

Ozonidy oligomeryczne – synteza, własności, oddziaływanie biologiczne na wybrane grzyby chorobotwórcze

MAREK NOCUN^{1*}, JERZY NIEDŹWIEDZKI², PAWEŁ KRZYŚCIAK³, ELŻBIETA NIEDŹWIEDZKA³

¹AGH Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

²AGH Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Robotyki, al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

³Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Lekarski, ul. Św. Anny 12, 31-008 Kraków

*e-mail: nocun@agh.edu.pl

Streszczenie

Ozon jest gazem o wysokiej aktywności chemicznej i silnych właściwościach utleniających. Właściwości utleniające ozonu wykorzystywane są do niszczenia mikroorganizmów chorobotwórczych m.in. bakterii, grzybów i wirusów. Stosowanie ozonu w formie gazowej do celów terapeutycznych jest jednak uciążliwe i nie zawsze możliwe. Właściwości biobójcze wykazują również niektóre oleje roślinne poddane działaniu ozonu przez określony czas. W artykule opisano proces syntezy biologicznie aktywnych związków polimerycznych (ozonidów). Syntezę prowadzono w oparciu o olej z oliwek. Stosując spektroskopię w podczerwieni, analizowano zmiany strukturalne zachodzące pod wpływem oddziaływania ozonu na olej. Obserwowane zmiany dotyczą głównie tworzenia się tlenowych związków o budowie pierścieniowej, które następnie przechodzą w formy liniowe. Zmiany lepkości w funkcji czasu ozonowania świadczą o tworzeniu się struktur rozgałęzionych i przechodzeniu oleju w formę polimeryczną. Pod wpływem ozonu następuje także utlenianie grup chromoforowych zawartych w oleju barwników. Wysoką aktywność ozonu w stosunku do związków barwnych zawartych w oleju potwierdzają wyniki spektroskopii UV-VIS. Wyniki badań bioaktywności syntetyzowanych ozonidów oligomerycznych na wybranych szczepach grzybów chorobotwórczych potwierdziły silne działanie przeciwgrzybicze tych związków.

Słowa kluczowe: ozon, ozonidy, aktywność biologiczna, grzyby chorobotwórcze

OLIGOMERIC OZONIDES - SYNTHESIS, PROPERTIES AND BIOLOGICAL IMPACTS ON SELECTED PATHOGENIC FUNGI

Ozone is a gas with high chemical activity and strong oxidizing properties. Oxidizing properties of ozone are used to destroy pathogenic micro-organisms, including bacteria, fungi and viruses. However, the use of ozone in the gaseous form for therapeutic purposes is cumbersome and not always possible. Biocidal properties exhibit also some vegetable oils treated with ozone for a specific time. The article describes the procedure for the synthesis of biologically active polymeric compounds (ozonides). The synthesis was based on olive oil. Using infrared spectroscopy, structural changes under the influence of ozone on the oil were analyzed. The observed changes relate mainly to the formation of oxygenated compounds building a ring, which then go into linear forms. Changes in viscosity as a function of ozonization time indicate the formation of branched structures, and passing the polymeric forms in the oil. Under the influence of ozone the chromophore dyes contained in the oil are oxidised. The high activity of ozone in relation to coloured compounds contained in the oil was confirmed by UV-VIS spectroscopy. Studies results of the bioactivity of the synthesized oligomeric ozonides on selected pathogenic fungi confirmed the strong antifungal activity of these compounds.

Keywords: Ozone, Ozonides, Biological activity, Pathogenic fungi

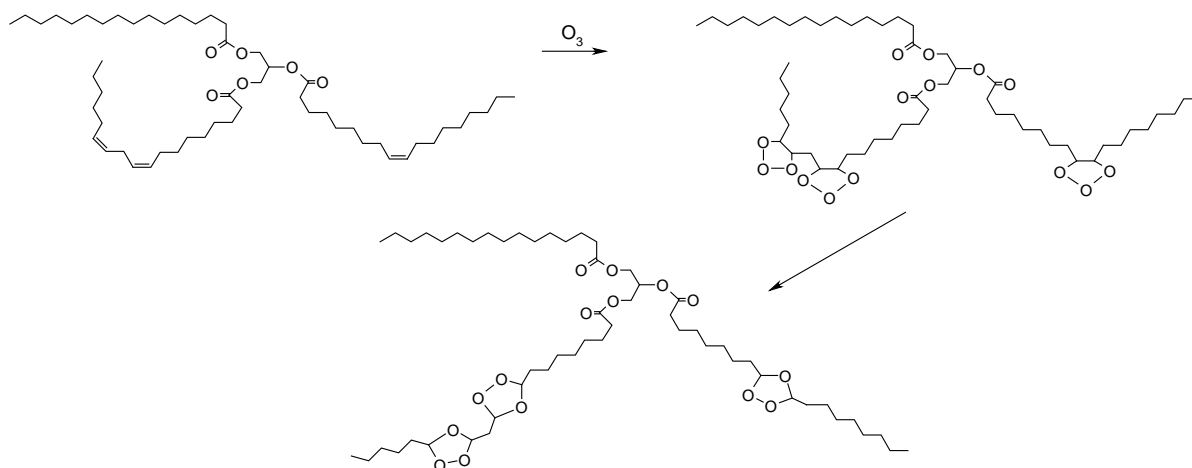
1. Wstęp

Odkryty pod koniec XVIII wieku ozon (O₃) jest jedną z najsilniejszych substancji utleniających. Zdolność utleniania przez ozon błony komórkowej mikroorganizmów (bakterii, grzybów) jest wykorzystywana m.in. do oczyszczania wody pitnej. Wyniki badań, prowadzonych od lat 50-tych ubiegłego wieku, wskazują na korzystne działanie terapeutyczne ozonu w przypadku zmian chorobowych skóry wywołanych przez bakterie i/lub grzyby chorobotwórcze [1-4].

Ozon powstaje z tlenu pod wpływem wyładowania elek-

trycznego pomiędzy elektrodami zasilanymi prądem stałym lub zmiennym o napięciu rzędu 10-30 kV. Pod wpływem wyładowania koronowego w przestrzeni międzyelektrodowej komory wyładowczej tlen zawarty w powietrzu przechodzi w ozon. Wydajność reakcji uzależniona jest od wielu czynników: temperatury, ciśnienia atmosferycznego, napięcia oraz częstotliwości prądu zasilającego elektrodę emisyjną, geometrycznych cech konstrukcyjnych komory wyładowczej, a także od materiałów z jakich komora wyładowcza została wykonana (zastosowanych dielektryków).

Bezpośrednie stosowanie ozonu gazowego w terapii jest



Rys. 1. Synteza trwałych pochodnych trójglicerydów nienasyconych w wyniku ich reakcji z ozonem [14].
 Fig. 1. Synthesis of stable derivative of unsaturated triglycerides by their reaction with ozone [14].

niepraktyczne i trudne do realizacji między innymi ze względu na jego toksyczność oraz szybki czas rozpadu.

Opisane w publikacjach wyniki badań wskazują, że podobne do ozonu gazowego właściwości terapeutyczne wykazują nienasycone kwasy tłuszczowe (oleinowy, linolowy, palmitynowy i linolenowy) poddane w odpowiednich warunkach saturacji gazowym ozonem [5-9]. Przeprowadzone badania wskazały, że bioaktywne ozonidy oligomeryczne można uzyskiwać poprzez saturację ozonem zimnotłoczonych olejów, uzyskiwanych z oliwek, ziaren słonecznika lub innych roślin oleistych. Istotne znaczenie dla przebiegu reakcji nienasyconych kwasów tłuszczowych z ozonem ma środowisko, w którym prowadzona jest synteza ozonidów. Stwierdzono negatywny wpływ obecności wody na przebieg tych reakcji. Z tego względu do syntezy należy stosować ozon wytwarzany z suchego powietrza lub tlenu.

Produkty reakcji kwasów tłuszczowych z ozonem są wynikiem reakcji opisanych przez Criegee'a [10-13]. Pod wpływem ozonu w miejsce podwójnych wiązań $>C=C<$, występujących w nienasyconych kwasach tłuszczowych, powstają mostki tlenowe (ozonidy). Początkowo powstające niestabilne ozonidy ulegają rozpadowi i poprzez cykl kolejnych przemian przechodzą w związki chemicznie stabilne. Ostatecznie, produktami reakcji są polinadtlenki (ozonidy oligomeryczne), występujące także w literaturze pod nazwą ozonidy Criegee'a. Reakcje te dotyczą zarówno nienasyconych trójglicerydów, wolnych kwasów tłuszczowych, jak i ich estrów, występujących między innymi w olejach jadalnych. Przykładowy mechanizm syntezy ozonidów oligomerycznych wg. reakcji Criegee'a przedstawiono na Rys. 1.

Ozonidy oligomeryczne są związkami stabilnymi. Potwierdzono to poprzez porównanie własności związków bezpośrednio po ich syntezie z tymi, które przechowywano w temp. pokojowej (18–24 °C) przez okres co najmniej 6 miesięcy. Wyniki badań wskazują, że w okresie tym nie następują zmiany w strukturze związków powodujące pogorszenie ich działań biologicznych. Pozwala to na ich stosowanie bez przechowywania w warunkach obniżonej temperatury.

2. Część eksperymentalna

2.1. Synteza ozonidów oligomerycznych z nienasyconych kwasów tłuszczowych

Do syntezy zastosowano olej pochodzenia roślinnego – olej z oliwek tłoczony na zimno, będący źródłem nienasyconych kwasów tłuszczowych. Skład chemiczny oleju z oliwek jest zmienny i zależy od regionu, z którego pochodzą oliwki oraz od zastosowanej metody ekstrakcji, niemniej jednak zawartość poszczególnych składników mieści się w zakresach podanych w Tabeli 1 [15, 16].

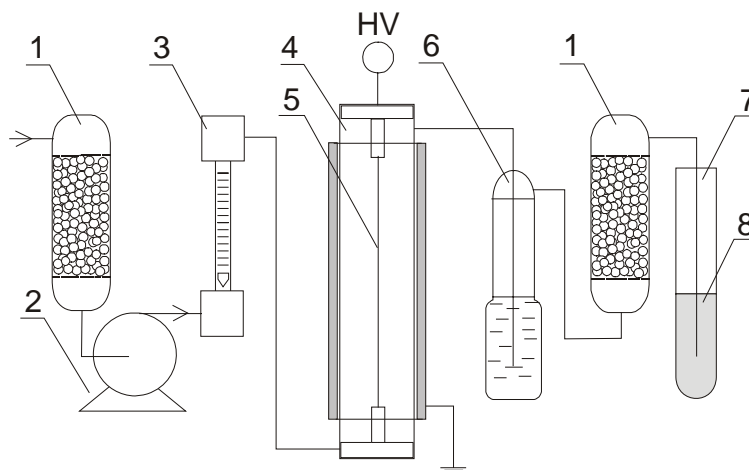
Tabela 1. Skład chemiczny oleju z oliwek.
 Table 1. Chemical composition of the olive oil.

L.p.	Kwas tłuszczowy	Zawartość [% wag.]
1.	oleinowy	55 - 83
2.	linoleinowy	3,5 - 21
3.	palmitynowy	7,5 - 20
4.	stearynowy	0,5 - 5,0
5.	α -linoleinowy	0 - 1,5

Użyty do badań olej (producent Basso Fedele & Figli, Srl, Włochy) jest mieszaniną kwasów jednonienasyconych (69,6% wag.), wielonienasyconych (9% wag.), nasyconych (13% wag.), a także wody i innych składników (0,4% wag.). Próbkę oleju w ilości 10 ml poddawano saturacji ozonem o stężeniu 5 mg/l przez 40 h.

W prowadzonych badaniach jako źródła wysokiego napięcia użyto transformatora Tesli SSTC (ang. *solid state Tesla coil*) z półprzewodnikowymi elementami kluczującymi oraz sprzężeniem zwrotnym synchronizującym pracę układu sterującego tak, aby uzyskać rezonans w obwodzie transformatora. Umożliwiło to zasilanie elektrody ulotowej komory wyładowczej wysokim napięciem o stosunkowo wysokiej częstotliwości $f = 140$ kHz. Napięcie elektrody ulotowej utrzymywano na poziomie $u = 15$ kV.

Ozon wytwarzano przy stałym przepływie powietrza przez komorę wyładowczą $v = 10$ l/min. Uproszczony schemat in-



Rys. 2. Schemat instalacji laboratoryjnej do ozonowania oleju: 1 – osuszacz powietrza, 2 – pompa, 3 – rotametr, 4 – generator ozonu, 5 – elektroda ulotowa, 6 – płuczka wodna, 7 – zbiornik, 8 – olej roślinny, HV – podłączenie wysokiego napięcia.

Fig. 2. Diagram of a laboratory equipment for ozonation oil: 1 – dehumidifier, 2 – pump, 3 – rotameter, 4 – ozone generator, 5 – discharge electrode, 6 – scrubber water, 7 – tank, 8 – vegetable oil, HV – high voltage connection

stalacji laboratoryjnej do syntezy ozonidów oligomerycznych przedstawiono na Rys. 2.

2.2. Stosowane metody badawcze

Badania strukturalne przeprowadzono za pomocą spektrometru IR Specord M80 Carl Zeiss Jena. Analizy wykonywane były techniką absorpcyjną, przy czym olej był nakładany na powierzchnię okienka KBr w postaci cienkiej warstwy bez dodatków rozpuszczalnika. Pomiar wykonano z rozdzielczością 4 cm^{-1} w zakresie $300\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

Do analizy w zakresie UV–VIS zastosowano spektrofotometr Jasco V650.

Właściwości reologiczne oleju analizowano za pomocą reometru. Pomiar lepkości przeprowadzono przy użyciu lepkościomierza cyfrowego RVDV-II+ Pro firmy Brookfield z przystawką do małych próbek Brookfield SSA z wrzecionem SC4-21. Zastosowanie przystawki do małych próbek (SSA) i wrzeciona typu SC4-21 umożliwia wykonanie pomiarów w zakresie lepkości $25\text{--}500000\text{ cP}$. Badania wykonano przy użyciu programu sterującego Brookfield Rheocalc 32. Zgodnie ze specyfikacją RVDV-II+ Pro dokładność pomiaru lepkości wynosiła 1%, zaś powtarzalność pomiaru lepkości - 0,2%. Badania wykonano na pobieranych w stałych odstępach czasu próbkach oleju, w trakcie procesu jego saturacji ozonem.

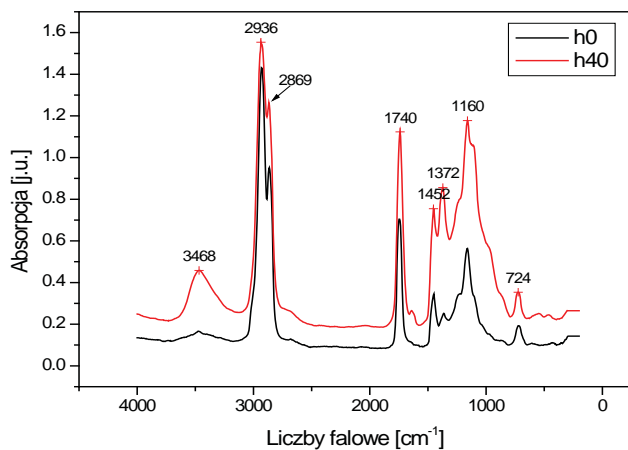
Badania bioaktywności ozonidów oligomerycznych przeprowadzono poprzez porównanie ich wpływu na rozwój kultur wybranych szczepów grzybów chorobotwórczych. Próbę kontrolną stanowiły hodowle tych samych szczepów z dodatkiem oleju nie poddanego ozonowaniu. Zawiesinę szczepu wzorcowego w soli fizjologicznej, o stężeniu ok. $3 \cdot 10^8\text{ CFU/ml}$ (1^0 McFarlanda), nanoszono za pomocą wymazu na podłoże Sabourauda. Po wyschnięciu na ten sam obszar podłoża nakładano 0,5 ml niemodyfikowanego oleju lub oleju ozonowanego i rozprowadzano za pomocą szklanej bagietki. Hodowle inkubowano w temperaturze $37\text{ }^\circ\text{C}$ przez okres 72 h.

3. Wyniki badań

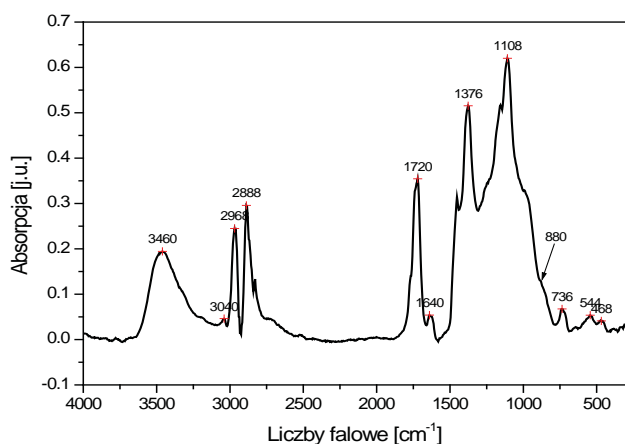
3.1. Badania IR

Właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna ozonowanego oleju jest wynikiem zmian strukturalnych jego składników. Zmiany struktury oleju w wyniku działania ozonu analizowane były za pomocą spektroskopii IR. Na Rys. 3 pokazano porównanie widm IR oleju wyjściowego (nieozonowanego) z widmem oleju po 40-godzinnym działaniu ozonu. Szerokie pasmo o małej intensywności z maksimum przy 3468 cm^{-1} świadczy o obecności w oleju wyjściowym wody. Intensywne piki przy 2936 cm^{-1} i 2869 cm^{-1} związane są z drganiami rozciągającymi wiązań C–H₃ odpowiednio asymetrycznych i symetrycznych. Drgania deformacyjne tych wiązań widoczne są w postaci pasm absorpcyjnych 1452 cm^{-1} i 1372 cm^{-1} . Szerokie pasmo absorpcyjne z maksimum przy 1160 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających symetrycznych i niesymetrycznych wiązań C–C oraz wiązań C–O [17, 18]. Drgania wiązań C=C i C=O dają pasmo absorpcyjne 1740 cm^{-1} [18], natomiast pasmo przy $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ pochodzi od drgań szkieletowych łańcuchów węglowodorowych. Z porównania widm oleju wyjściowego i po 40-godzinnym ozonowaniu widać wzrost intensywności pasm głównie w zakresie $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$. Istotnie wzrosła intensywność pasma przy $\sim 3460\text{ cm}^{-1}$, świadcząca o wzroście ilości grup OH w oleju. W celu szczegółowego prześledzenia zmian intensywności poszczególnych pasm zastosowano procedurę polegającą na odjęciu widma oleju wyjściowego od widma oleju po 40-godzinnym ozonowaniu. Przyjęto przy tym, że intensywność pasm pochodzących od wiązań rozciągających C–H w obu olejach powinna być zbliżona. Wyniki tej analizy przedstawiono na Rys. 4.

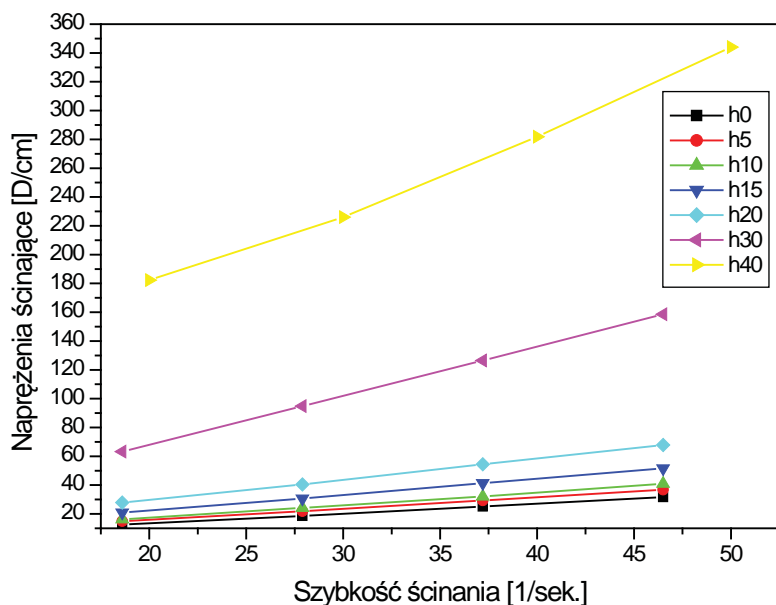
Największy wzrost intensywności obserwuje się dla pasma 1109 cm^{-1} związanego z drganiami rozciągającymi C–O w ozonidach [19–21]. Wzrost intensywności pasma 1376 cm^{-1} wiązań należy z tworzeniem się wiązań C–N. W procesie wytwarzania ozonu z powietrza tworzy się pewna ilość tlenków azotu, które w połączeniu z para wodną dają kwas azotowy (V) i (III). W wyniku reakcji kwasu z olejem mogą tworzyć się



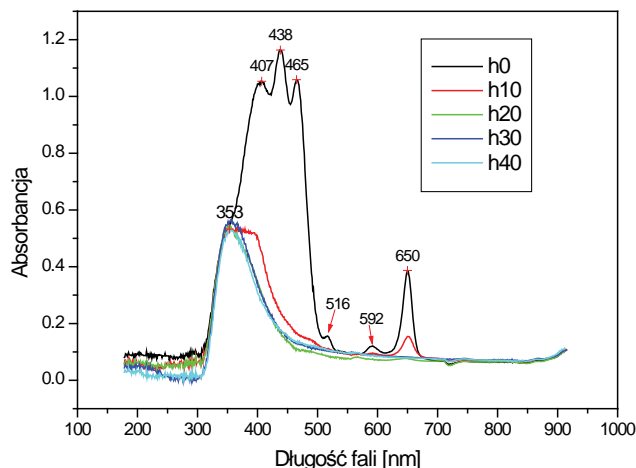
Rys. 3. Porównanie widm IR oleju wyjściowego (h0) i oleju po 40 godzinach saturacji ozonem (h40).
Fig. 3. Comparison of IR spectra of pure oil (h0) and oil after 40 hours of ozone saturation (h40).



Rys. 4. Wynik odjęcia widma oleju wyjściowego od widma oleju po 40 godzinach ozonowania.
Fig. 4. The result of subtracting the IR spectrum of original oil from one of oil after 40 h ozonation.



Rys. 6. Charakterystyka reologiczna oleju po różnych czasach ozonowania: h0 - olej wyjściowy, h10, h20, h30, h40 - czasy odpowiednio 10 h, 20 h, 30 h i 40 h.
Fig. 6. Rheological characteristic of the oil after different ozonation times: h0 - original oil, h10, h20, h30, h40 - times of 10 h, 20 h, 30 h, and 40 h, respectively.



Rys. 5. Widmo UV-VIS oleju z oliwek dla różnych czasów ozonowania: h0 - olej wyjściowy, h10, h20, h30, h40 - czasy odpowiednio 10 h, 20 h, 30 h i 40 h.
Fig. 5. UV-VIS spectrum of olive oil for different ozonation times: h0 - original oil, h10, h20, h30, h40 - times of 10 h, 20 h, 30 h, and 40 h, respectively.

wiązania C-N [17]. Pasma 1720 cm^{-1} świadczy o obecności wiązań podwójnych C=O. Obecność oligomerycznych nadtlenuków C-O-O-C potwierdza pasmo 880 cm^{-1} [17]. Pasma 2968 cm^{-1} i 2888 cm^{-1} związane z drganiami C-H₃ wynikają z poszerzenia tych pików w przypadku oleju ozonowanego, co świadczy o zmianie kąta i długości tych wiązań w wyniku ozonowania.

3.2. Badania UV-VIS

Pierwotna barwa oleju z oliwek pochodzi od związków barwnych i chlorofilu obecnego w oliwkach (chlorofil A - 432 nm i 465 nm, chlorofil B - 466 nm i 650 nm, neoksantyna - 412 nm, 437 nm i 466 nm, feofityna - 409 nm i 665 nm). Olej poddany działaniu ozonu o silnych właściwościach utleniających zmienia barwę z jasno żółtozielonej na słomkową

lub ulega całkowitemu odbarwieniu. Widmo UV-VIS wyjściowego oleju charakteryzuje się pikami absorpcyjnymi o maksimach przy długościach fali wynoszących 353, 407, 438, 465, 516, 592 i 650 nm (Rys. 5). Podczas ozonowania następuje zanik intensywnych pasm 438, 465 i 516 nm oraz obniżenie intensywności pasm 407 nm, 592 nm i 650 nm. Po 20 godzinach saturacji oleju ozonem obserwuje się już tylko obecność jednego pasma - 353 nm. Pasma to jest stabilne i nie ulega zmianie do zakończenia procesu ozonowania oleju. Po 40 godzinach ozonowania olej jest transparentny z lekko żółtym odcieniem. Transparentność oleju wskazuje, że woda jest chemicznie związana i nie tworzy emulsji z lejem.

3.3. Badania reologiczne

Charakterystyka reologiczna oleju poddanego działaniu ozonu została pokazana na Rys. 6.

Zarówno olej wyjściowy, jak i oleje ozonowane do 30 godz. wykazują prostoliniową zależność naprężenia ścinającego w funkcji szybkości ścinania, przy czym funkcja ta nie przechodzi przez początek układu współrzędnych, a więc oleje wykazują cechy ciała plastycznego Bingham'a. Wzrost naprężeń ścinających oleju ozonowanego do 15 godzin jest nieduży, natomiast dalsze ozonowanie prowadzi do znacznego wzrostu naprężeń ścinających. Ponadto charakterystyka oleju ozonowanego 40 godzin wykazuje odchyłki od liniowości. Dobrze obrazuje to Rys. 7, na którym pokazano zmianę lepkości oleju w funkcji czasu ozonowania.

Lepkość oleju wyjściowego wynosiła 67 cp, natomiast po 40 godzinnym ozonowaniu wzrosła do wartości 860 cp, a więc niemal 13-krotnie. Zmiana charakterystyki reologicznej, a zwłaszcza wzrost lepkości z czasem ozonowania związana jest początkowo ze wzrostem długości łańcuchów węglowodorowych, a przy dłuższym ozonowaniu następuje tworzenie struktury przestrzennej – rozgałęzione struktury polimeryczne.

3.4. Badania bioaktywności ozonidów oligomerycznych

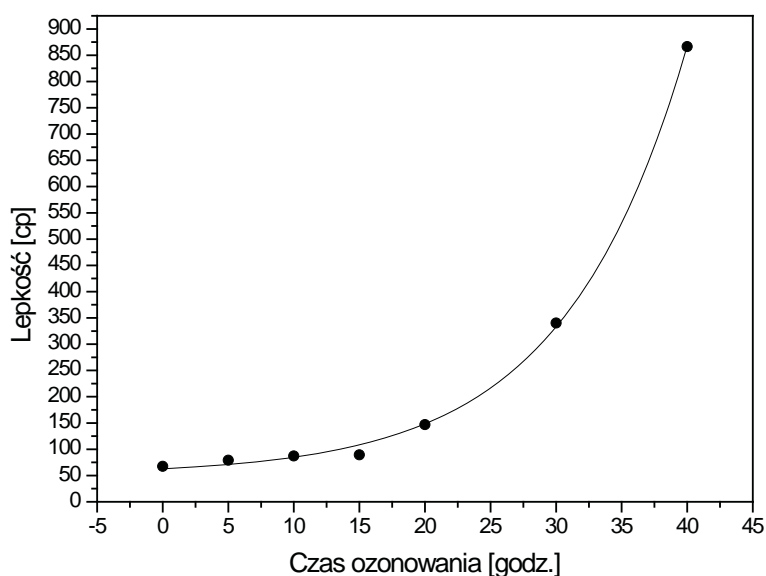
Na Rys. 8 przedstawiono wynik badania wzrostu grzybów chorobotwórczych na podłożu stałym, obejmującego hodowlę wzorcową z dodatkiem nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz ich pochodnych (ozonidów oligomerycznych) powstałych w wyniku reakcji z ozonem.

Badania wpływu ozonidów oligomerycznych na wzrost grzybów chorobotwórczych przeprowadzono na hodowlach szczepów *Candida albicans* ATCC 90028, *Trichphyton rubrum* oraz pleśni środowiskowych. Porównano wzrost szczepów po dodaniu na podłoże próbek ozonowanego oleju z oliwek z próbą kontrolną (olej nieozonowany).

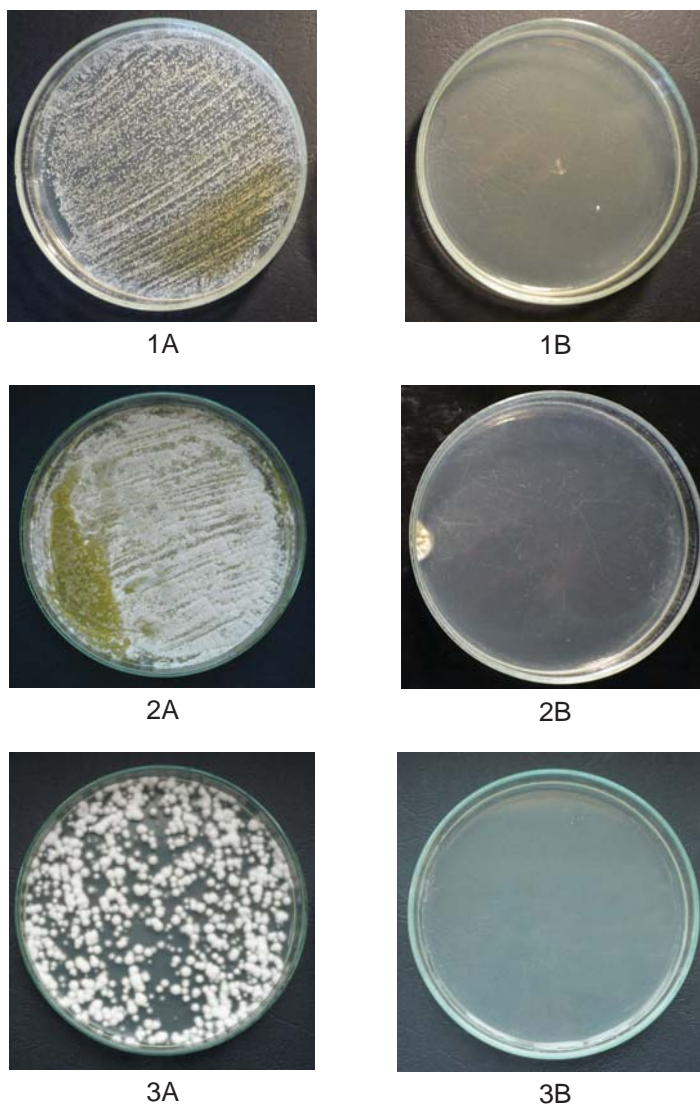
Wyniki przeprowadzonych badań wykazały całkowite zahamowanie wzrostu grzybów chorobotwórczych pod wpływem działania ozonidów oligomerycznych syntetyzowanych z trójglicerydów nienasyconych.

4. Wnioski

Olej z oliwek poddany ozonowaniu zwiększa swoją lepkość na skutek tworzenia się przestrzennej sieci polimerowej. Pod wpływem działania ozonu dochodzi do zerwania wiązań podwójnych C=C z jednoczesnym wbudowaniem tlenu pochodzącego z ozonu. Prowadzi to do wytworzenia struktur oligomerycznych, które przy dłuższym działaniu ozonu



Rys. 7. Lepkość oleju w funkcji czasu ozonowania.
Fig. 7. Viscosity of the oil as a function of ozonation time.



Rys. 8. Wpływ ozonidów oligomerycznych na rozwój kultur wybranych szczepów grzybów chorobotwórczych: 1 - *Candida albicans*, 2 - *Aspergillus fumigatus*, 3 - *Trichphyton rubrum*, A - próba kontrolna, B - olej po 40 h ozonowania
Fig. 8. Effect of oligomeric ozonides on growth of selected pathogenic fungi cultures; 1 - *Candida albicans*, 2 - *Aspergillus fumigatus*, 3 - *Trichphyton rubrum*, A - control probe, B - oil after 40 h ozonation.

przechodzą w polimeryczne rozgałęzione. Procesowi temu towarzyszy znaczny wzrost lepkości powstających związków. Badania mykologiczne, przeprowadzone na wybranych szczepach grzybów chorobotwórczych, wykazały silne działanie przeciwrzybicze zsyntetyzowanych ozonidów oligomerycznych.

Literatura

- [1] Bocci, A. V.: Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art, *Arch. Med. Res.*, 37, (2006), 425-435.
- [2] Rothchild, J., Harris, R., Mollica, P.: Current Concepts of Oxygen Ozone Therapy for Dentistry in the United States, *Int. J. Ozone Therapy*, (2010), 105-112.
- [3] Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., Zanardi, I.: The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug, *Med. Res. Rev.*, 29, (2009), 646-82.
- [4] Gracer, R. I., Bocci, V.: Can the combination of localized "proliferative therapy" with "minor ozonated autohemotherapy" restore the natural healing process?, *Med. Hypotheses*, 65, (2005), 752-760.
- [5] Menéndez, S., Falcón, L., Simón, D. R., Landa, N.: Efficacy of Ozonized Sunflower Oil in the Treatment of Tinea Pedis, *Mycoses*, 45 (2002), 329-332.
- [6] Hernández, F., Hernández, D., Zamora, Z., Díaz, M., Ancheta, O., Rodríguez, S., Torres, D., Duodenalis G.: Effects of an Ozonized Sunflower Oil Product (Oleozone®) on in Vitro Trophozoites, *Exp. Parasitol.*, 121, (2009), 208-212
- [7] Valacchi, G., Fortino, V., Bocci, V.: The Dual Action of Ozone on the Skin, *Br. J. Dermatol.*, 153, (2005), 1096-1100.
- [8] Geweely, N. S. I.: Antifungal activity of ozonized olive oil (Oleozone), *Int. J. Agric. Biol.*, 8, 5, (2006), 670-675.
- [9] Sechi, L. A., Lezcano, I., Nunez, N., Espim, M., Duprè, I., Pinna, A., Mollicotti, P., Fadda, G., Zanetti, S.: Antibacterial activity of ozonated sunflower oil (Oleozone), *J. Appl. Microbiol.*, 90, (2001), 279-284.
- [10] Criegee, R.: Mechanismus Der Ozonolyse, *Angew. Chem.*, 87, (1975), 765-771.
- [11] Bailey, P. S.: *Ozonation in Organic Chemistry*, Academic Press, New York (USA) 1978.
- [12] Polec, R., Yuzhakov, G.: Theoretical Analysis of the Stereoselectivity in the Ozonolysis of Olefins. Evidence for a Modified Criegee Mechanism, *J. Org. Chem.*, 62, (1997), 2757-2762.
- [13] Kuczkowski, R. L.: The structure and mechanism of formation of ozonides, *Chem. Soc. Rev.*, 21, (1992), 79-83, DOI: 10.1039/CS9922100079.
- [14] Travagli, V., Zanardi, I., Valacchi, G., Bocci, V.: Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases, *A Review Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation*, Vol. 2010, doi:10.1155/2010/610418.
- [15] <http://www.oliveoilsource.com/page/chemical-characteristics>
- [16] Beltraà, G., Del Rio, C., Sanchez, S., Martiànez, L.: Influence of Harvest Date and Crop Yield on the Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oils from Cv. Picual, *J. Agric. Food Chem.*, 52, (2004), 3434-3440.
- [17] Coates, J.: *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach in Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, 10815-10837.
- [18] Lee, D. H., Condrate, R. A.: FTIR spectral characterization of thin film coatings of oleic acid on glasses: I. Coatings on glasses from ethyl alcohol, *J. Mater. Sci.*, 34, (1999), 139-146.
- [19] Guerra Blanco, P., Poznyak, T., Chairez, I., Brito-Arias, M.: Structural characterization of ozonated grape seed and sunflower oils: Measurement of ozonation degree based on their total Unsaturation (TU), *E. J. Lipid Sci. Technol.*, 117, 7, (2015), 988-998.
- [20] Zanardi, I., Travagli, V., Gabbrielli, A., Chiasserini, L., Bocci, V.: Physico-Chemical Characterization of Sesame Oil Derivatives, *Lipids*, 43, (2008), 877-886.
- [21] Soriano Jr, N. U., Migo, V. P., Matsumura, M.: Functional Group Analysis during Ozonation of Sunflower Oil Methyl Esters by FT-IR and NMR, *Chem. Phys. Lipids*, 126, (2003), 133-140.



Otrzymano 28 stycznia 2016, zaakceptowano 24 marca 2016.