

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**ANDERSON BARBOSA GALVÃO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE ÓLEO OZONIZADO PARA FINS TERAPÊUTICOS  
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN**

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, outubro de 2020**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**ANDERSON BARBOSA GALVÃO**

**ANÁLISE MOLECULAR DE ÓLEO OZONIZADO PARA FINS TERAPÊUTICOS  
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da  
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

**São José dos Campos, outubro de 2020**

# **UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**ANDERSON BARBOSA GALVÃO**

## **ANÁLISE MOLECULAR DE ÓLEO OZONIZADO PARA FINS TERAPÊUTICOS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN**

### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco**

Orientador

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Cid Bartolomeu de Araújo (externo)**

Universidade Federal de Pernambuco

**Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior (interno)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Adjaci Uchoa Fernandes (Suplente)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Carlos José de Lima (Suplente)**

Universidade Anhembi Morumbi

**São José dos Campos, outubro de 2020**

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

## ANDERSON BARBOSA GALVÃO

Profissional de Engenharia com experiência em implantação de projetos de infraestrutura de redes de telecomunicações, coordenação de equipes com treinamentos e suporte, execução e desenvolvimento de projetos de eletroeletrônica, hidráulica, mecânica, automação comercial, industrial e nível intermediários dos idiomas inglês e espanhol.

### Ficha Catalográfica

G171a Galvão, Anderson Barbosa  
Análise Molecular de Óleo Ozonizado para fins Terapêuticos  
Utilizando Espectroscopia Raman / Anderson Barbosa Galvão. –  
2020.  
56f.: il.; 30 cm.

Orientador: Marcos Tadeu Tavares Pacheco.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade  
Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2020.  
Bibliografia: f.52-56

1. Engenharia Biomédica. 2. Raman. 3. Óleo de soja. 4. Ozônio.  
5. Espectroscopia. I. Título.

CDD 616.075

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grato aos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste mestrado, em especialmente:

Ao meu orientador, Professor Marcos Tadeu, por direcionar as minhas pesquisas, aos professores Landulfo e Lima, que se dispuseram incondicionalmente de seu tempo para sanar minhas dúvidas, me auxiliar nos experimentos e compartilhar seus conhecimentos agregando valor ao meu trabalho.

A Coordenação do curso de Engenharia Biomédica que apesar do distanciamento físico sempre me apoiaram na solução e esclarecimentos acadêmicos.

A minha querida e eterna companheira Rafaela Louise por tudo que vivemos e aprendemos no decorrer do meu mestrado e principalmente a paciência em entender as minhas ausências e atrasos em virtude do desenvolvimento desta dissertação.

Ao meu filho recém-nascido Júlio César por ser a fonte incentivadora desta conquista.

Aos familiares e amigos que estiveram ao meu lado nessas idas e vindas no trajeto de Belo Horizonte até São José dos Campos e vice e versa.

À Universidade Anhembi Morumbi pela bolsa de mestrado concedida e os seus demais Professores e Funcionários.

## RESUMO

Este trabalho visa avaliar a utilização da espectroscopia Raman dispersiva na análise da oxidação do óleo de soja submetido ao processo de ozonização, considerando-se diversas temperaturas e tempos de reação. Óleo de soja tem um alto teor de ácido linoleico, ácido oleico, gorduras monoinsaturadas e poli-insaturadas, os quais podem ser potencializados pela ação do ozônio e futuramente utilizados para em diversos tratamento de saúde. A espectroscopia Raman se caracteriza pelo desvio em frequência de um feixe monocromático, ao atingir e ser retroespalhado por um determinado alvo, permitindo a sua caracterização molecular. Os dados foram processados a partir do uso da técnica de Análise de Componentes Principais (PCA). O experimento realizado utilizou amostras de óleo de soja divididos em dois grupos, ozonizado e não ozonizado. Os espectros Raman obtidos a partir das amostras de óleo de soja ozonizado e não ozonizado, apresentam uma série de picos na região espectral entre 400 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Através da técnica PCA foi possível determinar que, durante o processo de oxidação das amostras por ozônio houve redução das intensidades dos picos em 1265, 1302, 1440, 1659 e 1750  $\text{cm}^{-1}$ , com destaque para o pico em 1659 e 1750  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídos à quebra das ligações duplas de carbono da cadeia lipídica, que segundo o mecanismo de Criegee, ocorre em função da redução dos compostos (-HC=CH-) e a geração dos subprodutos aldeídos e cetonas, com o aumento da cadeia de  $\text{CO}_2$ . Após a ozonização, as amostras de óleo de soja sofrem um processo prematuro de oxidação, ocasionando alterações químicas, dentre elas a clivagem das ligações duplas de carbono, alterando a sua estrutura molecular, o que pode ser constatado pela espectroscopia Raman.

**Palavras chaves:** espectroscopia Raman, óleo de soja, ozônio.

## ABSTRACT

This work aims to evaluate the use of dispersive Raman spectroscopy in the analysis of the oxidation of soybean oil submitted to the ozonation process, considering different temperatures and reaction times. Soy oil has a high content of linoleic acid, oleic acid, monounsaturated and polyunsaturated fats, which can be enhanced by the action of ozone and used in the future in various health treatments. Raman spectroscopy is characterized by the frequency deviation of a monochromatic beam, when reaching and being backscattered by a specific target, allowing its molecular characterization. The data were processed using the Principal Component Analysis (PCA) technique. The experiment carried out used samples of soybean oil divided into two groups, ozonized and non-ozonated. The Raman spectra obtained from samples of ozonized and non-ozonized soybean oil, show a series of peaks in the spectral region between 400 and 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Through the PCA technique it was possible to determine that, during the oxidation process of the samples by ozone, there was a reduction in peak intensities in 1265, 1302, 1440, 1659 and 1750  $\text{cm}^{-1}$ , with emphasis on the peak in 1659 and 1750  $\text{cm}^{-1}$ , which can be attributed to the breakdown of the double carbon bonds of the lipid chain, which according to the Criegee mechanism, occurs due to the reduction of the compounds ( $-\text{HC} = \text{CH}-$ ) and the generation of the aldehyde and ketone by-products, with the increase of the  $\text{CO}_2$  chain. After ozonation, soybean oil samples undergo a premature oxidation process, causing chemical changes, including the cleavage of carbon double bonds, changing their molecular structure, which can be seen by Raman spectroscopy.

**Key words:** Raman spectroscopy, soybean oil, ozonation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Matérias-primas e produtos derivados dos óleos e gorduras	13
<b>Figura 2</b> – Mecanismo de reação de ozonólise em alquenos proposto por Criegee	19
<b>Figura 3</b> – Reação de ozonólise do ácido oleico	20
<b>Figura 4</b> – Espectro eletromagnético da região ultravioleta e visível IR	23
<b>Figura 5</b> – Gerador de ozônio (Ozone & Life - modelo O & L 1.5M)	28
<b>Figura 6</b> – Medidor analítico (Anseros Ozone Water Analyzer TIZ)	29
<b>Figura 7</b> – Processo de ozonização da água, difusor de bolhas e excitador magnético	29
<b>Figura 8</b> – Dispositivo Venturi	30
<b>Figura 9</b> – Processo de ozonização do óleo de soja com dispositivo Venturi	30
<b>Figura 10</b> – Dispositivo de aquecimento e resfriamento, pastilha Peltier e dissipador de calor	31
<b>Figura 11</b> – Diagrama de blocos e imagem do sistema do espectrofotômetro Raman	32
<b>Figura 12</b> – Processo de ganho e perda de massa de ozônio na água na temperatura ambiente	35
<b>Figura 13</b> – Espectros Raman médios sem a retirada do fundo de fluorescência das amostras de soja sem e com ozônio nas temperaturas de 10, 30 e 60 °C e nos tempos iniciais 10, 20 e 40 minutos	37
<b>Figura 14</b> – Espectros médios normalizados de soja sem e com ozônio	38
<b>Figura 15</b> – Diferença entre os espectros médios normalizados de soja sem e com ozônio	40
<b>Figura 16</b> – Média e desvio padrão dos componentes principais (PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5)	41
<b>Figura 17</b> – Vetores dos componentes principais (SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5)	42
<b>Figura 18</b> – Características das médias espectrais dos PC's em relação à temperatura	45
<b>Figura 19</b> – Características das médias espectrais dos PC's em relação ao tempo	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Estimativa de concentração de ácidos graxos em óleos comestíveis	15
<b>Tabela 2</b> – Estrutura molecular dos principais ácidos graxos insaturados presentes no óleo de soja	16
<b>Tabela 3</b> – Determinação das temperaturas e tempos de submissão das amostras de óleo de soja sem e com ozônio	33
<b>Tabela 4</b> – Atribuições dos espectros Raman de óleos vegetais	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BHA</b>	Butilhidroxianisol
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno
<b>c</b>	Velocidade da luz
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa acoplada
<b>HPLC</b>	Cromatografia de alta eficiência
<b>h</b>	Constante de Planck
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozônio
<b>PCA</b>	Análises de componentes principais
<b>PG</b>	Propilgalato
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno (polyvnylidene fluoride)
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>TBHQ</b>	Terc-butil-hidroquinona
<b>v</b>	Frequência
<b>σ</b>	Ligação molecular sigma
<b>π</b>	Ligação molecular pi
<b>λ</b>	Comprimento de onda

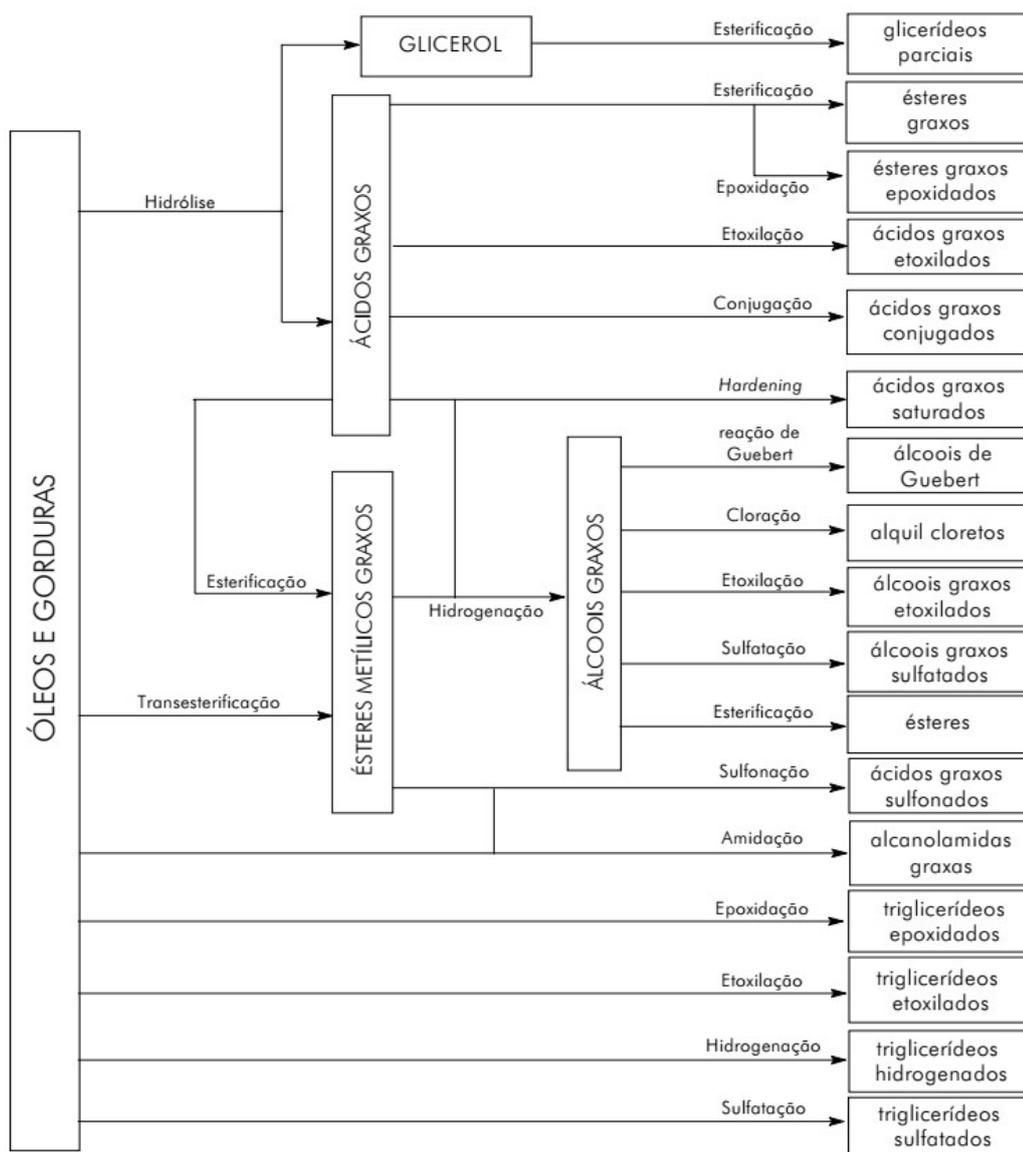
# Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Soja.....	14
1.2	Óleo de Soja.....	14
1.3	Ozônio.....	17
1.4	Ozonólise.....	18
1.5	Espectroscopia Raman.....	22
1.6	Análise de componentes principais (PCA).....	24
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Geral.....	26
2.2	Específico.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	Amostras.....	27
3.2	Processamento das amostras.....	27
3.2.1	Geração de ozônio.....	27
3.2.2	Processo de ozonização da água.....	28
3.2.3	Processo de ozonização da amostra de óleo de soja.....	30
3.2.4	Processo de resfriamento e aquecimento das amostras.....	31
3.3	Espectroscopia das amostras.....	31
3.4	Análise dos espectros.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Análise da transferência de massa de ozônio em água pura.....	35
4.2	Espectros Raman das amostras de óleos de soja sem e com ozônio.....	36
4.3	Análise das amostras por componentes principais e escores médios.....	40
4.4	Análise das amostras em relação à temperatura e ao tempo.....	44

4.5	Resultados em Saúde .....	49
4.6	Resultados em Tecnologia .....	50
5	CONCLUSÃO .....	51
	REFERÊNCIAS .....	52

# 1 INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras de origem vegetal e animal representam uma considerável fração de biomassa que é utilizada pelas indústrias químicas. Esses insumos oferecem muitas possibilidades de aplicação e fazem parte da composição de muitos produtos com alto valor agregado (TEIXEIRA, 2006), conforme Figura 1.



**Figura 1** – Matérias-primas e produtos derivados dos óleos e gorduras

Fonte: BRACKMAN (1984)

## 1.1 Soja

A soja é uma commodity agrícola de grande interesse mundial devido à sua utilização na alimentação humana e animal, bem como pelo seu valor econômico nos mercados nacional e internacional (SANTOS *et al.*, 2017). O Brasil tem mantido a liderança nas exportações e a segunda posição na produção mundial de soja, e pode, em 2020, alcançar o título de maior produtor mundial, com produção estimada de 123 milhões de toneladas e estimativa de esmagamento de 43,5 milhões de toneladas (CONAB, 2020). A soja e seus derivados são largamente consumidos em todo o mundo, tanto em nível doméstico quanto na elaboração de produtos industriais (SOUZA; BACCHI; ALVES, 2019; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

## 1.2 Óleo de Soja

O óleo de soja é extraído das sementes da soja por processo de esmagamento e extração com solvente. O conteúdo de óleo nas sementes varia entre 17 e 20% da sua composição. O domínio da soja no comércio mundial de óleos vegetais acontece em razão das características agrônômicas favoráveis, das safras confiáveis a preços competitivos e do retorno financeiro razoável aos agricultores e processadores.

Dada a maior quantidade de compostos insaturados presentes no óleo de soja (Tabela 1), ele se torna uma matéria-prima interessante em várias aplicações industriais, como tintas, vernizes, solventes, resinas, plásticos e materiais para escrita e impressão (TEIXEIRA, 2006).

Durante o processo de aquecimento a altas temperaturas, como em frituras, os óleos são continuamente expostos a vários fatores que levam a uma grande diversidade de reações químicas. Nesses casos, há consequente aceleração da degradação do alimento e da oxidação lipídica (CELLA; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008). As reações químicas envolvidas nesse processo são muito complexas e geram, em estágios mais avançados, produtos sensorialmente inaceitáveis (LUZIA; JORGE, 2009).

**Tabela 1** - Estimativa de concentração de ácidos graxos em óleos comestíveis

Ácidos Graxos	Estrutura	Valores de referência (%)		
		Soja	Canola	Milho
Ácido Láurico	C12:0	≤ 0,1	-	≤ 0,3
Ácido Mirístico	C14:0	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3
Ácido Palmítico	C16:0	9,7 – 13,3	3,3 – 6,0	9,2 – 16,5
Ácido Palmitoleico	C16:1	≤ 0,2	0,1 – 0,6	≤ 0,4
Ácido Estearico	C18:0	3,0 – 5,4	1,1 – 2,5	≤ 3,3
Ácido Oleico (Ômega 9)	C18:1	17,7 – 28,5	52,0 – 67,0	20,0 – 42,2
Ácido Linoleico (Ômega 6)	C18:2	49,8 – 57,1	16,0 – 25,0	39,4 – 65,6
Ácido Linolênico (Ômega 3)	C18:3	5,5 – 9,5	6,0 – 14,0	0,5 – 1,5
Ácido Araquídico	C20:0	0,1 – 0,6	0,2 – 0,8	0,3 – 0,7
Ácido Eicosenoico	C20:1	≤ 0,3	0,1 – 3,4	≤ 0,4
Ácido Eicosadienoico	C20:2	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1
Ácido Behênico	C22:0	0,3 – 0,7	≤ 0,5	≤ 0,5
Ácido Erúxico	C22:1	≤ 0,3	≤ 4,7	≤ 0,1
Ácido Lignocérico	C24:0	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,4

Fonte: Campestre Ind. e Com. de Óleos Vegetais LTDA

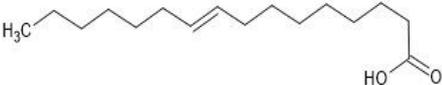
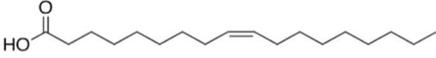
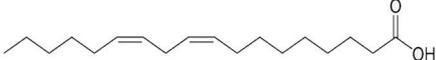
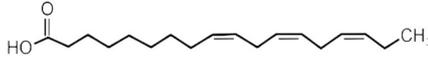
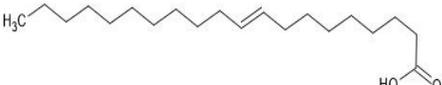
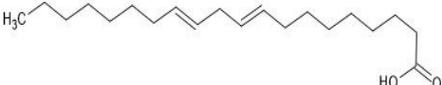
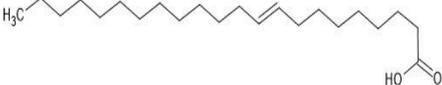
Valores de Referência: Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes - AOCs

Para prevenir a degradação e a oxidação lipídica dos óleos comestíveis, a indústria alimentícia faz uso de aditivos antioxidantes que tem como função bloquear ou retardar a ação de radicais livres (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2017). Os antioxidantes mais utilizados são de natureza sintética, como o BHA, BHT, PG e TBHQ. Dentre esses, o que apresenta maior eficácia em óleos vegetais é o TBHQ, mais resistente ao calor e proporciona excelente estabilidade para os produtos acabados (RAMALHO; JORGE, 2006).

Pesquisas apontam que o uso de antioxidantes sintéticos nos alimentos pode causar várias doenças (JORGE, 2009). Com exceção do Brasil, o uso de antioxidantes sintéticos é restringido em vários países, visto que existe a possibilidade de terem efeitos indesejáveis para a saúde humana e apresentarem potencial carcinogênico (LUZIA; JORGE, 2009).

A estrutura química dos principais ácidos graxos insaturados presentes no óleo de soja é mostrada na Tabela 2.

**Tabela 2** - Estrutura molecular dos principais ácidos graxos insaturados presentes no óleo de soja

Ácidos Graxos	Valores de referência (%)	Estrutura	Fórmula molecular
Ácido Palmitoleico	≤ 0,2	C16:1	
Ácido Oleico (Ômega 9)	17,7 – 28,5	C18:1	
Ácido Linoleico (Ômega 6)	49,8 – 57,1	C18:2	
Ácido Linolênico (Ômega 3)	5,5 – 9,5	C18:3	
Ácido Eicosenoico	≤ 0,3	C20:1	
Ácido Eicosadienoico	≤ 0,1	C20:2	
Ácido Erúcico	≤ 0,3	C22:1	

Fonte: TEIXEIRA (2006)

### 1.3 Ozônio

O ozônio ( $O_3$ ) é um gás instável, formado naturalmente a partir da luz (UV,  $\lambda \sim 260\text{nm}$ ) na estratosfera ou artificialmente por descargas elétricas. Possui estrutura cíclica constituída por uma molécula triatômica do átomo de oxigênio (O). Na temperatura ambiente, é um gás azul de odor característico pungente que pode ser facilmente notado em concentrações acima de 2 ppm (STÜBINGER; SABER; FILIPPI, 2006).

O ozônio é umas das moléculas oxidantes mais intensas na natureza ( $E_0 = 2,07\text{ V}$ ) (SILVA *et al.*, 2011), que em relação à água ( $E_0 = 1,23\text{ V}$ ) (RICE, 1982) e por ser uma molécula instável se decompõe facilmente em oxigênio por uma reação exotérmica (GROOTVELT *et al.*, 2004). Tem maior poder oxidante e uma ação mais seletiva sobre os componentes orgânicos, é muito mais instável, é 1,6 mais denso e 10 vezes mais solúvel na água, apresentando meia vida de 40 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . Não pode ser armazenado em temperatura ambiente e deve ser utilizado rapidamente (ESCARPANTER BULIÉS *et al.*, 1997; BOCCI, 2004a).

De acordo com a pressão e a temperatura, o ozônio pode se transformar imediatamente em moléculas de átomos de oxigênio, o dióxigênio ( $O_2$ ), e em oxidantes potentes. Em condições normais, a concentração do ozônio no ar atmosférico é em torno de 0,1 ppm, e em condições de muita poluição (dias quentes em cidades industriais), pode exceder 0,8 ppm, pois os átomos de oxigênio liberados pelo dióxido de nitrogênio em reação com a luz solar atacam as moléculas de oxigênio e formam o ozônio (ASSALIN, DURÁN, 2007; CETESB, 2020a; ENERGY AND AIR POLLUTION, 2020).

O ozônio é facilmente solúvel em água, e dado seu alto poder de oxidação e suas propriedades esterilizantes e desinfetantes em um determinado momento deixa de ter desempenho ativo devido à sua alta volatilidade (MARTINELLI *et al.*, 2017).

## 1.4 Ozonólise

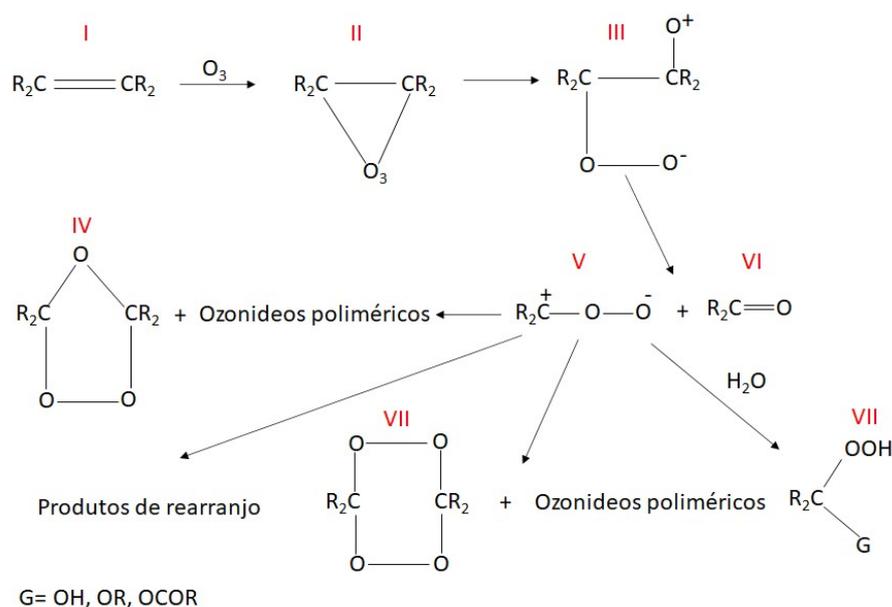
Os óleos comestíveis ozonizados apresentaram, *in vitro*, efeito bactericida, atividade germicida, ativação da microcirculação pontual, melhora do metabolismo celular de oxigênio, promovendo ainda estímulo de crescimento do tecido de granulação e revitalização do tecido epitelial (SCHWARTZ *et al.*, 2011). São promissores no tratamento futuro de diversas doenças, no entanto ainda serão necessários estudos *in vivo*. A aplicação de soluções ozonizadas, sobretudo a água e os óleos comestíveis, constitui uma técnica que pode auxiliar em diversos processos químicos, terapêuticos e industriais.

Um exemplo é a ozonioterapia, que consiste na administração terapêutica do ozônio. Pode ser realizada por diversas vias e tem sido muito utilizada em tratamentos de diversas enfermidades, (VALACCHI *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2017; ANZOLIN, BERTOL, 2018; ABOZ, 2019).

Um dos métodos de oxidação mais aplicados em óleos vegetais é a ozonólise, processo pelo qual o ozônio (O<sub>3</sub>) reage com alquenos para clivar a dupla ligação e formar dois grupos carbonila. A reação de ozonização de compostos insaturados já é conhecida desde o século XIX, mas, mal compreendida pelos cientistas da época. Em 1903 foi feita, por Molinari, a primeira ozonólise de um composto graxo e a análise dos produtos da clivagem. Em 1898, o uso de ozonetos de ácidos graxos insaturados como desinfetante foi patenteado por Weyl (KADESHI, 1963).

O mecanismo de adição de ozônio a alquenos mais aceito é o proposto por Criegee (1975), mostrado na Figura 2. O ozônio combinado à ligação (C=C) (I) gera inicialmente um ozonídeo instável (II), e posteriormente obtém-se o produto de reação (III) que, por sua vez, decompõe-se em outros dois elementos: um composto carbonílico (VI) e o óxido de carbonila (V).

Sem a introdução química de um solvente no procedimento, (V) e (VI) recombina-se para gerar, principalmente, 1,2,4 trioxolanos (IV) e ozonídeos poliméricos. Quando a ionização é realizada em meio aquoso, hidroperóxidos de hidroalquila (VII) podem ser gerados com a eliminação de moléculas de água (UEBELE, 2020).



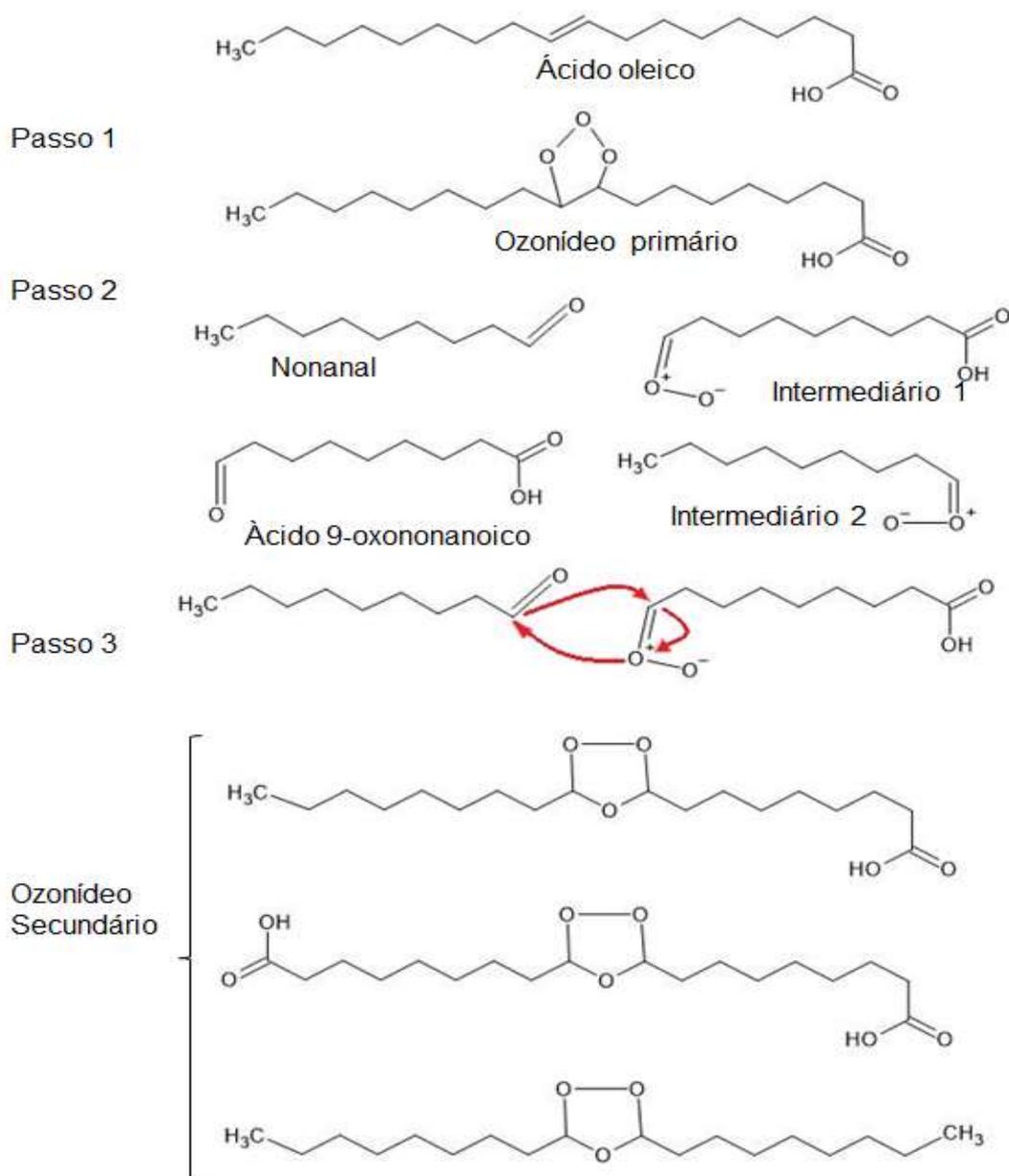
**Figura 2** - Mecanismo de reação de ozonólise em alquenos proposto por Criegee (OLIVEIRA, WOSCH, 2012)

As ligações duplas de carbono (C=C) dos ácidos graxos insaturados reagem com o ozônio. Elas têm a ligação sigma ( $\sigma$ ), que é forte e acontece em orbitais atômicos que interagem frontalmente, e as ligações pi ( $\pi$ ), que é menos intensa e ocorre entre orbitais atômicos paralelos. Por possuírem elétrons disponíveis para formar uma nova ligação com outro composto, as ligações duplas são clivadas facilmente com a ação dos três átomos de oxigênio do ozônio, a molécula deficiente em elétrons.

Desse modo, em um primeiro estágio as ligações ( $\pi$ ) são rompidas para a formação de ligações simples (C–C). Dentro do processo natural da reação existe a possibilidade da reconstrução dessa ligação dupla. No entanto, com a aplicação contínua de ozônio no óleo, o processo de reação de oxidação entre os carbonos existentes (C–C) continua até a formação de aldeídos ou cetonas (RAMANATHAN, *et al.*, 2002; OLIVEIRA e WOSCH, 2012).

Com base na demonstração dos mecanismos de reação propostos por Criegee, (SUN *et al.*, 2012), os principais componentes podem ser formados com a ozonólise do ácido oleico sem solventes, conforme demonstrado na Figura 3. O diagrama é uma

versão simplificada que mostra os intermediários importantes e produtos esperados para a ozonólise de ácido oleico. A reação inicial ocorre quando uma molécula de ozônio ataca a ligação dupla e o ozonídeo primário se forma. Esse ozonídeo primário de alta energia pode se decompor prontamente.



**Figura 3** - Reação de ozonólise do ácido oleico

A ozonização de ácidos graxos insaturados é um processo que pode ser controlado pela temperatura de reação: diferentes temperaturas influenciam nas propriedades físicas e químicas. Essas propriedades são muito valiosas na indústria, por causa dos efeitos da oxidação durante o armazenamento e o transporte. No campo da síntese orgânica, as propriedades físicas e químicas podem ser utilizadas como indicadores para a conclusão da reação e a formação de novos produtos.

Diversas pesquisas são relatadas na literatura para verificar o processo de reação de ozonização em óleos vegetais, como a pesquisa de Wasmi *et al.* (2015) que mostrou que o processo de ozonização resultou na clivagem de ligação dupla de carbono, indicada pelo monitoramento de algumas propriedades químicas e físicas. Observou-se, também, que esse processo foi influenciado pelo aumento da temperatura da reação de ozonização, enquanto as ligações duplas de oleína de palma foram totalmente clivadas à temperatura de ozonização de 150 °C (WASMI *et al.*, 2015).

A atuação do ozônio em diferentes processos de oxidação tem sido verificada em diversas vertentes, como propôs Faglia *et al.* (1999) e Ramanathan, Park e McIntyre (2002), que estudaram os efeitos da oxidação de ozônio à temperatura ambiente, e Shin *et al.* (1999), que demonstraram o uso do ozônio em sistemas de tratamento de água e esgoto.

Esses autores mostraram maneira de suplantiar a limitação de transferência de massa por meio do aumento da área interfacial disponível, diminuindo o tamanho das bolhas de gás ozônio que são dispersas em solução. Mostraram, também, que os melhores resultados foram alcançados com baixas taxas de fluxo de gás. As taxas de oxidação do fenol também foram comparadas para a pulverização eletrostática e o difusor de bolhas de tamanho médio dos poros, e os resultados indicam que o aumento da taxa de transferência de massa alcançado pela pulverização eletrostática melhora a taxa de remoção de fenol da solução.

Nessa mesma linha, Carvalho *et al.* (2015) revisaram a eficácia da terapia com ozônio como dependente da transferência de massa especificamente entre as fases gás-líquido. Para isso buscaram comparar a transferência de massa de ozônio-água realizada por um Venturi e um difusor de bolhas, notando que esse processo pode

promover a aplicação da ozonioterapia em sistemas biológicos, uma vez que processos turbulentos não danificam os fluidos envolvidos no processo. Embora importante, no artigo de Carvalho *et al.* (2015) não se pesquisou o tempo que o ozônio é eliminado da solução.

Assim, os óleos comestíveis assumem importante papel na síntese química de uma grande variedade de compostos que podem ser obtidos da reação com ozônio. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos nessa área, com aplicação em vários segmentos industriais.

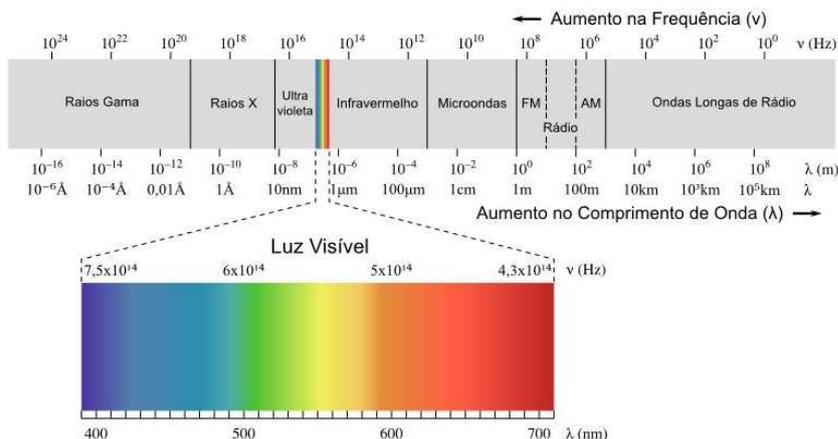
## 1.5 Espectroscopia Raman

A radiação infravermelha (IR) foi descoberta por Herschel em 1800, e por volta de 1900, Coblentz obteve espectros de absorção no infravermelho de grande número de compostos orgânicos em estado sólido, líquido e vapor. A maioria dos compostos que tenham ligações covalentes, absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Essa radiação faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que as ligam, chamado de espectroscopia de infravermelho (IV), que é o tipo de espectroscopia de absorção da região do infravermelho do espectro eletromagnético (PAVIA, *et al.*, 2010). Essa região que envolve comprimentos de onda maiores do que aqueles associados à luz visível, que vão de aproximadamente 400 a 800 nm.

A energia absorvida por uma molécula através da incidência de radiação infravermelha é convertida em energia vibracional, uma vez que não é energética o suficiente para causar transições eletrônicas. O processo é quantizado, porém o espectro vibracional aparece como uma série de bandas em vez de linhas, porque cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional.

O comprimento de onda  $\lambda$  é inversamente proporcional à frequência  $\nu$  (Figura 4) por meio da relação  $\nu = c/\lambda$ , onde  $c$  = velocidade da luz, e a energia é diretamente proporcional à frequência:  $E = h\nu$ , em que  $h$  = constante de Planck, nesta equação,

pode-se ver qualitativamente que a radiação de energia mais alta corresponde à região de raios-X do espectro, onde a energia pode ser grande o suficiente para quebrar as ligações das moléculas. Na outra ponta do espectro (RMN) ou ressonância de *spin* eletrônico (ESR) respectivamente.



**Figura 4** – Espectro eletromagnético da região ultravioleta e visível IR

O fenômeno de espalhamento de luz foi postulado pela primeira vez por Compton (1923), que observou um deslocamento no comprimento de onda de raios-X ao interagir com elétrons. Esse espalhamento inelástico de fótons de raios-X ficou conhecido como efeito Compton. Em 1928, Raman considerou a possibilidade da existência de um fenômeno similar, ou seja, um espalhamento inelástico de radiação também para a região visível do espectro.

No espalhamento inelástico de luz a radiação eletromagnética interage com a matéria através de seu campo elétrico, induzindo a molécula para um estado de energia virtual. Nesse estado, uma fração muito pequena da radiação é transmitida em todos os ângulos do caminho original e a intensidade dessa radiação espalhada aumenta com o tamanho da partícula, que pode ter sua energia dispersa em dois modos: a molécula pode retornar ao estado vibracional original ou pode retornar a outro estado de diferente energia.

No primeiro caso, tem-se o espalhamento elástico de luz, ou espalhamento Rayleigh (KRAPAS e SANTOS, 2002), enquanto que no segundo caso tem-se o espalhamento inelástico, ou espalhamento Raman (RAMAN e KRISHNAN, 1928).

O espalhamento Raman é mais facilmente visto como a mudança na frequência de uma pequena porcentagem da intensidade em um feixe monocromático, como resultado do acoplamento entre a radiação incidente e os níveis de energia vibracional das moléculas. Um modo vibracional será Raman ativo apenas quando alterar a polarizabilidade da molécula.

Algumas técnicas de espectroscopia são utilizadas para verificação dos compostos formados após a ozonólise, incluindo espectroscopia de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e a ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, técnicas de separação de componentes podem ser empregadas, como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) e cromatografia de alta eficiência (HPLC) (GUILLÉN; GOICOECHEA, 2008).

A técnica analítica utilizada nesse experimento foi espectroscopia Raman, projetada para detectar a dispersão da luz em uma amostra. Cada espalhamento de luz gera uma banda no espectro Raman no comprimento de onda relativo a essa mudança.

## **1.6 Análise de componentes principais (PCA)**

*Principal Component Analysis* (PCA) ou análise de componentes principais (ACP) é uma das técnicas mais utilizadas na redução de dimensionalidade, sendo caracterizado por identificar as dimensões ao longo das quais os dados se encontram mais dispersos. Desta forma, conseguimos identificar as dimensões que melhor diferenciam o conjunto de dados em análise, ou seja, os seus componentes principais.

A PCA foi inventada em 1901 por Karl Pearson, porém o tratamento formal do método é devido ao trabalho de Hotteling, na década de 30. E é mais usado comumente como uma ferramenta de análise exploratória de dados e para fazer modelos preditivos. Através desta técnica, é possível realçar as semelhanças e as diferenças neles existentes através da identificação de padrões. A sua identificação em dados caracterizados por grandes dimensões é difícil, uma vez que a sua representação gráfica não é viável, logo uma análise visual aos dados não é possível. Quando identificados os padrões no conjunto, o número de dimensões a analisar pode

ser reduzido sem que haja uma perda significativa de informação, pois o foco recai sobre a análise das dimensões principais que caracterizam o conjunto de dados.

A PCA encontra-se certamente entre as mais importantes ferramentas da análise multivariada, inclusive por constituir a base onde se fundamentam a maioria dos outros métodos multivariados de análise de dados. Como uma ferramenta de análise exploratória a PCA permite revelar a existência ou não de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras. Além disto, métodos eficientes de classificação, como a modelagem independente para analogia de classes (SIMCA) e de calibração, como a regressão em componentes principais (PCR) ou a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), são derivados da PCA. Exemplos: amostras anômalas, quimiometria, componentes fármacos e formulas químicas.

Com a análise da componente principal é possível a averiguação não paramétrica com resposta única e independentemente de qualquer hipótese quanto à distribuição de probabilidade dos dados. Define-se matematicamente como uma transformação linear ortogonal que transforma os dados em um novo sistema de coordenadas, de modo que as maiores variações de qualquer projeção dos dados estejam na primeira coordenada, chamada primeiro componente principal, PC1; a segunda maior variância na segunda coordenada, chamada segundo componente principal, PC2, e assim por diante (JOLLIFFE, 2002).

Para se conhecer as propriedades fundamentais do óleo de soja é importante observar os processos de armazenamento, resfriamento e aquecimento em variadas temperaturas e até mesmo sua submissão a um processo de ozonização para avaliar a posição das duplas ligações. Além disso, é necessária a verificação das alterações da composição química; a degradação dos ácidos graxos saturados e insaturados presentes; e a ozonização dos óleos vegetais, que pode dar importantes informações nesse processo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

O objetivo do presente estudo foi analisar as alterações moleculares em amostras de óleo de soja, in natura, manipuladas em laboratório para o ganho da massa de ozônio (O<sub>3</sub>), a fim de demonstrar o grau de degradação dos ácidos graxos e outros compostos, utilizando a espectroscopia Raman no infravermelho próximo, considerando o resfriamento e o aquecimento nas temperaturas de 10, 30 e 60 °C e instantes de medidas 0, 10, 20 e 40 minutos.

### **2.2 Específico**

Relacionar os dados coletados e processá-los seguindo a técnica PCA, identificando as diferenças nos picos da espectroscopia Raman.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

A espectroscopia Raman foi aplicada para detectar o espalhamento da luz e os dados obtidos foram planilhados gerando dados médios, desvios padrões e gráficos, entre outros, para a obtenção das informações necessárias à comprovação do experimento.

O pré-processamento dos dados utilizado foi o método PCA, realizado por meio do *software* Matlab 2017.

#### **3.1 Amostras**

O primeiro experimento comparativo, realizado em temperatura ambiente, utilizou 500 mL de água ultrapura produzida pelo Sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), submetida ao processo de transferência de massa a partir de um difusor de bolhas e excitado por um agitador magnético no reservatório para homogeneizar a distribuição do gás no meio líquido.

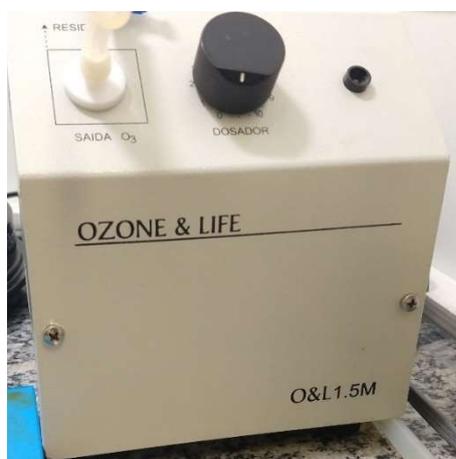
O segundo experimento foi realizado com dois grupos de amostras de óleo de soja adquiridas em supermercado local, denominados Grupo 1 e Grupo 2. As amostras do Grupo 1 são compostas por amostras in natura, sem ozônio, e as amostras do Grupo 2 são compostas pelas mesmas amostras do Grupo 1 mais ozônio, porém submetidas ao processo de transferência de massa a partir de um Venturi feito de PVDF, com diâmetro interno de 1/4", que foram ozonizadas.

#### **3.2 Processamento das amostras**

##### **3.2.1 Geração de ozônio**

O ozônio ( $O_3$ ) foi gerado a partir da matéria prima oxigênio ( $O_2$ ) fornecido por um cilindro com volume de  $1m^3$ , conectado a uma válvula de dois estágios, onde no primeiro há um abaixamento da pressão de  $\sim 15,51$  MPa para  $0,34$  MPa, e no segundo

estágio um mecanismo que permite a regulação da vazão para 0,125 L/Min., daí há uma conexão para a entrada do gerador de ozônio (Ozone & Life, modelo O & L 1.5M, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 5). De acordo com o fabricante na saída há a mistura de  $O_2+O_3$  a uma concentração de ozônio valendo 62 mg/L. Como o gás ozônio é caracterizado como tóxico principalmente para o trato respiratório humano, realizou-se o procedimento de ozonização do óleo utilizando material EPI (Equipamento de Proteção Individual), usando máscara com filtro de carvão ativado e óculos de proteção.



**Figura 5** - Gerador de ozônio (Ozone & Life - modelo O & L 1.5M)

### **3.2.2 Processo de ozonização da água**

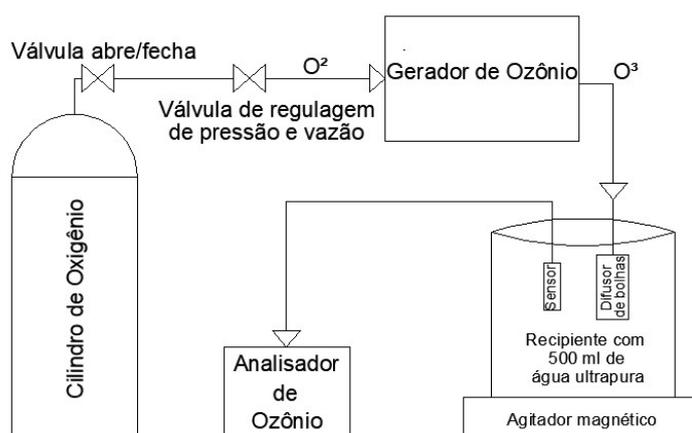
Durante todo o processo de ozonização da água foi utilizado um analisador de ozônio (modelo Anseros Ozone Water Analyzer TIZ, Dischingerweg Tübingen, Alemanha) (Figura 6) para medir a concentração de ozônio residual e a temperatura, que permaneceu em torno de 25 °C durante todo o experimento. O princípio físico de medição do sensor desse aparelho é baseado no método de amperometria potencioestática autolimpante com reativação intermitente dos dois eletrodos de ouro, com faixa de medição de 0,01 a 4,00 mg/L de ozônio em água.



**Figura 6** – Medidor analítico (Anseros Ozone Water Analyzer TZ)

O processo de ozonização da água foi executado por 12 minutos para a transferência de massa de ozônio para a água ultrapura. A saída do gerador de ozônio foi conectada diretamente à entrada do difusor de bolhas de aço inoxidável com tamanho de poro de 0,5 microns, mergulhado em um reservatório com capacidade de 2 L, preenchido com 500 mL de água ultrapura e um agitador magnético no reservatório para garantir uma distribuição homogênea do gás no líquido (Figura 7).

Imediatamente após esse processo foi medido o tempo de escape da água através do analisador de ozônio, assim foi possível determinar que o tempo de retenção do ozônio dentro de água foi de 245 minutos, e que toda a massa de ozônio se extinguiu completamente.



**Figura 7** - Processo de ozonização da água com difusor de bolhas e excitador magnético

### 3.2.3 Processo de ozonização da amostra de óleo de soja

A reação de ozonização foi executada por 2 h para a transferência de massa de ozônio para o óleo de soja. A saída do gerador de ozônio foi conectada a uma das entradas de gás do Venturi. Na outra entrada foi injetado o óleo de soja por meio de uma bomba elétrica de 12 V na saída do Venturi (Figura 8), com o resultado da mistura turbulenta de ar líquido dentro dele, acoplada a um recipiente com capacidade de 1 L, contendo 500 mL de óleo de soja (Figura 9). Após o processo de ozonização as amostras foram armazenadas por aproximadamente 15 h em um freezer com temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Figura 8 – Dispositivo Venturi

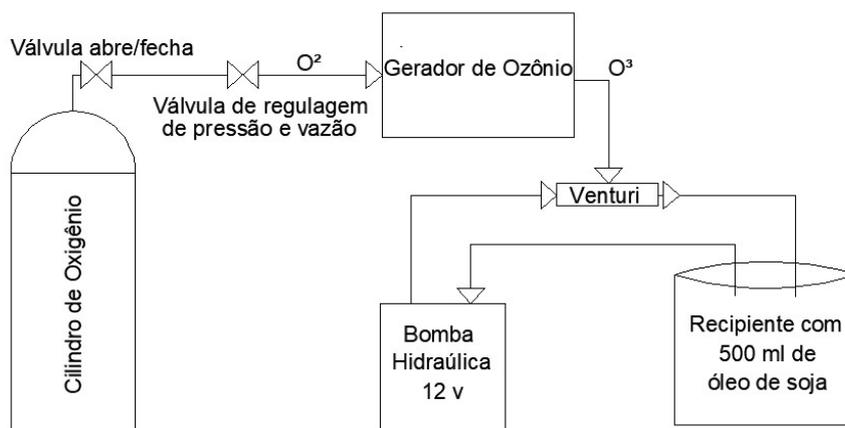


Figura 9 - Processo de ozonização do óleo de soja com dispositivo Venturi

### 3.2.4 Processo de resfriamento e aquecimento das amostras

Para o resfriamento e aquecimento das amostras do óleo de soja utilizou-se uma pastilha termoelétrica Peltier (modelo TEC1-12706, São Paulo, SP, Brasil), que funciona com tensão variável de 0 a 15,2 V e com pico máximo de potência em 6 A, gerando uma potência total de operação de 72 W. A temperatura de operação pode ser ajustada entre -30 °C a + 70 °C.

Foram acoplados a essa pastilha de Peltier (Figura 10) dois dissipadores de calor em alumínio com um orifício para a inserção das amostras analisadas em cada dissipador e para o correto controle e aferição da temperatura das amostras analisadas, realizados com a utilização de um termômetro digital (modelo MT-510, Minipa) alimentado com bateria de 9 V, e com uma ponteira termopar (modelo MTK-01). A faixa de medição de temperatura é de -50 °C a 200 °C com precisão  $\pm 0,75\%$  da leitura ou  $\pm 2,2$  °C.



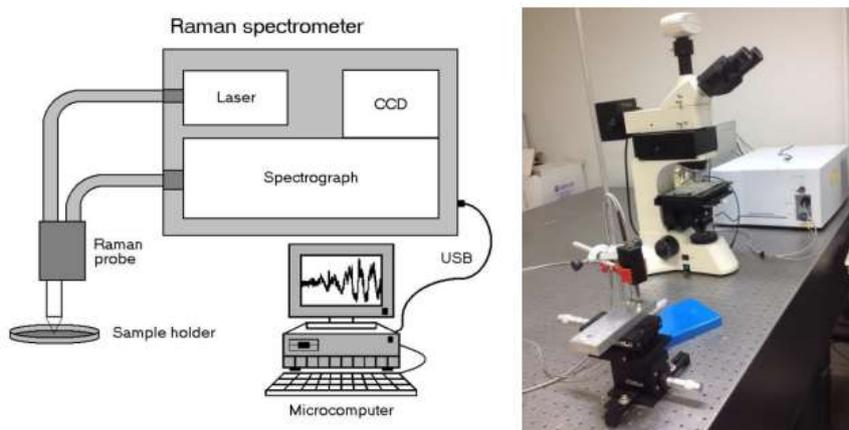
**Figura 10** – Dispositivo de aquecimento e resfriamento, pastilha Peltier e dissipador de calor

### 3.3 Espectroscopia das amostras

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, em torno de 25 °C, em um laboratório sem a presença de luz. Para a obtenção dos espectros, foi utilizado um espectrômetro Raman dispersivo de bancada (modelo Dimension P-1,

Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA), com o laser acoplado a uma sonda Raman baseada em fibra ótica, (modelo Vector Probe, Lambda Solutions Inc., Waltham, MA, EUA), utilizando um laser de diodo (830 nm) com potência de 250 mW; um espectrógrafo de imagem; e uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CCD) de alta sensibilidade (Figura 11).

O sistema foi controlado por um software de computador (RamanSoftHR830). O espectrômetro possibilita o esboço de imagens utilizando um espectrógrafo para imagens e um detector multicanal.



**Figura 11** – Diagrama de blocos e imagem do sistema do espectrofotômetro Raman

Fonte: PASSONE (2017)

Foi utilizada uma pipeta para a transferência do volume de 0,5 mL de amostras do Grupo 1, que foram colocadas no orifício de alumínio do dissipador de calor da pastilha Peltier e posteriormente o termopar teve sua ponteira mergulhada diretamente no óleo. A distância entre a sonda Raman emissora da luz infravermelha e a superfície da amostra de óleo foi de 10 mm para todos os experimentos. O dissipador de calor foi movimentado apenas no sentido horizontal para a coleta de dados em um novo ponto da amostra.

Para as amostras do Grupo 2, com ozônio, foi adotado o mesmo procedimento aplicado nas amostras do Grupo 1, porém entre as variações de temperatura as amostras foram substituídas para garantir que o processo de aquecimento não acelerasse a ação de decomposição do ozônio.

De acordo com as temperaturas e tempos pré-determinados, conforme mostrado na Tabela 3, as amostras foram submetidas, imediatamente e uma a uma, à espectroscopia Raman, com o tempo de exposição de 3 s para a aquisição do sinal Raman, coletado em 10 acumulações de 3 s cada.

O tempo de aquisição do espectro Raman não pode ser muito longo, pois as amostras geralmente sofrem alguma alteração quando atingidas por potências elevadas de laser por um longo período de exposição: as bandas vibracionais dificilmente podem ser identificadas e a análise quantitativa se torna inviável.

**Tabela 3** - Determinação das temperaturas e tempos que as amostras de óleo de soja sem e com ozônio foram submetidas

Identificação da amostra	Temperatura (°C)	Tempos (minutos)
Amostra 1	10	0, 10, 20 e 40
Amostra 2	30	0, 10, 20 e 40
Amostra 3	60	0, 10, 20 e 40

### 3.4 Análise dos espectros

Para a obtenção de números compreensíveis entre as principais bandas de deslocamento Raman de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  que puderam ilustrar os gráficos, procedeu-se da seguinte forma: os dados gerados pelo software “*Raman Soft HR 830*” sofreram um processo de calibração espectral e pré-processamento com subtração do fundo de fluorescência, utilizando uma rotina desenvolvida no Matlab 2017, e através do software Microsoft Excel 2016 realizou-se a remoção manual de picos de raios cósmicos remanescentes e foi possível obter os gráficos sem fluorescência.

A análise de componentes principais (PCA) é um processo que elimina em série cada variação, independentemente dos espectros de calibração. Os dados são apontados em menores dimensões calculadas por combinações lineares, tais como: componentes principais (PC) e escores (SC) e, em particular, a partir dos valores do espalhamento Raman para cada comprimento de onda.

Houve a necessidade de reutilização do software Matlab 2017 para calcular os componentes e os escores das amostras analisadas, com o intuito de localizar as

diferenças espectrais entre as amostras de óleos em função da ozonólise, gerando informações entre os grupos dadas as diferenças na composição química dos óleos analisados.

Os cinco primeiros PC's e os cinco primeiros SC's foram responsáveis pela maior variabilidade total dos dados originais e foram avaliados possibilitando a determinação de quantos componentes principais e escores se têm nos espectros, bem como a sua influência na variância espectral do conjunto de dados.

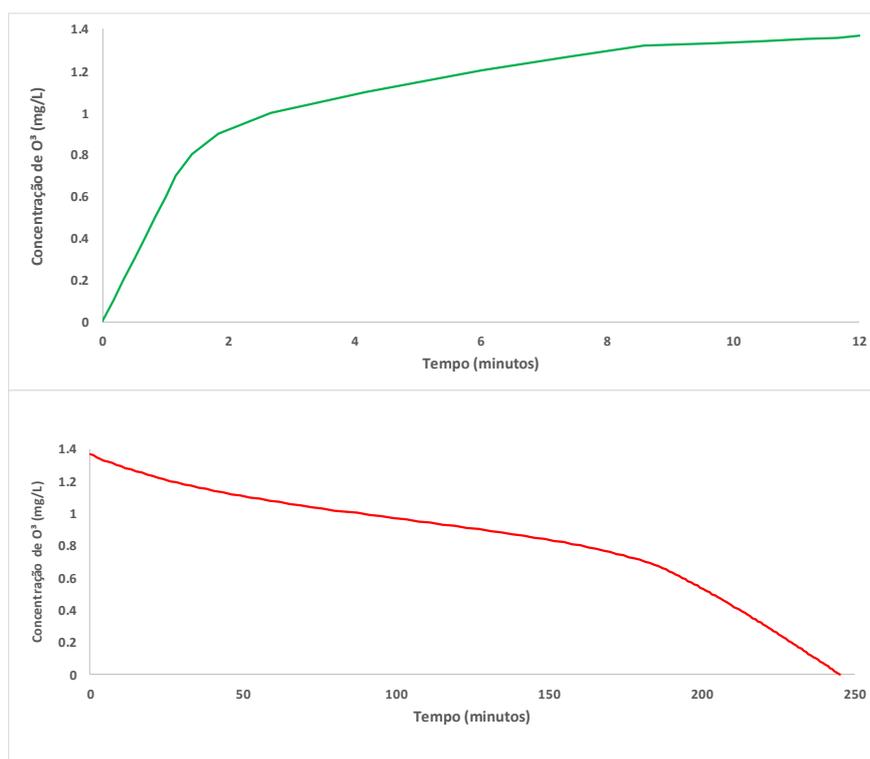
No experimento foram analisadas 120 amostras de óleo de soja. Em cada grupo de cinco amostras foi aplicado um tempo de 0, 10, 20, 40 minutos e temperatura de 10, 30 e 60 °C, totalizando 60 amostras do Grupo 1 e 60 amostras do Grupo 2.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da transferência de massa de ozônio em água pura

O método de transferência de massa de ozônio é um processo complexo devido à natureza altamente reativa do ozônio e sua solubilidade na água. Durante 12 minutos a água sofreu o processo do ganho de massa de ozônio por meio de um difusor de bolhas, atingindo o valor de 1,37 mg/L de concentração de ozônio na água.

Após 245 minutos toda a massa adquirida de ozônio se extinguiu, conforme pode ser observado pela Figura 12, comprovando a volatilidade do ozônio, dadas as suas propriedades físicas e químicas e a sua interação com o meio.

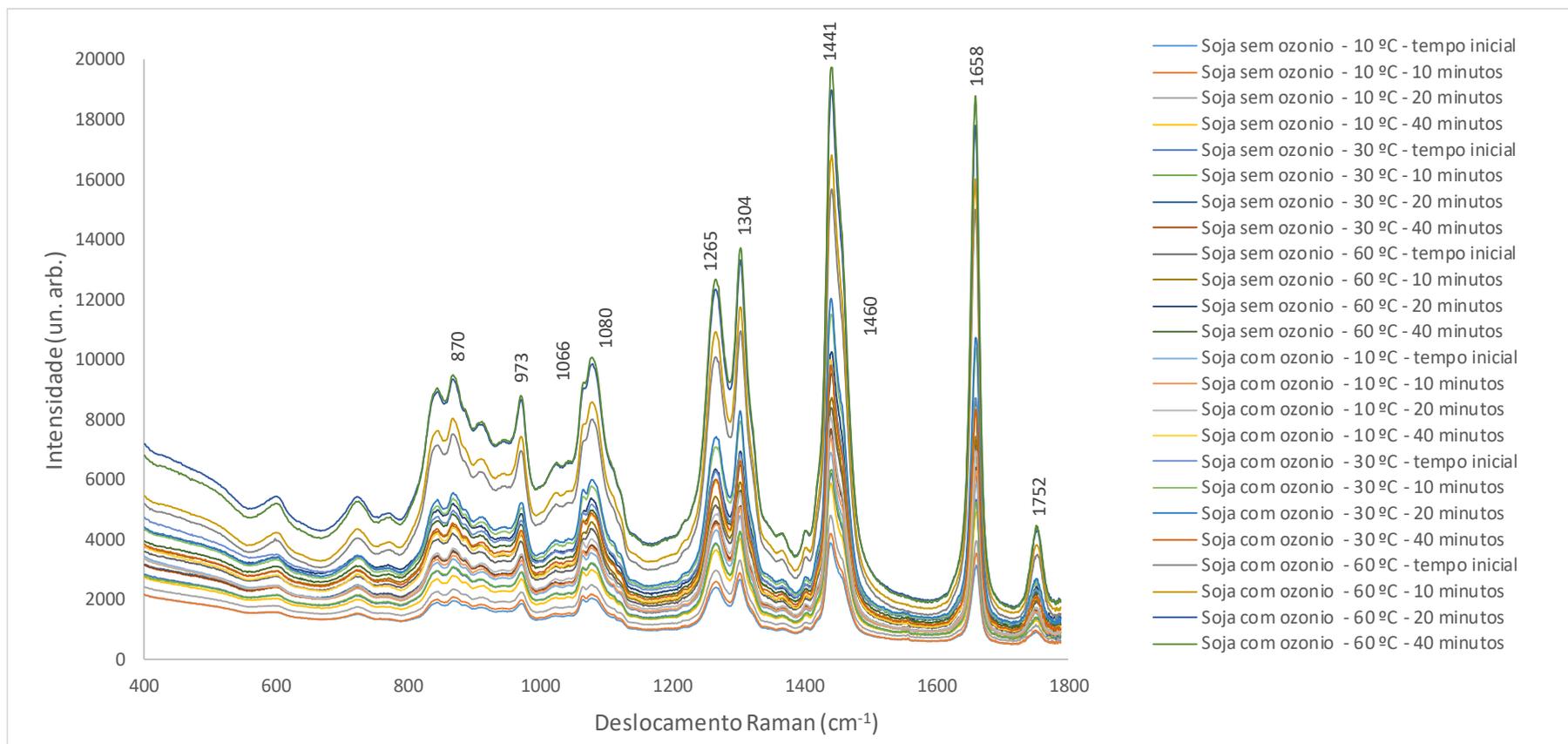


**Figura 12** - Processo de ganho e perda de massa de ozônio na água na temperatura ambiente

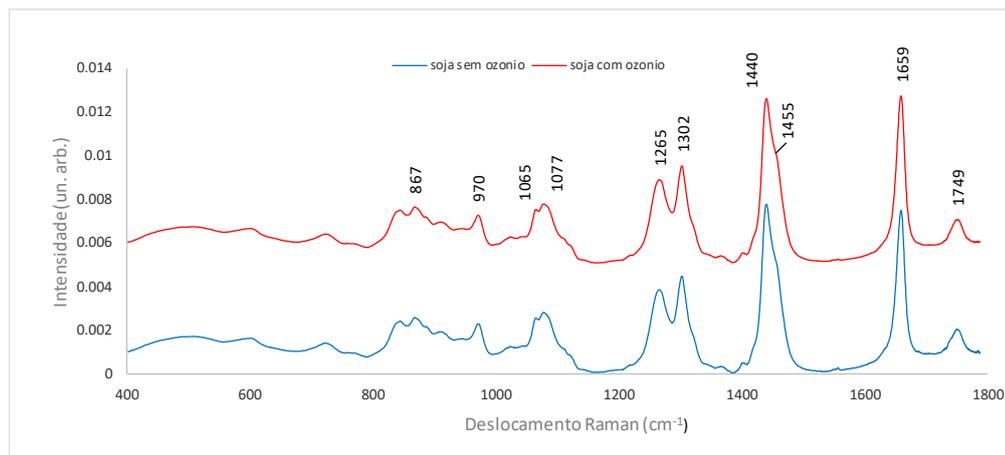
## **4.2 Espectros Raman das amostras de óleos de soja sem e com ozônio**

Para a realização deste estudo foi necessária uma revisão bibliográfica sobre o processo de ozonização de materiais e compostos e a compreensão dos resultados da espectroscopia Raman obtidos nas 120 amostras analisadas sem a retirada do fundo de fluorescência, conforme ilustrado na Figura 13. As principais bandas observadas no experimento foram com picos em 870, 973, 1066, 1080, 1265, 1304, 1441, 1460, 1658 e 1752  $\text{cm}^{-1}$ .

Para a obtenção de números compreensíveis foi realizado um processo de calibração espectral e reprocessamento com subtração do fundo de fluorescência das principais bandas de deslocamento Raman de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ , incluindo ainda a remoção manual de picos de raios cósmicos remanescentes, assim foi possível obter os gráficos sem fluorescência, denominados espectros Raman normalizados do óleo de soja sem e com ozônio (Figura 14).



**Figura 13** - Espectros Raman médios sem a retirada do fundo de fluorescência das amostras de soja sem e com ozônio nas temperaturas de 10, 30 e 60 °C e nos tempos iniciais 10, 20 e 40 minutos



**Figura 14** - Espectros médios normalizados de soja sem e com ozônio

Os principais picos Raman do óleo referem-se às vibrações moleculares de seus componentes químicos. As principais bandas que aparecem no óleo de soja são atribuídas às vibrações de carbono, incluindo as deformações angulares e axiais e os estiramentos e dobras no plano e fora do plano.

Os dez principais picos considerados mais relevantes para a análise da oxidação de óleos comestíveis estão compreendidos nas seguintes regiões: de 400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  (867, 1065 e 1077  $\text{cm}^{-1}$ ) são picos característicos de vibração (C-C) que representam os picos de vibração da estrutura da cadeia de metileno ( $\text{CH}_2$ ). Já o pico 970  $\text{cm}^{-1}$  está diretamente relacionado com a vibração de flexão de curvatura trans do isômero ( $=\text{CH}$ ).

Na região de 1200 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  a banda de 1265  $\text{cm}^{-1}$  representa as vibrações e deformações dos grupos cis ( $=\text{CH}$ ) do ácido graxo insaturado. Na região de 1300  $\text{cm}^{-1}$ , a banda 1302  $\text{cm}^{-1}$  demonstra a vibração por torção do metileno ( $\text{CH}_2$ ) ou alongamento alifático do ácido graxo saturado. Na região de 1400 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , o pico 1440  $\text{cm}^{-1}$  representa a vibração e deformação simétrica em tesoura de metileno ( $\text{CH}_2$ ) do ácido graxo saturado, e o pico 1455  $\text{cm}^{-1}$  representa a vibração e deformação do metil ( $\text{CH}_3$ ), ambos do ácido graxo saturado.

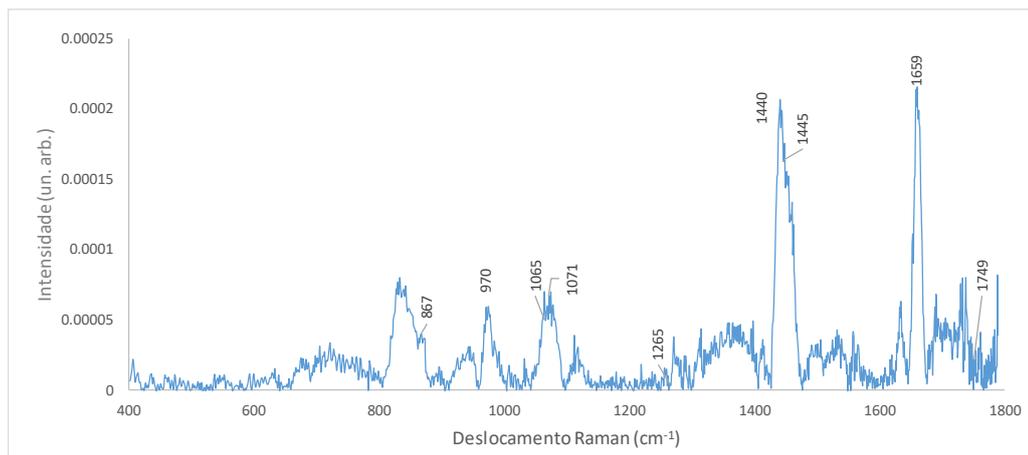
Na região de 1600 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  a banda de pico 1659  $\text{cm}^{-1}$  representa as vibrações e deformações do grupo cis ( $\text{C}=\text{C}$ ) do ácido graxo insaturado, e o pico 1750  $\text{cm}^{-1}$  representa a vibração de alongamento da ligação dupla do éster carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ). A Tabela 4 representa faixas de bandas mais comuns nos espectros Raman em óleos vegetais comestíveis (HOUTAN *et al.*, 1990; MUIK *et al.*, 2005; SAMYN *et al.*, 2012).

**Tabela 4** - Atribuições dos espectros Raman de óleos vegetais

<b>Posição da banda em <math>\text{cm}^{-1}</math></b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Modo de vibração molecular</b>	<b>Característica Óleo</b>
1265	=C-H	Isômero simétrico (=C-H) cis em balanço	Ácido graxo insaturado
1302	>CH <sub>2</sub>	Torção (em todas as fases do -CH <sub>2</sub> )	Ácido graxo saturado e insaturado
1440	>CH <sub>2</sub>	Deformação simétrica (em tesoura do -CH <sub>2</sub> )	Ácido graxo saturado e insaturado
1659	C=C	Alongamento da ligação dupla cis (C=C)	Ácido graxo insaturado
1750	C=O	Alongamento da ligação dupla (C=O)	Ácido graxo saturado e insaturado

Os espectros médios Raman obtidos das amostras de óleos de soja com e sem ozônio na região espectral de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  apresentam uma série de bandas com diversas intensidades e larguras com um excelente sinal/ruído. Tais bandas correspondem a diferentes modos vibracionais de vários grupos moleculares de ácidos graxos (GREMLICH, 1998).

As diferenças entre os espectros médios de óleos sem ozônio e com ozônio (Figura 15), sugerem que o processo de oxidação em relação ao ozônio que está sendo liberado do óleo de soja ozonizado ocasiona a inversão de polaridade dos picos e alterações estruturais nas moléculas do óleo de soja, exceto no pico na banda 1659  $\text{cm}^{-1}$ , que indica o resultado da clivagem da ligação dupla do carbono (C=C).



**Figura 15** – Diferença entre os espectros médios normalizados de soja sem e com ozônio

### 4.3 Análise das amostras por componentes principais e escores médios

Com o método PCA é possível comprovar a existência de padrões de comportamento em cada um dos grupos e a análise discriminante permite classificar as amostras em grupos, de acordo com suas semelhanças espectrais, para a obtenção dos valores dos SC's (Figura 16), dos PC's (Figura 17) e dos desvios padrões das amostras de óleos de soja e seus comparativos das variações de temperatura e de tempo. Os componentes principais possuem os picos Raman nas posições referentes às diferenças na composição química de cada amostra de óleo de soja e os escores representam as intensidades de cada PC ao reconstituir o espectro original.

Com a utilização da técnica PCA, PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5, foi possível identificar e analisar as diferenças espectrais encontradas entre o óleo de soja sem e com ozônio, que apresentaram diferença estatisticamente significativa para discriminação dos ácidos graxos saturados e insaturados.

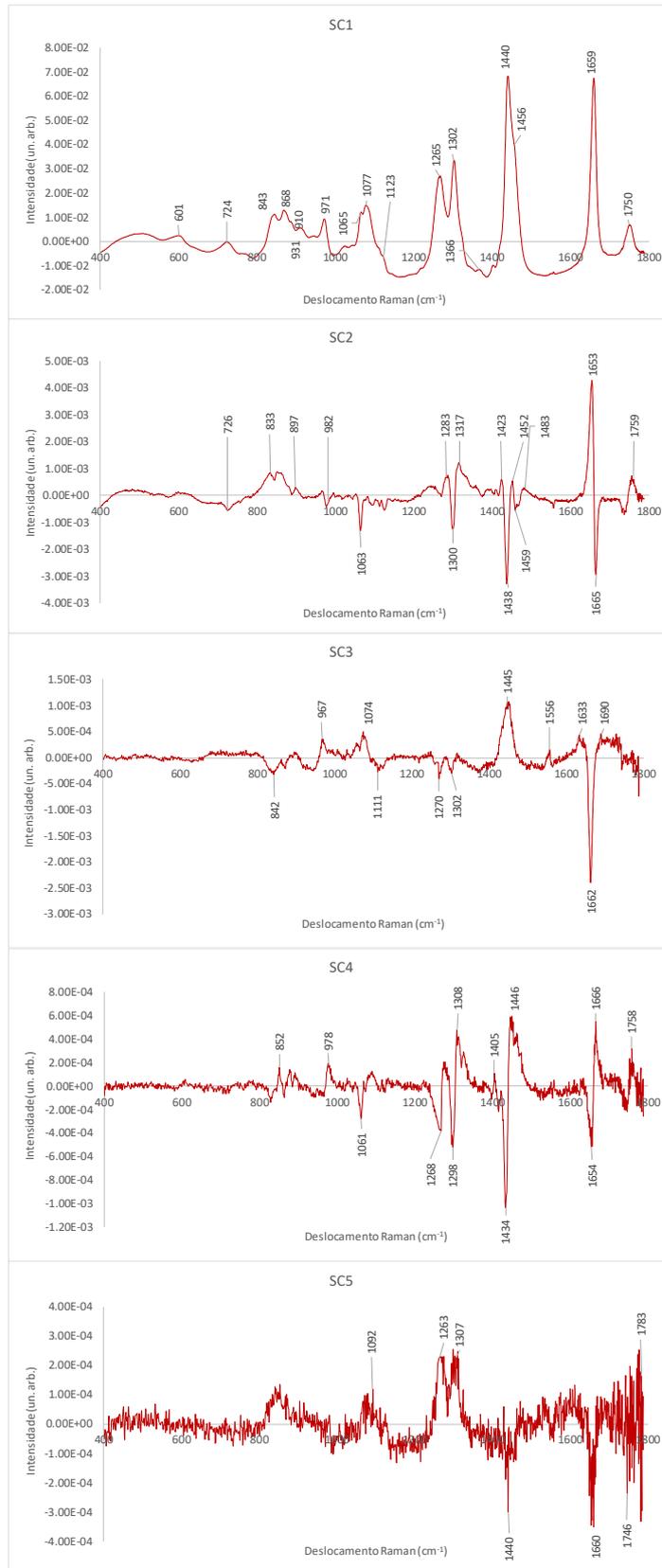
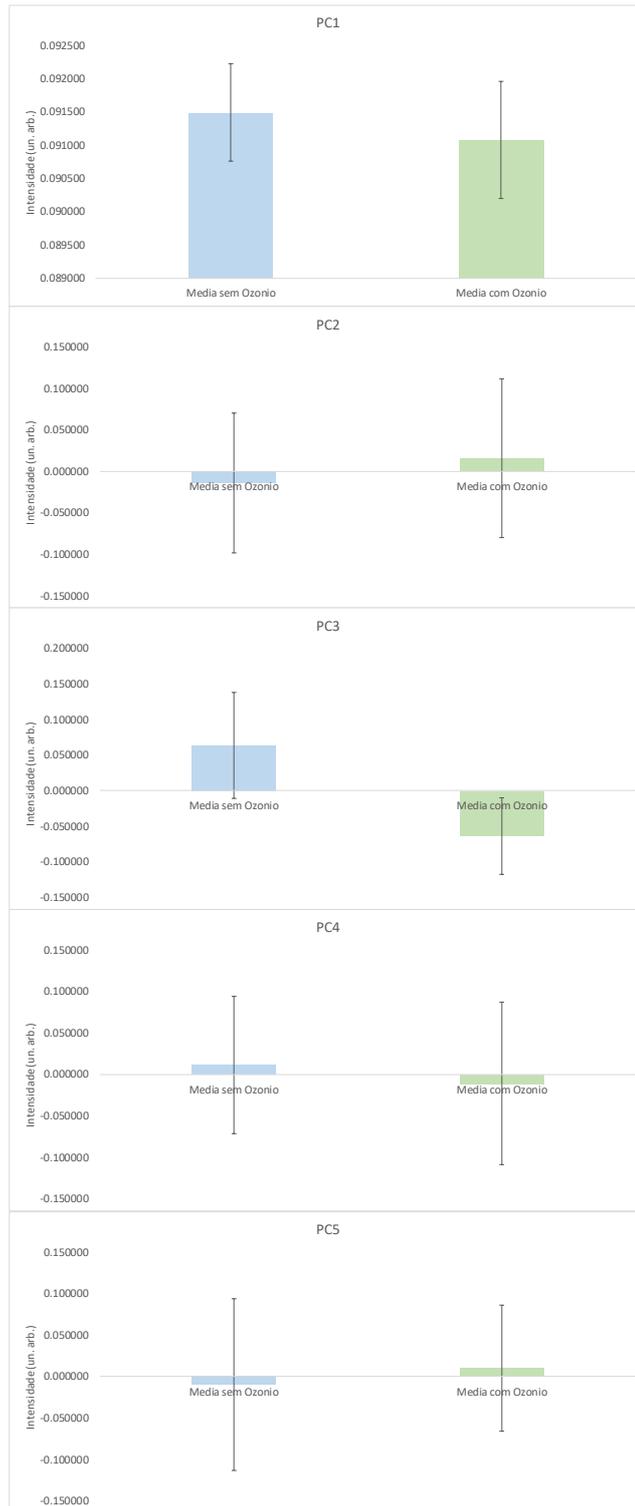


Figura 16 - Vetores dos componentes principais SC1, SC2, SC3, SC4 e SC5



**Figura 17** - Média e desvio padrão dos componentes principais PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5

De acordo com as médias e os escores analisados, os componentes principais PC1 e suas respectivas características estão localizados nas seguintes bandas: 868,

971 e 1077  $\text{cm}^{-1}$ , considerados como a identificação principal do óleo analisado. A característica composta pelos ácidos graxos saturados localiza-se nas bandas 1302, 1440 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  e a característica composta pelos ácidos graxos insaturados se encontram nas bandas 1265 e 1659  $\text{cm}^{-1}$ , conforme a Tabela 4.

Os componentes principais PC2, obtidos em decorrência do processo de oxidação observado no experimento, são predominantes nas seguintes bandas: 1300, 1438 e 1665  $\text{cm}^{-1}$ . Foi observada uma considerável redução nos valores da banda em relação ao PC1. Na banda 1300  $\text{cm}^{-1}$  houve uma diminuição na associação do pico em relação ao comparativo do óleo com ozônio. Tal fato sugere uma perda de flexão da torção em fase do metileno ( $\text{CH}_2$ ) (MUIK *et al.*, 2005). Na banda 1438  $\text{cm}^{-1}$  também foi observada uma diminuição na associação do pico em relação ao comparativo do óleo com ozônio, que pode ser definida como uma deformação simétrica (em tesoura do  $-\text{CH}_2$ ), (HOUTAN *et al.*, 1990; MUIK *et al.*, 2005; SAMYN *et al.*, 2012).

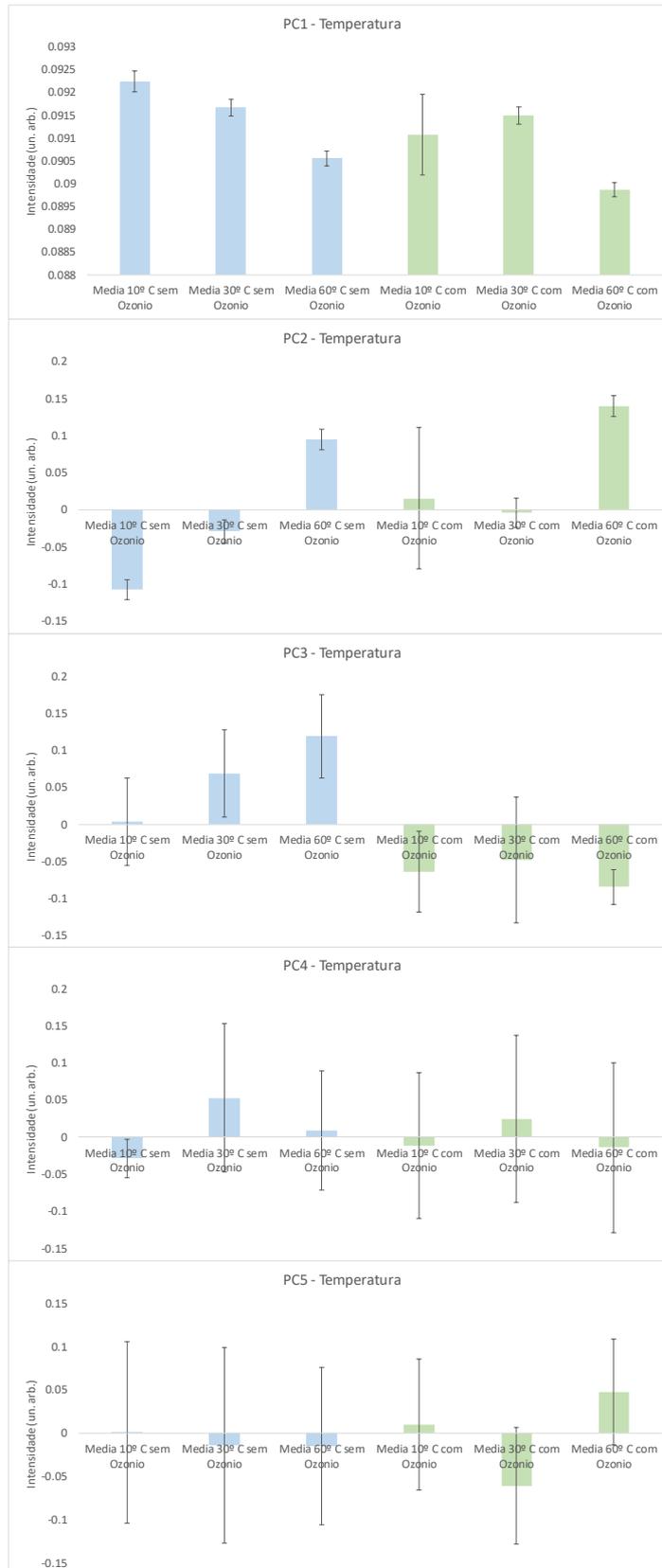
Nos componentes principais PC3, obtidos em decorrência do processo de oxidação observado no experimento, os picos que mais predominaram foram os das seguintes bandas: 967, 1074, 1445 e 1662  $\text{cm}^{-1}$ . Observou-se um pequeno acréscimo nos valores de banda em relação ao PC2. Na banda 1445  $\text{cm}^{-1}$ , foi identificado um aumento na associação do pico em relação ao comparativo do óleo com ozônio, o que pode ter acarretado um ganho na alteração da deformação simétrica (em tesoura do  $-\text{CH}_2$ ) (HOUTAN *et al.*, 1990; MUIK *et al.*, 2005; SAMYN *et al.*, 2012).

Os componentes principais PC4, obtidos em decorrência do processo de oxidação observado no experimento, predominaram nas seguintes bandas: 1061, 1268, 1298, 1434 e 1654  $\text{cm}^{-1}$ . Observou-se um decréscimo nos valores da banda em relação ao PC3. Na banda 1268  $\text{cm}^{-1}$  foi identificada uma diminuição na associação do pico em relação ao comparativo do óleo com ozônio, que pode ser definida como a deformação da cadeia conjugada cis e com conseqüente perda da associação da clivagem da ligação dupla do carbono ( $=\text{CH}$ ) (BAILEY e HORVAT, 1972). Nas bandas 1298 e 1434  $\text{cm}^{-1}$  ocorreu a mesma alteração observada em PC2, havendo uma diminuição na associação do pico em relação ao comparativo do óleo de soja com ozônio. Sugeriu-se, para o primeiro, uma diminuição na associação do pico, uma perda de flexão da torção em fase do metileno ( $\text{CH}_2$ ) (MUIK *et al.*, 2005), e para o segundo a deformação simétrica (em tesoura do  $-\text{CH}_2$ ).

Os componentes principais PC5, obtidos em decorrência do processo de oxidação observado no experimento, os picos que mais predominaram foram nas seguintes bandas: 1440, 1660 e 1746  $\text{cm}^{-1}$ . Observou-se um decréscimo nos valores de banda em relação ao PC4. Na banda 1440  $\text{cm}^{-1}$  ocorreu a mesma alteração que foi notada em PC2. Houve uma diminuição na associação do pico em relação ao comparativo do óleo de soja com ozônio, definida como a perda de flexão simétrica, (em tesoura do  $-\text{CH}_2$ ). Na banda 1660  $\text{cm}^{-1}$  também foi identificada uma diminuição na associação do pico em relação ao comparativo do óleo de soja com ozônio, podendo ser definida como uma perda do alongamento da vibração das moléculas olefínicas diretamente relacionadas à quantidade de isômeros insaturados na associação simétrica da ligação dupla ( $\text{C}=\text{C}$ ) (SAMYN *et al.*, 2012; MUIK *et al.*, 2005; HOUTAN, *et al.*, 1990). Na banda 1758  $\text{cm}^{-1}$ , considerada um dos ácidos graxos saturados das amostras, identificou-se que houve um aumento na sua intensidade que pode ser definido como o espalhamento na ligação do estiramento éster carbonílico ( $\text{C}=\text{O}$ ) (MUIK *et al.*, 2003; GALLIER *et al.*, 2011).

#### **4.4 Análise das amostras em relação à temperatura e ao tempo**

Com a utilização da técnica PCA, os PC's foram agrupados em função da temperatura e do tempo (Figuras 18 e 19) para identificar as diferenças espectrais encontradas entre o óleo de soja sem e com ozônio. Ambos apresentaram pequenas diferenças estatisticamente significativas para a descrição dos compostos químicos das amostras.



**Figura 18** - Características das médias espectrais dos PC's em relação à temperatura

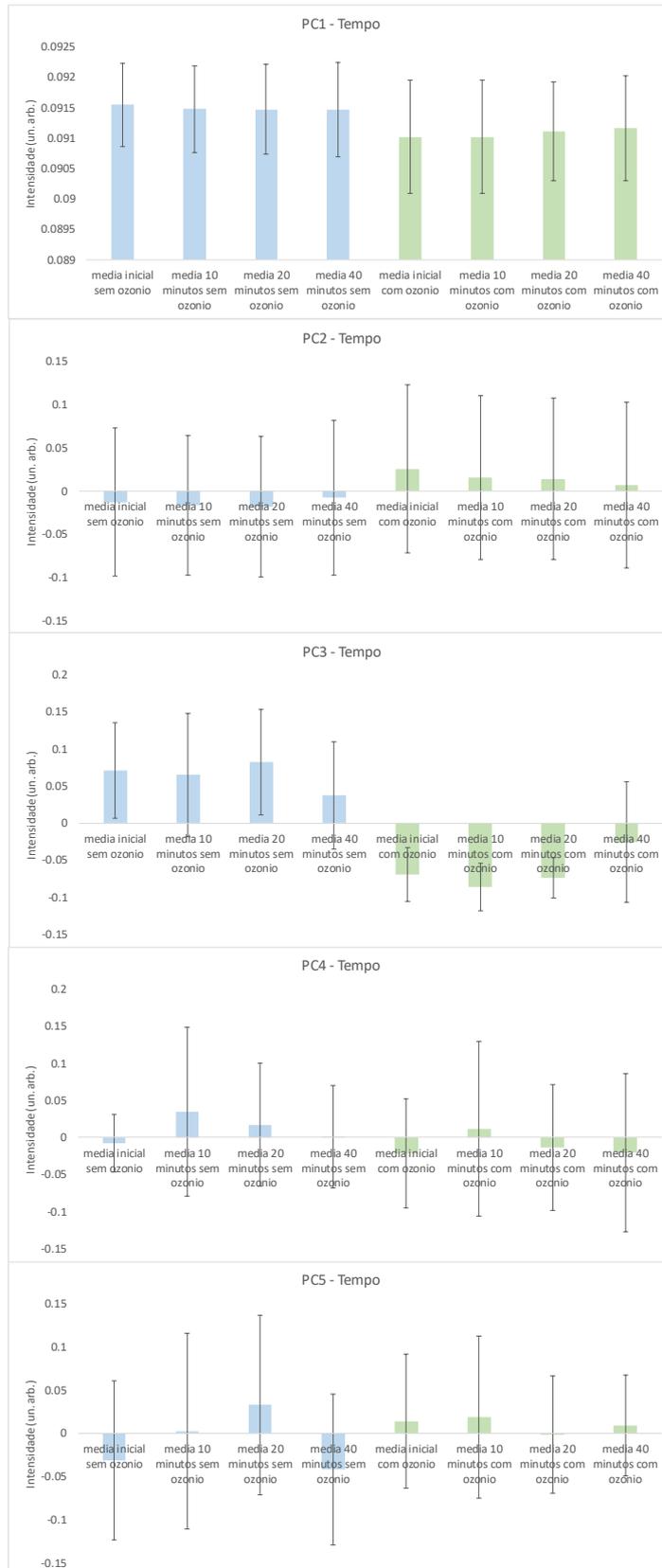


Figura 19 - Características das médias espectrais dos PC's em relação ao tempo

As amostras de óleo de soja sem e com ozônio, quando aquecidas por um período de tempo apresentam várias proporções de ácidos graxos saturados e insaturados, monoinsaturados e poli-insaturados e outros componentes, o que afeta a intensidade e o deslocamento Raman das bandas características nos espectros.

Os dados obtidos entre as médias espectrais de temperatura, conforme a Figura 16, sugerem que todos os componentes principais PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5 se comportaram de forma semelhante, ou seja, com o aumento da temperatura as amostras de óleo de soja com e sem ozônio sofreram degradação em sua estrutura molecular e, conseqüentemente, perda nas associações simétricas das ligações duplas de carbono (C=C), deformações simétricas em tesoura do metileno e na vibração de deformação do (CH) no metileno (CH<sub>2</sub>).

Conforme ocorreu com as médias espectrais da temperatura, os dados obtidos entre as médias espectrais de tempo expostas na Figura 17 também sugerem que todos os componentes principais (PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5) se comportaram de forma semelhante.

Com o aumento do tempo de exposição em uma temperatura pré-determinada, as amostras de óleo de soja sem e com ozônio apresentaram degradação nos componentes principais durante o experimento, e com o decorrer do tempo associado ao aumento da temperatura foi observada a ampliação do grau de oxidação nas amostras ozonizadas devido à sua ação oxidativa.

Conforme proposto por Criegee, a banda 1659 cm<sup>-1</sup> sofreu uma clivagem nas ligações (C=C) gerando novos elementos, tais como: ozonídeos, aldeídos e ácidos carboxílicos. A determinação desses produtos pode ser utilizada como parâmetro da ocorrência da reação química.

A região espectrométrica do Raman utilizada neste trabalho, que abrange a faixa de 400 a 1800 cm<sup>-1</sup>, permitiu verificar a presença desses compostos, no entanto, essa região pode ser chamada "*fingerprint*", ou de impressão digital. Entre esses comprimentos de onda podem-se encontrar picos de quase todos os compostos orgânicos que têm oxigênio na molécula.

Nesses casos é comum utilizar dois picos para comprovar a presença de um composto. Com relação aos ozonídeos, com picos das regiões de 820 e 900 cm<sup>-1</sup>, encontram-se picos de epóxidos e hidroperóxidos, e próximo a 900 cm<sup>-1</sup> insaturações

(C–C). Nos aldeídos no pico da região de  $1750\text{ cm}^{-1}$  é encontrada a carbonila do aldeído, juntamente com pico (COOH) do ácido carboxílico e dos ésteres. Os ácidos carboxílicos geram picos em vários comprimentos de onda: nas regiões entre  $920$  a  $970\text{ cm}^{-1}$  e de  $1400$  a  $1460\text{ cm}^{-1}$ , ambas com sobreposição de picos de duplas ligações.

Com base nessas informações nota-se que não é possível avaliar com precisão a presença dos produtos da reação de ozonólise na região espectral analisada, em função das possíveis sobreposições de picos dos compostos presentes na própria amostra.

Foi constatado, ainda, que a redução da intensidade dos picos em  $1302$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  está diretamente relacionada à oxidação do hidrocarboneto adicional na cadeia das moléculas de triglicerídeos. Durante o processo de oxidação das amostras de óleo, as alterações mais características na estrutura lipídica são a perda das ligações duplas, devido à ação da liberação de um radical de oxigênio do ozônio que pode ser observado na banda de  $1269\text{ cm}^{-1}$ .

A banda  $1659\text{ cm}^{-1}$  se destaca por desaparecer a partir do escore SC2 (Figura 15). Isso ocorre por causa da clivagem das ligações duplas de carbono da cadeia lipídica, gerando o aumento da cadeia de ( $\text{CO}_2$ ) e, segundo o mecanismo de Criegee, a redução dos compostos ( $-\text{HC}=\text{CH}-$ ) e a geração dos subprodutos aldeídos e cetonas.

Os resultados das bandas observadas no experimento sujeito à oxidação pelo processo de ozonização foram coerentes com os dados dos estudos realizados anteriormente na espectroscopia Raman, em bandas bem definidas em óleos comestíveis (BEATTIE, *et al.*, 2004; MAHESAR, *et al.*, 2014).

Como o óleo de soja tem uma densidade menor que a água (CETESB, 2020b), no primeiro experimento de ganho de massa de ozônio foi possível comprovar a eficácia de ozonização do óleo de soja em comparação à ozonização da água. Em relação ao comparativo das amostras de óleo ozonizada é possível assegurar que durante todo o experimento a massa se manteve estável, não atingindo seu limite temporal para o início da perda dessa massa.

Os detectores Raman têm se desenvolvido muito rapidamente especialmente no tamanho, o que pode tornar a aquisição da medição do espectro mais rápida e

eficiente para oleaginosos e aquosos, porém o mesmo não se pode dizer em relação aos analisadores de ozônio, que dada a sua tecnologia de captura ainda se demonstram possíveis apenas para aquisição e medição em meios gasoso e líquido, porém não oleosos.

#### **4.5 Resultados em Saúde**

O ozônio realiza a potencialização dos componentes químicos dos óleos comestíveis em geral, o que no futuro poderá ser facilmente difundido e utilizado em prol de tratamentos diversos de saúde (SCHWARTZ *et al.*; SILVA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2017).

O óleo ozonizado tem um papel significativo no combate de diversos problemas de saúde, contribuindo para aliviar sintomas com mais agilidade, age diretamente nas áreas afetadas e otimiza os tratamentos.

No Brasil, as recomendações de uso são apenas para o uso na pele, o óleo ozonizado pode garantir uma série de benefícios, devido sua modulação do estresse oxidativo; melhora no transporte de oxigênio no sangue e efeitos cicatrizantes e antimicrobianos, é comum em países regulamentados seu uso por via oral visando combater problemas como giárdia e infecções intestinais.

Com a aplicação do óleo ozonizado muitas condições podem ser tratadas, tendo em vista suas propriedades antissépticas que combatem infecções e melhora cortes, feridas e úlceras. Possui propriedades anti-inflamatórias e um potencial de oxigenar a pele, alivia queimaduras solares e inflamações quase imediatamente, pode acelerar a regeneração dos tecidos e favorecer a cicatrização, o que reduz dores e inflamações comuns em Osteoartrose. O óleo ozonizado também auxilia no combate a dores em geral, musculares e de ouvido, e ainda diminui a incidência de espasmos e câimbras. Alguns efeitos agregados do óleo contribuem muito para o combate da acne, desintoxicação da pele; melhoria da circulação; redução de infecções; eliminação de bactérias; redução da incidência de manchas. No caso de eczemas e dermatites, a ação do óleo diminui significativamente a incidência de manchas e até de processos inflamatórios. O óleo ozonizado tem ação antifúngica, os fungos de unha

podem ser removidos com mais facilidade e eficiente no tratamento caspa ou seborreia.

## **4.6 Resultados em Tecnologia**

O processo de geração de ozônio é um pouco oneroso e o ozônio não pode ser armazenado por longo período de tempo. Nos meios sólidos, líquidos, gasosos ou em gel, se não for aquoso não é totalmente possível a medição do nível de concentração ou o ganho de massa na transferência de ozônio.

Novas tecnologias tendem a ser implementadas para que componentes de diversos materiais possam realizar a medição principalmente em óleos. Pesquisas diversas se fazem imprescindíveis, com novos estudos no campo da ozonólise, incluindo a comprovação das diversas alterações que incidem no procedimento químico gerado pela reação em cadeia no decorrer do processo de oxidação, identificando ainda os compostos gerados por essas alterações químicas.

Deve-se ressaltar que o ozônio não fica armazenado no óleo, uma vez que ele apresenta uma característica de instabilidade de sua molécula, neste sentido, o que ocorre é que quando há a degenerescência do ozônio, seu radical (íon) reage com as moléculas que constituem o óleo gerando também compostos ozonídeos, que também apresentam características oxidantes, assim na verdade o que se verifica no óleo ozonizado são os índices de peróxidos e acidez, para isso há técnicas químicas de titulação que permitem realizar a medida de quantificação destes compostos oxidantes no óleo. Sugiro remodelar o termo óleo com ozônio para óleo ozonizado.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados da submissão das amostras de óleo de soja a temperaturas de 10 a 60 °C, com variação de tempo de 0 a 40 minutos, e a análise de suas estruturas moleculares apontam que depois da clivagem das duplas ligações, ozonídeos, aldeídos e ácidos carboxílicos podem ser formados após a reação de ozonólise e visualizados pela técnica Raman nos escores SC1, SC4 e SC5 (Figura 16).

Os resultados de identificação das amostras foram obtidos com a técnica estatística da PCA, e por meio dos resultados foi possível identificar as mudanças nos óleos, pois as alterações de intensidade indicam a alteração da composição química.

Após à ozonização as amostras sofrem um processo prematuro de oxidação, ocasionando inicialmente alterações químicas, dentre elas a clivagem das ligações duplas de carbono em reação com ozônio que está se separando do óleo de soja, fazendo que esse óleo tenha sua estrutura molecular modificada. Tal processo diante do aumento da temperatura e do tempo de exposição tem seu ciclo reiniciado, mesmo após o resfriamento das amostras.

Este estudo serve como material auxiliar para ser empregado em outros trabalhos acadêmicos e até mesmo em pesquisas, sendo relevante o aprofundamento da análise da oxidação pelo ozônio no óleo de soja, diante da necessidade da modernização de novos equipamentos de medição, tendo em vista o mercado promissor de óleos comestíveis ozonizados.

## REFERÊNCIAS

- ABOZ – **Associação Brasileira de Ozonioterapia, 2020.** Disponível em: <https://www.aboz.org.br/>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.
- ANZOLIN, A. P.; BERTOL, C. D. **Ozonioterapia como terapêutica integrativa no tratamento da osteoartrose: uma revisão sistemática.** BrJP, São Paulo, 2018, v.1, n.2, pp.171-175. ISSN 2595-3192. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180033>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.
- ASSALIN, M.R.; DURÁN, N. Novas tendências para aplicação de ozônio no tratamento de resíduos: ozonização catalítica. **Revista Analytica**, n. 26, pp. 76-86, 2006.
- BAILEY, G.F.; HORVAT, R.J. Raman spectroscopic analysis of the cis/trans isomer composition of edible vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 49 pp. 494–498, 1972.
- BEATTIE, J. R.; BELL S. E.; MOSS B. W.; A critical evaluation of Raman spectroscopy for the analysis of lipids: fatty acid methyl esters. **Lipids**. 2004, v. 39, n. 5 pp. 407-419. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1245-z>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.
- BOCCI V.; How ozone acts and how it exerts therapeutics effects. In: Lynch E. **Ozone: The revolution in dentistry.** Reino Unido: Quintessence Publishing Books; 2004. Cap 1.1, pp.15-20.
- BRACKMAN, B.; KNAUT; J.; WALLSCHEID, P.; **Oleochemicals**, Henkel KGA, Dusseldorf-Alemanha, 1984.
- ESCARPANTER BULIÉS, J. C. et al.; Resultados terapêuticos en la osteoartritis de la rodilla con infiltraciones de ozono. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, Habana, v. 16, n. 2, pp. 124-132, 1997.
- CAMPESTRE – **Campestre Ind. E Com. De Óleos Vegetais Ltda**, Disponível em: <http://www.campestre.com.br/oleos-vegetais/oleo-de-soja/>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.
- CARVALHO, H.; et al.; Effectiveness of ozone-liquid mass transfer aiming ozone therapy. **World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering**, June 7-12, 2015, Toronto, Canada. Springer. pp.1283-1285, 2015.
- CELLA, R. C. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F.; Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Food Science and Technology**, v. 22, n. 2, pp. 111-116, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612002000200002>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

CETESB – **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Padrões de Qualidade do Ar.** Disponível em: <http://ar.cetesb.sp.gov.br/padroes-de-qualidade-do-ar>. Acesso em: 25 de outubro de 2020a.

CETESB – **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Ficha de Informação de Produto Químico – Óleo de soja.** Disponível em: [https://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha\\_completa1.asp?consulta=%C3%93LEO%20DE%20SOJA](https://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=%C3%93LEO%20DE%20SOJA). Acesso em: 25 de outubro de 2020b.

COMPTON, A. H.; A quantum theory of the scattering of X-rays by light elements. **Physical Review**, Second Series v. 25, n. 5, pp. 483–502, 1923. Disponível em: <https://doi.org/10.1103/PhysRev.21.483>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento, Observatório agrícola – Acompanhamento da safra brasileira de grãos, V.7, Safra 2019/2020 – N4 – Quarto levantamento- Janeiro/2020** – Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/monitoramento-agricola>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

CRIEGEE, R.; Mechanism of ozonolysis, **Angewandte Chemie International Edition**, English. v. 14, n. 11, pp. 745-748, 1975.

IEA – Energy and air pollution 2020 - **World Energy Outlook Special Report.** Disponível em <https://www.iea.org/topics/world-energy-outlook>. Acesso em: 10 de setembro de 2020.

FAGLIA, G.; et al.; Electrical and structural properties of RGTO-In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sensors for ozone detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 57, n. 1-3, pp. 188-191, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00079-9). Acesso em: 25 de outubro de 2020.

GALLIER, S.; et al.; Composition of Bovine Milk Fat Globules by Confocal Raman Microscopy. **International Dairy Journal**, v.21, n.6, pp. 402-412, 2011.

GREMLICH, H.-U.; The use of optical spectroscopy in combinatorial chemistry. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 61, n. 3, pp 179-187, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1998\)61:3<179::AID-CC5>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1998)61:3<179::AID-CC5>3.0.CO;2-0). Acesso em: 25 de outubro de 2020.

GROOTVELT, M.; et al.; History of clinical applications of ozone. In: Lynch E. **Ozone: The revolution in dentistry.** Reino Unido: Quintessence Publishing Books; 2004. Cap 1.2, pp.23-30.

GUILLÉN, M. D.; GOICOECHEA, E.; Detection of primary and secondary oxidation products by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) in sunflower oil during storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 26, pp. 10729-10736, 2007.

JOLLIFFE, I.T.; **Principal Component Analysis, Second Edition.** Nova York: 2002. Springer, pp. 373-405.

JORGE, N.; **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009. pp. 165.

HOUTAN, S. –J.; et al.; Determination of the total unsaturation in oils and margarines by Fourier transform Raman spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 67, n. 8. pp.483-486, 1990.

KADESCH, R. G.; Ozonolysis of fatty acids and their derivatives. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**. v. 6, pp. 291-312, 1963. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(63\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0079-6832(63)90026-0). Acesso em: 25 de outubro de 2020.

KRAPAS, S.; SANTOS, P. A. M. **Modelagem do espalhamento Rayleigh da luz com propósitos de ensino e aprendizagem**. Caderno Brasileiro de Ensino de Física: 2002. v. 19, n. 3, pp. 341-350.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N.; Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**: 2009. v. 32, n. 4, pp. 946-949.

MAHESAR, S. A.; et al.; Analytical approaches for the assessment of free fatty acids in oils and fats. **Analytical Methods**, v. 6, pp. 4956-4963, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C4AY00344F>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

MARTINELLI, M.; et al.; Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. **Journal of Ozone Therapy and Hygiene**. v. 3, n. 4: pp.1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7203/jo3t.3.4.2019.15426>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

MENDONÇA, M. A.; et al.; Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo de fritura em unidades de produção de refeição no Distrito Federal. **Comunicação em ciências da saúde**, v. 19, n. 2, pp. 115-122, 2008.

MOREIRA, L.; et al.; Effect of Ozone as Acaricide: Action of the ozone on the Cuticle and Respiratory Spiracle of Tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. **Ozone: Science & Engineering**, v. 40, n. 3, pp. 183-190, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1403306>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

MUIK, B.; et al.; Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 134, n. 2, pp. 173-182, 2005.

MUIK, B.; et al.; Fourier Transform Raman Spectrometry for the Quantitative Analysis of Oil Content and Humidity in Olives, **Applied Spectroscopy**, v.57, n. 2, pp. 233-237, 2003.

NASCIMENTO, T. L.; et al.; Evaluation of soybean oil and biodiesel (glycine max) from physical-chemical parameters. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 3, pp. 12685-12695, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-218>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

OLIVEIRA, A. R. M.; WOSCH, C.L.; **Ozonolysis: the search for a mechanism.** Química Nova, Curitiba, 2012, v. 35, n. 7, pp. 1482-1485. ISSN 0100-4042. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700034>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

PASSONI, D. J.; **Análise de óleos lubrificantes utilizando dados do espectro Raman.** Orientador: Marcos Tadeu Tavares Pacheco. 2017. 61 f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Mecânica) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2017.

PAVIA, D.L. et al., **Introdução à Espectroscopia**, Ed. Cengage Learning, 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N.; **Antioxidants used in oils, fats and fatty foods.** Química Nova, 2006, v. 29, n. 4, pp. 755-760. ISSN 1678-7064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S.; A new type of secondary radiation. **Nature** 1928, v. 121, n. 3048, pp. 121, 501-502, 1928. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/121501c0>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

RAMANATHAN, S.; PARK, C. -M.; MCINTYRE, P. C.; Electrical properties of thin film zirconia grown by ultraviolet ozone oxidation. **Journal of applied physics**, v. 91, n. 7, pp. 4521-4527, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.1459103>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

RICE, R. G.; NETZER, A.; Handbook of ozone technology and applications: **Ann Arbor Science. Michigan.** 1982, pp. 1-37.

SAMYN, P.; et al.; Quality and Statistical Classification of Brazilian Vegetable Oils Using Mid-Infrared and Raman Spectroscopy. **Applied spectroscopy.** v. 66, n. 5, pp. 552-565, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1366/11-06484>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

SANTOS, G. M.; et al.; Determinação do índice de acidez em óleos de soja comercializados em supermercados varejistas. **Revista Ciência e Saúde On-line.** v. 2, n. 2, 2017. Disponível em: <https://revistaeletronicafunvic.org/index.php/c14ffd10/article/view/74>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

SCHWARTZ, A.; et al.; **Guía para el uso médico del ozono - Fundamentos terapêuticos e indicaciones.** 1. ed. Madrid: Artes Gráficas, 2011.

SHIN, W. T.; et al.; Ozonation using microbubbles formed by electric fields. **Separation and purification technology**, v. 15, n. 3, pp. 271-282, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(98\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(98)00107-5). Acesso em: 25 de outubro de 2020.

SILVA, S. B.; et al.; Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 659-682, 2011.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n2p659>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

SILVA, L. F.; SILVA, M. M.; RIBEIRO, D. S.; Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de bagaço de uvas tintas. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, pp. 254-259, 2017.

SOUZA, M. O.; BACCHI, M. R. P.; ALVES, L. R. A.; Análise de fatores que influenciam o processamento de soja no Brasil. **Revista Brasileira de Economia e Agronegócio**, v. 17, n. 3, pp. 485-506, 2019.

STÜBINGER S.; SABER R.; FILIPPI A.; **The use of ozone in dentistry and maxifacial surgery: a review**. Quintessence International. v. 37, n. 5, pp. 353-361, 2006.

SUN, C.; ZHAO, Y.; CURTIS, J. M.; A study of the ozonolysis of model lipids by electrospray ionization mass spectroscopy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 26, pp.921-930, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rcm.6183>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

TEIXEIRA, S.; **Modificações catalíticas de óleos vegetais para a produção de insumos químicos**. Orientador: Ulf Schuchardt. 2006. 217 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

UEBELE, D. T. R.; **Caracterização de Óleo de Girassol Ozonizado em Diferentes Tempos Usando Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier**. Orientador: Laurita dos Santos. 2020. 90 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Brasil, São Paulo, 2020.

VALACCHI, G.; et al.; Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, pp. 107-115, 11 out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00649.x>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.

WASMI, B. A.; et al.; Chemical and Physical Properties Investigation as Indicators for the Ozonation Reaction Completion of Palm Olein. **Ozone: Science & Engineering**, v. 37, n. 6, pp. 503-508, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01919512.2015.1053013>. Acesso em: 25 de outubro de 2020.