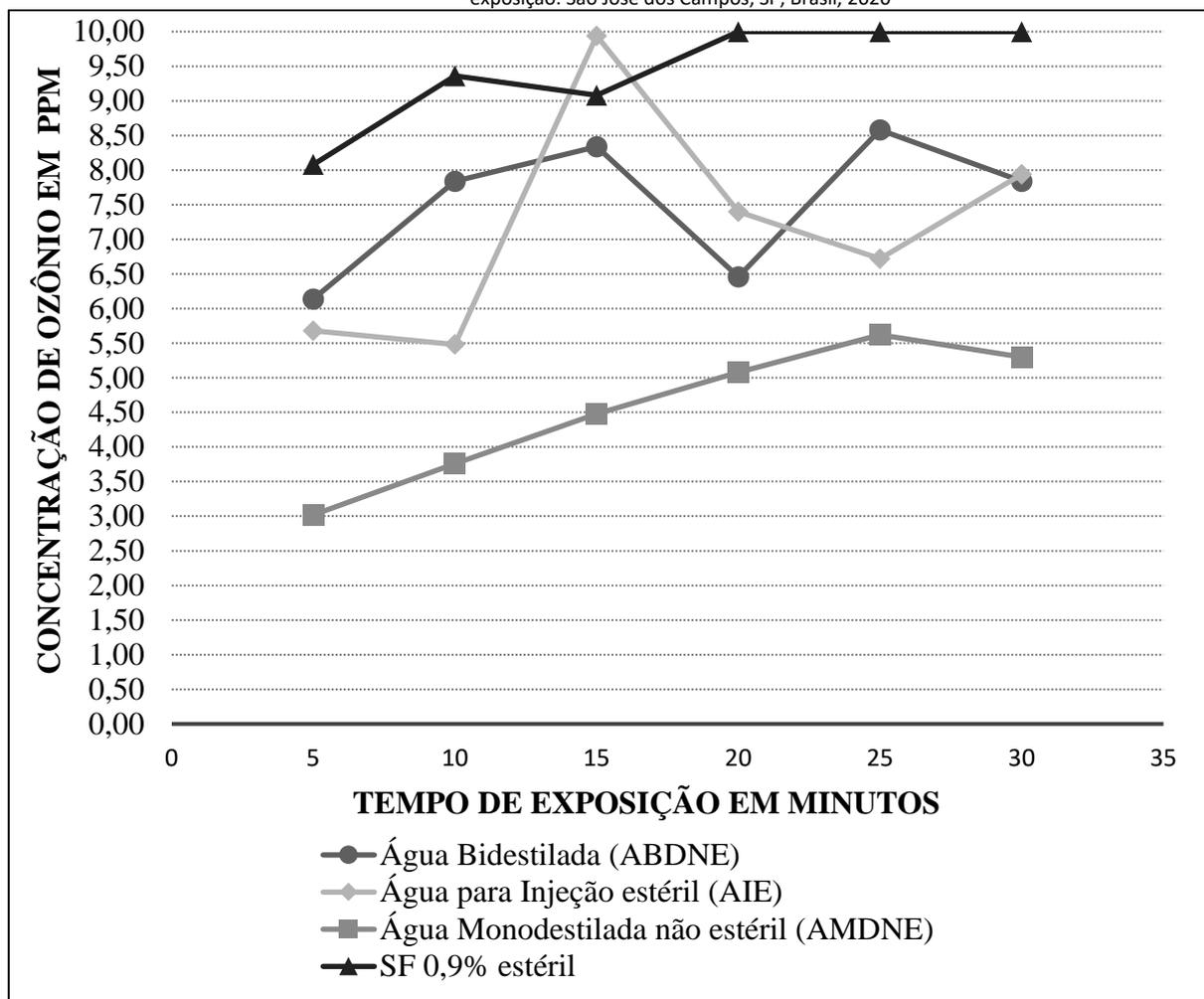
Tempo de saturação (Tsat)

A ozonização de todas as soluções aquosas testadas deteve-se no tempo máximo de 30 minutos.

Csat máxima de todas as soluções (exceto a AMDNE que atingiu seu pico aos 25 minutos) aconteceu aos 15 minutos de ozonização, indicando que a saturação máxima de O₃ aconteceu neste momento (Figura 1).



Figura 1. Concentração de saturação (C_{sat}) do ozônio em função do Tempo de saturação (T_{sat}) ao gás segundo os diferentes tipos de solução aquosa e tempo de exposição. São José dos Campos, SP, Brasil, 2020



Cerca 5 a 10 minutos de exposição da água bidestilada é o tempo necessário para que se obtenha uma saturação satisfatória do O₃²⁵. No entanto, ao utilizarmos a metade da capacidade da torre ozonizadora alteramos a pressão da solução para com o gás e minimizamos o tempo de contato e, neste estudo, utilizou-se a metade da capacidade da torre ozonizadora (500ml) para os procedimentos.

Este fato explica porque o T_{sat} relacionado a C_{sat} máxima aconteceu aos 15 minutos, excedendo-se ao tempo discorrido na Declaração de Madrid²⁵. A concentração final de ozônio na água é função da concentração na fase gasosa, da pressão do gás, da temperatura da água e da tecnologia de intercâmbio entre líquido e gás²⁶.

A ozonização com metade da capacidade da coluna, no mesmo tempo e mesma concentração tem menor transferência de fase, com o volume de 1000 ml de água é necessário somente 05 minutos de exposição, com gerador calibrado a 60 mg/L, para se obter uma concentração final de 10 a 15 mg/L²⁷.

No presente estudo, evidenciamos que com 500 ml, e gerador calibrado a 56 mg/L, com ¼ de fluxo de O₂, expondo a AIE (a qual apresentou maior C_{sat} dentre as soluções testadas) a 15 minutos de ozonização, obtivemos o equivalente a concentração de 9,94 mg/L. O fato de

alcançarmos uma C_{sat} satisfatória com a metade da capacidade da torre ozonizadora mostra que se pode produzir água ozonizada com volumes menores e sem desperdícios da solução.

A partir do vigésimo minuto do T_{sat} é notável uma instabilidade no comportamento da C_{sat} devido a degradação do ozônio. Estudo recente evidenciou a taxa de degradação do O₃ aumentou com o aumento do pH da solução²⁸.

Concentração de saturação (C_{sat})

Nos testes realizados, a ABDNE mostrou uma C_{sat} crescente nos 5, 10 e 15 minutos no processo de ozonização, partindo de 6,14ppm e alcançando o pico de saturação com 8,34 ppm aos 15 minutos de exposição. AMDNE apresentou um padrão diferente com cinética mais linear, contudo com valores bem menores de saturação quando comparado à ABDNE e, seu pico foi atingido com 25 minutos de ozonização, com C_{sat} de 5,62mg/L.

A solubilidade do O₃ em água pura se ajusta a lei de Henry (1803), que estabelece que o estado de saturação do gás na água é proporcional a sua concentração. Há evidências de que a cinética do O₃ em água corresponde a uma reação em relação à concentração do gás, que por sua

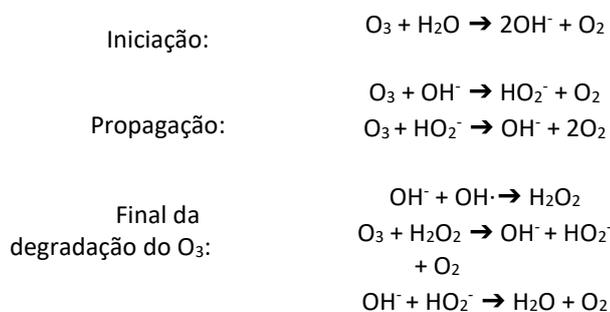
vez, é catalisada por íons hidroxilas (OH^-) sobre o pH com intervalo entre 1-8²⁹.

Aos 15 min de ozonização a diferença de Csat entre as águas AMDNE e AIE foi de 5,46 ppm. O fator que pode ter contribuído para este resultado é a ausência de íons e matéria orgânica na AIE. Por apresentar quantidades de espécies iônicas e, por não se tratar de uma água extremamente pura, a AMDNE reage com o gás ozônio e forma subprodutos aumentando sua degradação e diminuindo sua efetividade³⁰.

Neste quesito, a AMDNE contém traços iônicos que funcionam como substratos para formação de radicais e substâncias potencialmente tóxicas, as quais são inutilizáveis para fins terapêuticos, pois não possuem capacidade de desinfecção². Sobretudo, soma-se o fato de não ser estéril, cujos fragmentos biológicos podem alterar o pH e acelerar o consumo de O_3 na solução.

A decomposição do O_3 é considerada um processo complexo de reações em cadeia de radicais². A interação de O_3 com íons hidroxilas, que são espécies reativas do metabolismo do O_2 , iniciam o processo de reações de oxido-redução³¹. Os íons hidróxidos principiam a decomposição do O_3 e formam o radical hidroperóxido (HO_2^-), este, por sua vez, produz radical hidroxila (OH^-) e superóxido (O_2^-) o que pode levar a uma decomposição adicional de O_3 , denominando-se reação radical em cadeia³². Estudo publicado em 1987, já relatava que na decomposição do O_3 em pH inferior a 7, em qualquer temperatura, os radicais OH^- iniciam a decomposição direta do O_3 e são a principal causa da decomposição do ozônio nesta condição³⁰.

A degradação do ozônio em água bidestilada é relatada em vários estudos e pode ser simplificada com o esquema a seguir^{2,33}:



Ao final da do processo de decomposição do O_3 no meio aquoso, obtemos, invariavelmente, água (H_2O) e oxigênio (O_2); não é recomendado que a água que já passou por este processo seja novamente ozonizada²⁷.

Neste estudo, observou-se que a AIE apresentou o maior pico de Csat de O_3 entre todas as soluções aquosas testadas (9,94 ppm) (Figura 2). A Csat de O_3 na AIE se elevou ao máximo no tempo de exposição de 15 minutos, corroborando com a literatura que observa quantidade máxima de ozônio entre 8 e 15 minutos de exposição². Na concentração de borbulhamento a 56 mg/L a Csat da AIE variou de 5,48 ppm a 9,94 ppm, sendo que o maior teor de O_3 que foi obtido dentre as soluções testadas ocorreu com

uma solução injetável, límpida, hipotônica, estéril e aprotéica, cujo pH varia entre 5,0 a 7,0³⁴.

A solução de SF 0,9% ozonizada chegou no máximo da Csat após 10 minutos exposta à mistura O_2/O_3 . Aos 5, 10 e 15 minutos as concentrações foram de 8,08 mg/L, 9,36 mg/L e 9,08 mg/L, respectivamente.

A partir do vigésimo minuto de exposição o espectrofotômetro não conseguiu realizar a leitura, possivelmente, devido a presença dos compostos oxidados, estes podem alterar significativamente a análise. Neste sentido, o próprio fabricante do kit utilizado apresenta como compostos interferentes os possíveis agentes oxidantes presentes na amostra que podem produzir resultados elevados no teste, como por exemplo: cloro (Cl); dióxido de cloro (ClO_2); íon férrico (Fe^{+3}); íon cúprico (Cu^{+2}); entre outro²¹⁻²². Este é um dado importante, visto que substâncias oxidadas pelo O_3 podem interferir diretamente na análise e se não houver cuidado neste julgamento, pode-se inferir valores altos de concentração de O_3 ao invés de relatar a formação de compostos oxidados possivelmente deletérios à saúde.

Ao se avaliar a velocidade de absorção do O_3 em solução salina e constatou-se que a absorção e degradação do O_3 nesta solução é mais rápida devido a interação com moléculas de NaCl. O ozônio é capaz de oxidar íons cloreto em solução salina para formar clorato e, o conteúdo de clorato aumenta gradualmente com o tempo. Além disso, concentrações mais altas de O_3 resultam em níveis aumentados de clorato (ClO_3^-)³⁵. É importante ressaltar que o O_3 pode reagir com seu recipiente e, assim, aumentar os níveis de substâncias tóxicas na solução de ozônio³⁶.

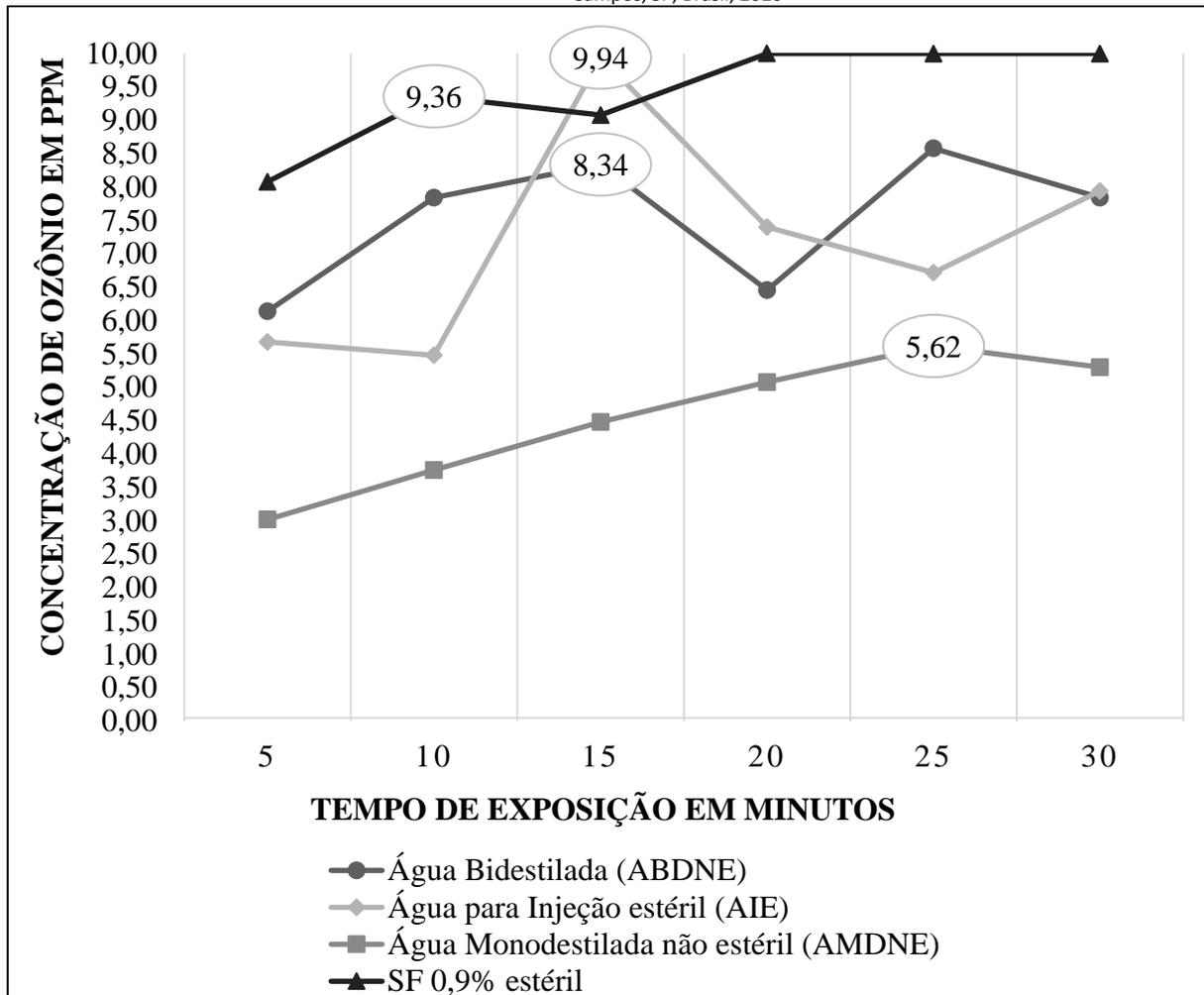
Recentemente, um estudo³⁶ confirmou a produção de ClO_3^- ao ozonizar SF a 0,9% com O_3 nas concentrações de 20, 40 e 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para simular os cenários de ozonização de SF 0,9% na prática clínica, o mesmo estudo utilizou recipientes comuns de polipropileno e bolsas de transfusão sanguínea resistentes ao O_3 como Policloreto de Vinila (PVC) associado a plastificantes (aditivos que conferem flexibilidade e maleabilidade) como o adipato de di-(2-etil-hexila) – DEHA, e ftalato de di-(2-etil-hexila) – DEHP. Os resultados sugeriram que, sob as mesmas condições, o PVC associado a plastificantes produziu teores de ClO_3^- menores. Entretanto, com o passar do tempo (3, 6 e 15 dias) o teor do composto aumentou significativamente.

Há relatos da solução salina ozonizada para uso tópico. Estudo publicado em 2019³⁷, relata uso da SF0,9% ozonizada para tratamento de neuroinfecção de pé diabético. Foram aplicados jatos de SF0,9%, ozonizado em altas concentrações (80 ppm), a fim de garantir o desbridamento do tecido necrótico solto, bem como, do exsudato purulento.

Contudo, a aplicação tópica da solução salina ozonizada deve ser melhor investigada, a fim de verificar a descontaminação e desbridamento de feridas, por exemplo, versus a potencialidade de alteração e efeitos deletérios em nível celular, pelos compostos oxidados da solução durante a ozonização.



Figura 2. Pico das Concentrações de saturação (C_{sat}) do ozônio segundo o tempo de exposição ao gás em diferentes tipos de solução aquosa. São José dos Campos, SP, Brasil, 2020



Apontam-se que os materiais do recipiente da ozonização, bem como de seu acondicionamento, são capazes de reagir com o O₃ e liberar substâncias tóxicas na solução. Como terapia de infusão intravenosa, a SF 0,9% ozonizada requer administrações repetidas em um curto período³⁶. Faz-se necessário mais estudos experimentais e clínicos para determinar se a exposição recorrente ao ClO₃⁻ é capaz de trazer prejuízos aos diversos sistemas orgânicos do indivíduo.

Pode ser gerado o cloreto (Cl⁻), o hipoclorito de sódio (NaClO), bem como suas espécies oxidadas como o ClO₃⁻, substâncias que são muito irritantes e nocivas, mesmo em concentrações baixas, e imperceptíveis aos métodos analíticos³⁸.

A infusão intravenosa de solução salina ozonizada é potencialmente tóxica para alguns autores e, portanto, esta prática não é recomendada pelos mesmos. A solução salina ozonizada pode conter substâncias tóxicas, incluindo peróxido de hidrogênio, ácido bromoso e ácido hipocloroso³⁸. Substâncias reativas podem ser formadas a partir da ozonização do SF 0,9% e a avaliação toxicológica desses produtos é um desafio complexo que deve ser melhor estudado e elucidado.

Em contrapartida, a SF 0,9% ozonizada decorre de uma necessidade alternativa à auto-hemoterapia maior, cujo método necessita da manipulação legalmente reconhecida do sangue e ser assistida, muitas vezes, por hematologistas e hemoterapeutas.

Pesquisadores apontam que o cloro gasoso se forma em meios ácidos com pH inferiores a 3,0; o ácido hipocloroso (HClO) se forma entre o pH de 3,0-7,5; enquanto os ClO₃⁻ se formam a partir de soluções alcalinas fracas e com pH maiores que 7,5. Tendo em vista o pH da SF 0,9% que está entre 5,5-5,7 e do sangue que é de 7,4, é eminente a formação de HClO tanto em solução salina ozonizada, quanto no meio sanguíneo². O que, teoricamente, permite a recomendação da SF 0,9% ozonizada, bem como, da ozonização via auto-hemoterapia maior, pois em ambos os casos se tem a formação do HClO.

Não há consenso para o uso da SF 0,9% ozonizada no mundo. Na Rússia esta prática é bastante difundida, todavia, os artigos científicos publicados apenas em russo, dificultam o acesso a estas informações e, conseqüentemente, a divulgação desta prática^{2,39}.

Faz-se necessário que sejam conduzidos mais estudos *in vitro* e *in vivo* para melhor esclarecer os possíveis efeitos deletérios *versus* a aplicação da infusão intravenosa

e tópica da SF 0,9% ozonizada para diversos fins terapêuticos.

Considerações Finais

Com o presente estudo, determinamos as concentrações de ozônio em diferentes tipos de soluções aquosas (ABDNE, AMDNE, AIE e SF 0,9%), utilizando-se o método DPD. Dentre as soluções aquosas empregadas, percebeu-se que a AIE obteve uma Csat mais satisfatória que as demais soluções.

Evidenciamos que o tempo de ozonização de 500 ml AIE (concentração de O₃ a 56 mg/L e ¼ de fluxo de O₂), com temperatura entre 19°C e 30°C, é de 15 minutos.

Soluções aquosas ozonizadas são preteridas pelos pesquisadores e profissionais da saúde na prática clínica, os quais optam por utilizar vias de aplicação sistêmicas (Insuflação retal e Auto-hemoterapia Maior) e/ou o óleo ozonizado, cujas concentrações do O₃ e/ou seus subprodutos são mais acessíveis e claras.

Foi notável a fragilidade do O₃ na água advindo daí a vulnerabilidade do uso da solução aquosa ozonizada para fins terapêuticos. A alta degradação do O₃ em meio aquoso dificulta a padronização de doses e a especificidade da água a ser utilizada. Estudos com soluções ozonizadas, cujos métodos de determinação de concentração e tempo de ozonização não são claros, produzem resultados dúbios e passíveis de questionamentos, dificultando a

desmistificação e consolidação da ozonioterapia, como terapia integrativa na prática clínica, inclusive na enfermagem e diversas outras áreas. Neste íterim, a enfermagem é essencial para a prestação de uma assistência de qualidade em toda estrutura organizacional de saúde⁴⁰, contribuindo com a produção de conhecimento acerca da ozonioterapia.

O efeito da ozonização do SF 0,9% corrobora com o conceito de que outros compostos oxidados podem mascarar os resultados da Csat de O₃. Soluções salinas ozonizadas devem ser melhor investigadas tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, a fim de determinar melhor seus benefícios da sua utilização via sistêmica e tópica versus seus possíveis efeitos deletérios a nível celular e a diversos sistemas orgânicos.

A determinação do O₃ e seus subprodutos em diferentes soluções aquosas permanecem como um desafio importante. O desenvolvimento de ensaios com controle rigoroso de pH, temperatura e comparação entre vários métodos simultâneos, serão oportunos para delineamento de um padrão de comportamento do O₃ nas diferentes soluções aquosas. Nesta perspectiva, mais estudos acerca de dosagem e concentrações do O₃, bem como, de seus subprodutos devem ser realizados, a fim de embasar a melhor tomada de decisão acerca das doses seguras aplicadas na ozonioterapia.

Referências

1. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy: State of the Art. Arch Med Res. 2006; 37(4): 425-435. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.08.006
2. Schwartz A. Manual de Ozonoterapia Clínica. Madrid (SPA): Medizeus – Soluciones Médicas; 2017. 651p.
3. Borrelli E, Bocci V. The use of Ozone in Medicine. Ann Med Health Sci Res [Internet]. 2018 [cited 2021 jan 25]; 8 (2):117-119. Available from: <https://www.amhsr.org/articles/the-use-of-ozone-in-medicine.pdf>
4. Valacchi G, Sticozzi C, Zanardi I, Belmonte G, Cervellati F, Bocci V, et al. Ozone mediators effect on “in vitro” scratch wound closure. Free Radic Res. 2016; 50(9):1022-1031. doi: 10.1080/10715762.2016.1219731
5. Clavo B, Rodríguez-Esparragón F, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Sánchez G, Llontop P, Aguiar-Bujanda D, et al. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects. Antioxidants (Basel). 2019; 8(12):588. doi:10.3390/antiox8120588
6. Martínez-Sánchez G, Schwartz A, Di Donna V. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. Antioxidants (Basel). 2020; 9(5):389. doi: 10.3390/antiox9050389
7. Cangul S, Erpacal B, Adiguzel O, Sagmak S, Unal S, Tekin S. Does the Use of Ozone as a Cavity Disinfectant Affect the Bonding Strength of Antibacterial Bonding Agents? Ozone: Sci Eng. 2020; 42(6):565-570. doi: 10.1080/01919512.2020.1746633
8. Hrishi TS, Kandapur PP, Bhat GS, Vishwanath S, Kamath S. Efficacy of Subgingival Ozone Irrigation for Management of Chronic Periodontitis – A Clinical, Microbiological and Biochemical study. J Cont Med Dent [Internet]. 2020 [cited 2021 jan 25]; 8(1):64-71. Available from: <https://www.jcmed.com/admin/pdf/819a12.pdf>
9. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith NL, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. Med Gas Res. 2019; 9(3):163-167. doi: 10.4103/2045-9912.266997
10. Rajeshwaran N, Malaippan S. Assessment of Bacterial Micro Colonies Present in Tissue Samples Obtained Using Ozonated Water as an Irrigating Agent from Patients with Periodontitis. J Pharm Res Int. 2020; 32(19):90-97, 2020. doi: 10.9734/JPRI/2020/v32i1930713
11. Güzel-Seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry. LWT: Food Sci Tech. 2004; 37(4):453-460. doi: 10.1016/j.lwt.2003.10.014
12. Güzel-Seydim Z, Bever Jr PI, Greene AK. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. Food Microbiol. 2004; 21(4):475-479. doi: 10.1016/j.fm.2003.10.001
13. Belcher D, Sopher C, editors. Ozone Applications in Fish Farming: Technical Report. Palo Alto, CA (USA): Eletronic Power Research Institute; 2002, 118p.
14. Zainuddin NS, Chee FP, Chang JHW, Dayou J. Development and Operational Implementation of a Novel Method for Production of Ozonated Water. Trans Sci Tech. [Internet]. 2017 [cited 2021 jan 25]; 4(3): 218-223. Available from: <http://tost.unise.org/pdfs/vol4/no3/4x3x218x223.html>



15. Shechter H. Spectrophotometric method for determination of ozone in aqueous solutions. *Water Res.* 1973; 7(5): 729-739. doi: 10.1016/0043-1354(73)90089-4
16. Sugita H, Asai T, Hayashi K, Mitsuya T, Amanuma K, Maruyama C, et al. Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus* sriolicida, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(12): 4072-5. doi: 10.1128/AEM.58.12.4072-4075.1992
17. Franson MA. Iodometric method. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 17 ed. Washington, DC (USA): American Public Health Association; 1989.
18. Franson MA. "DPD Colorimetric Method". In *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 14 ed. Washington, DC (USA): American Public Health Association; 1976.
19. Tango MS, Gagnon GA. Impact of ozonation on water quality in marine recirculation systems. *Aquacult Eng.* 2003; 29(3-4):125-137. doi: 10.1016/S0144-8609(03)00061-X
20. Wang T, Reckhow DA. Spectrophotometric Method for Determination of Ozone Residual in Water Using ABTS: 2,2'-Azino-Bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonate). *Ozone Sci Eng.* 2016; 38(5): 373-381. doi: 10.1080/01919512.2016.1188681
21. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. (Edit.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 19th ed. New York (USA): American Public Health Association Inc.; 1995.
22. Environmental Protection Agency (US). *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes.* Washington, DC (USA): Office of Research and Development; 1983, 552p.
23. Barder H, Sturzenegger V, Hoigné J. Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of the N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD). *Wat Res.* 1988; 22(9):1109-1115, 1988. doi: 10.1016/0043-1354(88)90005-X
24. Zou J, Cai H, Wang D, Xiao J, Zhou Z, Yuan B. Spectrophotometric determination of trace hydrogen peroxide via the oxidative coloration of DPD using a Fenton system. *Chemosphere.* 2019; 224: 646-652. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.005
25. International Scientific Committee of Ozone Therapy (ISCO3). *Madrid Declaration on Ozone Therapy.* 3 ed. Madrid (SPA): ISCO3; 2020, 103p.
26. Gonçalves AA. Ozone as a Safe and Environmentally Friendly Tool for the Seafood Industry. *J Aquat Food Prod Tech.* 2016; 25(2): 210-229. doi: 10.1080/10498850.2013.841785
27. Nogales C, Beloti M. Água ozonizada para uso clínico: que tipo de água posso usar? [E-book]. Balneário Camboriú (SC): Philozon; 2020. [cited 2021 jan 25]. Available from: <https://materiais.philozon.com.br/mini-e-book-agua-ozonizada>
28. Yang P, Luo S, Liu H, Jiao W, Liu Y. Aqueous ozone decomposition kinetics in a rotating packed bed. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2019; 96: 11-17. doi: 10.1016/j.jtice.2018.10.027
29. Ershov BG, Morosov PA. The Kinetics of Ozone Decomposition in Water, the Influence of pH and Temperature. *Russ J Phys Chem A.* 2009; 83(8): 1295-1299. doi: 10.1134/S0036024409080093
30. Sotelo JL, Beltran FJ, Benítez FJ, Beltran-Heredia J. Ozone Decomposition in Water: Kinetic Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1987; 26(1):39-43. doi: 10.1021/ie00061a008
31. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, Sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1997; 43(1):61-8. doi: 10.1590/S0104-42301997000100014
32. Jung Y, Hong E, Kwon M, Kang J-W. A kinetic study of ozone decay and bromine formation in saltwater ozonation: Effect of O₃ dose, salinity, pH and temperature. *Chem Eng J.* 2017; 312:30-38. doi: 10.1016/j.cej.2016.11.113
33. Egorova GV, Voblikova VA, Sabitova LV, Tkachenko IS, Tkachenko SN, Lunin VV. Ozone Solubility in Water. *Moscow Univ Chem Bull.* 2015; 70(5):207-210. doi: 10.3103/S0027131415050053
34. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). *Farmacopeia Brasileira.* 6ª edição: Volume II - Insumos Farmacêuticos e Especialidades. [Internet]. 2019 [cited 2021 jan 25]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>
35. Bocci V. *Ozone: a new medical drug.* 2 ed. Siena (ITA): Springer; 2011, 336 p.
36. Ma L, Wen S, Yuan J, Zhang D, Lu Y-L, Zhang L, et al. Detection of chlorite, chlorate and perchlorate in ozonated saline. *Exp Ther Med.* 2020; 20(3):2569-2576. doi: 10.3892/etm.2020.9005
37. Schwartz A, Bardeles HGR, Talbott B. Ozone therapy in the treatment of the neuroinfectious diabetic foot: case report. *Ozone Ther Glob J* [Internet]. 2019 [cited 2021 jan 25]; 9(1): 135-143. Available from: <http://www.xn--revistaespaoladeozonoterapia-7xc.es/index.php/reo/article/view/152/148>
38. Bocci V, Zanardi I, Borrelli E, Travagli V. Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. *J Pharm Pharmacol.* 2012; 64(4): 482-489. doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01427.x
39. Schwartz A. Solución Salina Ozonizada (Sso3): Fundamentos Científicos. *Rev Esp Ozonoterapia* [Internet]. 2016 [cited 2021 jan 25]; 6 (1): 111-120. Available from: <http://www.xn--revistaespaoladeozonoterapia-7xc.es/index.php/reo/article/view/91>
40. Felipe CA. A valorização da enfermagem no enfrentamento da COVID-19. *Glob Acad Nurs.* 2020; 1(2):e12. doi: dx.doi.org/10.5935/2675-5602.20200012

