



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais



**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO QUIMILUMINESCENTE PARA
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE OXIDANTE DE ÓLEOS
OZONIZADOS**

Mestranda: Nathalia Mariana Pavan

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2023

NATHALIA MARIANA PAVAN

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO QUIMILUMINESCENTE PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE OXIDANTE DE ÓLEOS OZONIZADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

BAURU

2023

Pavan, Nathalia Mariana.

Desenvolvimento de Método Quimiluminescente para
Determinação da Capacidade Oxidante de Óleos
Ozonizados / Nathalia Mariana Pavan, 2023
78 f. : il.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências, Bauru, 2023

1. Ozonólise. 2. Óleo Ozonizado. 3.
Quimiluminescência. I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE NATHALIA MARIANA PAVAN, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 24 dias do mês de fevereiro do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de NATHALIA MARIANA PAVAN, intitulada **Desenvolvimento de Método Quimiluminescente para Determinação da Capacidade Oxidante de Óleos Ozonizados**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru UNESP, Dr. JULIANO PASSARETTI FILHO (Participação Virtual) do(a) Departamento Técnico de Pesquisa e Desenvolvimento / Botupharma - Botucatu, Prof. Dr. FLAVIO JUNIOR CAIRES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru UNESP Bauru. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Valdecir Farias
Ximenes:11252888
848
Prof. Dr. VALDECIR FARIAS XIMENES

Digitally signed by Valdecir Farias Ximenes 1125288888
DN: cn=Valdecir Farias Ximenes 1125288888, ou=UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", o=UNESP, c=BR
Reason: I am the author of this document
Date: 2023.02.28 16:38:51-02'00'
Full PDF Reader Version: 12.1.1

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Ivone (*in memorian*), que não pôde acompanhar esta etapa de minha vida, mas preparou todo meu alicerce para que eu chegasse até aqui, com seu amor incondicional.

Ao meu pai Sérgio, por todo o apoio que me deu durante toda minha trajetória, sem você eu não teria conseguido.

À minha irmã e amiga Giovanna, por sempre ter acreditado no meu potencial. Pelas longas conversas e descobertas que fizemos juntas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdecir, por ter acreditado em mim e por toda a paciência ao longo deste projeto.

Ao meu cunhado Leandro, por todo o acolhimento e compreensão.

Às minhas amigas de laboratório: Gabriela, Carmen e Luiza, que fizeram meus dias mais alegres.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos os Professores do POSMAT e da FC, que contribuíram para minha formação.

Ao INCT-BioNat pela bolsa concedida nº: 88887.612536/2021-00.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.”

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

A ozonioterapia é um procedimento médico, veterinário e odontológico bem difundido. As técnicas utilizadas são diversas e incluem a administração direta e controlada do gás ozônio e a utilização de materiais/substâncias previamente ozonizadas, como é o caso dos óleos ozonizados. Diversos tipos de óleos podem ser ozonizados para aplicação tópica. A ozonização altera a estrutura dos ácidos graxos que compõem os óleos, gerando compostos oxidantes (como peróxidos e ozonídeos), que são os agentes no processo de cicatrização. Neste trabalho foi desenvolvido um método para caracterização da capacidade oxidante de óleos ozonizados utilizando-se de quimiluminescência. Para isso, óleo de gergelim foi submetido à ozonização em diferentes tempos e caracterizados pelos seus índices de peróxidos, alterações nos espectros de infravermelho e por seu comportamento térmico. Os índices de peróxido obtidos após ozonização foram (controle: $12 \pm 2 \text{ mmol kg}^{-1}$, 10 min: $177 \pm 5 \text{ mmol kg}^{-1}$, 30 min: $301 \pm 5 \text{ mmol kg}^{-1}$, 60 min: $439 \pm 11 \text{ mmol kg}^{-1}$, 120 min: $628 \pm 10 \text{ mmol kg}^{-1}$). As análises por infravermelho mostraram o desaparecimento progressivo da banda de estiramento C=C e aumento da banda de estiramento OH, consistente com o processo de ozonólise. Análises por DSC foram capazes de detectar a decomposição exotérmica exclusiva dos óleos ozonizados. Os métodos quimiluminescentes foram baseados na utilização de luminol como sonda e peroxidase de raiz forte (HRP) como catalisador. Em outra abordagem, a peroxidase foi substituída por taurina cloramina. Os métodos foram otimizados em relação aos solventes, tampões, pH, concentração de luminol, HRP e taurina cloramina. Foi observada uma correlação entre a emissão de quimiluminescência e a concentração dos óleos ozonizados. No entanto, o aumento excessivo do tempo de ozonólise provocou diminuição da emissão de quimiluminescência. Em conclusão, o método desenvolvido apresentou potencial como método alternativo para estudo do poder oxidante de óleos ozonizados.

Palavras chave: ozonólise, óleo ozonizado, quimiluminescência.

ABSTRACT

Ozonotherapy is a widespread medical, veterinary and dental procedure. The techniques used are diverse and include the direct and controlled administration of ozone gas and the use of preciously ozonated materials, such as ozonized oils. Several types of oils can be ozonized for topic application. Ozonization alters the structure of the fatty acids, generating oxidizing compounds (such as peroxides and ozonides), which are the agents in the wound healing. In this work, a technique for characterizing the oxidizing capacity of ozonized oils using chemiluminescence was developed. For this, sesame oil was subjected to Ozonization at different times and characterized by its peroxide index, changes in infrared spectra and its thermal behavior. The peroxide index obtained after Ozonization were (control: 12 ± 2 mmol kg⁻¹, 10 min: 177 ± 5 mmol kg⁻¹, 30 min: 301 ± 5 mmol kg⁻¹, 60 min: 439 ± 11 mmol kg⁻¹, 120 min: 628 ± 10 mmol kg⁻¹). Infrared analysis showed the progressive disappearance of the C=C stretch band and increase in the OH stretch band, consistent with the ozonolysis process. DSC analysis were able to detect an exothermic decomposition unique to ozonized oils. The chemiluminescent methods were based on the use of luminol as a probe and horseradish peroxidase (HRP) as a catalyst. In another approach, peroxidase was replaced by chloramine taurine. The methods were optimized in relation to solvents, buffers, pH, luminol concentration, HRP and chloramine taurine. A correlation was obtained between chemiluminescence emission and concentration of ozonized oils. However, the excessive increase in ozonolysis time caused a decrease in chemiluminescence emission. In conclusion, this technique presented potential as an alternative method for studying the oxidizing power of ozonized oils.

Keywords: ozonolysis, ozonized oil, chemiluminescence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HÍBRIDO DE RESSONÂNCIA DO OZÔNIO	17
FIGURA 2 – ESTRUTURAS MOLECULARES DOS ÁCIDOS OLEICO (A) E LINOLEICO (B).....	22
FIGURA 3 – UTILIZAÇÃO DE COLÍRIO DE ÓLEO OZONIZADO PARA O TRATAMENTO DE CONJUNTIVITE CRÔNICA DE UM GATO	24
FIGURA 4 – PROCESSO DE OZONÓLISE DE ÓLEO.....	33
FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE O ÓLEO NÃO OZONIZADO E OS ÓLEOS OZONIZADOS POR 10, 30, 60 E 120 MINUTOS	39
FIGURA 6 – CONJUNTO DE ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO ÓLEO OZONIZADO EM COMPARAÇÃO COM O ÓLEO NÃO OZONIZADO	41
FIGURA 7 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO ÓLEO NÃO OZONIZADO EM COMPARAÇÃO COM O ÓLEO OZONIZADO POR 60 MINUTOS	42
FIGURA 8 – CURVAS REFERENTES ÀS ANÁLISES TERMOTERMOGRAVIMÉTRICAS DO ÓLEO OZONIZADO PELOS TEMPOS DE 10, 30, 60 E 120 MINUTOS, COMPARADO COM O ÓLEO NÃO OZONIZADO.....	45
FIGURA 9 – CURVAS DO DTG DOS ÓLEOS OZONIZADOS POR 10, 30, 60 E 120 MINUTOS, COMPARADOS COM O ÓLEO NÃO OZONIZADO.....	46
FIGURA 10 – CURVAS DE DSC DOS ÓLEOS OZONIZADOS POR 10, 30, 60 E 120 MINUTOS COMPARADOS COM O ÓLEO NÃO OZONIZADO.....	47
FIGURA 11 – ENTALPIA DE DECOMPOSIÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO.....	47
FIGURA 12 – REAÇÃO PROPOSTA PARA AÇÃO DE PERÓXIDOS PRESENTES NO ÓLEO SOBRE O LUMINOL	48
FIGURA 13 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ PARA O ÓLEO DILUÍDO EM THF.....	49
FIGURA 14 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ PARA O ÓLEO DILUÍDO EM CICLO-HEXANO	50
FIGURA 15 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O TEMPO DE OZONÓLISE PARA O ÓLEO DILUÍDO EM CICLO-HEXANO	51
FIGURA 16 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ PARA O SISTEMA 2-METILINDOL.....	52
FIGURA 17 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ PARA A REAÇÃO COM A LUCIGENINA, NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE HRP	53
FIGURA 18 – PERFIL CINÉTICO COMPARATIVO ENTRE AS SONDAS LUMINOL, LUCIGENINA E 2-METILINDOL.....	54
FIGURA 19 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ PARA O SISTEMA SULFATO FERROSO-LUMINOL.....	55
FIGURA 20 – PERFIL CINÉTICO COMPARATIVO ENTRE OS CATALISADORES SULFATO FERROSO E HRP.....	56
FIGURA 21 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O PH DO TAMPÃO PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL	57
FIGURA 22 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL	58
FIGURA 23 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE HRP.....	59
FIGURA 24 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO OZONIZADO PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL.....	60
FIGURA 25 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ DE ACORDO COM A MASSA DE ÓLEO OZONIZADO PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL	60
FIGURA 26 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ DE ACORDO COM O TEMPO DE OZONÓLISE PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL.....	62
FIGURA 27 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O TEMPO DE OZONÓLISE PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL	62
FIGURA 28 – ESTRUTURA DA ENZIMA HORSE RADISH PEROXIDASE (HRP)	63
FIGURA 29 – REAÇÃO GLOBAL PROPOSTA DA TAU-NHCL COM O LUMINOL.....	64
FIGURA 30 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O PH DO TAMPÃO UTILIZADO NA REAÇÃO COM A TAU-NHCL.....	65
FIGURA 31 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE TAU-NHCL	66
FIGURA 32 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL	67
FIGURA 33 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A PRESENÇA DA TAU-NHCL E DO ÓLEO OZONIZADO ...	68
FIGURA 34 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL.....	69
FIGURA 35 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ DE ACORDO COM A CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO OZONIZADO PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL	69
FIGURA 36 – PERFIL CINÉTICO DE EMISSÃO DE LUZ DE ACORDO COM O TEMPO DE OZONÓLISE PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL.....	70

FIGURA 37 – CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O TEMPO DE OZONÓLISE PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL.....	71
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MASSA DE OZÔNIO PRODUZIDA POR MINUTO.....	38
TABELA 2 – ÍNDICE DE PERÓXIDOS DO ÓLEO DE GERGELIM OZONIZADO	39
TABELA 3 – ÁREAS INTEGRADAS DAS CURVAS DOS ESTIRAMENTOS DO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DE ACORDO COM O TEMPO DE OZONÓLISE.....	43
TABELA 4 – RAZÃO ENTRE AS ÁREAS INTEGRADAS.....	43
TABELA 5 – COMPARATIVO DAS TEMPERATURAS DE DECOMPOSIÇÃO DA PARTE OLEOSA E DOS COMPOSTOS OZONIZADOS, PORCENTAGEM DOS RESÍDUOS ENCONTRADOS APÓS A ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA, E A ESTIMATIVA DA AMOSTRA QUE PASSOU POR OZONIZAÇÃO.	46
TABELA 6 – ANOVA, EMISSÃO DE LUZ PARA O ÓLEO DILUÍDO EM CICLO-HEXANO	51
TABELA 7 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE EMISSÃO DE LUZ E O PH DO TAMPÃO PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL	57
TABELA 8 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE LUMINOL	58
TABELA 9 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE HRP.....	59
TABELA 10 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO OZONIZADO PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL	60
TABELA 11 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O TEMPO DE OZONÓLISE PARA O SISTEMA HRP-LUMINOL.....	62
TABELA 12 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O PH DO TAMPÃO NA REAÇÃO COM TAU-NHCL.....	65
TABELA 13 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DE TAU-NHCL	66
TABELA 14 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A PRESENÇA DA TAU-NHCL E DO ÓLEO OZONIZADO	68
TABELA 15 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E A CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL	69
TABELA 16 – ANOVA, CORRELAÇÃO ENTRE A EMISSÃO DE LUZ E O TEMPO DE OZONÓLISE PARA A REAÇÃO COM A TAU-NHCL	71

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{mol L}^{-1}$	Micromol por litro
cal	Calorias
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FT-IR	Infravermelho por Transformada de Fourier
g mol^{-1}	Gramas por mol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	Horsehadish Peroxidase
IP	Índice de Peróxidos
meq kg^{-1}	Miliequivalente por quilograma
mg mL^{-1}	Miligramas por mililitro
mmol	Milimols
mmol L^{-1}	Milimols por litro
mol L^{-1}	Mol por litro
nm	Nanômetros
nmol L^{-1}	Nanomol por litro
P.E.	Ponto de Ebulição
P.F.	Ponto de Fusão
RLU	Unidade Relativa de Luz
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Tau-NHCl	Taurina Cloramina
TG	Termogravimetria
THF	Tetraidrofurano
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 OZONIOTERAPIA	18
2.2 ÓLEOS OZONIZADOS	21
2.3 MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS OZONIZADOS	25
2.4 QUIMILUMINESCÊNCIA	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 REAGENTES E SOLVENTES	28
4.2 EQUIPAMENTOS	28
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES	28
4.3.1 Luminol 10,0 mmol L ⁻¹	28
4.3.2 Peroxidase de Raiz Forte 5,0 µmol L ⁻¹	29
4.3.3 Taurina 0,5 mol L ⁻¹	29
4.3.4 Solução Taurina Cloramina 5,0 mmol L ⁻¹	29
4.3.5 Tiosulfato de Sódio 0,1 mol L ⁻¹	29
4.3.6 Amido 0,2%	29
4.3.7 Solução Saturada de KI	29
4.3.8 Mistura de Solventes ácido acético:clorofórmio (3:2)	30
4.3.9 Solução tampão fosfato de sódio 10,0 mmol L ⁻¹ pH 7	30
4.3.10 Solução tampão tris(hidroximetil)aminometano 50,0 mmol L ⁻¹ pH 8 e 9... ..	30
4.3.11 Solução tampão etanolamina 50,0 mmol L ⁻¹ , pH 10 e pH 11	30
4.3.12 2-Metilindol 100,0 mmol L ⁻¹	30
4.3.13 Lucigenina 10,0 mmol L ⁻¹	31
4.4 PROCEDIMENTOS	31
4.4.1 Determinação da capacidade de geração de ozônio pelo aparelho	31
4.4.2 Ozonização do Óleo	32
4.4.3 Determinação dos Valores de Peróxido	33
4.4.4 Análises de Infravermelho (FTIR)	34

4.4.5	Estudos Térmicos	35
4.4.6	Estudos de Quimiluminescência	35
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	QUANTIFICAÇÃO DE OZÔNIO GERADO	38
5.2	OZONIZAÇÃO DO ÓLEO DE GERGELIM	38
5.3	ESTUDOS DE INFRAVERMELHO (FT-IR)	40
5.4	ANÁLISES TÉRMICAS	44
5.5	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA QUIMILUMINESCENTE PARA ESTUDO DE ÓLEOS OZONIZADOS	48
5.5.1	Estudo da dependência do solvente	49
5.5.2	Estudo da sonda quimiluminescente	51
5.5.3	Estudo do catalisador da reação	54
5.5.4	Otimização do Sistema Quimiluminescente	56
5.5.5	Estudo da utilização da Tau-NHCl	63
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A ozonioterapia é um procedimento médico, veterinário e odontológico já bem estabelecido na literatura e bastante utilizado em países da Europa e América Latina¹. No Brasil, faz parte de estudos experimentais e existem várias maneiras de aplicação do ozônio, sendo os mais comuns a insuflação de gás ozônio, água ozonizada e óleo ozonizado.

O processo de ozonólise do óleo provoca uma alteração na cadeia carbônica dos ácidos graxos, gerando compostos peroxídicos, principalmente ozonídeos, hidroperóxidos e compostos carbonílicos. Esses peróxidos e ozonídeos são os responsáveis pelo stress oxidativo local na membrana plasmática de fungos e bactérias, causando o rompimento de sua parede celular, facilitando a permeabilidade destes compostos dentro da célula, onde irão ocorrer reações a nível molecular, podendo ser geradas espécies reativas de oxigênio (EROs), que são agentes naturais bastante efetivos em espécies resistentes aos tratamentos comuns²⁻⁴.

Bactérias e fungos são comumente encontrados no ambiente bucal, e normalmente encontra-se dificuldade no tratamento, devido à sua resistência aos medicamentos comuns, além da possibilidade de reações alérgicas a seus componentes. Os óleos ozonizados podem ser importantes aliados na eliminação de bactérias resistentes, uma vez que sua ação ocorre na parede celular, provocando a precipitação de sua membrana citoplasmática². Em 2019, Vadhana, et. al.⁵, realizou um estudo randomizado onde comparou um enxaguante bucal comercial com o óleo de gergelim ozonizado, para validar sua eficácia na eliminação da bactéria *S. mutants*, comum no biofilme oral e obteve resultados satisfatórios.

Após a ozonólise, os óleos devem ser caracterizados para avaliar as alterações decorrentes em sua cadeia. Diversas técnicas já são amplamente utilizadas para sua caracterização, sendo a principal delas a de Índice de Peróxidos, uma vez que estes são os principais produtos da oxidação de ácidos graxos⁶. Além de análises físico-químicas, análises espectroscópicas, como RMN e FT-IR⁷⁻¹² são importantes pois geram informações sobre a natureza das espécies formadas¹³.

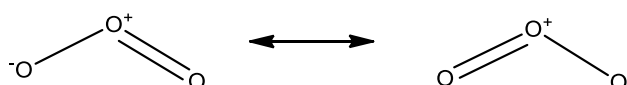
Uma outra maneira bastante eficiente de determinação de substâncias oxidativas é a Quimiluminescência. Esta técnica é baseada na oxidação de uma substância suscetível, gerando emissão de luz das moléculas em seu estado excitado^{14,15}.

Neste trabalho foi desenvolvido um método quimiluminescente para determinar a capacidade oxidante de óleos ozonizados. O método teve como base a utilização do catalisador peroxidase de raiz forte (HRP) e a sonda quimiluminescente luminol. Em outra abordagem, a HRP foi substituída por taurina cloramina (Tau-NHCl). Os métodos foram otimizados e mostraram ótima correlação entre a concentração de óleo e a intensidade de emissão de luz. Através desta técnica foi possível correlacionar o grau de ozonização do óleo de gergelim com a emissão de quimiluminescência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O ozônio é um gás, variedade alotrópica do oxigênio, de leve cor azulada. Possui estrutura angular, com ângulos de $116,8^\circ$ e o comprimento de suas ligações é de $127,8 \text{ pm}$. Sua estrutura de ressonância pode ser verificada na Figura 1¹⁶. Na atmosfera é formado naturalmente, e sua maior concentração está na estratosfera, onde é responsável por limitar a quantidade de radiação ultravioleta na superfície terrestre^{17,18}.

Figura 1: Híbrido de ressonância do ozônio. Adaptado de Motta, 2011¹⁹.



Mesmo sendo formado naturalmente na estratosfera, altas concentrações de ozônio na troposfera, a parte mais inferior da atmosfera, podem causar danos ao meio ambiente e à saúde dos organismos vivos¹⁸. Sendo uma substância altamente oxidante, o ozônio é capaz de reagir com substâncias orgânicas, atuando como um poluente secundário. O órgão que regulamenta e monitora a qualidade do ar no Estado de São Paulo é a CETESB, e determina que a concentração máxima permitida de ozônio é de $160 \mu\text{g m}^{-3}$ em um limite de uma hora, enquanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) determina um limite máximo de $100 \mu\text{g m}^{-3}$ por um período de 8 horas¹⁹, para o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH) o limite é de $200 \mu\text{g m}^{-3}$ ²⁰.

O ozônio também pode ser formado quando oxigênio medicinal é submetido à um campo elétrico. Descoberta realizada pelo químico Werner von Siemens, inventor do tubo de super-indução, ou tubo de Siemens, baseado no método corona, que consiste de duas placas de eletrodo superpostas que na presença de alta tensão gera ozônio^{21,22}. Esse campo leva à dissociação da molécula de oxigênio, que são muito instáveis, e acabam ligando-se uns aos outros por conta do excesso de átomos de oxigênio, formando o ozônio^{17,23}.

Quando é gerado para fins medicinais, alguns cuidados devem ser tomados, para que subprodutos não sejam gerados. O gás a ser utilizado deve ser preferencialmente o oxigênio puro, pois o ar atmosférico possui moléculas de nitrogênio, que pode gerar compostos nitrogenados. A reação de formação do ozônio

libera -68,4 cal e é reversível, o que indica que o ozônio se decompõe espontaneamente, dificultando sua armazenagem.

O processo de formação do ozônio pelo método corona pode ser verificado nas equações 1 e 2, e sua decomposição nas equações 3 e 4²². A equação 5 propõe a reação geral para formação do ozônio.



Como os pulmões não possuem um sistema antioxidante capaz de resistir à oxidação do ozônio, este não deve ser inalado, pois pode gerar efeitos tóxicos na traqueia e nos brônquios. A aplicação intravenosa de ozônio também não é mais uma técnica aprovada pela Sociedade Europeia de Ozonioterapia, desde 1983, pois foi verificada ocorrência de embolia pulmonar^{17,23}.

Em contato com os componentes sanguíneos, o ozônio tem capacidade de ativar algumas propriedades biológicas, como a geração imediata de EROs que são inativadas pelo sistema antioxidante do organismo, gerando subprodutos como peróxido de hidrogênio, aldeídos e produtos de oxidação lipídica (LOPs). Esta cadeia de reações gera uma resposta antioxidante de todo o organismo, nas células e nos órgãos, não sendo mais uma ação de reparação direta do ozônio^{17,24}.

A reação de ozonólise é uma das principais reações do ozônio com substâncias orgânicas insaturadas, e é caracterizada pela clivagem das duplas ligações, formando outros compostos como aldeídos, cetonas e compostos carbonílicos.

2.1 OZONIOTERAPIA

O ozônio é um agente altamente oxidante, ficando atrás apenas de duas substâncias: o flúor e o persulfato²⁵. Por conta deste efeito oxidante, ele é um

poderoso agente bactericida, antiviral e antifúngico, e é seguro na utilização para diversas finalidades, incluindo tratamento de água, esterilização de instrumentos de uso médico e higienização de alimentos¹⁷. Após alguns experimentos com higienização de legumes, foi comprovada a ação bactericida do ozônio na água sem perda de suas propriedades organolépticas, e esta técnica vem sendo utilizada para o tratamento de água potável, principalmente em áreas da Europa²⁵.

A ozonioterapia foi muito difundida no início do século XX, durante a Primeira Guerra Mundial, para tratamento de gangrenas e outros ferimentos, e foi bem consolidada no tratamento de pelo menos 114 doenças desde o início de sua utilização²⁶. Porém, após diversos acidentes envolvendo esse tipo de terapia, em decorrência de má utilização ou da falta de experiência e conhecimentos sobre o assunto, ela ficou esquecida pela comunidade médica; retornando após melhores estudos envolvendo o ozônio²⁵. Por conta de sua toxicidade, quando mal utilizado, o ozônio divide opiniões na comunidade médica.

O ozônio foi descoberto pelo alemão Christian Frederick Schonbein, em 1840²⁷, quando este estava fazendo experimentos com uma pilha voltaica na presença de oxigênio, quando percebeu a emissão de um gás com odor elétrico e pungente^{21,25}. Por conta da percepção de sua alta reatividade, Schonbein acreditou que o ozônio poderia ser utilizado como desinfetante. Porém, não teve eficácia quando o utilizou para tratamento de uma infecção por *Bacillus anthracis* enquanto trabalhava em um experimento para novos conservadores de carnes²¹.

Alguns pesquisadores da ozonioterapia creditam ao Major George Stoker o pioneirismo da investigação e utilização médica do ozônio. Enquanto participava da Guerra Britânica-Zulu, ele se interessou pela maneira que os Zulus tratavam seus doentes. Eles rejeitavam todos os medicamentos que eram oferecidos pelos seus invasores, e levavam os doentes para altas montanhas por uma ou suas semanas, afim de inalarem ar puro. Quando o Major retornou para Londres, iniciou estudos com tratamentos utilizando misturas de oxigênio com ar puro, fundando então a “Casa do Oxigênio”, que consistia em expor os pacientes à esta mistura, por via inalatória ou apenas o membro ferido, que ficaram conhecidas como câmaras hiperbáricas. Após o sucesso da utilização do oxigênio, ele iniciou tratamentos utilizando misturas de

oxigênio com ozônio, e teve diversos estudos publicados na revista Lancet no início dos anos 1900²⁸.

O ozônio era utilizado inicialmente para tratamento de ferimentos e infecções onde não havia a possibilidade de utilização de antibióticos comuns. Porém, conforme os estudos avançaram, percebeu-se que o O₃ não só possui efeito bactericida, como também possui propriedades hemodinâmicas e anti-inflamatórias, além de permitir que aconteça nos tecidos uma ferida fisiológica, o que reduz o aparecimento de quelóides²⁹, o ozônio possui capacidade de estimular angiogênese, que é a capacidade do corpo de criar novos vasos sanguíneos; e efeito desbridante³⁰. A ação do ozônio na inativação de bactérias se dá pelo rompimento da barreira celular através da oxidação de fosfolipídios e lipoproteínas; no combate aos vírus, o ozônio danifica a camada externa de proteínas que envolvem o ácido nucleico e altera o ciclo reprodutivo do vírus através da supressão do contato deste com a célula humana por peroxidação²⁶.

Em meados dos anos 1980, cientistas alemães iniciaram estudos para utilização da auto-hemoterapia no tratamento de pacientes com HIV. As principais vias de administração do ozônio são: aplicação tópica com óleos ou água ozonizada; método infiltrativo; aplicações de ozônio via intra-arterial; e o método sistêmico, denominado auto-hemoterapia, que consiste em ozonizar o sangue do próprio paciente para posteriormente reintroduzi-lo no organismo. Com o medo de o HIV vir a se tornar uma pandemia mundial, e sem medicamentos eficientes para seu tratamento, autoridades canadenses autorizaram estudos para verificar a eficácia da auto-hemoterapia, como método alternativo. Os testes *in vitro* mostraram-se bem sucedidos na desinfecção de sangue contaminado por HIV, porém os testes *in vivo* não demonstraram o mesmo resultado²⁶.

A utilização do ozônio para tratamento de doenças é um assunto bastante controverso na área médica. O Conselho Federal de Medicina brasileiro (CFM) define a ozonioterapia como um procedimento que pode ser realizado apenas em caráter experimental, com concordância por parte do paciente de acordo com as condições em que a pesquisa será realizada, e cuja aplicação clínica das técnicas mais agressivas, não está liberada, de acordo com a Resolução CFM nº 2.181/2018³¹. Isto se deve à falta de estudos clínicos randomizados, além da falta de consenso entre os

estudos quanto à dose segura de administração do ozônio e os riscos decorrentes de sua má utilização, como sequelas e até mesmo morte do paciente por embolia gasosa.

2.2 ÓLEOS OZONIZADOS

Devido ao seu alto efeito oxidante, que é maior que o do oxigênio puro, o ozônio é considerado um poderoso agente bactericida, antiviral e antifúngico^{27,29}. Em seu estado gasoso, é muito reativo, e muitas vezes não está apto para utilização tópica²⁹.

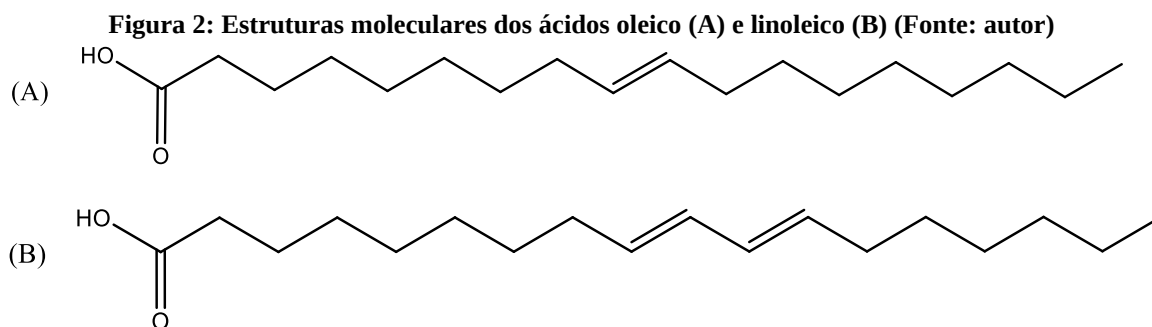
Como mencionado anteriormente, o ozônio é capaz de reagir com substâncias orgânicas insaturadas. A ozonólise é uma reação já bem estabelecida na literatura e promove a clivagem de duplas ligações carbono-carbono³², e tem como intermediário molozonídeos, que se rearranjam formando ozonídeos. Estes, por sua vez, levam a formação de hidroperóxidos e compostos carbonílicos³³. Nos óleos, a reação com o ozônio ocorre principalmente nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, como é o caso dos ácidos oleico e linoleico. Esta, por sua vez, leva à formação de compostos oxigenados, como ozonídeos, peróxidos poliméricos e outros peróxidos orgânicos³⁴.

É interessante notar que óleos puros podem sofrer oxidação natural, levando à existência de peróxidos formados a partir de sua exposição ao ar. Não sendo algo desejável para utilização alimentar, existem resoluções para estabelecer valores aceitáveis de peróxidos. De acordo com a Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, da Anvisa, a quantidade máxima de peróxidos permitida para óleos e gorduras refinados, como é o caso do óleo de gergelim, deve estar abaixo de 10 meq kg⁻¹ ³⁵.

As reações químicas que ocorrem no óleo quando ozônio é borbulhado, são bem complexas, e possui diversos mecanismos de reação, conforme foi descrito por Criegee. Os produtos são variados, e incluem peróxidos orgânicos, hidroperóxidos e peróxidos poliméricos^{7,11}, que estão ligados à ação oxidante dos óleos ozonizados. Estas são moléculas altamente instáveis e oxidantes, que são geradas quando as moléculas de ozônio quebram as duplas ligações carbonílicas que estão presentes no óleo. Essa reação pode produzir também compostos mais estáveis, como cetonas e aldeídos³⁰.

Diversos tipos de óleos podem ser ozonizados para utilização tópica^{5,30,34,36-43}. E a estrutura de sua cadeia, ou seja, a quantidade de duplas ligações na cadeia pode influenciar no resultado da ozonólise. A utilização de óleos essenciais *in natura* e ozonizados para o tratamento de infecções pelo fungo *T. mentagrophytes* foi o objetivo de estudo de Kume, et. al.⁴³, em 2021. Neste estudo, óleos de canela, cravo-da-índia, citronela, eucalipto e menta foram ozonizados e comparados com suas versões não ozonizadas na determinação das concentrações inibitórias e fungicida em culturas do fungo de estudo. De acordo com os resultados obtidos, os óleos de citronela, canela e cravo-da-índia demonstraram melhores resultados em comparação ao seu óleo *in natura*, apresentando melhor atividade antifúngica em menores tempos de exposição. Os óleos de eucalipto e menta também obtiveram bons resultados, mas precisaram de maiores tempos de exposição ao fungo para garantir redução na carga fúngica.

O óleo de gergelim vem sendo utilizado em diversas áreas, como indústria de alimentos, cosméticos, como fixador de perfumes, e na indústria farmacêutica como carreador de substâncias lipossolúveis⁴⁴. A composição majoritária do óleo de gergelim são os ácidos oleico e linoleico (Figura 2)⁴⁵, que são triglicerídeos insaturados. Este óleo tem uma estabilidade oxidativa superior quando comparado com óleos de outras origens por conta da existência de antioxidantes naturais^{7,46}. A atividade antioxidante do óleo de gergelim tem papel fundamental na redução de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) tóxicas, melhorando a cicatrização de feridas^{38,47}. Além disso, o óleo de gergelim ozonizado induz o crescimento de fibroblastos e colágeno, o que indica um bom processo de cicatrização⁴⁷.



Vários estudos *in vitro* foram realizados para verificar a eficácia de óleos ozonizados frente a culturas de bactérias, identificando seu poder bactericida para posterior utilização *in vivo*. Rensi, et al.⁴⁸, utilizou óleos ozonizados em uma cultura de bactérias do tipo *Propionibacterium acnes* para verificar sua eficácia na utilização de óleos ozonizados no tratamento de acne. Seu estudo foi realizado com base na necessidade de desenvolvimento de tratamentos alternativos aos antibióticos quimioterápicos, que estão sendo utilizados em larga escala e se tornaram uma questão de saúde pública, devido ao desenvolvimento de bactérias que se tornam resistentes aos antibióticos comuns. Foram utilizados óleos de girassol e coco ozonizados neste estudo, e a identificação de atividade bactericida foi realizada de forma qualitativa, utilizando-se de corante Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio. Nos dois óleos foi identificado efeito bactericida nas colônias de bactérias, tornando-os, assim, aliados no tratamento de acne inflamatória.

A utilização de ozonioterapia, com a aplicação de óleos ozonizados, é muito difundida na área veterinária e odontológica. Existem diversos estudos utilizando técnicas com óleos ozonizados que obtiveram bons resultados, eliminando a utilização de antibióticos e anti-inflamatórios, principalmente em casos onde essas medicações não puderam ser utilizadas^{37,49-51}.

Um estudo realizado por Sanches, em 2008²⁵, relata a utilização de óleo ozonizado para cicatrização e retração tecidual de uma lesão no torso de um porquinho da Índia. A administração do óleo foi realizada topicamente sobre a lesão, e após 8 dias de tratamento foi verificada a cicatrização completa da pele, sem a necessidade de utilização de outras interações medicamentosas durante o tratamento. Demonstrando, assim, sucesso da utilização deste método em *Cavia porcellus*, sem efeitos colaterais observados.

Um estudo de caso foi reportado por Spadea, et al.²⁹ em 2018, onde um gato deu entrada no hospital veterinário apresentando uma conjuntivite crônica desde seu nascimento, causada pela bactéria *Enterococcus* spp. Uma vez que o animal não respondia aos tratamentos convencionais com a utilização de anti-inflamatórios e antibióticos, foi utilizada a ozonioterapia, com um colírio ozonizado especialmente desenvolvido para utilização oftálmica (Figura 3). Este colírio consiste em um óleo ozonizado lipossômico que foi administrado duas vezes ao dia, uma gota em cada

olho. Após dez dias de tratamento, os sintomas de conjuntivite não foram mais detectados no animal.

**Figura 3: Utilização de colírio de óleo ozonizado para o tratamento de conjuntivite crônica de um gato²⁹.
Reproduzido com autorização do autor²⁹**



Fig. 3. Right eye of a 6-month-old cat before starting the treatment. Note marked conjunctival edema, redness of the conjunctiva, and mucous discharge.

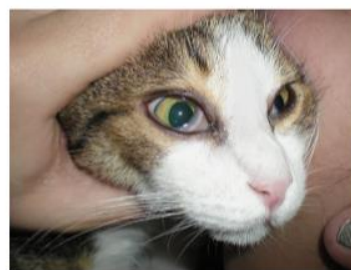


Fig. 4. Same eye of Figure 3 after 10 days of therapy. Normal eye, with mucous discharge still present.

Na odontologia, a utilização de óleos ozonizados associados a curativos de demora está sendo amplamente estudado como substituinte de antibióticos. A utilização de hidróxido de cálcio como curativo de demora já é bem definida, por conta de sua alta eficácia contra algumas bactérias, porém é de ciência que não é um poderoso agente bactericida, por isso os especialistas fazem uso deste produto associado a outras substâncias que possuam estas propriedades¹.

Em 2006, Diaz, et al.⁵², realizou um estudo *in vitro* para avaliar a capacidade bactericida de dois tipos de óleos vegetais ozonizados. Os óleos escolhidos foram o óleo de oliva e o óleo de semente de girassol. Foram misturados, separadamente, 80 mL de cada óleo com 8 mL de água, e estas misturas foram inseridas no ozonizador. O processo de ozonização foi realizado em banho a temperatura ambiente (25°C), e foram obtidas 2 amostras de óleo ozonizado para cada mistura, variando-se o tempo de ozonização no reator. Os óleos ozonizados foram caracterizados e avaliados quanto às quantidades de peróxidos, acidez, e índice de iodo. Após a caracterização, os óleos foram avaliados quanto à capacidade bactericida frente às bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* e obtiveram resultados satisfatórios.

Um estudo realizado por Cruz²⁷ em 2006, demonstrou a avaliação *in vitro* de óleos ozonizados como agente bactericida em curativos de demora na odontologia. Sua proposta foi avaliar a associação de óleos ozonizados à curativos de demora já utilizados e aceitos pela comunidade odontológica: “Calen®” e “Calen PMCC®”. Em seu trabalho, as bactérias *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram semeadas em placas de Petri e expostas aos materiais ozonizados por um período de até 180 dias após a

ozonização para verificar a eficácia durante longo período. Os resultados demonstraram que os óleos associados à utilização de curativos de demora possuem boa atividade bactericida e são seguros para utilização na odontologia.

Algumas espécies de fungos podem causar lesões na pele, chamadas de dermatofitoses, comumente conhecidas como micoses. A busca por medicamentos alternativos, que possuam baixa toxicidade e baixo custo se mostrou uma necessidade. Os resultados do estudo evidenciam que a utilização de óleos essenciais ozonizados é promissora para o tratamento de infecções fúngicas^{36,43}.

Um dos principais problemas enfrentados atualmente no tratamento de infecções bacterianas diz respeito ao aumento de bactérias resistentes aos antibióticos comuns. Isso se deve, principalmente, ao uso exacerbado de antibióticos e ao surgimento de superbactérias^{40,53}. A principal vantagem da utilização de óleos ozonizados para tratamento de infecções, é a não seleção de bactérias resistentes, uma vez que o sistema oxidante do óleo ozonizado atua diretamente na parede celular das bactérias, causando sua morte. Em 2020, Monteiro, et. al.⁵³, demonstraram a utilização de óleos ozonizados para o tratamento de bactérias *E. faecalis* resistentes aos antibióticos comuns, isoladas de uma infecção endodôntica. O estudo, realizado *in vitro*, utilizou óleo de girassol ozonizado e gás ozônio aplicados diretamente nas culturas da bactéria, comparados com culturas sem tratamento e tratadas com óleo de girassol puro. Seus resultados demonstraram efetiva redução microbiana nas culturas tratadas com o óleo ozonizado e gás ozônio.

Estes resultados confirmam a ação oxidante do óleo ozonizado para o efetivo tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Isto se deve ao fato de a ozonólise alterar a estrutura do óleo, gerando compostos passíveis de stress oxidativo, como as espécies químicas oxigenadas reativas.

2.3 MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS OZONIZADOS

São diversos os métodos para a determinação de peróxidos em sistemas oxidantes⁵⁴. Sendo o principal agente oxidante nos óleos ozonizados, a determinação da quantidade de peróxidos gerada na ozonização de óleos é crucial para quantificar seu poder bactericida.

O principal método é o índice de peróxidos, que identifica todas as espécies capazes de oxidar o iodeto de potássio a iodo^{55,56}. É uma técnica já bem estabelecida na literatura, e seu procedimento pode ser encontrado facilmente nas farmacopeias⁵⁷.

Além da determinação de peróxidos, as técnicas espectroscópicas são importantes aliadas na determinação das alterações na cadeia do óleo decorrente de sua ozonólise. Técnicas como o Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de carbono (RMN ^1H e ^{13}C), além de técnicas cromatográficas, já foram utilizadas por diversos autores para a caracterização de ácidos graxos ozonizados.^{6,11,58}

As técnicas termoanalíticas são bastante utilizadas para demonstrar diversos eventos térmicos, como transições entálpicas e determinar reações endo ou exotérmicas de acordo com as variações de temperatura na amostra. O calor retirado ou fornecido na amostra é capaz de provocar diversas modificações físicas ou químicas em sua estrutura, que pode trazer informações sobre as energias de suas ligações. Para os óleos ozonizados, os estudos térmicos são muito importantes para a determinação do grau de ozonólise do óleo, além de possibilitar o entendimento dos produtos da reação do óleo com o ozônio^{12,59}.

2.4 QUIMILUMINESCÊNCIA

Quimiluminescência pode ser descrita como uma reação onde é formada uma espécie que está em um estado eletronicamente excitado¹⁴. Nesta reação, a espécie formada tem dois caminhos: emitir radiação e retornar ao estado inicial, ou transferir sua energia para uma molécula capaz de emitir luminescência⁶⁰. A maior parte das reações quimiluminescentes são provenientes da oxidação do oxigênio e de seus derivados, como o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e o radical hidroxila¹⁴. Para ser caracterizada como quimiluminescente, a reação precisa satisfazer alguns requisitos: ela deve gerar energia suficiente que precisa ser canalizada para que sejam produzidas espécies no estado eletronicamente excitado; a reação deve ser favorável energeticamente, ou seja, ser exotérmica; e o rendimento da reação deve ser alto, para que seja garantida a desativação radiativa da espécie no estado excitado^{14,60}.

O rendimento quântico da reação pode ser obtido integrando-se a área sob a curva analítica da intensidade de emissão *versus* o tempo da reação, em um intervalo determinado, e sua intensidade máxima é proporcional à concentração do analito⁶⁰.

Diversos sistemas quimiluminescentes são utilizados para fins analíticos. Os mais comuns envolvem a utilização de sondas como luminol, lucigenina, compostos de Ferro e alguns derivados indólicos. E, muitas vezes, são necessários catalisadores como as peroxidases. Entre elas destaca-se a *Horseradish peroxidase* (HRP), uma enzima que possui um grupo prostético heme, também identificado como ferroprotoporfirina, formado por um íon Fe^{3+} ⁶¹. Esta enzima é largamente utilizada em métodos analíticos por conta de sua estabilidade, além de sua capacidade de catalisar a oxidação dos mais variados substratos utilizando-se de peróxido de hidrogênio¹⁴.

Uma das vantagens do método analítico da quimiluminescência é sua alta sensibilidade^{62,63}. Por exemplo, utilizando luminol como sonda quimiluminescente e a HRP como catalizador, a detecção de peróxido de hidrogênio pode chegar à ordem de 3 μM , que ainda pode ser aumentado utilizando outros compostos, como ácido p-cumárico, fenol e anilina⁶⁴.

Algumas reações quimiluminescentes induzidas por gás ozônio são utilizadas como detectores de nitrogênio e enxofre em cromatografia gasosa^{65,66}. Este sistema também pode ser utilizado para determinação de compostos orgânicos tanto em solução como em estado sólido, como por exemplo corantes adsorvidos em sólidos⁶⁷. Sendo os peróxidos os produtos principais da reação de ozonólise, um sistema baseado em quimiluminescência apresenta potencial para caracterizar a capacidade oxidante de óleos ozonizados.

3. OBJETIVOS

Otimizar a produção de óleos ozonizados, caracterizá-los quimicamente e desenvolver um método quimiluminescente para a caracterização da capacidade oxidante destes óleos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os reagentes e soluções utilizados nos procedimentos foram: óleo de gergelim (*sesame oil*), luminol ($C_8H_7N_3O_2$), peroxidase de raiz forte (*HRP*), sulfato ferroso ($FeSO_4$), 2-metilindol (C_9H_9N), iodeto de potássio (KI), amido 0,2%, ácido acético glacial (CH_3COOH), triclorometano ($CHCl_3$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A., tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), fosfato de sódio (Na_3PO_4), tris(hidroximetil)aminometano ($(HOCH_2)_3CNH_2$), etanolamina ($HOCH_2CH_2NH_2$), taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico), ácido hipocloroso ($HOCl$), tetraidrofurano (C_4H_8O), isopropanol (C_3H_8O), ciclo-hexano (C_6H_{12}), acetona (C_3H_6O), iodeto de mercúrio (II), todos adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

4.2 EQUIPAMENTOS

Neste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: medidor de pH (pH 3000, Analyser); balança analítica (AG245, Mettler Toledo); Luminômetro (Centro LB 960, Berthold Technologies); Gerador de Ozônio (OEM Modelo GL-3189A); espectrofotômetro de FT-IR (FT/IR-4600, Jasco Technologies).

4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico, sem passar por nenhuma purificação adicional. A água utilizada foi duplamente deionizada utilizando-se um sistema de osmose reversa e um sistema de purificação Milli-Q.

4.3.1 Luminol 10,0 mmol L⁻¹

Para o preparo de uma solução de Luminol 10,0 mmol L⁻¹ (Massa Molar: 177,16 g mol⁻¹) foram pesados, em um tubo de microcentrifugação de 1,5 mL, 0,00199 g e dissolvidos com 1000 µL de água deionizada. Esta solução foi mantida em geladeira.

4.3.2 Peroxidase de Raiz Forte 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Para o preparo de solução estoque de HRP 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Massa Molar: 44000 g mol^{-1}), foram pesados 0,0011 g de HRP e diluído em tampão fosfato pH 7.0. A solução de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada a partir desta solução diluída em tampão fosfato pH 7.

4.3.3 Taurina 0,5 mol L^{-1}

Para o preparo de 5 mL da solução de Taurina, 0,5 mol L^{-1} (Massa Molar: 125,0 g mol^{-1}), foram pesados 0,3125 g de Taurina e diluído com 5 mL de água. Esta solução não foi mantida em geladeira.

4.3.4 Solução Taurina Cloramina 5,0 mmol L^{-1}

Para o preparo de 5 mL de Taurina Cloramina 5,0 mmol L^{-1} , foram pipetados 0,5 mL da solução de Taurina 0,5 mol L^{-1} , à esta solução foram adicionados 0,023 mL de HOCl 1,08 mol L^{-1} e completados com 4,477 mL de água.

4.3.5 Tiosulfato de Sódio 0,1 mol L^{-1}

Para o preparo de 50 mL de solução de Tiosulfato de Sódio 0,1 mol L^{-1} (Massa Molar: 248,18 g mol^{-1}), foram pesados 1,2409 g de tiosulfato de sódio e o volume de 50 mL foi completado com água em um balão volumétrico.

4.3.6 Amido 1%

Para a preparação da solução de amido 1%, fez-se uma pasta remoendo 2 g de amido e 10 mg de iodeto de mercúrio (II) com cerca de 30 mL de água. Esta pasta foi vertida em cerca de 1 L de água fervente para resultar em uma suspensão clara. Após a solução ser resfriada em temperatura ambiente, foi transferida para um frasco com tampa esmerilhada e armazenada em geladeira.

4.3.7 Solução Saturada de KI

Para o preparo da solução saturada de KI, adicionou-se 50 mL de água em um béquer e adicionou-se KI até que este não fosse mais dissolvido.

4.3.8 Mistura de Solventes ácido acético:clorofórmio (3:2)

Para o preparo de 10 mL da mistura de solventes utilizada na titulação, adicionou-se em um frasco 60 mL de ácido acético glacial e 40 mL de clorofórmio. Esta solução foi armazenada em geladeira.

4.3.9 Solução tampão fosfato de sódio 10,0 mmol L⁻¹ pH 7

Inicialmente, preparou-se uma solução de fosfato monobásico de sódio 10,0 mmol L⁻¹ (Massa Molar: 119,98 g mol⁻¹) e uma solução de fosfato dibásico de sódio 10,0 mmol L⁻¹ (Massa Molar: 141,96 g mol⁻¹). Para o preparo de 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 10,0 mmol L⁻¹, adicionou-se em um béquer 50 mL da solução de fosfato monobásico de sódio 10,0 mmol L⁻¹, e o pH foi ajustado adicionando-se à esta solução, fosfato dibásico de sódio 10,0 mmol L⁻¹.

4.3.10 Solução tampão tris(hidroximetil)aminometano 50,0 mmol L⁻¹ pH 8 e 9

Para o preparo de 100 mL de solução tampão tris(hidroximetil)aminometano, 50,0 mmol L⁻¹ (Massa Molar: 121,14 g mol⁻¹), foram pesados 0,6 g de tris(hidroximetil)aminometano, e dissolvidos em cerca de 60 mL de água deionizada. Os ajustes de pH foram realizados adicionando-se ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Quando o pH desejado foi alcançado, o volume de 100 mL foi completado em balão volumétrico com água deionizada.

4.3.11 Solução tampão etanolamina 50,0 mmol L⁻¹, pH 10 e pH 11

Para o preparo de 100 mL de solução tampão etanolamina, 50,0 mmol L⁻¹ (Massa Molar: 61,1 g mol⁻¹), foram pesados 0,3 g de etanolamina, e dissolvidos em cerca de 60 mL de água deionizada. Os ajustes de pH foram realizados adicionando-se ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Quando o pH desejado foi alcançado, o volume de 100 mL foi completado em balão volumétrico com água deionizada.

4.3.12 2-Metilindol 100,0 mmol L⁻¹

Para o preparo de 5 mL da solução de 2-Metilindol, 100,0 mmol L⁻¹ (Massa Molar: 131,17 g mol⁻¹) foram pesados 0,0655 g, e o volume foi completado em balão

volumétrico com álcool etílico. A concentração de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada a partir desta solução, diluída em álcool etílico.

4.3.13 Lucigenina $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$

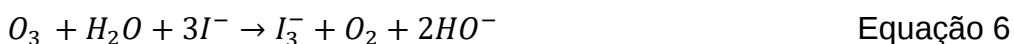
Para o preparo de 1 mL de solução de lucigenina, $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Massa Molar: $510,506 \text{ g mol}^{-1}$) foram pesados $0,005 \text{ g}$, e o volume foi completado com DMSO.

4.4 PROCEDIMENTOS

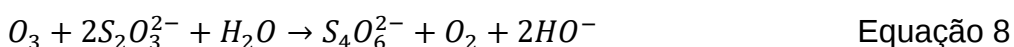
4.4.1 Determinação da capacidade de geração de ozônio pelo aparelho

Para determinar a massa de ozônio que é gerada pelo aparelho, utilizou-se o procedimento de titulação de iodeto de potássio com tiosulfato de sódio^{55,56}. Reagiu-se com ozônio, 50 mL de KI, tamponado com $3,5 \text{ g}$ de fosfato monossódico e $7,3 \text{ g}$ de fosfato dissódico, pelos tempos: 30 segundos, 1 minuto e 2 minutos. Após a reação, para a acidificação do meio reacional, foram adicionados 25 mL de ácido sulfúrico P.A., resultando em uma solução de cor avermelhada. Então, procedeu-se à titulação com tiosulfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Quando a solução apresentou uma coloração amarelo-palha, adicionou-se 5 a 10 mL de uma solução de amido 1% , e a titulação procedeu-se até a solução se tornar transparente.

A titulação iodométrica parte do princípio da oxidação dos íons iodeto à tri-iodeto pelo ozônio, quando este está dissolvido em meio ácido. Após a acidificação, a solução contendo o tri-iodeto foi titulada com tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) gerando o tetrionato ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$)^{55,56}, de acordo com a equação 7:



Somando-se as equações 5 e 6, temos:



O número de mols de tiossulfato foi determinado a partir do volume consumido na titulação, de acordo com a equação 9:

$$n = M \times V \quad \text{Equação 9}$$

onde: n é o número de mols de tiossulfato, M é a molaridade da solução de tiossulfato, V é o volume consumido na titulação.

Após determinar-se o número de mols de tiossulfato, utilizou-se a proporção de 1:2 mols de tiossulfato para cada mol de ozônio consumido na reação, de acordo com a reação global 7.

Após a determinação do número de mols de ozônio, utilizou-se a equação 10 para determinar a massa de ozônio gerado pelo aparelho.

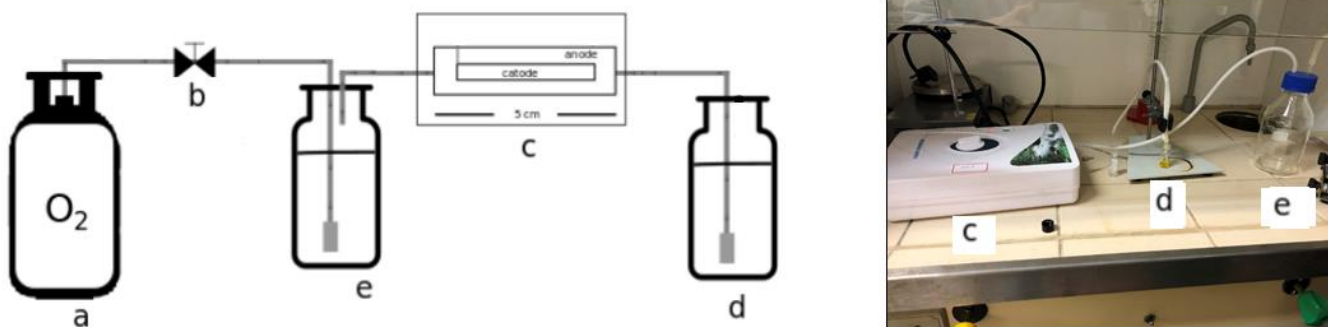
$$m = n \times MM \quad \text{Equação 10}$$

onde: m é a massa de ozônio a ser calculada, n é o número de mols de ozônio, MM é a massa molar de ozônio.

4.4.2 Ozonização do Óleo

Para realizar a ozonização do óleo, foi utilizado um gerador de ozônio comercial OEM Modelo GL-3189A. O sistema pode ser verificado na Figura 4. Utilizou-se oxigênio medicinal como fonte de oxigênio para geração de ozônio, com vazão de 1 L min⁻¹. Foi utilizado um frasco lavador para a passagem prévia do oxigênio, e o óleo a ser ozonizado foi colocado em um frasco, onde o ozônio foi borbulhado diretamente sobre o óleo. Foram pesados, com precisão, cerca de 1 grama de óleo, e estes foram ozonizados por tempos determinados e analisadas por quimiluminescência.

Figura 4: Processo de ozonólise de óleo. a) cilindro de oxigênio, b) válvula de agulha, c) gerador de ozônio, d) frasco de ozonólise, e) frasco lavador de gases. Esquema adaptado de Passareti, 2011⁶⁸.



4.4.3 Determinação dos Valores de Peróxido

Para avaliar os valores de peróxido dos óleos após ozonólise, foi utilizado o método de iodometria, que está bem estabelecido na literatura, para tal foi utilizado o método IFRA^{69,70}. Foram pesados 3 gramas de óleo de gergelim, e este foi ozonizado pelos tempos 10, 30, 60 e 120 minutos. Após a ozonização, foi pesado 1 grama do óleo ozonizado, e a este foi adicionado 15 mL de uma mistura de ácido acético glacial e clorofórmio na proporção de 3:2, e 0,3 mL de uma solução saturada de KI em um Erlenmeyer de 25 mL. Essa solução foi deixada no escuro por um período de 1 hora.

Após o tempo de repouso, acrescentou-se 25 mL de água deionizada e agitou-se por pelo menos 1 minuto. Essa solução foi titulada com tiosulfato de sódio 0,10 mol L⁻¹, até que a cor acastanhada ficasse levemente amarelada. Quando este ponto foi atingido, acrescentou-se 0,3 mL da solução de amido 1%, e procedeu-se à titulação até que a solução ficasse completamente transparente. Realizou-se uma medida sem acrescentar o óleo, que será o parâmetro branco para a determinação do valor de peróxido.

O volume consumido na titulação foi, então, anotado e utilizando a equação 11 pode-se determinar o valor de peróxido do óleo ozonizado.

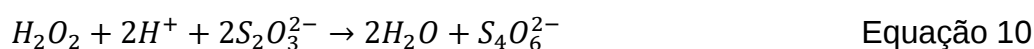
$$PV_{\left[\frac{mmol}{kg}\right]} = \frac{[SO_3^{2-}] * 1000 * (V_1 - V_0)}{2 * m_g} \quad \text{Equação 11}$$

onde: $[SO_3^{2-}]$ é a concentração molar da solução de tiosulfato utilizada na titulação, V_1 é o volume consumido na titulação, V_0 é o volume da titulação do branco e m é a massa em gramas do óleo ozonizado.

A determinação do índice de peróxido (IP) dos óleos foi realizada por iodometria. O método consiste em quantificar a concentração de peróxidos no óleo, expressado em termos de equivalência a peróxido de hidrogênio por kg de óleo como indicado nas equações 8 a 10.



Somando as equações 8 e 9:



Desta maneira, considerado que cada 0,50 mol de peróxido equivale a 1 mol de tiosulfato. Considerando a equação $n = C * V$, temos que:

$$(n_{S_2O_3^{2-}} = C_{S_2O_3^{2-}} * V_{(L)}) \equiv \left(n_{H_2O_2} = \frac{C_{S_2O_3^{2-}} * V_{(L)}}{2} \right) \quad \text{Equação 11}$$

Quando considerada a massa do óleo ozonizado:

$$IP_{\frac{mmol}{kg}} = \frac{C_{S_2O_3^{2-}} * V_{(mL)} * 1000}{2 * m_g} \quad \text{Equação 12}$$

onde: $n_{S_2O_3^{2-}}$ é o número de mols de tiosulfato, $C_{S_2O_3^{2-}}$ é a concentração de tiosulfato utilizado na titulação, $V_{(L)}$ é o volume total da solução, $n_{H_2O_2}$ é o número de mols de peróxido, $IP_{\frac{mmol}{kg}}$ é o valor de peróxido expresso em milimols por quilograma de óleo ozonizado, $V_{(mL)}$ é o volume gasto na titulação, 1000 é a conversão para 1000 g de óleo, m_g é a massa em gramas de óleo ozonizado utilizado⁶⁹.

4.4.4 Análises de Infravermelho (FTIR)

As amostras de óleo ozonizado foram caracterizadas através de espectroscopia na região do infravermelho, utilizando-se um espectrofotômetro baseado em transformada de Fourier (FTIR), (JASCO, Japan), utilizando um detector *deuterated triglycine sulfate* (DLATGS) e resolução de 2 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos na região de 500 a 4000 cm⁻¹.

As amostras de óleo foram adicionadas entre duas janelas de brometo de potássio e analisadas no modo de transmissão. A limpeza das janelas foi realizada com acetona e secagem com lenço de papel e jato de ar. O software utilizado foi o SpectraManager, e o background foi realizado com a janela de KBr.

4.4.5 Estudos de Análise Térmica

Os estudos de análise térmica foram realizados em atmosfera inerte de N₂. A faixa de temperatura para a análise de TG/DTG, foi de 30 a 800°C, com razão de aquecimento de 10°C por minuto. Para a análise de DSC, a faixa de temperatura foi de 30 a 230°C, com razão de aquecimento de 10°C por minuto.

Os resultados de TG/DTG foram analisados na faixa de 100 a 800°C, enquanto os resultados de DSC foram analisados na faixa de 30 a 230°C.

4.4.6 Estudos de Quimiluminescência

Para os estudos de quimiluminescência foi utilizado um Luminômetro de placas (Centro LB 960, Berthold Technologies, USA). Foram utilizadas placas pretas e opacas de 96 poços NuncTM Denmark pretas.

4.4.6.1 Estudo da dependência do solvente

Para a realização dos estudos da dependência do solvente, foi utilizada uma concentração de óleo de 0,1 g por mL de solvente. Os solventes utilizados foram tetraidrofurano (THF), isopropanol e ciclo-hexano. Nenhum deles foi previamente tratado, sendo utilizados em sua forma pura. O volume final da reação foi de 200 µL, e as concentrações de óleo (5,0 mg mL⁻¹), HRP (12,50 nmol L⁻¹), luminol (0,50 mmol L⁻¹) e tampão (43,75 mmol L⁻¹) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.2 Estudo da dependência do pH do meio reacional

Para os estudos da dependência do pH do meio reacional, foram utilizados 175 µL das seguintes soluções tampão: fosfato de sódio 10,0 mmol L⁻¹, pH 7,0; Tris 50,0 mmol L⁻¹, pH 8,0; Tris 50,0 mmol L⁻¹, pH 9,0; etanolamina 50,0 mmol L⁻¹, pH 10,0 e

etanolamina $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 11,0. O volume final da reação foi de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), luminol ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), HRP ($12,5 \text{ nmol L}^{-1}$), ou Tau-NHCl ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.3 Estudo da dependência do luminol

Para os estudos da dependência do luminol, variou-se a concentração de luminol ($0,25$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), HRP ($12,5 \text{ nmol L}^{-1}$) e tampão tris pH 9,0 ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.4 Estudo da dependência do HRP

Para os estudos da dependência do HRP, variou-se a concentração de HRP ($3,1$ a $12,5 \text{ nmol L}^{-1}$), em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), luminol ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e tampão tris pH 9,0 ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.5 Estudo da utilização de sulfato ferroso

Para o estudo da utilização do sulfato ferroso, utilizou-se uma solução de sulfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), luminol ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e tampão tris ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.6 Estudo da utilização do 2-metilindol

Para o estudo da utilização do 2-metilindol, utilizou-se uma solução de 2-MI $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), HRP ($0,5 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) e tampão tris pH 9,0 ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As

análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.7 Estudo da utilização da Tau-NHCl

Para o estudo da utilização da Tau-NHCl, utilizou-se uma solução de Tau-NHCl $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), luminol ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e tampão tris pH 9,0 ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.8 Estudo da utilização da lucigenina

Para o estudo da utilização da lucigenina, utilizou-se uma solução de lucigenina $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de óleo ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$), tampão tris pH 9,0 ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e HRP ($12,5 \text{ nmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU) em função da massa de óleo dissolvido.

4.4.6.9 Estudo da variação da concentração de óleo

Para o estudo da variação da concentração de óleo, variou-se a concentração de óleo (0 a $16,81 \text{ mg mL}^{-1}$), em um volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$. As concentrações de tampão tris pH 9,0 ($50,0 \text{ mmol L}^{-1}$), luminol ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), HRP ($12,5 \text{ nmol L}^{-1}$) ou Tau-NHCl ($6,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram mantidas fixas. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados expressos em valores de Unidade Relativa de Luz (RLU).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPadPrism. Foi aplicada a análises estatística ANOVA, seguido de teste Tukey, com valor de significância $P < 0,05$. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUANTIFICAÇÃO DE OZÔNIO GERADO

Inicialmente foi necessário determinar a quantidade de ozônio que o aparelho é capaz de gerar por minuto e, dessa maneira, proceder a ozonização dos óleos com uma massa conhecida de ozônio. Com base na estequiometria de 1 mol de ozônio para cada 2 mols de tiosulfato (Equação 7, sessão 4.4.1), obteve-se a massa de ozônio/tempo para o ozonizador utilizado (Tabela 1).

Tabela 1: Massa de ozônio produzida por minuto

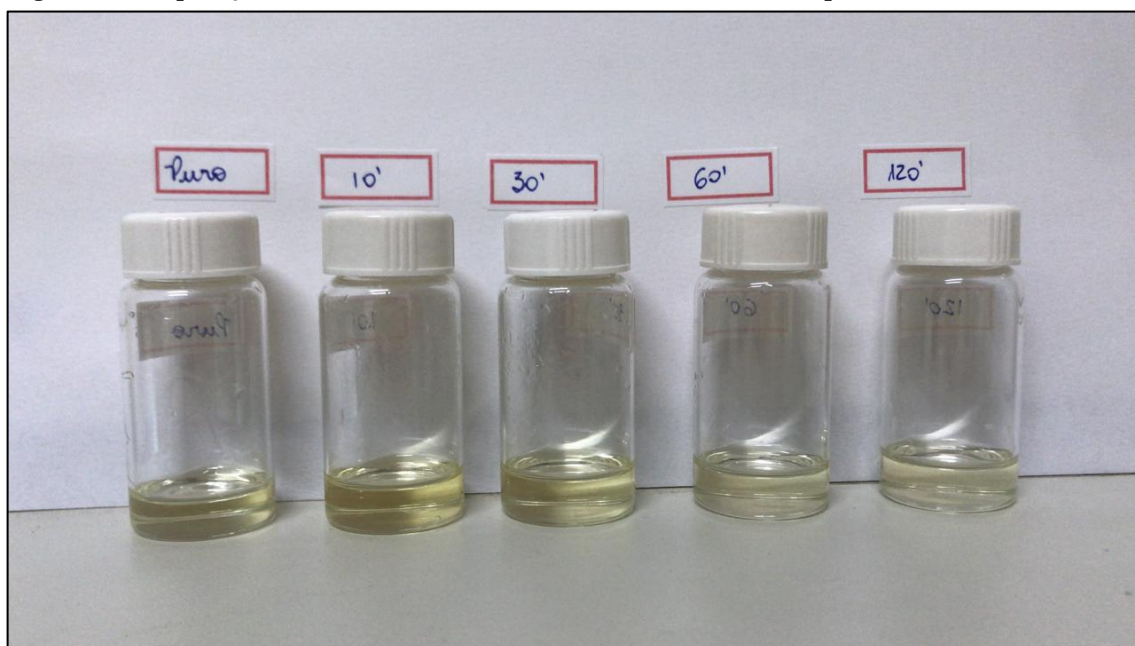
Tempo de Ozonólise	$V_{S_2O_3^{2-}}$ (mL)	m_{O_3} (mg)	m_{O_3} (mg minute ⁻¹)
30 segundos	$11,5 \pm 1,5$	$2,7 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,7$
1 minuto	$23,9 \pm 0,5$	$5,7 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,1$
2 minutos	$46,5 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$
Média			5,6
Desvio Padrão			0,5

O resultado foi de $5,6 \pm 0,5$ mg de ozônio produzido por minuto. Com estes valores, pode-se estimar a quantidade de ozônio que foi injetada durante a ozonização do óleo em estudo, e dessa maneira estimar o tempo necessário para saturação das duplas ligações do mesmo.

5.2 OZONIZAÇÃO DO ÓLEO DE GERGELIM

Após a quantificação da massa de ozônio por tempo que o aparelho foi capaz de produzir, iniciou-se a etapa de ozonização dos óleos. A figura 5 representa a diminuição de cor dos óleos ozonizados em relação ao tempo de exposição ao ozônio. As amostras mais claras quando movimentadas exibiram resistência ao movimento, indicando aumento da viscosidade. Esse aumento de viscosidade é bastante considerável para o óleo ozonizado pelo nosso tempo máximo de 120 minutos, e foi o fator determinante para que não fosse realizada a ozonólise por tempos maiores, uma vez que o óleo se torna extremamente viscoso o que tornaria dificultada a reação com o ozônio com eficiência.

Figura 5: Comparação entre o óleo não ozonizado e os óleos ozonizados por 10, 30, 60 e 120 minutos.



As amostras de óleo foram ozonizadas e os resultados foram comparados com o óleo não ozonizado (tabela 2).

Tabela 2: Índice de peróxidos do óleo de gergelim ozonizado

Tempo de ozonólise	O ₃ injetado (mg)	Índice de Peróxido (mmol Kg ⁻¹)
Óleo não ozonizado	0	12 ± 2 ^a
10 minutos	56	177 ± 5 ^b
30 minutos	168	301 ± 5 ^c
60 minutos	336	439 ± 11 ^d
120 minutos	672	628 ± 10 ^e

Os resultados representam média e desvio padrão de três experimentos. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

Como esperado, pôde-se observar um aumento considerável no índice de peróxido em função do tempo de ozonólise. Considerando o índice aceitável pela Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, da Anvisa, o óleo que foi utilizado neste trabalho está dentro do esperado para o índice de peróxidos, indicando que o aumento foi resultante da ozonólise do óleo.

Tendo como base a literatura recente sobre caracterização de óleos ozonizados^{7,34}, comparou-se os resultados obtidos, e pode-se observar o mesmo

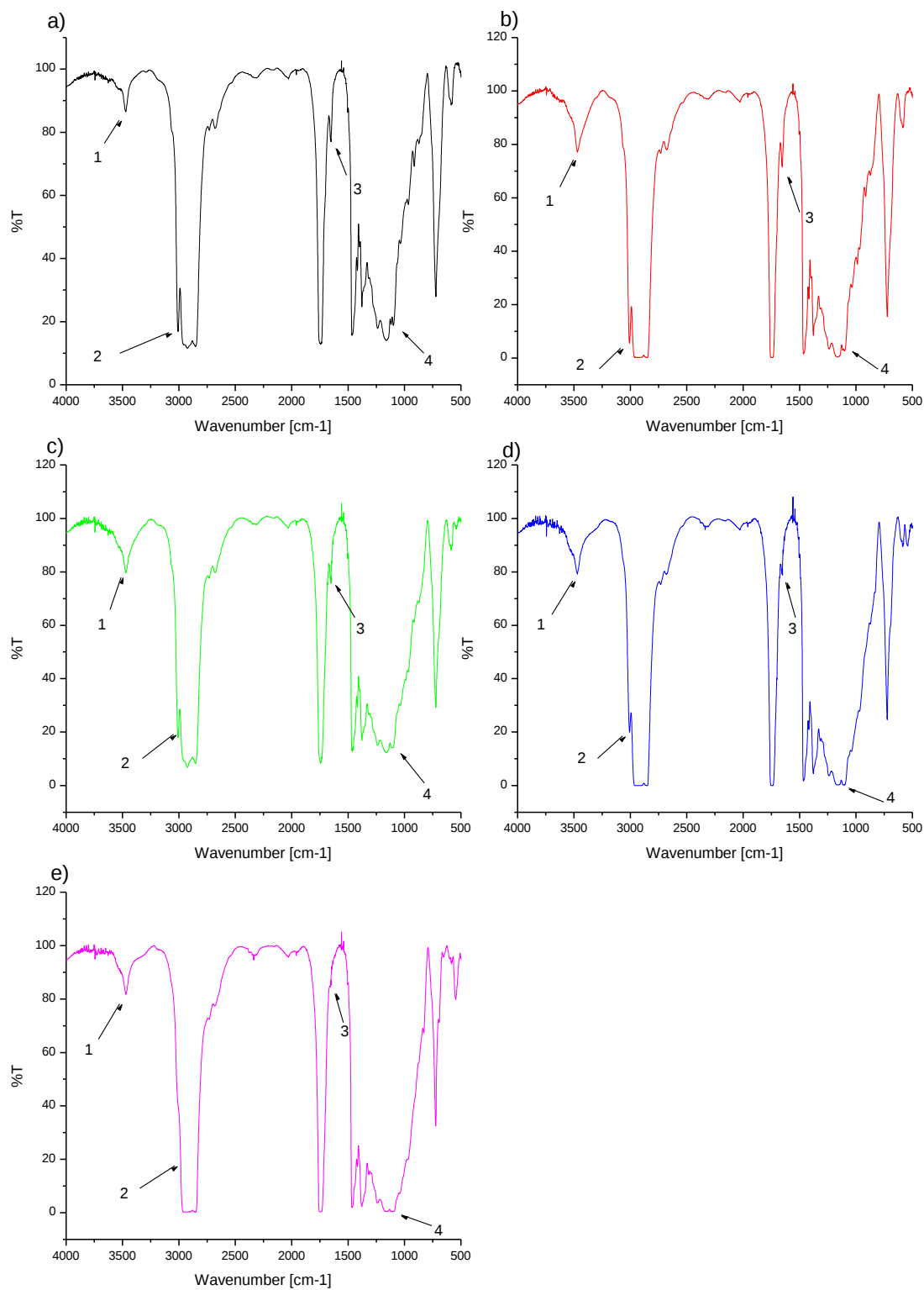
comportamento do óleo ozonizado, ou seja, um aumento do índice de peróxidos conforme aumenta-se o tempo de ozonização.

O peso molecular médio do óleo de gergelim é 874 g mol^{-1} ⁴⁵. Portanto, 3 gramas de óleo utilizado correspondem a cerca de 3,4 mmol de óleo. Considerando que cada mol de óleo possui em média 3 ligações duplas, pode-se estimar cerca de 10,3 mmol em duplas ligações. Como o ozonizador utilizado produz 5,62 mg de ozônio por minuto (Tabela 1), ou seja, 0,12 mmol de ozônio por minuto, teríamos em 120 minutos, 14,4 mmol de ozônio. Portanto, o suficiente para reagir com 10,3 mmol de duplas ligações presente na massa de óleo utilizada, considerando que a eficiência da reação seja de 100%.

5.3 ESTUDOS DE INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os resultados obtidos mostram que a ozonólise do óleo de gergelim foi eficiente na produção de peróxido orgânicos nas cadeias insaturadas do óleo, como pôde ser evidenciado pelo alto índice de peróxido encontrado. Assim, os próximos estudos tiveram por objetivo caracterizar os óleos ozonizados e tentar correlacionar as alterações em suas estruturas moleculares com os níveis de peróxido. Inicialmente estudou-se as alterações nos espectros de infravermelho dos óleos provocados pela ozonização. As mudanças observadas na intensidade das bandas utilizadas para correlação com o grau de ozonização foram aqueles relacionados às ligações: C=C, O-H, =C-H, C-O, e a razão entre as áreas destes picos. Estas bandas estão indicadas pelas setas na Figura 6. Pode-se observar mudanças em todos os picos apontados, demonstrando as mudanças ocorridas no óleo após a ozonização.

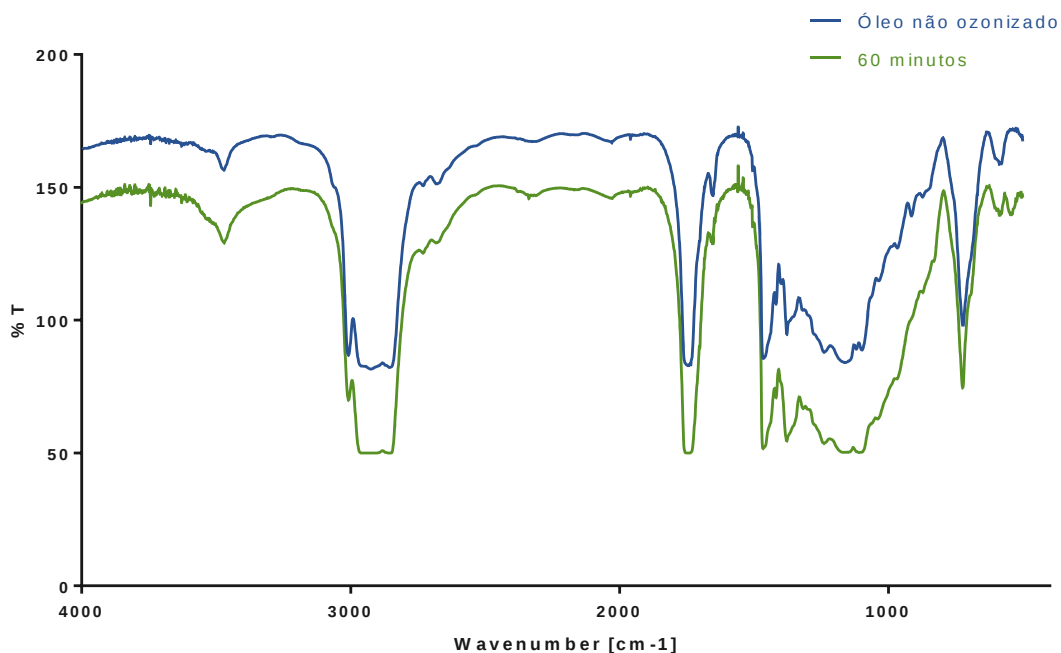
Figura 6: Conjunto de espectros de infravermelho do óleo ozonizado em comparação com o óleo não ozonizado. Óleo não ozonizado (a), ozonólise de 10 minutos (b), ozonólise de 30 minutos (c), ozonólise de 60 minutos (d) e ozonólise de 120 minutos (e). Ligações: OH (1), =C-H (2), C=C (3), C-O (4)



O objetivo da análise de FT-IR é investigar quais mudanças podem ser observadas na estrutura do óleo após a ozonólise. De acordo com Soriano, et. al.⁷¹, as principais alterações esperadas na ozonólise de ácidos graxos estão relacionadas com a redução das ligações C=C e =C-H que devem ser saturadas pelo ozônio, e o aumento das ligações C-O e O-H correspondentes à formação dos ozonídeos e demais compostos peroxídicos formados após a reação.

De fato, a Figura 6 mostra reduções bem definidas nos estiramentos dos picos em 3009 cm^{-1} (2) e 1654 cm^{-1} (3) que representam as ligações assimétricas =C-H e C=C, respectivamente⁷, mostrando a saturação das duplas ligações presentes no óleo, e o aumento do número de ligações C-O⁷, que pode ser identificada com o aumento da intensidade das bandas correspondentes em 1105 cm^{-1} (4), demonstrando que existe a formação de ligações carbono-oxigênio, evidenciando a formação de ozonídeos (Figura 7).

Figura 7: Espectros de infravermelho do óleo não ozonizado em comparação com o óleo ozonizado por 60 minutos.



No óleo ozonizado por 120 minutos (Figura 6e), pode-se observar que já ocorreu a saturação das duplas ligações, tendo reduzido significativamente os picos relativos às duplas =C-H e C=C (2e, 3e).

Pode-se observar, também, um aumento no estiramento em 3465 cm^{-1} (1) que indica a presença de grupos hidroxila, possivelmente oriundo de peróxidos⁷², que é significativamente menor no óleo puro (1a).

Para validar a significância do aumento e redução dos picos apontados anteriormente, foi calculado a área dos picos e a razão entre elas. Para isso, utilizou-se ferramenta do próprio software do equipamento. Na Tabela 3 estão apresentadas as áreas integradas dos picos de absorbância. Foram selecionados os pontos próximos ao início e final de cada pico e fixados para cada um dos gráficos. Verificou-se a redução das áreas correspondentes às insaturações do óleo, demonstrando que conforme aumenta-se o tempo de ozonólise, ocorre a saturação das duplas ligações pela reação com o ozônio. O contrário também é observado, ou seja, as áreas referentes às ligações do peróxido/ozonídeo (C-O) e dos peróxidos (O-H) aumenta conforme aumenta-se o tempo de ozonólise, o que está em acordo com os resultados obtidos na análise do índice de peróxidos realizada anteriormente.

Tabela 3: Áreas integradas das curvas dos estiramentos do espectro de infravermelho de acordo com o tempo de ozonólise

Área dos picos	Óleo não ozonizado	10 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos
O-H	32376,5	30300,2	30667,4	30761,3	31373,7
C=C	8469,8	8149,7	8360,0	8484,3	8621,1
C-O	2293,1	900,4	751,8	409,0	216,5
=C-H	20787,5	20163,7	20353,0	21241,0	21776,0

Para avaliar quantitativamente o aumento e diminuição dos estiramentos, foi feito o cálculo da razão entre as áreas integradas dos picos de absorbância apresentadas na Tabela 3. Pode-se observar na Tabela 4 que houve aumento significativo dos picos referentes às ligações O-H e C-O em relação às ligações =C-H e C=C.

Tabela 4: Razão entre as áreas integradas

Razão entre áreas	Óleo não ozonizado	10 minutos	30 minutos	60 minutos	120 minutos
O-H / C=C	3,8	3,7	3,6	3,6	3,6
C-O / =C-H	9,1	22,4	27,1	52,0	100,6
O-H / =C-H	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4
C-O / C=C	3,7	9,0	11,1	20,7	39,8

A maior razão observada foi para a formação dos ozonídeos, frente à redução das duplas ligações C=C. Os resultados obtidos na espectroscopia estão de acordo com os dados consultados na literatura⁷ que demonstram um aumento significativo dos estiramentos referentes à formação dos ozonídeos enquanto as duplas ligações são saturadas pela ozonólise.

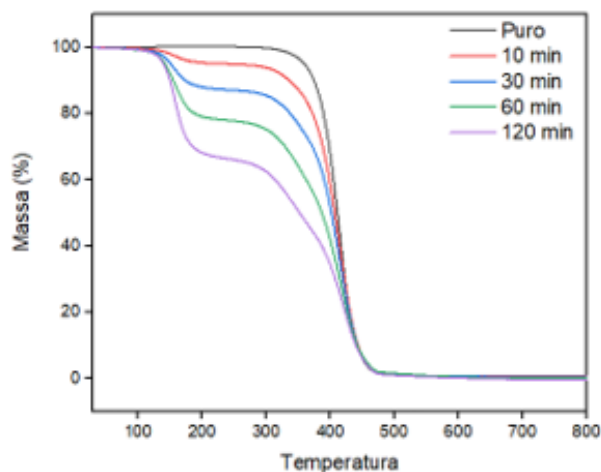
5.4 ANÁLISE TÉRMICA

A análise térmica consiste em uma técnica analítica que auxilia na identificação de processos físicos e químicos que envolvem variação de energia. As análises de DTG/TG e DSC foram realizadas para amostras do óleo ozonizado por 10, 30, 60 e 120 minutos e comparadas com a análise realizada para o óleo não ozonizado, que será o padrão de referência.

A curva de TG (Figura 8) para o óleo não ozonizado indica que sua decomposição ocorre em apenas uma etapa na faixa de temperatura de 288,3 a 480,7°C, reforçada pela curva de DTG (Figura 9), que apresenta um único vale em temperatura de 415,1°C.

Já as amostras do óleo ozonizado apresentaram três eventos térmicos diferentes para a análise de TG, evidenciando a presença de compostos ozonizados, que são mais instáveis e se degradam em menores temperaturas, em oposição à cadeia do óleo que irá se degradar em temperaturas maiores, conforme demonstrado na análise do óleo puro. A curva de DTG confirma estes três eventos, além de apresentar um aumento do pico, que representa o aumento da perda de massa da amostra, demonstrando que o aumento do tempo de ozonólise do óleo, aumenta a porcentagem de óleo que reage com o ozônio, para produzir compostos peroxídicos.

Figura 8: Curvas referentes às análises termogravimétricas do óleo ozonizado pelos tempos de 10, 30, 60 e 120 minutos, comparado com o óleo não ozonizado.

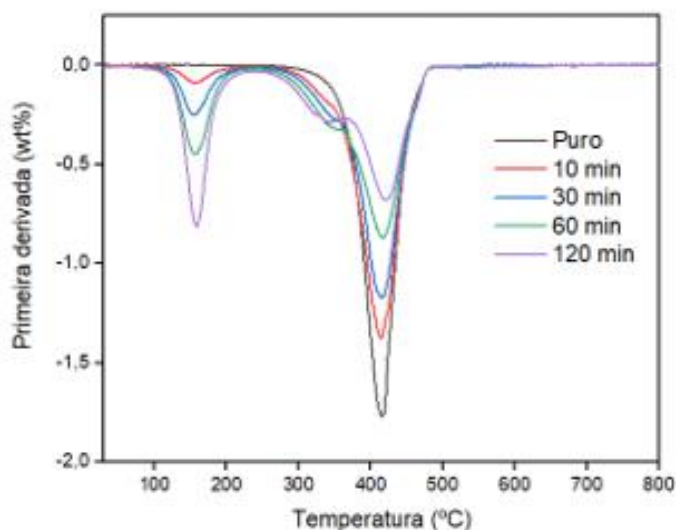


A análise de DTG demonstra que para o óleo ozonizado existe mais de um evento térmico, enquanto para o óleo não ozonizado pode-se observar apenas um evento, de acordo com a Figura 9. É importante notar que os eventos relacionados à decomposição dos produtos ozonizados aumentam proporcionalmente à diminuição dos eventos relacionados à decomposição da fase oleosa. O óleo puro não apresenta nenhum evento na temperatura referente aos compostos peroxídicos, entre 100 e 200°C, enquanto apresenta um evento de grande proporção na temperatura de 400 a 500°C, demonstrando pouco ou nenhum composto relacionado aos peróxidos.

O oposto ocorre quando se aumenta o tempo de ozonólise, onde o evento relacionado nas temperaturas de 100 e 200°C aumenta, conforme se diminui o evento nas temperaturas entre 400 e 500°C. Além disso, os eventos foram acompanhados de perda de massa, que aumentaram de acordo com o tempo de ozonólise, de 3,98% em 10 minutos de ozonólise até 32,02% aos 120 minutos de ozonólise.

De acordo com Cataldo¹², os ozonídeos formados após a ozonólise do óleo são decompostos em torno de 155°C, gerando um pico, que aumenta gradativamente conforme aumenta-se o tempo da ozonólise. Os picos exotérmicos na análise de DSC são atribuídos à degradação oxidativa dos ozonídeos, possivelmente por conta da liberação do oxigênio que ocorre quando os ozonídeos são decompostos³⁴.

Figura 9: Curvas do DTG dos óleos ozonizados por 10, 30, 60 e 120 minutos, comparados com o óleo não ozonizado.



Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de decomposição do óleo, dos compostos ozonizados, além da porcentagem de resíduos restantes após a análise a uma estimativa da amostra que passou por ozonização. Essa estimativa está relacionada com a perda de massa de cada amostra após as análises de DTG/TG.

Tabela 5: Comparativo das temperaturas de decomposição da parte oleosa e dos compostos ozonizados, porcentagem dos resíduos encontrados após a análise termogravimétrica, e a estimativa da amostra que passou por ozonização.

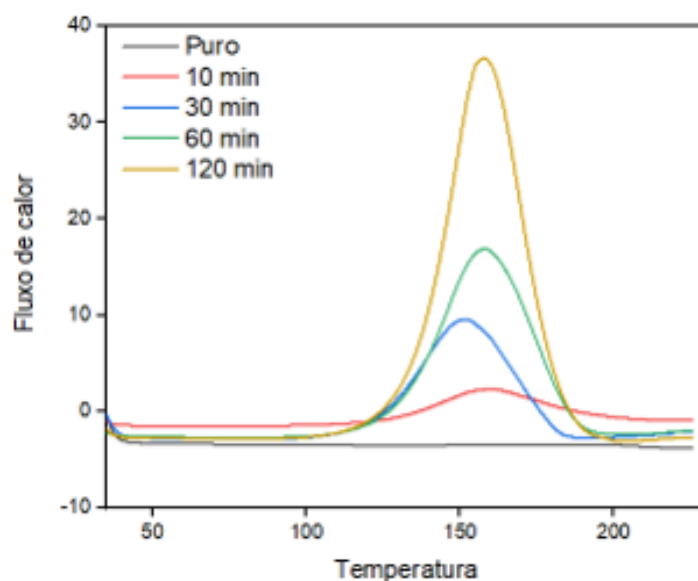
Tempo de ozonólise (minutos)	Temperatura de decomposição do óleo (°C)	Temperatura de decomposição dos compostos ozonizados (°C)	Porcentagem de resíduos (%)	% da amostra que passou por ozonização
0	288,3	n.a.	0,78	n.a.
10	281,8	122,9	0,69	3,98
30	275,7	122,5	0,61	11,27
60	275,8	110,3	0,18	20,27
120	264,0	110,3	0,00	32,02

As análises de DSC (Figura 10) confirmam que a 120°C ocorre a decomposição dos compostos R-O-O, e reação exotérmica. Comportamento similar não foi observado no óleo puro.

Considerando a inexistência deste evento para o óleo puro, possivelmente ele está relacionado à modificação estrutural da cadeia do óleo causada pela reação de ozonólise, como a presença de ozonídeos e compostos peroxídicos na cadeia do ácido graxo.

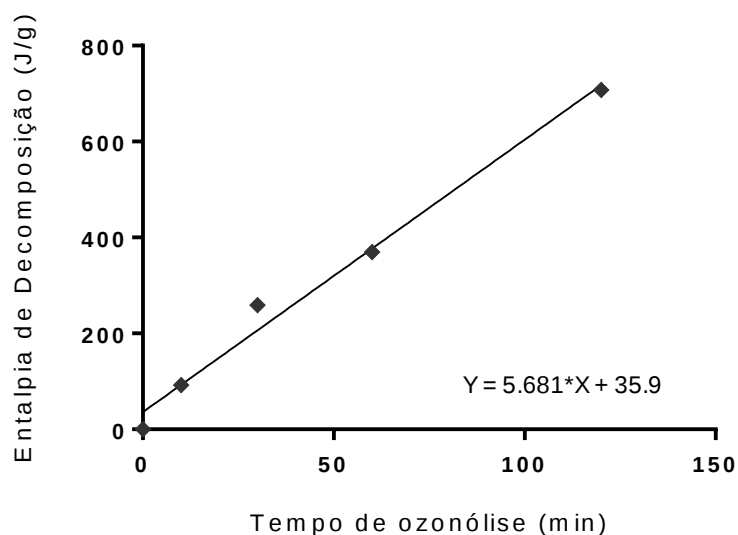
A partir destas curvas, foi possível determinar a entalpia associada ao processo, que aumenta de acordo com o aumento do tempo de ozonólise do óleo.

Figura 10: Curvas de DSC dos óleos ozonizados por 10, 30, 60 e 120 minutos comparados com o óleo não ozonizado.



Os resultados da entalpia de decomposição do óleo ozonizado estão descritos na Figura 11, e pode-se observar que a entalpia aumenta de forma linear conforme se aumenta o tempo de ozonólise do óleo.

Figura 11: Entalpia de decomposição do óleo ozonizado



Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para a análise de índice de peróxidos, que está descrita na sessão 5.2, onde se observa um aumento significativo dos resultados, conforme o aumento do período de ozonólise do óleo.

As análises térmicas foram utilizadas, neste trabalho, como uma demonstração qualitativa da geração de peróxidos e ozonídeos após a ozonólise do óleo de gergelim,

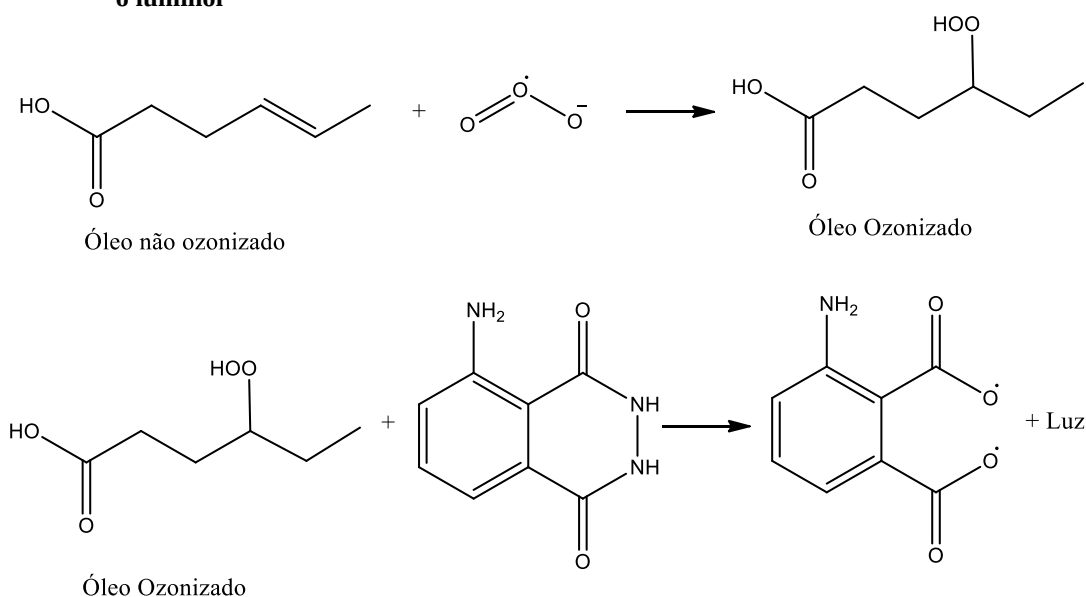
através da alteração de suas cadeias, que pode ser observada através do aumento da entalpia de decomposição da amostra conforme o aumento do tempo de ozonólise do óleo.

5.5 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA QUIMILUMINESCENTE PARA ESTUDO DE ÓLEOS OZONIZADOS

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologia quimiluminescente para a identificação/quantificação da capacidade oxidativa dos óleos ozonizados. Partindo dos resultados anteriores, onde pode-se observar que a ozonização do óleo de gergelim resultou em peróxidos na cadeia do óleo, deu-se início ao desenvolvimento da tecnologia, utilizando como base o que já existe na literatura para sistemas oxidantes.

Inicialmente, foram selecionadas três possíveis reações entre o óleo ozonizado para gerar a emissão de luz. O luminol, que é uma sonda já bastante utilizada, e é suscetível à ação de peróxidos em meio alcalino⁷³, de acordo com a reação representada pela Figura 12. Além do luminol, outras duas sondas poderiam ser promissoras para este sistema.

Figura 12: Reação proposta para ação de peróxidos presentes no óleo sobre o luminol



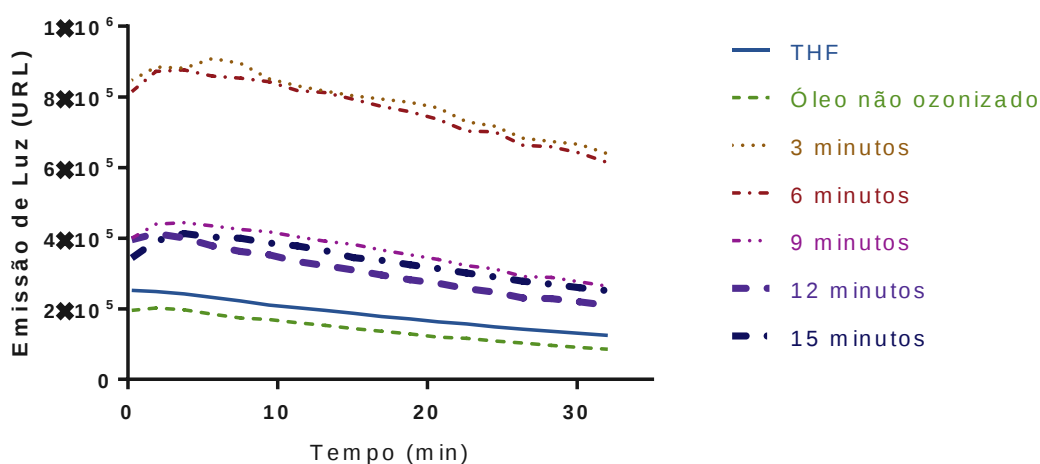
Derivados indólicos também tem potencial para gerar luz quando são oxidados. O composto 2-metilindol tem demonstrado eficiência quimiluminescente quando oxidado por oxidantes fracos¹⁴. Sendo assim, este composto foi considerado como uma alternativa ao luminol.

A lucigenina (nitrato bis-N-metil acridina) já é conhecida na literatura como uma alternativa para sistemas quimiluminescentes, tendo ação similar ao luminol⁷⁴, ela é comumente utilizada em sistemas de detecção do radical ânion superóxido, e poderia ser uma alternativa interessante para o luminol.

5.5.1 Estudo da dependência do solvente

Primeiramente, se viu a necessidade de diluição do óleo, uma vez que se trata de uma substância de viscosidade elevada, o que dificultaria medidas precisas de pequenos volumes. O óleo, então, foi diluído inicialmente no solvente THF para garantir a precisão do volume utilizado nas medições. Utilizando a proporção de 0,10 g de óleo por mL de THF. A Figura 13 mostra o perfil cinético de emissão de luz da reação dos óleos em diferentes tempos de ozonólise, diluídos em THF.

Figura 13: Perfil cinético de emissão de luz para o óleo diluído em THF. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo não ozonizado]= 5,3 mg mL⁻¹, [óleo 3 minutos]= 5,7 mg mL⁻¹, [óleo 6 minutos]= 5,7 mg mL⁻¹

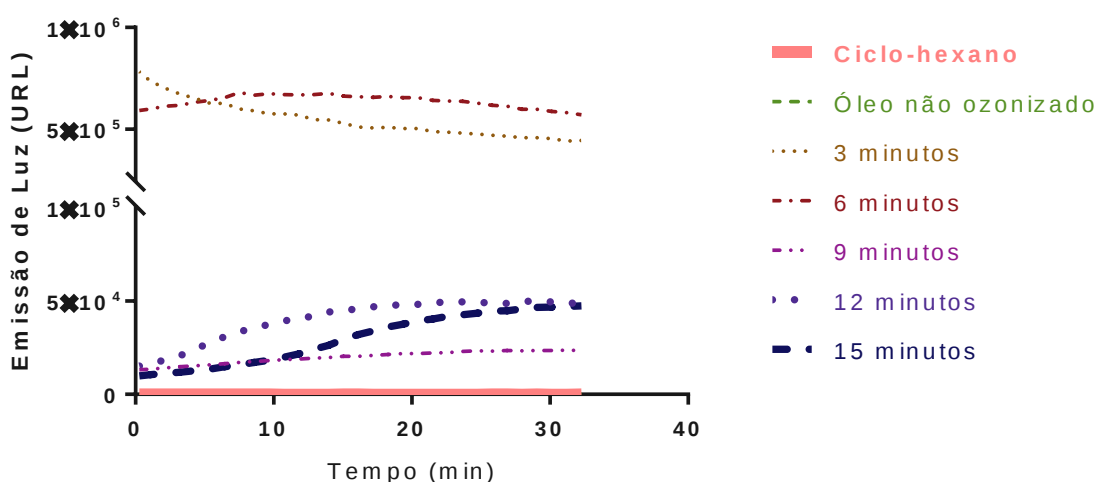


Como mostrado na Figura 13, mesmo na ausência de óleo, observou-se emissão de luz. Este efeito pode ser atribuído à peróxidos que são provenientes do próprio solvente. De fato, é comum a presença de resíduos de peróxidos em éteres⁷⁵. Este resultado nos levou à busca por solventes mais adequados. Assim, O THF foi substituído por isopropanol. No entanto, visualmente, pôde-se verificar que o

isopropanol não foi eficiente na diluição do óleo e as amostras mostraram-se opacas, o que inviabilizou sua aplicação (resultado não mostrado).

Buscou-se, novamente, uma alternativa para o solvente, e se decidiu pela utilização do ciclo-hexano, que é um solvente apolar e não possui peróxidos. Visualmente pôde-se observar que o óleo foi completamente diluído, e a solução apresentou-se transparente, com uma única fase. Com a utilização do ciclo-hexano a interferência do solvente na emissão de luz foi resolvida, garantindo que, o que é verificado no gráfico da cinética de emissão de luz seja apenas proveniente da oxidação do luminol pelo óleo (Figura 14).

Figura 14: Perfil cinético de emissão de luz para o óleo diluído em ciclo-hexano. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo não ozonizado]= 5,1 mg mL⁻¹, [óleo 3 minutos]= 6,4 mg mL⁻¹, [óleo 6 minutos]= 6,5 mg mL⁻¹, [óleo 9 minutos]= 5,3 mg mL⁻¹, [óleo 12 minutos]= 6,0 mg mL⁻¹, [óleo 15 minutos]= 6,3 mg mL⁻¹



Porém, ainda se identificou um decréscimo de luminescência conforme aumenta-se o tempo de ozonólise (Figura 15). Isto será mais aprofundado nos capítulos seguintes, onde serão estudadas alternativas para o sistema luminol-HRP, buscando alternativas para obtenção de melhores resultados.

Figura 15: Correlação entre a emissão de luz e o tempo de ozonólise para o óleo diluído em ciclo-hexano. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 mmol L⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05).

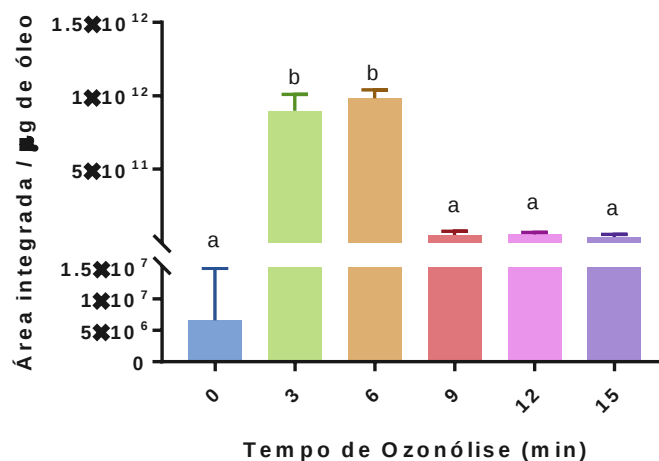


Tabela 6: ANOVA, emissão de luz para o óleo diluído em ciclo-hexano

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	2,33e+024	5	4,67e+023	F (5, 8) = 208,6	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,79e+022	8	2,24e+021		
Total	2,35e+024	13			

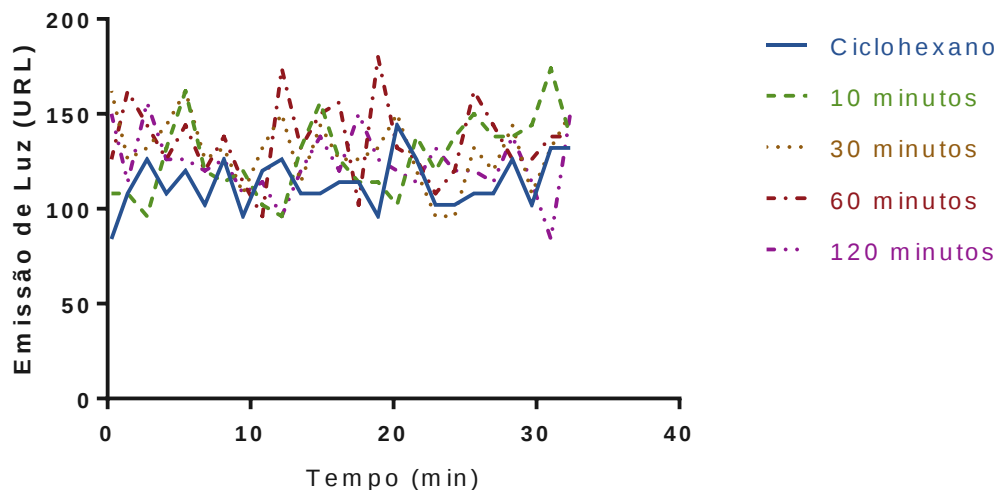
5.5.2 Estudo da sonda quimiluminescente

Foram selecionadas inicialmente três possíveis sondas quimiluminescentes para o estudo: o luminol, o 2-MI e a lucigenina. Sendo o luminol a sonda mais básica e já bastante conhecida de literatura, o 2-MI um derivado indólico que pode ter emissão comparável à do luminol em sistemas quimiluminescentes^{14,76,77} e a lucigenina que é um agente orgânico também clássico de literatura para sistemas oxidantes^{14,74,78}.

5.5.2.1 Estudo do 2-metilindol como sonda quimiluminescente

Derivados indólicos tem potencial para gerar luz quando são oxidados. O composto 2-metilindol tem demonstrado eficiência quimiluminescente quando oxidado por oxidantes fracos¹⁴. Sendo assim, foi utilizado este composto como uma possível alternativa ao luminol. A Figura 16 mostra o perfil cinético de quimiluminescência dos óleos e demonstra que o 2-metilindol não se mostrou eficiente no estudo aqui desenvolvido.

Figura 16: Perfil cinético de emissão de luz para o sistema 2-metilindol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [2-MI]= 2,0 mmol L⁻¹, [óleo 10 minutos]= 5,2 mg mL⁻¹, [óleo 30 minutos]= 5,9 mg mL⁻¹, [óleo 60 minutos]= 5,1 mg mL⁻¹, [óleo 120 minutos]= 5,6 mg mL⁻¹



Os resultados que podem ser observados na Figura 16 são decorrentes do background do aparelho. Mesmo que não se coloque nenhuma amostra no leitor, encontraremos resultados semelhantes a estes, o que indica que não há emissão de luz satisfatória para a oxidação do 2-metilindol pelo óleo ozonizado.

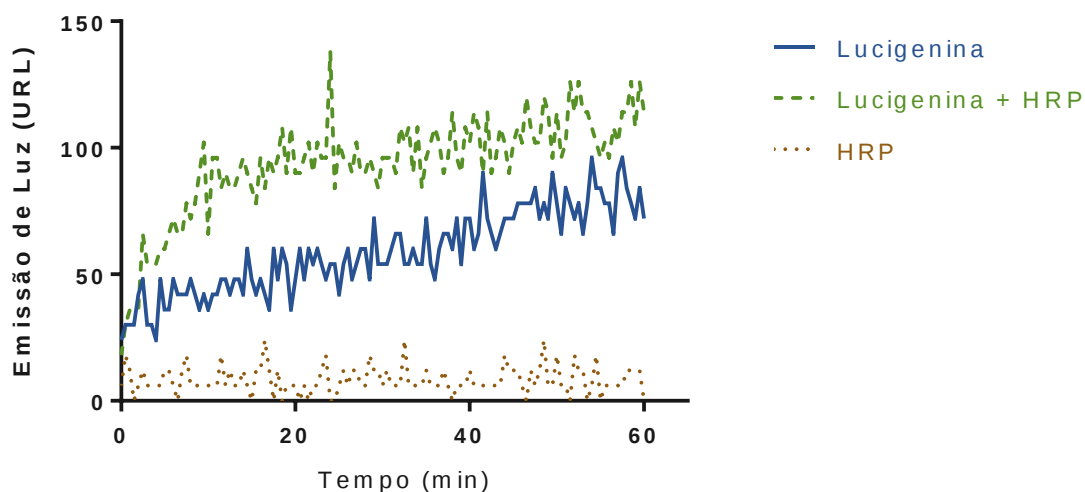
5.5.2.2 Estudo da lucigenina como sonda quimiluminescente

A lucigenina (nitrato bis-N-metil acridina) já é conhecida na literatura como uma alternativa para sistemas quimiluminescentes, tendo ação similar ao luminol⁷⁴, ela é comumente utilizada em sistemas de detecção do radical ânion superóxido. Para esse estudo, foi utilizado o óleo ozonizado por 60 minutos.

Como a lucigenina independe de catalisador para que a reação ocorra, foram realizados ensaios com e sem a utilização da HRP. Para confirmar que a ação do sistema não iria ser influenciado pela enzima, foi feito um teste somente com a reação desta e do óleo ozonizado.

Na figura 17, está apresentado o resultado da utilização do sistema lucigenina. Esta não demonstrou eficiência para utilização para a determinação de peróxidos, não sendo evidenciada expressiva emissão de luz no sistema. Mesmo com a utilização do HRP, não foi observada quantidade suficiente de luz para que seja considerado um sistema eficiente para utilização neste trabalho.

Figura 17: Perfil cinético de emissão de luz para a reação com a lucigenina, na presença e na ausência de HRP. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [lucigenina]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo]= 5,8 mg mL⁻¹.

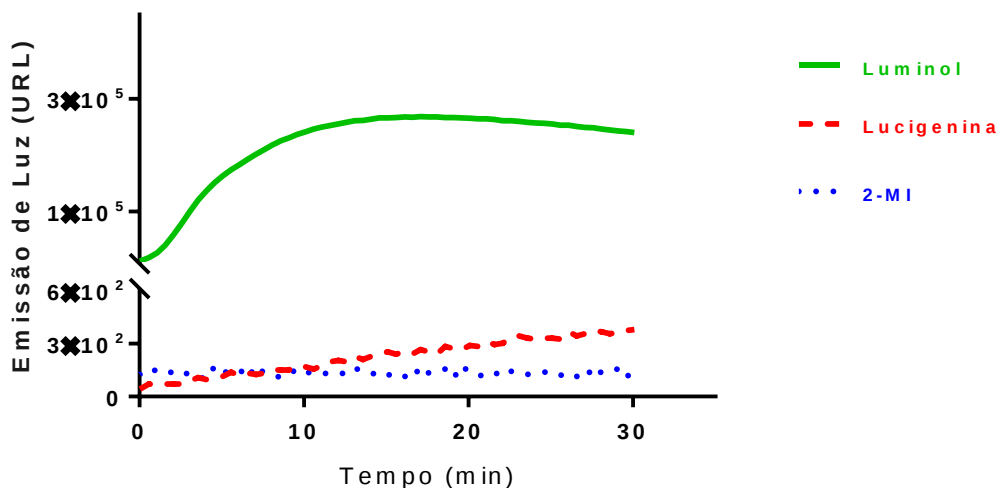


5.5.2.3 Estudo do luminol como sonda quimiluminescente

Tendo como referência os resultados da lucigenina e do 2-MI apresentados anteriormente, foi realizado o mesmo experimento com o luminol.

Pode-se verificar na Figura 18 um aumento bastante expressivo no resultado de emissão de luz pelo luminol quando comparado com as outras duas sondas. De fato, o luminol é uma das sondas quimiluminescentes mais eficientes e já bem definida na literatura para um sistema oxidante baseado em peróxidos.

Figura 18: Perfil cinético comparativo entre as sondas luminol, lucigenina e 2-metilindol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [2-MI]= 2,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [lucigenina]= 0,5 mmol L⁻¹, [óleo ozonizado]= 5,1 mg mL⁻¹



Considerando o sistema de peróxidos do óleo ozonizado, já se esperava que a reação com o luminol seria mais favorecida, uma vez que a lucigenina é mais comumente utilizada em sistemas de detecção do ânion superóxido e o 2-MI mesmo tendo bons resultados em um sistema oxidante baseado em peróxidos, não apresenta resultados tão expressivos quanto o luminol¹⁴.

5.5.3 Estudo do catalisador da reação

A HRP é uma enzima peroxidase que pode ser utilizada como catalisadora de reações oxidativas¹⁴. Como trata-se de uma enzima bastante utilizada para este tipo de reação, foi a nossa escolha para o início dos estudos de catalisador.

Também existem relatos na literatura da utilização do sulfato ferroso juntamente com o luminol em análises quimiluminescentes⁷⁹. A indução da quimiluminescência do luminol pelo sulfato ferroso está ligada à redução de peróxido de hidrogênio pelo Fe²⁺ para a formação de um radical hidroxila, de acordo com a reação⁷⁹:

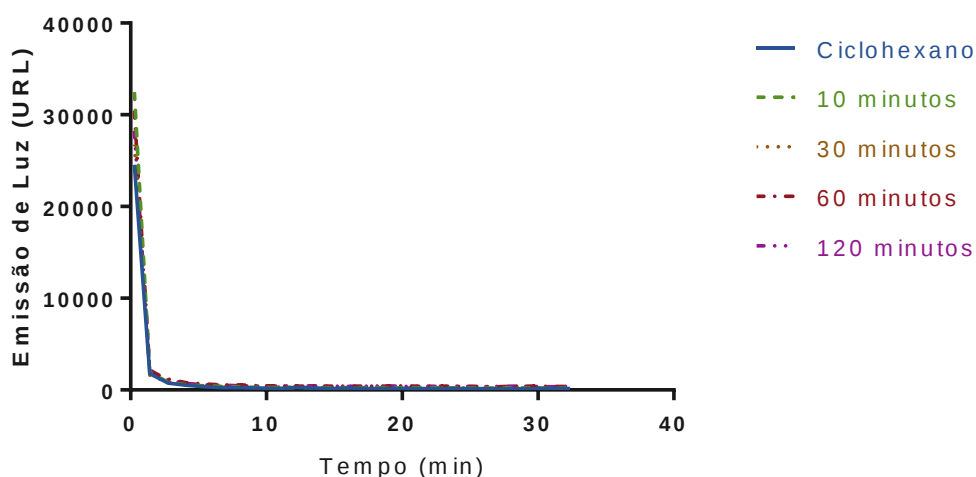


Sendo assim, os dois catalisadores foram comparados na reação quimiluminescente do sistema do óleo ozonizado.

5.5.3.1 Estudo da utilização de sulfato ferroso como catalisador da reação

Pode-se observar que existe emissão de luz no sistema luminol-sulfato ferroso (Figura 19). Porém, a reação ocorre muito rapidamente, e logo se observa o decaimento da emissão de luz. Também pode se observar a emissão de luz pelo solvente, o que sugere que este método não é eficaz para o objetivo deste trabalho.

Figura 19: Perfil cinético de emissão de luz para o sistema sulfato ferroso-luminol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [sulfato ferroso]= 1,0 mmol L⁻¹, [óleo 10 minutos]= 5,2 mg mL⁻¹, [óleo 30 minutos]= 5,9 mg mL⁻¹, [óleo 60 minutos]= 5,1 mg mL⁻¹, [óleo 120 minutos]= 5,6 mg mL⁻¹

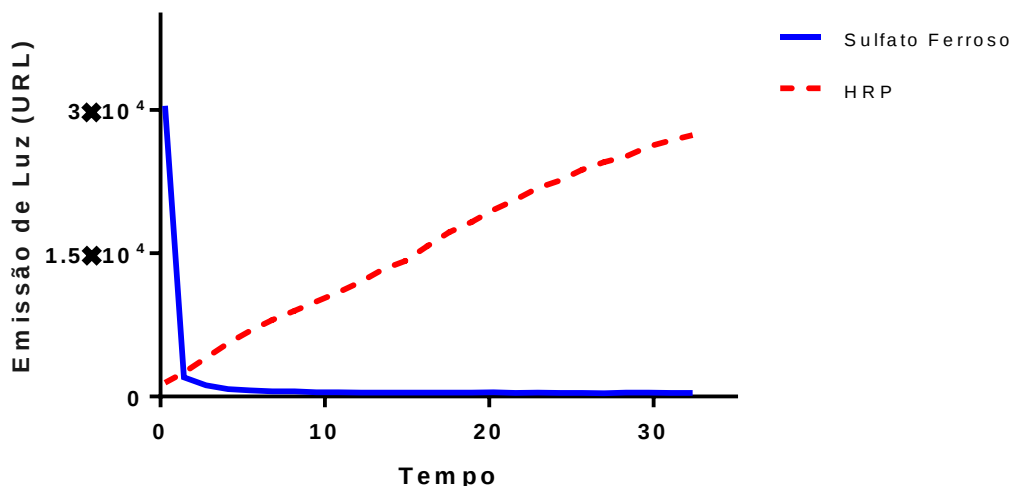


Considerando que o parâmetro analítico para determinar a concentração de peróxidos no óleo ozonizado é a área sob a curva da cinética de emissão de luz, em uma reação rápida como a que ocorreu com o Fe (II), essa área fica muito pequena, o que tornaria difícil demonstrar bons resultados.

5.5.3.2 Estudo da utilização da HRP como catalisador da reação

Quando o resultado do sulfato ferroso é comparado com a HRP, pode se observar um aumento considerável da área sob a curva. A Figura 20 mostra que a reação da HRP é bem mais lenta quando comparada com o sulfato, fornecendo uma área suficiente para mostrar bons resultados. Dessa forma, a HRP se mostrou a escolha mais adequada para o sistema quimiluminescente.

Figura 20: Perfil cinético comparativo entre os catalisadores sulfato ferroso e HRP. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [sulfato ferroso]= 1,0 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo ozonizado]= 5,1 mg mL⁻¹.



5.5.4 Otimização do Sistema Quimiluminescente

Estes primeiros estudos nos deram os parâmetros iniciais para o desenvolvimento do método quimiluminescente para a determinação do sistema oxidante do óleo ozonizado. Tendo então determinado o melhor solvente para dissolver o óleo, a melhor sonda quimiluminescente e o catalisador da reação, foram estudados os demais parâmetros visando a otimização do método analítico.

Para isto, foram avaliados pH, concentração de luminol e HRP. Nos ensaios iniciais, foi verificado que a reação era bastante rápida, pois o sinal de emissão de luz já se iniciava em valores altos, e havia posterior decaimento. Para minimizar as perdas de luz entre o tempo de injeção da enzima e a primeira leitura de emissão, a mesma foi adicionada diretamente no equipamento, utilizando uma de suas seringas de injeção.

5.5.4.1 Estudo da dependência do pH do meio reacional

Sabe-se que a reação de peróxidos com o luminol é favorecida em meio alcalino^{14,80}. Para identificar o melhor valor de pH para a reação com óleo ozonizado,

foram realizados ensaios variando o pH entre 7,0 e 11,0, mantendo-se constante as concentrações de luminol, HRP e o óleo ozonizado por 60 minutos (Figura 21).

Figura 21: Correlação entre a emissão de luz e o pH do tampão para o sistema HRP-luminol. Concentrações finais: [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo]= 5,2 mg mL⁻¹. Os tampões utilizados foram: fosfato de sódio pH 7,0, Tris pH 8,0 e 9,0, etanolamina pH 10,0 e 11,0. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

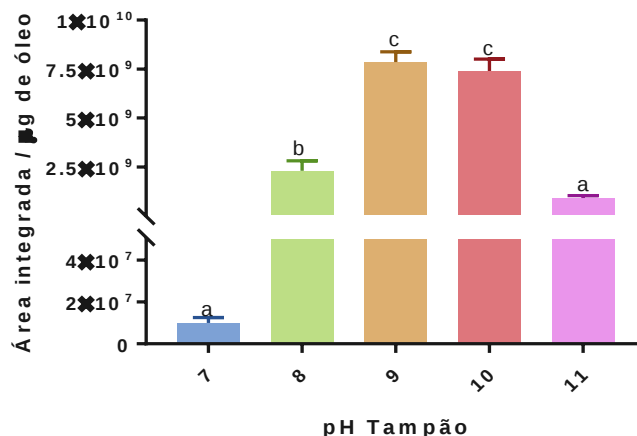


Tabela 7: ANOVA, correlação entre emissão de luz e o pH do tampão para o sistema HRP-Luminol

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	1,27e+020	4	3,18e+019	F (4, 8) = 211,9	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,2e+018	8	1,50e+017		
Total	1,28e+020	12			

Em 2015, YANG et al.⁸¹ demonstraram que o pH do meio de reação tem influência na emissão de luz para o sistema luminol-HRP-H₂O₂. Segundo estes autores, o sistema possui maior eficiência em pH 9,0-9,5. Aqui encontramos resultados semelhantes, o que reforça a proposta de que os peróxidos orgânicos presentes no óleo possuem comportamento semelhante ao H₂O₂ na reação com luminol. De fato, como mostrado na Figura 21, pode-se observar que a melhor eficiência de emissão de luz foi encontrada em pH 9-10. Demonstrando que existe correlação entre o sistema oxidante luminol-H₂O₂ e luminol-óleo ozonizado.

5.5.4.2 Estudo da dependência do luminol

Uma vez determinado o melhor solvente, e o pH do meio reacional, prosseguiu-se para o estudo da dependência do luminol nos valores de emissão de luz. Utilizando o meio de reação já estabelecido com solução tampão pH 9,0, óleo ozonizado e HRP, variou-se a concentração do luminol. Sendo o luminol o responsável pela emissão de luz no sistema, quando em contato com agentes oxidantes, espera-se que ao aumentar sua concentração, os resultados da emissão de luz também aumentarão.

No entanto, não foi isso que se verificou. De fato, estatisticamente não se verificou diferenças entre o total de emissão de luz e a concentração utilizada de luminol, embora na menor concentração utilizada se observou o melhor resultado (Figura 22). Isto provavelmente está relacionado à menor velocidade da reação, o que acarretou em uma menor perda de luz entre o momento de injeção e primeira leitura no equipamento. Portanto, seguiremos utilizando a concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de luminol.

Figura 22: Correlação entre a emissão de luz e a concentração de luminol. Concentrações finais: [tampão tris]= $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$, [HRP]= $12,5 \text{ nmol L}^{-1}$, [óleo]= $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes ($P < 0,05$)

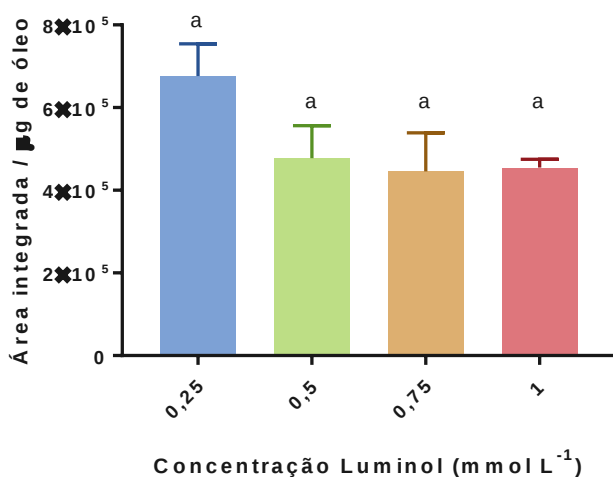


Tabela 8: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e a concentração de Luminol

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	7,15e+010	3	2,38e+010	F (3, 4) = 4,441	P=0,0919
Dentro do Grupo	2,15e+010	4	5,36e+09		
Total	9,30e+010	7			

5.5.4.3 Estudo da dependência do HRP

Utilizando o meio de reação já estabelecido com solução tampão pH 9,0, óleo ozonizado e luminol, variou-se a concentração do HRP, e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 23. Com o aumento da concentração de HRP aumenta-se, também, a quantidade de enzima disponível para catalisar a reação do peróxido com o luminol, então pode-se observar um aumento significativo de emissão de luz. Sendo assim, a concentração utilizada para os demais ensaios foi a de $12,50 \text{ nmol L}^{-1}$.

Figura 23: Correlação entre a emissão de luz e a concentração de HRP. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [óleo]= 5,2 mg mL⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05).

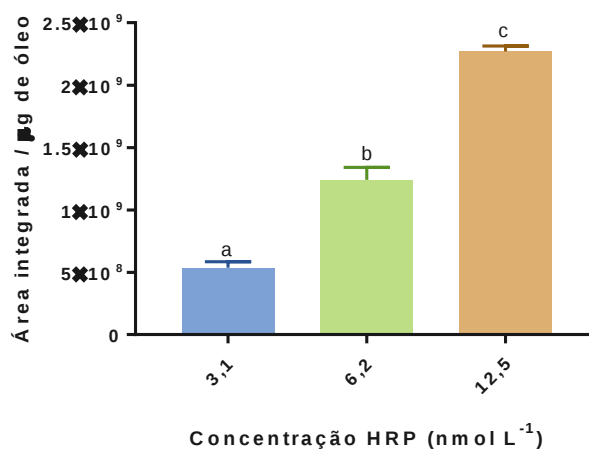


Tabela 9: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e a concentração de HRP

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	4,56e+018	2	2,28e+018	F (2, 6) = 487,7	P<0,0001
Dentro do Grupo	2,80e+016	6	4,67e+015		
Total	4,58e+018	8			

5.5.4.4 Estudo da correlação entre a concentração de óleo ozonizado e emissão de luz

Determinados os melhores parâmetros para o meio reacional, iniciou-se o estudo da correlação da concentração do óleo com a emissão de luz. O óleo ozonizado por 60 minutos foi o escolhido para análise, pois foi o que demonstrou resultado mais satisfatório nos ensaios anteriores.

Considerando a maior concentração de peróxidos em função da concentração de óleo utilizada, esperava-se um aumento da emissão em função da concentração, o que de fato se verificou, como demonstrado na Figura 24. O mesmo resultado pode ser observado analisando-se o perfil cinético da emissão de luz (Figura 25). Para concentrações menores, a reação inicia mais rapidamente, mas observa-se a saturação em pouco tempo, atingindo o platô após 10 minutos de reação. Para concentrações maiores, o platô pode ser observado após 20 minutos de reação, indicando que existe mais peróxidos disponíveis para que se atinja a saturação.

Figura 24: Correlação entre a emissão de luz e a concentração de óleo ozonizado para o sistema HRP-luminol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

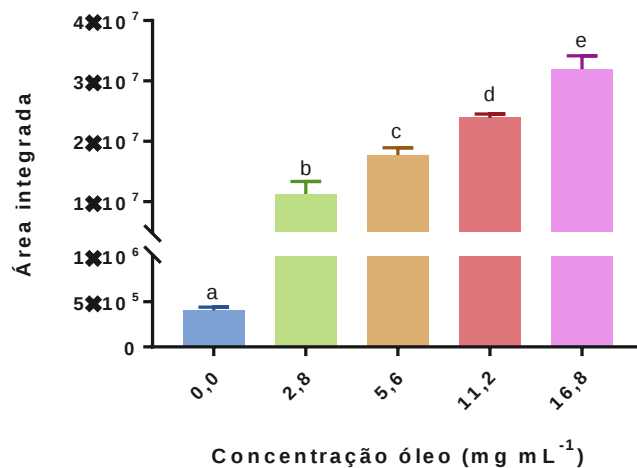
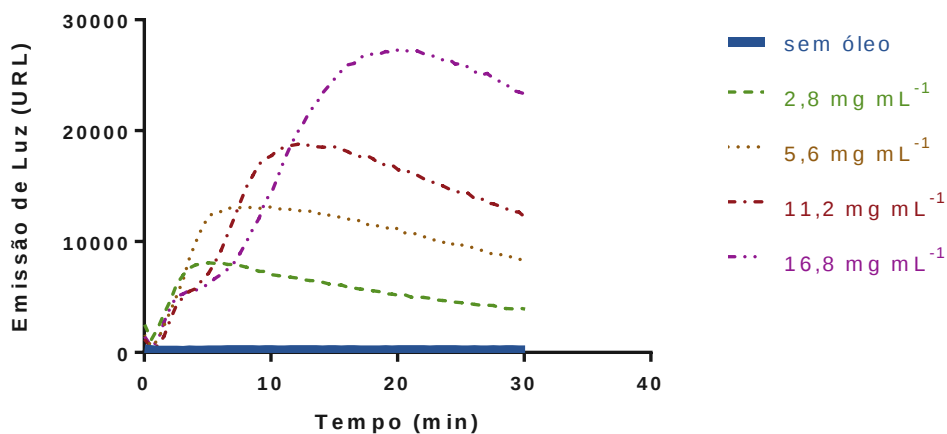


Tabela 10: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e a concentração de óleo ozonizado para o sistema HRP-Luminol

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	1,50e+015	4	3,76e+014	F (4, 9) = 197,4	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,71e+013	9	1,90e+012		
Total	1,52e+015	13			

Figura 25: Perfil cinético de emissão de luz de acordo com a massa de óleo ozonizado para o sistema HRP-luminol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹



5.5.4.5 Dependência da emissão de luz em relação ao tempo de ozonólise.

Com o meio de reação definido, procedeu-se à nova ozonólise dos óleos para determinação do sistema quimiluminescente. Os óleos foram ozonizados novamente, por tempos determinados de 10, 30, 60 e 120 minutos e estes foram analisados, com o meio de reação já padronizado, com solvente ciclo-hexano, tampão tris pH 9,0, luminol, HRP e o óleo ozonizado. Tendo como base os resultados observados para o índice de peróxidos para os óleos ozonizados (Tabela 1, seção 5.1), que evidenciaram um aumento de peróxidos conforme aumentou-se o tempo de ozonólise, espera-se que os resultados de emissão de luz acompanhem esta lógica.

A Figura 26 mostra a cinética de emissão de luz de acordo com o tempo de ozonólise dos óleos, e pode-se observar que os óleos com menos tempo de ozonólise (10 e 30 minutos) atingiram o pico de emissão de luz mais rapidamente que os óleos com tempo maior de ozonólise. Pode-se observar um aumento significativo entre os óleos de 10, 30 e 60 minutos. Porém, para o óleo de 120 minutos, há um decaimento da emissão total de luz (Figura 27), o que não condiz com o resultado obtido para o índice de peróxidos.

Figura 26: Perfil cinético de emissão de luz de acordo com o tempo de ozonólise para o sistema HRP-luminol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo não ozonizado]= 5,4 mg mL⁻¹, [óleo 10 minutos]= 5,3 mg mL⁻¹, [óleo 30 minutos]= 5,1 mg mL⁻¹, [óleo 60 minutos]= 5,5 mg mL⁻¹, [óleo 120 minutos]= 5,1 mg mL⁻¹

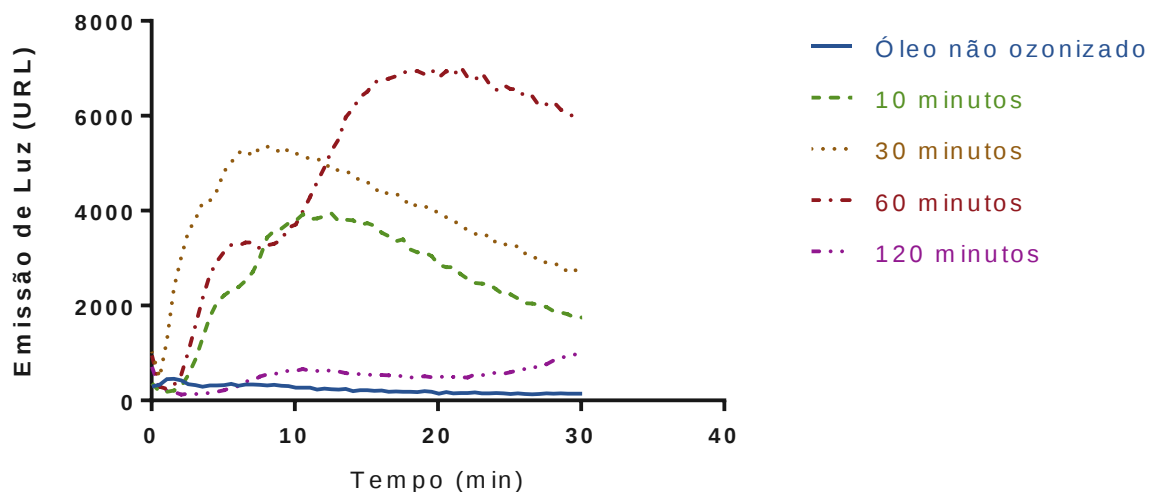


Figura 27: Correlação entre a emissão de luz e o tempo de ozonólise para o sistema HRP-luminol. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [HRP]= 12,5 nmol L⁻¹, [óleo não ozonizado]= 5,4 mg mL⁻¹, [óleo 10 minutos]= 5,3 mg mL⁻¹, [óleo 30 minutos]= 5,1 mg mL⁻¹, [óleo 60 minutos]= 5,5 mg mL⁻¹, [óleo 120 minutos]= 5,1 mg mL⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

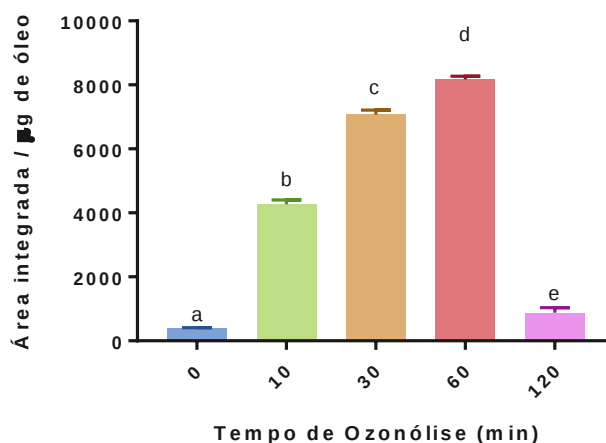


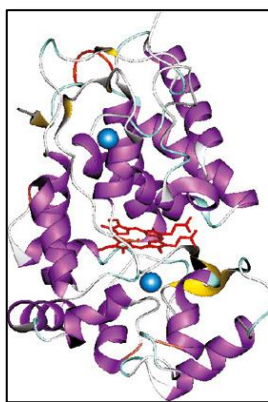
Tabela 11: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e o tempo de ozonólise para o sistema HRP-Luminol

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	1,48e+08	4	3,71e+07	F (4, 10) = 2,47e+03	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,50e+05	10	1,50e+04		
Total	1,49e+08	14			

Possivelmente esse resultado seja decorrente das alterações na cadeia por conta da ação da ozonólise. Visualmente, o óleo ozonizado por mais tempo (120 minutos) demonstrou aumento em sua viscosidade, o que pode dificultar o acesso do HRP à cadeia do óleo, resultando em uma diminuição da emissão de luz.

Duas hipóteses poderiam explicar estes resultados: (i) o grupo heme do HRP é o centro catalítico da enzima, que deve ser oxidado pelo peróxido presente no óleo¹⁴. Como o grupo heme está localizado no interior da enzima (Figura 28), com o aumento da viscosidade e o tamanho da cadeia do óleo ficaria difícil o acesso a este local para que possa ocorrer este efeito catalítico. (ii) altas concentrações de peróxidos podem inativar a HRP⁸², causando esse efeito de decaimento na emissão de luz, uma vez que não terá HRP disponível para que a reação ocorra. Tendo em vista esse resultado, foi necessário buscar alternativas para a HRP, e, possivelmente, para o luminol.

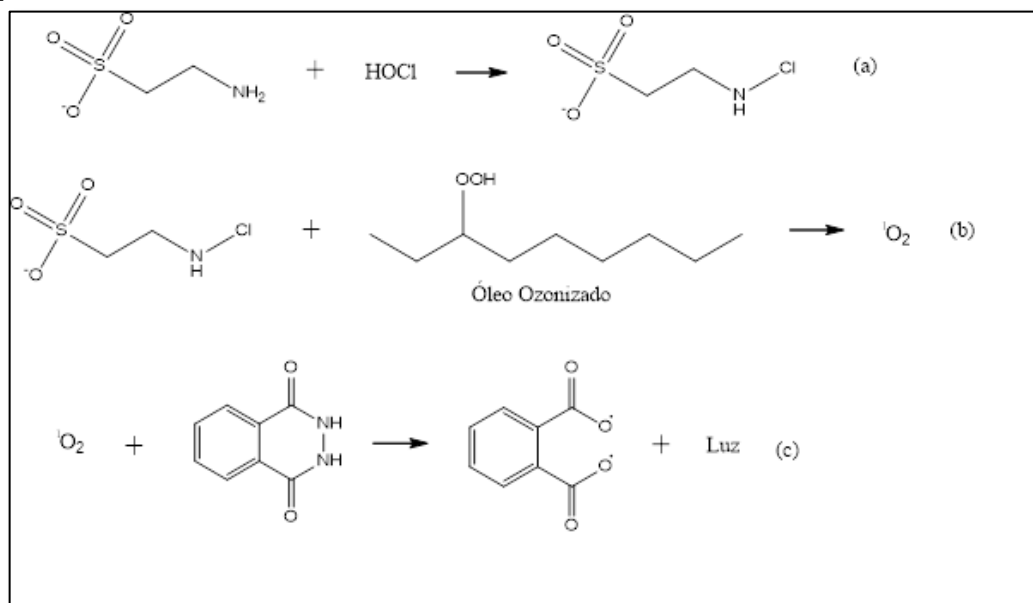
Figura 28: Estrutura da enzima Horseradish Peroxidase (HRP)⁷⁶



5.5.5 Estudo da utilização da Tau-NHCl

Buscando-se ainda o sistema quimiluminescente mais eficiente para estudos dos óleos ozonizados, decidiu-se pela utilização da Tau-NHCl juntamente com o luminol. Está bem estabelecido na literatura que a cloramina é um oxidante brando⁸³, e quando reage com peróxidos, pode gerar oxigênio singlete que, quando em contato com o luminol emite luz.

Figura 29: Reação global proposta da Tau-NHCl com o luminol. (a) Reação da taurina com ácido hipocloroso, formando a Tau-NHCl. (b) Reação proposta da Tau-NHCl com o óleo ozonizado, formando oxigênio singlete. (c) Reação proposta do oxigênio singlete com o luminol, seguido de emissão de luz. Adaptado de Ximenes et. al. 2020⁸⁴.



5.5.5.1 Estudo da dependência do pH do meio de reação sobre a Tau-NHCl

Para verificar se os parâmetros de reação utilizados anteriormente também são válidos para a Tau-NHCl, inicialmente foi realizado o estudo do pH do meio reacional. Já foi verificado anteriormente que o luminol tem maior eficiência em meio alcalino, porém não foi encontrado na literatura nenhuma relação da eficiência da Tau-NHCl com o pH do meio reacional. O resultado obtido para o ensaio com a variação do pH do meio reacional (Figura 30) indicou, novamente, que a reação em pH 9,0 foi mais satisfatória, coincidindo com os resultados anteriores utilizando HRP juntamente com o luminol.

Reações da Tau-NHCl usualmente ocorrem em pH fisiológico (7,0), uma vez que a taurina é um aminoácido que pode ser encontrado no organismo humano, e a reação com o HClO também pode ocorrer em meio intracelular⁸⁵. Porém, para sua utilização como oxidante na reação quimiluminescente, o pH não tem influência significativa, tendo o luminol um papel mais importante na escolha do pH.

Figura 30: Correlação entre a emissão de luz e o pH do tampão utilizado na reação com a Tau-NHCl. Concentrações finais: [luminol]= 0,50 mmol L⁻¹, [Tau-NHCl]= 6,0 mmol L⁻¹, [óleo]= 5,1 mg mL⁻¹. Os tampões utilizados foram: fosfato de sódio pH 7,0, tris pH 8,0 e 9,0, etanolamina pH 10,0 e 11,0. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05).

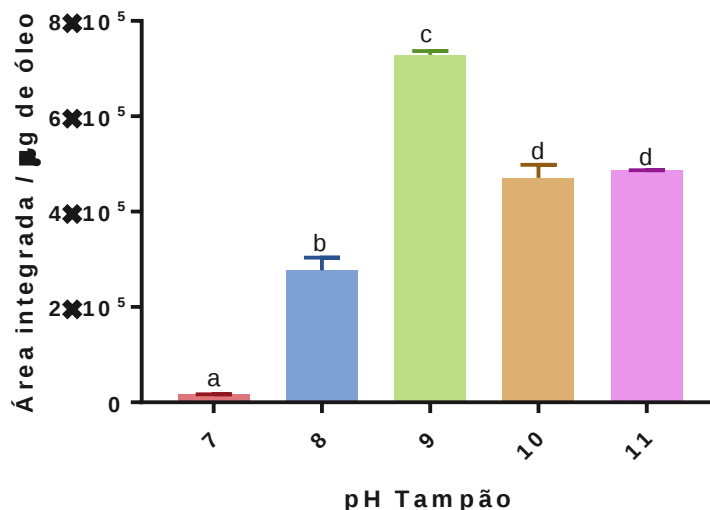


Tabela 12: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e o pH do tampão na reação com Tau-NHCl

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	5,65e+011	4	1,41e+011	F (4, 5) = 457,9	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,54e+09	5	3,09e+08		
Total	5,67e+011	9			

5.5.5.2 Estudo da influência da concentração da Tau-NHCl

A Tau-NHCl tem papel diferente do HRP na reação quimiluminescente, enquanto o HRP catalisa a reação ocorrida entre o luminol e o peróxido, a Tau-NHCl reage diretamente com o peróxido do óleo ozonizado, que por sua vez oxida o luminol que irá emitir luz. Sendo a responsável pela reação diretamente com o peróxido do óleo, acredita-se que o aumento de sua concentração será diretamente proporcional ao aumento de luz. Foi realizado, então, um ensaio mantendo o meio reacional padrão com tampão Tris, luminol e o óleo ozonizado, e variou-se a concentração da Tau-NHCl (Figura 31). A Figura 32 mostra o perfil cinético conforme variou-se a concentração da Tau-NHCl.

Pode-se observar que a resposta do sistema é muito baixa quando não há Tau-NHCl para que a reação ocorra, e o aumento de luz é proporcional ao aumento da concentração da Tau-NHCl. A reação ocorreu de maneira mais lenta do que com a utilização do HRP, e o pico de luz foi obtido após 20 minutos de reação. Os resultados demonstraram que a concentração da Tau-NHCl tem influência no resultado da

emissão de luz, e conforme aumenta-se sua concentração, aumenta-se também a emissão de luz pelo sistema. Este resultado demonstra que a Tau-NHCl é um reagente promissor para o estudo quimiluminescente do óleo ozonizado.

Figura 31: Correlação entre a emissão de luz e a concentração de Tau-NHCl. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [óleo]= 5,5 mg mL⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

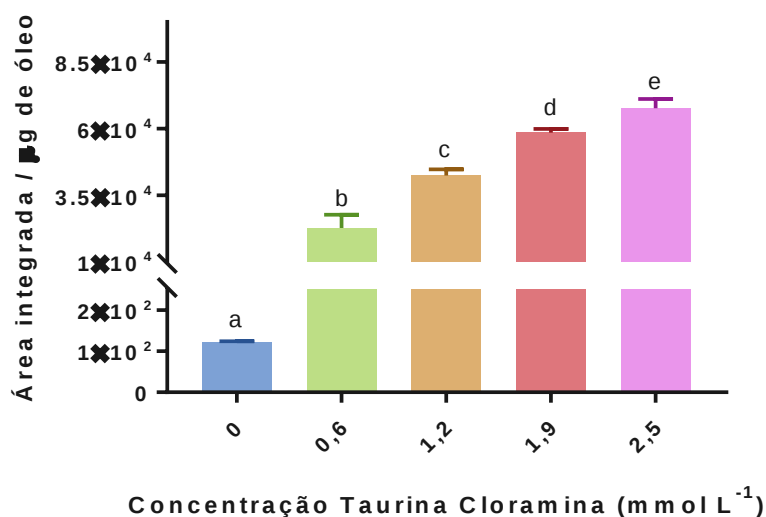
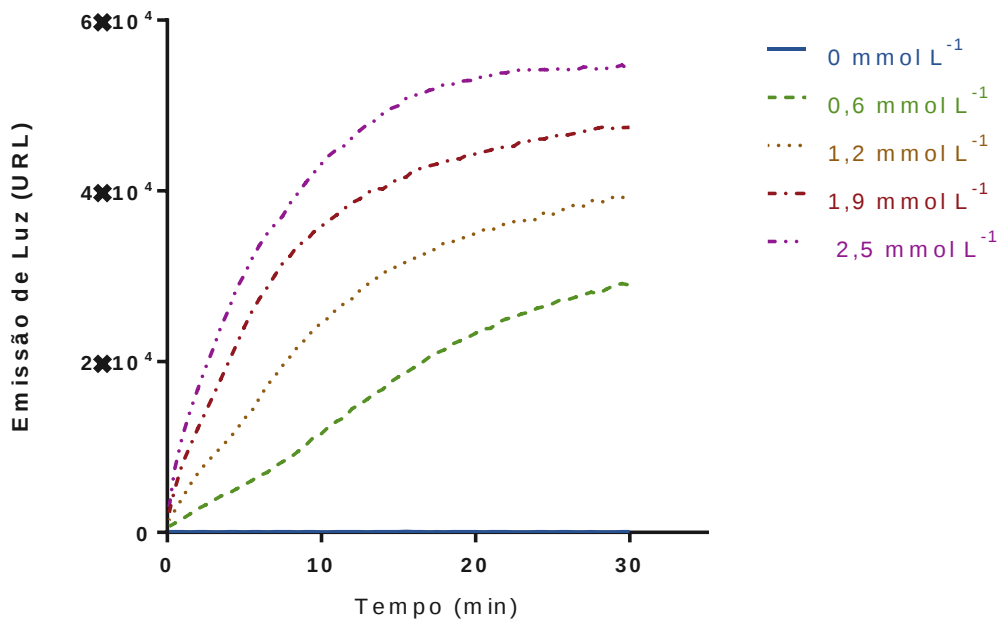


Tabela 13: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e a concentração de Tau-NHCl

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	5,65e+011	4	1,41e+011	F (4, 5) = 457,9	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,54e+09	5	3,09e+08		
Total	5,67e+011	9			

Figura 32: Perfil cinético de emissão de luz para a reação com a Tau-NHCl. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [óleo]= 5,5 mg mL⁻¹



5.5.5.3 Estudo sistema reacional Tau-NHCl-luminol-óleo

Foi realizada uma análise controle para demonstrar a influência de cada reagente na emissão de luz. Isto se faz necessário, uma vez que tanto o óleo ozonizado como a Tau-NHCl são oxidantes e poderiam sozinhos serem responsáveis pela emissão de luz. Como pode ser observado na Figura 33, ainda que se observe emissão de luz pelo sistema óleo + luminol ou Tau-NHCl + luminol, houve um aumento de 100 vezes para o sistema com todos os componentes presentes.

Figura 33: Correlação entre a emissão de luz e a presença da Tau-NHCl e do óleo ozonizado. A= luminol 0,5 mmol L⁻¹ e óleo ozonizado 5,7 mg mL⁻¹, B= Tau-NHCl 2,0 mmol L⁻¹ e luminol 0,5 mmol L⁻¹, C= Tau-NHCl 2,0 mmol L⁻¹, luminol 0,50 mmol L⁻¹ e óleo ozonizado 5,7 mg mL⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

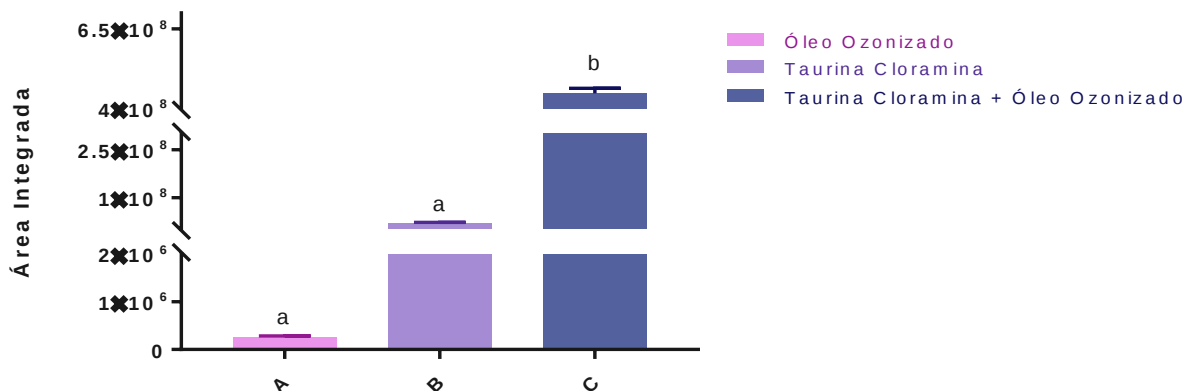


Tabela 14: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e a presença da Tau-NHCl e do óleo ozonizado

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	2,55e+017	2	1,27e+017	F (2, 3) = 1449	P<0,0001
Dentro do Grupo	2,64e+014	3	8,80e+013		
Total	2,55e+017	5			

5.5.5.4 Estudo da Variação da Concentração do Óleo

Tendo identificado os melhores parâmetros para a utilização da Tau-NHCl juntamente com o luminol, procedeu-se ao estudo do comportamento da emissão de luz de acordo com a concentração do óleo. O óleo escolhido para este estudo foi o óleo ozonizado por 60 minutos. Variou-se a concentração do óleo, e foi realizado um experimento sem óleo para controle. A Figura 34 mostra a emissão de luz de acordo com a concentração do óleo, e pode-se observar o aumento da emissão de luz. O que demonstra que em uma maior concentração de óleo existe mais peróxidos disponíveis para que a reação ocorra, aumentando a emissão de luz. No perfil cinético da reação (Figura 35) pode-se observar o pico da emissão de luz após 10 minutos de reação, e a saturação ocorre após esse período.

Figura 34: Correlação entre a emissão de luz e a concentração do óleo ozonizado para a reação com a Tau-NHCl. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [Tau-NHCl]= 1,8 mmol L⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

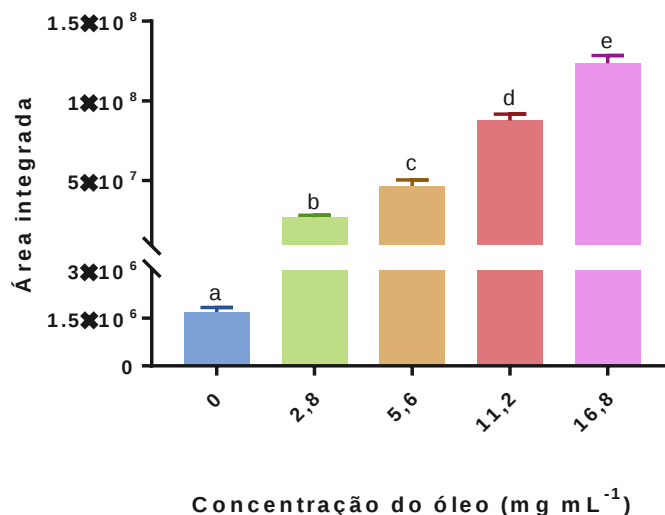
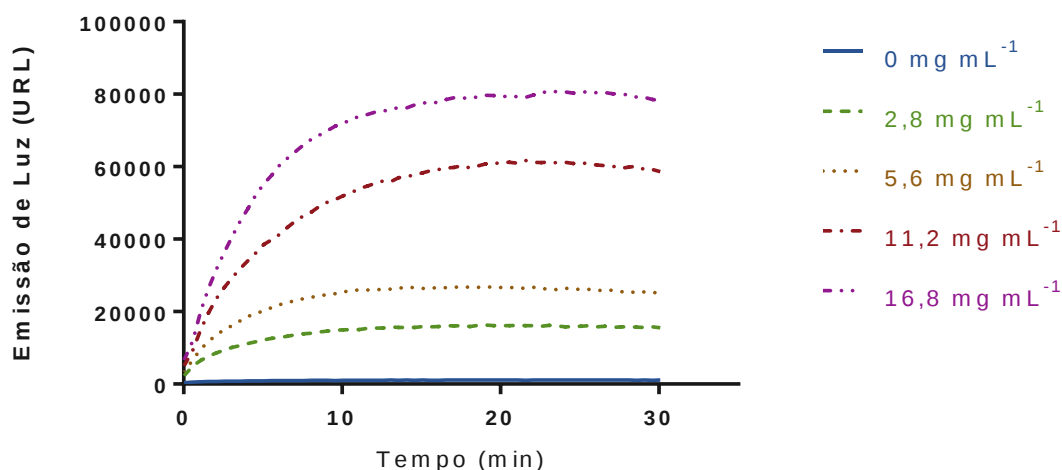


Tabela 15: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e a concentração do óleo ozonizado para a reação com a Tau-NHCl

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	2,83e+016	4	7,08e+015	F (4, 10) = 632,3	P<0,0001
Dentro do Grupo	1,12e+014	10	1,12e+013		
Total	2,84e+016	14			

Figura 35: Perfil cinético de emissão de luz de acordo com a concentração de óleo ozonizado para a reação com a Tau-NHCl. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [Tau-NHCl]= 1,8 mmol L⁻¹



5.5.5.5 Estudo do sistema otimizado

Com o método otimizado, prosseguiu-se à uma nova ozonização do óleo pelos tempos pré-determinados (10, 30, 60 e 120 minutos) e realizou-se nova análise

quimiluminescente, com os resultados normalizados (Figura 37). O perfil cinético de luminescência do sistema pode ser verificado na Figura 36, e demonstra um pico de emissão de luz após 10 minutos de reação, e posterior decaimento da luz, como verificado nos sistemas anteriores.

Ainda que a utilização da Tau-NHCl tenha demonstrado boa perspectiva como sonda quimiluminescente, observa-se, novamente, um decréscimo no resultado para o óleo ozonizado por tempos maiores. É provável que este resultado seja, também, em decorrência das alterações na cadeia do óleo após a ozonólise.

Figura 36: Perfil cinético de emissão de luz de acordo com o tempo de ozonólise para a reação com a Tau-NHCl. Concentrações finais: [tampão ris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [Tau-NHCl]= 1,8 mmol L⁻¹, [óleo não ozonizado]= 5,4 mg ml⁻¹, [óleo 10 minutos]= 5,9 mg ml⁻¹, [óleo 30 minutos]= 5,6 mg ml⁻¹, [óleo 60 minutos]= 5,1 mg ml⁻¹, [óleo 120 minutos]= 5,7 mg ml⁻¹

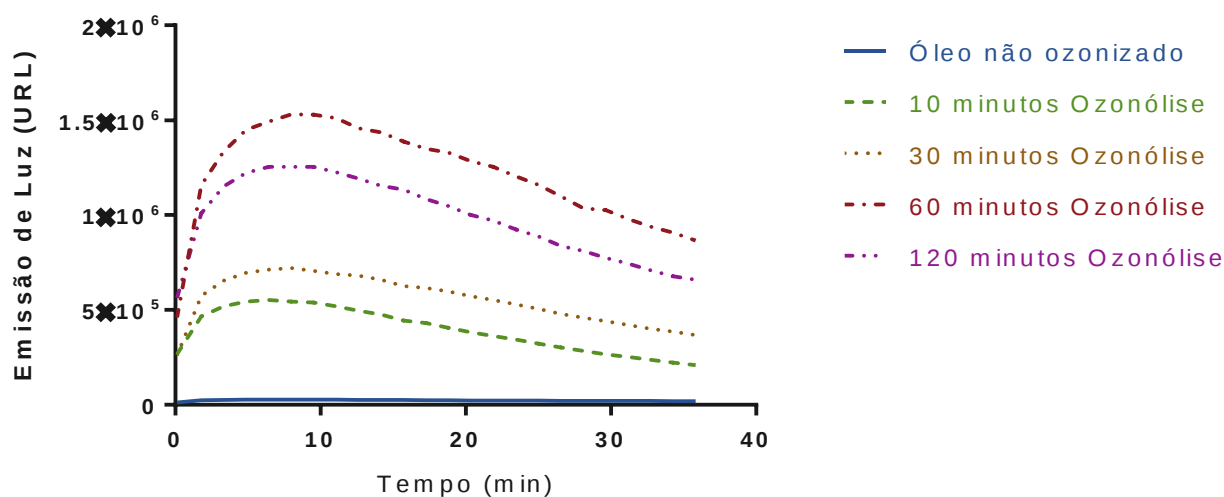


Figura 37: Correlação entre a emissão de luz e o tempo de ozonólise para a reação com a Tau-NHCl. Concentrações finais: [tampão tris]= 50,0 mmol L⁻¹, [luminol]= 0,5 mmol L⁻¹, [Tau-NHCl]= 1,8 mmol L⁻¹, [óleo não ozonizado]= 5,4 mg ml⁻¹, [óleo 10 minutos]= 5,9 mg ml⁻¹, [óleo 30 minutos]= 5,6 mg ml⁻¹, [óleo 60 minutos]= 5,1 mg ml⁻¹, [óleo 120 minutos]= 5,7 mg ml⁻¹. Letras diferentes representam médias dos grupos estatisticamente diferentes (P<0,05)

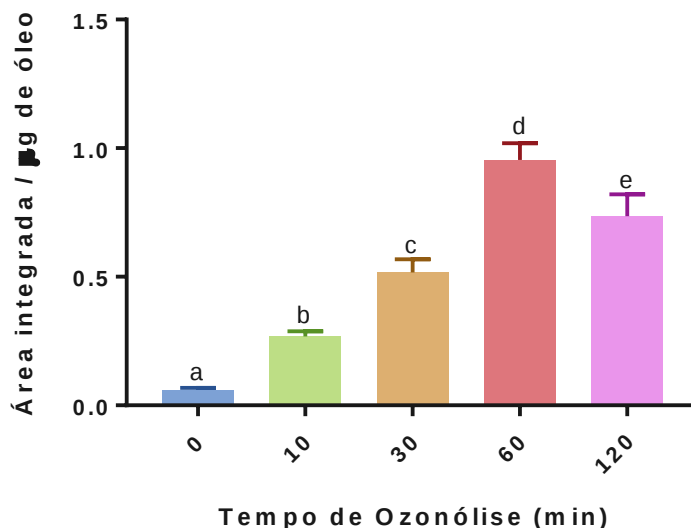


Tabela 16: ANOVA, correlação entre a emissão de luz e o tempo de ozonólise para a reação com a Tau-NHCl

Fonte de Variação	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre Grupos	1,31	4	0,33	F (4, 9) = 119,2	P<0,0001
Dentro do Grupo	0,02	9	0,003		
Total	1,33	13			

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados já obtidos na caracterização dos óleos, se pode concluir que a ozonização do óleo de gergelim alterou a estrutura da cadeia do óleo, gerando compostos peroxídicos e ozonídeos como demonstrado pelas análises de Índice de Peróxidos, FT-IR e análises térmicas.

Os resultados obtidos por quimiluminescência do óleo ozonizado demonstraram que existem compostos peroxídicos passíveis de oxidação pelo luminol. A técnica apresentou potencial como método alternativo para a determinação do poder oxidante dos óleos ozonizados, observado a partir da correlação encontrada entre a emissão de quimiluminescência e a concentração do óleo ozonizado.

Entretanto, o aumento excessivo da ozonólise provocou uma diminuição da emissão de quimiluminescência, possivelmente relacionada com o aumento da

viscosidade do óleo, que dificulta a interação destes peróxidos com os compostos estudados (HRP e Tau-NHCl).

REFERÊNCIAS

1. Nimer HYY. O USO DA OZONIOTERAPIA NAS DIVERSAS ESPECIALIDADES DA ODONTOLOGIA. Published online 2018.
2. Mendes MLT. Avaliação in vitro da atividade antifúngica do óleo de coco ozonizado contra *Candida* spp. Published online 2017:95.
3. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018;56(138):235-241. doi:10.1016/j.intimp.2018.01.040
4. Anzolin A, Da Silveira-Kaross N, Bertol C. Ozonated oil in wound healing: What has already been proven? *Med Gas Res*. 2020;10(1):54-59. doi:10.4103/2045-9912.279985
5. Vadhana V, Sharath A, Geethapriya P, Vijayasankari V. Effect of sesame oil, ozonated sesame oil, and chlorhexidine mouthwash on oral health status of adolescents: A randomized controlled pilot trial. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2019;37(4):365-371. doi:10.4103/JISPPD.JISPPD_244_19
6. Machado GC, Chaves JBP, Antoniassi R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. *Rev Ceres*. 2006;53(308):463-470.
7. Zanardi I, Travagli V, Gabbrielli A, Chiasserini L, Bocci V. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. *Lipids*. 2008;43(9):877-886. doi:10.1007/s11745-008-3218-x
8. Tıǧlı Aydın RS, Kazancı F. Synthesis and Characterization of Ozonated Oil Nanoemulsions. *JAACS, J Am Oil Chem Soc*. 2018;95(11):1385-1398. doi:10.1002/aocs.12150
9. Uzun H, Kaynak EG, Ibanoglu E, Ibanoglu S. Chemical and structural variations in hazelnut and soybean oils after ozone treatments. *Grasas y Aceites*. 2018;69(2). doi:10.3989/gya.1098171
10. Díaz MF, Gavín JA. Characterization by NMR of ozonized methyl linoleate. *J Braz Chem Soc*. 2007;18(3):513-518. doi:10.1590/S0103-50532007000300003
11. Sadowska J, Johansson B, Johannessen E, Friman R, Broniarz-Press L, Rosenholm JB. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. *Chem Phys Lipids*. 2008;151(2):85-91. doi:10.1016/j.chemphyslip.2007.10.004
12. Cataldo F. Chemical and thermochemical aspects of the ozonolysis of ethyl oleate: Decomposition enthalpy of ethyl oleate ozonide. *Chem Phys Lipids*. 2013;175-176:41-49. doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.07.005
13. Ledea-Lozano OE, Fernández-García LA, Gil-Ibarra D, et al. Characterization of different ozonized sunflower oils I. Chemical changes during ozonization. *Grasas y Aceites*. 2019;70(4). doi:10.3989/gya.1166182
14. Ximenes VF. Estudo de novos sistemas quimiluminescentes aplicados na determinação de atividade enzimática. Published online 2000.
15. Albertin R, Arribas MAG, Bastos EL, et al. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos

- de demonstração para a sala de aula. *Quim Nova*. 1998;21(6):772-779. doi:10.1590/s0100-40421998000600018
16. Interativa QN. Ozônio (O3). Accessed January 3, 2022. <http://qnint.s bq.org.br/novo/index.php?hash=molecula.32>
 17. Chagas, L. H.; Mira A. Efeito do óleo ozonizado em lesões cutâneas em ratos. *Rev Cultiv o Saber*. Published online 2015:168-181. <http://weekly.cnbnews.com/news/article.html?no=124000>
 18. de Freitas CS. Desenvolvimento de sensor portátil para monitoramento de ozônio gasoso utilizando mPADs, impressão 3D e smartphones. Published online 2019.
 19. Motta FD. Geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18, (18O3), formando oxigênio-18 molecular singlete, 18O2 (1Δg), e modificações na 2'- desoxiguanosina. 2011;2. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-13102011-094231/>
 20. NIOSH/The National Institute for Occupational Safety and Health. niosh.pdf. 10/30/2019. Published 2019. Accessed March 27, 2023. <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0476.html>
 21. Bocci V. *OZÔNIO Uma Nova Droga Médica.*; 2005.
 22. Da Silva LM. Investigação da tecnologia eletroquímica para a produção de ozônio: aspectos fundamentais e aplicados. Published online 2004.
 23. Martins IVR, Junior ;Edson Dias Costa. Aplicação do Ozônio na Terapêutica do Sistema de Canais Radiculares: Revisão de Literatura. *Braz Dent J*. Published online 2018:121. <http://e-journal.uajy.ac.id/14649/1/JURNAL.pdf>
 24. Kawahara R, Joaquim JGF. OZONIOTERAPIA quando a compreensão faz toda a diferença. Published online 2011:17-21.
 25. Sanchez CMS. A utilização do óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinho da índia (*Cavia porcellus*) - Relato de caso. Published online 2008.
 26. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med*. 2011;2(1):66-70.
 27. Cruz HFO. Avaliação in vitro da afinidade e do efeito antimicrobiano do ozônio associado a veículos e curativos de demora. *Diss - Univ Estadual Paul Fac Odontol*. Published online 2006.
 28. Quintero R, Schwartz A. Pioneers in the dawn of ozone therapy The African Contribution to Ozone Therapy Dr. George Stoker (1854-1920). *Rev Española Ozonoterápia*. 2017;7(1):105-110.
 29. Spadea L, Tonti E, Spaterna A, Marchegiani A. Use of Ozone-Based Eye Drops: A Series of Cases in Veterinary and Human Spontaneous Ocular Pathologies. *Case Rep Ophthalmol*. 2018;9(2):287-298. doi:10.1159/000488846
 30. Guinesi AS, Andolfatto C, Idomeo BF, Arnaldo AC, Juliano PF, Roberta VF. Ozonized Oils: A qualitative and quantitative analysis. *Braz Dent J*. 2011;22(1):37-40. doi:10.1590/S0103-64402011000100006
 31. Conselho Federal de Medicina. RESOLUÇÃO CFM nº 2.181/2018. 2018;2018(D). <https://sistemas.cfm.org.br/normas/visualizar/resolucoes/BR/2018/2181>
 32. McMurry J. *Química Orgânica - Vol. 1*. 6ª.; 2011.
 33. Nunes FMN, Pereira PA de P, Andrade JB de. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa. *Quim Nova*. 2000;23(6):794-804. doi:10.1590/s0100-40422000000600013

34. Rodrigues De Almeida Kogawa N, José De Arruda E, Micheletti AC, et al. Synthesis, characterization, thermal behavior, and biological activity of ozonides from vegetable oils. *RSC Adv.* 2015;5(80):65427-65436. doi:10.1039/c5ra02798e
35. ANVISA AN de VS. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Published online 2005:1-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055>
<https://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006>
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.024>
<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127252>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001>
36. Kume JÉP, Andreani Junior R, Vazquez GH, Kozusny-Andreani DI. Atividade antifúngica de óleos essenciais in natura e ozonizados sobre o agente etiológico da esporotricose. *Rev Ibero-Americana Ciências Ambient.* 2021;12(3):126-135. doi:10.6008/CBPC2179-6858.2021.003.0012
37. Reddy, K. S.; Prasad, S. D.; Sirisha, P. D.; Prashanth V. Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Ozonated Sesame Oil, Calcium Hydroxide and their Combination as Intracanal Medicament against *Candida Albicans*: An in-vitro study. *Adv Hum Biol.* 2015;5(2):78-87.
38. Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, et al. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair Regen.* 2011;19(1):107-115. doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00649.x
39. Melo MS, Alves LP, Carvalho HC, et al. Ozonioterapia Em Queimaduras Induzidas Por Laser De Co 2 Em Pele De Ratos. Published online 2014:2671-2674.
40. Cardoso I da CC, Santos AC, Cardoso L da CC, Almeida MB de. Potencial antimicrobiano de óleos vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas: uma revisão integrativa. *Res Soc Dev.* 2021;10(2):e22410212451. doi:10.33448/rsd-v10i2.12451
41. Melo MAMF. Avaliação das Propriedades de Óleos Vegetais visando a Produção de Biodiesel. *Diss (Mestrado em Química)*. Published online 2010:114.
http://quimica.ufpb.br/posgrad/dissertacoes/Dissertacao_Maria_Andrea_Mendes_Formiga_Melo.pdf
42. Maruno M. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. Published online 2009:166.
<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-22102009-154453/en.php>
43. Kume JEP, Andreani Junior R, Di-Tanno MFP, Kozusny-Andreani DI. Uso de óleos essenciais in natura e ozonizados no controle in vitro de *Trichophyton mentagrophytes*. *Res Soc Dev.* 2021;10(1):e4710111233. doi:10.33448/rsd-v10i1.11233
44. Budowski P, Markley KS. The Chemical and Physiological Properties of Sesame Oil. *Chem Rev.* 1951;48(1):125-151. doi:10.1021/cr60149a005
45. Campestre. Ficha técnica óleo de gergelim. Accessed March 16, 2021.
https://www.campestre.com.br/pdf/ficha_tecnica_oleo_de_gergelim.pdf
46. Kamal-Eldin A, Appelqvist L-Å. The effects of extraction methods on sesame oil stability. *J Am Oil Chem Soc.* 1995;72(8):967-969. doi:10.1007/BF02542076
47. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, et al. Ozonated oils as functional dermatological matrices: Effects on the wound healing process using SKH1 mice. *Int J Pharm.* 2013;458(1):65-73. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.09.039
48. Rensi AM. V, Navarro B c. A, Andreani G, Zangaro RA, Kozusny-Andreani DI, Lima JC.

- AVALIAÇÃO DO EFEITO DE OLEOS OZONIZADOS DE GIRASSOL E COCO NO CONTROLE *Propionibacterium acnes*. *XXIV Congr Eng Biomédica*. Published online 2014:1164-1166.
49. Ferreira JC, Pires RH, Costa GB da, Carrijo BN, Guiotto FG, Rodrigues VS. The In Vitro Effect of Ozone Therapy Against Equine *Pythium insidiosum*. *J Equine Vet Sci*. 2021;98:103305. doi:10.1016/j.jevs.2020.103305
 50. Moraes MM, Coelho MS, Nascimento WM, et al. The antimicrobial effect of different ozone protocols applied in severe curved canals contaminated with *Enterococcus faecalis*: ex vivo study. *Odontology*. 2021;109(3):696-700. doi:10.1007/s10266-021-00592-6
 51. Almeida NR, Beatriz A, Micheletti AC, Arruda EJ de. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. *Orbital - Electron J Chem*. 2013;4(4). doi:10.17807/orbital.v4i4.467
 52. Díaz MF, Hernández R, Martínez G, et al. Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. *J Braz Chem Soc*. 2006;17(2):403-407. doi:10.1590/S0103-50532006000200026
 53. Monteiro CGJ, Gama MS, Moura BF, et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Ozonated Sunflower Oil against Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Endodontic Infection. *Ozone Sci Eng*. 2021;43(4):378-383. doi:10.1080/01919512.2020.1822150
 54. de Mattos IL, Shiraishi KA, Braz AD, Fernandes JR. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. *QuimNova*. 2003;26(3):373-380.
 55. Bnct J, Bikdsall C a I, Jenkins a C. Iodometric Determination of Ozone. *Anal Chem*. 1952;24(4):662-664.
 56. Ferre-Aracil J, Cardona SC, Navarro-Laboulais J. Determination and Validation of Henry's Constant for Ozone in Phosphate Buffers Using Different Analytical Methodologies. *Ozone Sci Eng*. 2015;37(2):106-118. doi:10.1080/01919512.2014.927323
 57. Ferre-Aracil J, Cardona SC, Navarro-Laboulais J. Determination and Validation of Henry's Constant for Ozone in Phosphate Buffers Using Different Analytical Methodologies. *Ozone Sci Eng*. 2015;37(2):106-118. doi:10.1080/01919512.2014.927323
 58. Díaz BMF, Gavín JA, Andrade JB De. Structural characterization by Nuclear Magnetic Resonance of ozonide triolein. 2008;59(3):274-281.
 59. Denari GB, Cavaleiro ÉTG. Princípios e aplicações de análise térmica. In: *Curso Teórico/Prático de Análises Térmicas*. ; 2012. doi:10.2141/jpsa.010134
 60. Matsuda MMN. Estudos da influencia de surfactantes e determinação de cloro em água potável empregando-se TCPO e 2-NPO. Published online 2003.
 61. da Silva VPA, Alves CR, Dutra RF, de Oliveira JE, Rondina D, Furtado RF. Biossensor Amperométrico para Determinação de Peróxido De Hidrogênio Em Leite. *Eclética Química*. 2011;36(2):143-157.
 62. Sornambigai M, Venkateswara Raju C, Senthil Kumar S. Bimodal Electrogenenerated Chemiluminescence of the Luminol/Dicyclohexylamine (DCHA) System: A Novel and Highly Sensitive Detection of DCHA via ECL-Flow Injection Analysis. *Anal Chem*. 2021;93(16):6472-6480. doi:10.1021/acs.analchem.1c00306
 63. Shahid W, Ejaz SA, Al-Rashida M, et al. Identification of NSAIDs as lipoxygenase inhibitors through highly sensitive chemiluminescence method, expression analysis in mononuclear cells and computational studies. *Bioorg Chem*. 2021;110:104818. doi:10.1016/j.bioorg.2021.104818

64. Díaz AN, Sanchez FG, García JAG. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies. *Anal Chim Acta*. 1996;327(2):161-165. doi:10.1016/0003-2670(96)00077-3
65. Yan X. Unique selective detectors for gas chromatography: Nitrogen and sulfur chemiluminescence detectors. *J Sep Sci*. 2006;29(12):1931-1945. doi:10.1002/jssc.200500507
66. Luong J, Gras R, Hawryluk M, Shearer R. A brief history and recent advances in ozone induced chemiluminescence detection for the determination of sulfur compounds by gas chromatography. *Anal Methods*. 2016;8(39):7014-7024. doi:10.1039/C6AY01887D
67. Toby S. Chemiluminescence in the Reactions of Ozone. *Chem Rev*. 1984;84:277-205.
68. Felix EP, Passaretti J, Garcia G, Cardoso AA. A new fluorescence method for determination of ozone in ambient air. *Microchem J*. 2011;99(2):530-534. doi:10.1016/j.microc.2011.07.006
69. Method IA. peroxide value procedure IFA. 2019;32(0).
70. Api AM, Boyd J, Renskers K. Peroxide levels along the fragrance value chain comply with IFRA standards. *Flavour Fragr J*. 2015;30(6):423-427. doi:10.1002/ffj.3257
71. Soriano NU, Migo VP, Matsumura M. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. *Chem Phys Lipids*. 2003;126(2):133-140. doi:10.1016/j.chemphyslip.2003.07.001
72. John J, Bhattacharya M, Raynor PC. Emulsions containing vegetable oils for cutting fluid application. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2004;237(1-3):141-150. doi:10.1016/j.colsurfa.2003.12.029
73. Saqib M, Qi L, Hui P, et al. Development of luminol-N-hydroxyphthalimide chemiluminescence system for highly selective and sensitive detection of superoxide dismutase, uric acid and Co²⁺. *Biosens Bioelectron*. 2018;99(July 2017):519-524. doi:10.1016/j.bios.2017.08.028
74. Santos, R. M. S.; Santos, M. F.; Costa MFD. Quimioluminescência e bioluminescência. *Quim Nova*. 1993;16(3):200-209.
75. Arcuri ASA. Substancias Peroxidaveis. Published online 1999:62.
76. Veitch NC. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249-259. doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.022
77. Ximenes VF, Padovan CZ, Carvalho DA, Fernandes JR. Oxidation of melatonin by taurine chloramine. *J Pineal Res*. Published online May 27, 2010:no-no. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00772.x
78. Yan Y, Shi P, Song W, Bi S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: In Vitro and In Vivo Perspectives. *Theranostics*. 2019;9(14):4047-4065. doi:10.7150/thno.33228
79. Yildiz G, Demiryürek AT. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: A method for hydroxyl radical study. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1998;39(3):179-184. doi:10.1016/S1056-8719(98)00025-2
80. Souza BS De, Ferreira JA. Funcionamento do luminol e sua utilização para a identificação de sangue latente. *Rev Científica Fundação Hermínio Ometto*. 2018;6(1):37-46. <http://www.uniararas.br/revistacientifica>
81. Yang L, Jin M, Du P, et al. Study on enhancement principle and stabilization for the luminol-H₂O₂-HRP chemiluminescence system. *PLoS One*. 2015;10(7).

82. Hiner ANP, Hernandez-ruiz J, Arnao MB, Garcia-canovas F, Acosta M. A Comparative Study of the Purity , Enzyme Activity , and Inactivation by Hydrogen Peroxide of Commercially Available Horseradish Peroxidase Isoenzymes A and C. *Biotechnol Bioeng*. 1996;50(08):655-662.
83. Petrônio MS. Oxidação de lisozima por haloaminas: caracterização química e efeitos biológicos. Published online 2014.
84. Ximenes VF, Ximenes TP, Morgon NH, de Souza AR. Taurine Chloramine and Hydrogen Peroxide as a Potential Source of Singlet Oxygen for Topical Application. *Photochem Photobiol*. 2021;97(5):963-970. doi:10.1111/php.13410
85. Dall'igna DM. Avaliação da viabilidade celular e perfil de citocinas de linfócitos sanguíneos e esplênicos de ratos sépticos submetidos ao tratamento in vitro com taurina e cloramina taurina. Published online 2013.