



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA

ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO BIODIESEL: IDENTIFICAÇÃO DOS CROMÓFOROS E FLUORÓFOROS E CONTRIBUIÇÃO DESSAS MOLÉCULAS NO MONITORAMENTO DA DEGRADAÇÃO TERMO-OXIDATIVA

Keurison Figueredo Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Campo Grande – 2016

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010

79070-900 * Campo Grande (MS) *

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DO BIODIESEL:
IDENTIFICAÇÃO DOS CROMÓFOROS E FLUORÓFOROS E
CONTRIBUIÇÃO DESSAS MOLÉCULAS NO MONITORAMENTO DA
DEGRADAÇÃO TERMO-OXIDATIVA**

Keurison Figueredo Magalhães

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Doutorado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para a obtenção do título de Doutor em Química (área de concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Campo Grande – 2016

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010

79070-900 * Campo Grande (MS) *

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Química
Doutorado

Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezesseis, às oito horas e trinta minutos, no Anfiteatro da Unidade XI, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Samuel Leite de Oliveira (UFMS), Magno Aparecido Trindade Gonçalves (UFGD), Glaucia Braz Alcantara (UFMS), Giuseppe Abiola Camara da Silva (UFMS) e Gilberto Maia (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **KEURISON FIGUEREDO MAGALHÃES**, CPF 01626015147, do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Estudo espectroscópico do biodiesel: identificação dos cromóforos e fluoróforos e contribuição dessas moléculas no monitoramento da degradação termo-oxidativa.**" e orientação de Samuel Leite de Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Samuel Leite de Oliveira

Dr. Magno Aparecido Trindade Gonçalves

Dra. Glaucia Braz Alcantara

Dr. Giuseppe Abiola Camara da Silva

Dr. Gilberto Maia

ASSINATURA

Samuel Leite de Oliveira
Magno Aparecido Trindade Gonçalves
Glaucia Braz Alcantara
Giuseppe Abiola Camara da Silva
Gilberto Maia

AVALIAÇÃO

APROVADO
APROVADO
Aprovado
Aprovado
Aprovado

RESULTADO FINAL:

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

OBSERVAÇÕES: NADA A DECLARAR

Conferir com o Original
Em: 29/02/2016
Celestino Gonçalves de Oliveira
M. SUP. 0421927

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Samuel Leite de Oliveira Presidente da Banca Examinadora
Keurison Figueredo Magalhães Aluno

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho aos meus Pais Carmelindo e Zilda e toda minha família pelo apoio e presença em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

- À Deus e aos meus Pais;
- Às minhas irmãs Karen, Kariny e Ana Karolina;
- À Capes pela bolsa concedida;
- Ao Prof. Samuel Leite de Oliveira por seu apoio, confiança, amizade e orientação;
- Ao Prof. Anderson R. L. Caires por seu apoio e sugestões;
- Ao Prof. Guillermo Orellana Moraleda e sua esposa Prof^a. Mari Cruz, da Universidade Complutense de Madrid, que me receberam e orientaram durante 1 ano em seu laboratório, enriquecendo muito meu conhecimento e modo de trabalho.
- À Renata pela paciência e companheirismo durante todo meu trajeto.
- Aos meus amigos de laboratório e da vida, Juliete, Cayo, Cristiane, Gustavo, Amanda, Luiz, Adailton, Silvano, Cleidson, Agleison, Douglas, Edu, Rodrigo e Kaique pelo companheirismo de sempre.
- Aos meus amigos do GSOLFA de Madrid, Guido, Javi, Alex, Nuria, Silvia, Irene, Cristina, Javi (algas), Maxi, Victória, Francesca, Idoia, Jose, Rikka, Pramit, Lidia, Laura, Alberto, Sergio e Betina;
- Aos companheiros de doutorado Fabio, Dayana, Glaucia, Suely, Neto, Persy e Valente;
- À Prof^a. Glaucia Alcantara da UFMS pela atenção e colaboração com meu projeto;
- À Prof^a. Margarete Soares da Silva da UEMS pela colaboração com nosso grupo;
- Aos professores do programa de Pós-Graduação em Química da UFMS;
- Ao CNPq, FUNDECT e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Com o crescente consumo energético mundial, a preocupação com questões ambientais faz com que pesquisas no desenvolvimento de combustíveis alternativos se tornem cada vez mais importantes. Diante deste cenário, o biodiesel desponta como uma alternativa interessante a ser empregado em motores de ciclo diesel. Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), o biodiesel pode ser classificado como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais, e sua utilização pode reduzir a emissão de gases de efeito estufa quando comparado ao uso de diesel. Diversos parâmetros físicos e químicos estão relacionados com a qualidade do biodiesel, tais como densidade e viscosidade. Diversas técnicas baseadas em espectroscopia óptica vêm sendo utilizadas no monitoramento da qualidade do biodiesel como FT-IR e absorção UV-Vis. Neste estudo investigou-se os principais cromóforos e fluoróforos presentes no biodiesel produzido a partir de diferentes fontes oleaginosas. Com base nos espectros de absorção e fluorescência dos ésteres metílicos padrão, no conteúdo de ésteres metílicos presentes nas amostras de biodiesel e resultados de ressonância magnética nuclear, foi possível identificar que os tetraenos conjugados são os compostos responsáveis pela fluorescência na região de 400 a 500 nm em amostras de biodiesel analisadas. Resultados de fluorescência resolvida no tempo corroboraram tal afirmação, de acordo com a literatura consultada. O tratamento térmico do biodiesel de soja e canola em estufa sem fluxo de ar induzido, resultou em mudanças na intensidade e perfil espectral da absorção UV-Vis e fluorescência das amostras diluídas e não diluídas. Essas mudanças são provocadas pela formação de dienos, trienos e tetraenos conjugados, que apresentam absorção na região entre 200 e 330 nm, sendo os tetraenos conjugados os responsáveis pela fluorescência em torno de 420 nm, indicando que estes compostos podem ser utilizados como sonda no monitoramento da degradação do biodiesel nesses experimentos. Um estudo da estabilidade termo-oxidativa do biodiesel de soja em tempo real monitorado por meio de medições de fluorescência induzida por um LED de 380 nm, também foi conduzido. A metodologia adotada permitiu acompanhar de forma satisfatória a termo-oxidação de acordo com os resultados de absorção UV-Vis, cromatografia, fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo. Para tanto, tetraenos conjugados foram reconhecidos como sonda para o monitoramento da oxidação. Dessa forma, os resultados obtidos mostram que o monitoramento da fluorescência do biodiesel pode ser realizado com a configuração experimental adotada, podendo ser desenvolvido um experimento simples, barato, de forma rápida e precisa.

Palavras-chave: Biodiesel. Termo-oxidação. Tetraenos conjugados. Espectroscopia de absorção molecular. Espectroscopia de fluorescência. Fluorescência resolvida no tempo.

ABSTRACT

With the growing world energy consumption, concerns regarding to the environmental issues make researches dealing with the development of alternative fuels. In this scenario, biodiesel has emerged as an interesting alternative fuel to be employed in diesel engines. According to the ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e biocombustíveis), biodiesel is classified as a mixture of alkyl esters of fatty acids produced from vegetable oils or animal fats; its use can contribute for reducing greenhouse gas emissions. Various physical and chemical parameters are related to the quality of biodiesel, such as density and viscosity. Several techniques based on optical spectroscopy have been used in monitoring the quality of biodiesel as FT-IR and UV-Vis absorption. In this study, the main chromophores and fluorophores present in the biodiesel produced from different oil sources were investigated. Based on the absorption and fluorescence spectra, nuclear magnetic resonance, and fluorescence lifetime results, conjugated tetraenes were identified as the responsible for the fluorescence in the region from 400 to 500 nm in the biodiesel samples analyzed. Fluorescence lifetime results corroborate this claim, according to the literature. The heat treatment of soybean and canola biodiesel, in a furnace without induced airflow, resulted in changes in the intensity and spectral profile of the UV-Vis absorption and fluorescence of diluted and undiluted samples. These alterations were caused by the formation of conjugated dienes, trienes, and tetraenes in the region between 200 and 330 nm; conjugated tetraenes, responsible for the fluorescence around 420 nm, exhibited changes in the fluorescence spectra, revealing that these compounds may be used as probes for monitoring the thermal degradation of biodiesel. A study of thermal-oxidative stability of the soybean biodiesel under airflow in real time, monitored by fluorescence measurements induced by a LED emitting at 380 nm, was also carried out. This methodology allowed following satisfactorily the thermal oxidation of the biodiesel samples since the results are in accordance with those achieved from UV-Vis absorption, chromatography, steady-state fluorescence and time-resolved fluorescence. The results show that the biodiesel fluorescence may be used in the development of a simple, inexpensive, and accurate analytical approach able to assess the oxidative degradation of biodiesel.

Keywords: Biodiesel. Thermal-oxidation. Conjugated tetraenes. Molecular absorption spectroscopy. Fluorescence spectroscopy. Fluorescence lifetime.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ésteres metílicos formados presentes de biodiesel.	17
Figura 2 – Representação da reação de transesterificação via catálise básica.....	18
Figura 3 – Representação da reação de hidrólise do éster.....	18
Figura 4 – Ilustração da reação de esterificação de um ácido graxo.	18
Figura 6 - Mecanismo geral de auto-oxidação do derivado do ácido linoleico.....	20
Figura 7 - Estruturas moleculares dos principais antioxidantes sintéticos e naturais presentes em óleos e biodiesel.....	21
Figura 8 – Representação esquemática do método <i>Rancimat</i>	22
Figura 9 – Representação da curva típica de condutividade elétrica em função do tempo, para determinação do período de indução.	22
Figura 10 - Ilustração de níveis de energia envolvidos em transições eletrônicas.....	25
Figura 12 – Ilustração da transmissão de radiação pela matéria.	26
Figura 13 – Diagrama simplificado de Jablonski.	28
Figura 14 – Representação do mecanismo ao efeito de filtro interno. (a) efeito de filtro interno primário (PIFE) e (b) efeito de filtro interno secundário (SIFE).....	30
Figura 15 – Descrição esquemática de uma curva de decaimento temporal de fluorescência.	32
Figura 16 - Esquema de funcionamento de um fluorímetro de contagem de um único fóton.	33
Figura 17 – Tipos de vibrações moleculares. O sinal positivo significa a movimentação do plano da página em direção ao leitor; o sinal negativo significa a movimentação na direção oposta.....	35
Figura 18 – Separação do biodiesel de soja (fase superior) e resíduos (fase inferior).	38
Figura 19 – Figura ilustrativa do procedimento utilizado para degradação da amostra de biodiesel de soja em estufa.	42
Figura 21 – Alíquotas de biodiesel retiradas durante experimentos de fluorescência em tempo real. Amostra não tratada (NT). Tratamento: 80 °C sem fluxo de ar induzido (superior) e 110 °C e 0,5 L min ⁻¹ (inferior).	45
Figura 22 – Cubeta de quartzo de 1,0 mm e porta cubetas usado nas medições de fluorescência resolvida no tempo com ângulo de 56°.	47
Figura 23 – Espectros de absorção no infravermelho médio do ácido oleico e biodiesel de soja. Amostras não diluídas.	50
Figura 24 – Espectros de absorção no UV-Vis dos biodieseis obtidos de diferentes fontes. Amostras diluídas em hexano grau HPLC na concentração de 1,2 mg mL ⁻¹	51

Figura 25 – Espectros de absorção dos padrões de ésteres metílicos diluídos em hexano grau HPLC. Palmitato (0,81 mmol L ⁻¹), estearato (0,74 mmol L ⁻¹), oleato (1,05 mmol L ⁻¹), linoleato (2,17 mmol L ⁻¹), linolenato (0,74 mmol L ⁻¹).....	53
Figura 26 – Mapas de contorno de excitação/emissão dos biodieseis diluídos em hexano grau HPLC. 1,2 mg mL ⁻¹ . Os espalhamentos Rayleigh (*) e Raman (**) também são mostrados nos gráficos.	54
Figura 27 – Mapas de contorno de excitação/emissão dos ésteres metílicos (padrão) diluídos em hexano. 1,2 mg mL ⁻¹ . Os espalhamentos Rayleigh (*) e Raman (**) também são mostrados nos gráficos.	55
Figura 28 – Mapas de contorno de excitação/emissão do tocoferol diluídos em hexano grau HPLC 0,39 mmol L ⁻¹ . Antioxidante TBHQ diluído em etanol grau HPLC 1,0 mg mL ⁻¹	56
Figura 29 – Mapas de contorno de excitação/emissão da clorofila a purificada diluída em metanol e β-caroteno diluído em hexano grau HPLC 0,28 mmol L ⁻¹	57
Figura 30 – Espectros de RMN de ¹ H do padrão de linolenato de metila.....	58
Figura 31 – Espectro de RMN de ¹³ C do linolenato de metila padrão.	61
Figura 32 – Produto principal entre os compostos minoritários, originado a partir da decomposição do linolenato.	62
Figura 33 – Possíveis estruturas de trienos (superior) e tetraenos (inferior) conjugados derivados da decomposição do linolenato de metila (padrão).....	62
Figura 34 – Espectros de absorção UV-Vis do biodiesel de soja e absorbância em 320 nm em função da temperatura. Amostras não diluídas.....	64
Figura 35 - Espectro de absorção das amostras de biodiesel de soja e canola em função da temperatura, diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL ⁻¹	64
Figura 36 – Absorbância em 232 e 270 nm para as amostras de biodiesel de soja e canola em função da temperatura, diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL ⁻¹	66
Figura 37 – Absorbância em 300 e 315 nm para as amostras de biodiesel de soja e canola em função da temperatura diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL ⁻¹	66
Figura 38 – Espectro de fluorescência em excitação em 350 nm e intensidade de emissão em 430 nm em função da temperatura de degradação. Amostras não diluídas.....	67
Figura 39 – Mapas de contorno de excitação/emissão das amostras de biodiesel de soja (superior) e canola (inferior) em função da temperatura. Diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL ⁻¹ . Espalhamentos Rayleigh (*) e Raman (**) também são exibidos.	68

Figura 40 – Intensidade de fluorescência em 420 nm com excitação em 300 nm obtido para as amostras de biodiesel de soja em função da temperatura, diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL ⁻¹	69
Figura 41 – Espectros de fluorescência do biodiesel de soja em função do tempo de tratamento, com excitação em 380 nm obtidos para as amostras tratadas a 80 e 110 °C, com e sem fluxo de ar. A banda em 380 nm é decorrente da fonte de excitação. Amostras não diluídas.	71
Figura 42 – Intensidade de fluorescência a 495 e 660 nm das amostras tratadas a 80 e 110 °C em função do tempo, sob fluxo de ar de 0, 0,1 e 0,5 L min ⁻¹	72
Figura 51 – Espectros de fluorescência com excitação a 315 nm das amostras tratadas a 80 e 110 °C sem fluxo de ar. Diluídos em hexano grau HPLC 0,8 mg mL ⁻¹	80
Figura 52 - Intensidade de fluorescência a 420 nm com excitação a 315 nm em função do tempo de tratamento a 80 e 110°C em diferentes fluxos de ar.	80
Figura 53 – Mapas de contorno de excitação/emissão das amostras tratadas a 80 °C sem fluxo de ar. Diluídos em hexano grau HPLC 0,8 mg mL ⁻¹	81
Figura 54 – Mapas de contorno de excitação/emissão obtidos para as amostras degradadas a 110 °C com fluxo de ar de 0,5 L min ⁻¹ . Diluídos em hexano grau HPLC 0,8 mg mL ⁻¹	82
Figura 55 – Decaimento temporal da fluorescência para as amostras sem tratamento e tratadas durante 12 h a 80 e 110 °C adotando um fluxo de ar de 0,5 L min ⁻¹ . Amostras não diluídas. .	84
Figura 56 - Decaimento obtido para as amostras tratadas a 80 e 110 °C em diferentes fluxos de ar. Amostras não diluídas.	86
Figura 57 – Valores de tempo de vida (τ_1 , τ_2 e τ_3) obtidos para as amostras tratadas a 80 e 110 °C, sob diferentes fluxos de ar, em função do tempo.	87
Figura 58 – Amplitudes relativas associadas a τ_1 , τ_2 e τ_3 obtidas para as amostras tratadas a 80 e 110 °C, sob diferentes fluxos de ar, em função do tempo.	88
Figura 59 – Tempo de vida médio τ_m das amostras submetidas a 80 e 110 °C, sob diferentes fluxos de ar, em função do tempo.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média de derivados de ácidos graxos presentes em óleos (%).	15
Tabela 3 – Cromóforos típicos que apresentam absorção na região UV.....	25
Tabela 4 – Fluoróforos típicos que apresentam absorção na região UV-Vis.	29
Tabela 5 – Grupos orgânicos que apresentam absorção na região do infravermelho médio. ..	36
Tabela 6 – Condições experimentais utilizadas para as medições de CG-DIC.....	41
Tabela 7 – Condições experimentais utilizadas para as medições de CG-EM.....	48
Tabela 8 – Composição média dos ésteres metílicos nos biodieseis obtidas via CG-DIC.....	49
Tabela 9 – Atribuições de RMN de ¹ H dos ésteres metílicos padrão estudados: palmitato, estearato, oleato, linoleato e linolenato.	59
Tabela 10 – Atribuições de RMN de alguns fragmentos possivelmente originados a partir da decomposição dos ésteres metílicos insaturados (linoleato e linolenato).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis
B100	100% de biodiesel na mistura diesel/biodiesel
BHA	Butil-hidroxi-anizol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CG-DIC	Cromatografia a gás com detector de ionização em chama
FT-IR	Fourier transformer infrared (Infravermelho por transformada de Fourier)
FIR	Far infrared (Infravermelho distante)
gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHSQC	Gradient Heteronuclear Single Quantum Correlation
gTOCSY	Gradient Total Correlation Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE)
IE	Impacto de elétrons
IR	Infravermelho
LED	Light Emitting Diode (diodo emissor de luz)
MIR	Mid infrared (Infravermelho médio)
NIR	Near infrared (Infravermelho próximo)
PA	Para análise
PG	Propil-galato
PIFE	Primary Inner Filter Effect
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
SIFE	Secondary Inner Filter Effect
TCSPC	Time-correlated single-photon counting
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Óleos.....	15
2.2 Biodiesel.....	16
2.3 Produção do biodiesel	17
2.4 Estabilidade do biodiesel.....	19
2.5 Espectroscopia óptica	23
2.5.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis	24
2.5.2 Espectroscopia de fluorescência.....	28
2.5.3 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo	30
2.5.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio	34
3 - OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Produção do Biodiesel.....	38
4.2 Identificação dos Fluoróforos Presentes no Biodiesel	39
4.2.1 Preparo das amostras	39
4.2.2 Absorção UV-Vis.....	39
4.2.3 Fluorescência.....	40
4.2.4 Cromatografia a gás com detector de ionização em chama (CG-DIC).....	40
4.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	41
4.2.6 Absorção no infravermelho médio (FT-IR)	42
4.3 Estudo espectroscópico da degradação do biodiesel em função da temperatura	42
4.3.1 Preparo das amostras	42
4.3.2 Absorção UV-Vis.....	43
4.3.3 Fluorescência.....	43
4.4 Estudo da degradação do biodiesel sob fluxo de ar em função do tempo.....	43
4.4.2 Fluorescência em tempo real induzida com LED	43
4.4.3 Absorção UV-Vis.....	45
4.4.4 Fluorescência.....	45
4.4.5 Fluorescência resolvida no tempo	46
4.4.6 Cromatografia a gás com detector de massas	48
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	49

5.1 Identificação dos cromóforos e fluoróforos presentes no biodiesel.....	49
5.1.1 Absorção UV-Vis.....	51
5.1.2 Fluorescência.....	54
5.1.4 Ressonância magnética nuclear (RMN de ¹³ C e ¹ H).....	57
5.2 Estudo espectroscópico da degradação do biodiesel em função da temperatura	63
5.2.1 Absorção UV-Vis.....	63
5.2.2 Fluorescência.....	67
5.3 Estudo espectroscópico da degradação do biodiesel sob fluxo de ar em função do tempo	70
5.3.1 Fluorescência em tempo real induzida com LED	70
5.3.2 Absorção UV-Vis.....	73
5.3.3 Fluorescência.....	79
5.3.4 Fluorescência resolvida no tempo	83
6 - CONCLUSÕES.....	90
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
8 - APÊNDICE.....	101

1 - INTRODUÇÃO

A busca por tecnologias mais limpas e baratas tem aumentando consideravelmente, devido ao grande impacto ambiental que o acelerado desenvolvimento industrial está desencadeando há décadas.¹

A degradação ambiental vem recebendo atenção em todo o mundo, em virtude de importantes fatores socioambientais, como as evidentes mudanças climáticas e a diminuição das fontes de obtenção de petróleo. Estudos e análises de novas fontes energéticas sustentáveis, renováveis e biodegradáveis têm sido desenvolvidos. A investigação de fontes energéticas alternativas à utilização de combustíveis fósseis está deixando de ser um argumento simplesmente político e ideológico, e transformando-se em um aspecto extremamente importante do ponto de vista ambiental e econômico.²

O aumento desenfreado na concentração de poluentes na atmosfera causa o agravamento de fatores climáticos como a chuva ácida, poluição química e mudanças climáticas mais acentuadas, que podem causar danos severos à saúde da população. Os principais responsáveis pelo aumento de poluentes na atmosfera são os combustíveis fósseis, como diesel e gasolina, que, por exemplo, contribuem para a liberação de partículas em suspensão, partículas inaláveis, fumaça, dióxido de enxofre (SO₂) e inúmeros outros óxidos.³

O biodiesel desponta neste cenário como um combustível alternativo, ambientalmente amigável e de fácil disponibilidade, pois pode ser produzido a partir de diferentes fontes como óleos vegetais, sebo, resíduos industriais, algas e óleos residuais.⁴ Atualmente, no Brasil o biodiesel é produzido majoritariamente por sebo de animais e óleos vegetais como os de soja, canola, girassol e milho.⁵ Óleos vegetais são produtos que possuem aplicação em diversos setores industriais como o farmacêutico, perfumaria, lubrificação, cosmético e alimentício. Todos os óleos vegetais e aqueles de origem animal são compostos principalmente por triglicerídeos, que são ésteres formados por ácidos carboxílicos de cadeia longa, os óleos vegetais contêm ainda carotenoides, compostos fenólicos, porfirinas, tocoferóis e alguns óleos essenciais, ademais não possuem enxofre em sua composição e apresentam elevado poder calorífico, o que os torna matéria-prima atrativa para a produção de biodiesel.^{6;7}

O Brasil possui uma grande quantidade de áreas espalhadas por todo o território nacional que produzem oleaginosas, como a soja, girassol e milho, algumas delas com alto rendimento lipídico e extenso potencial de mercado. Desta forma, a produção nacional do biodiesel é de grande interesse não apenas pela variedade de matéria-prima disponível, mas também pelas enormes áreas produtivas, onde muitas oleaginosas são nativas.⁸

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Óleos

Óleos e gorduras são substâncias de origem vegetal ou animal que devido à sua composição química são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos apolares, tais como o hexano. Uma das principais diferenças entre um óleo e uma gordura está no aspecto físico, uma vez que os óleos são definidos como substâncias líquidas à temperatura ambiente, e as gorduras são caracterizadas como substâncias sólidas nas mesmas condições. Os óleos e gorduras são compostos em maior proporção por triglicerídeos e derivados de ácidos graxos.⁹ A Tabela 1 apresenta a concentração média de derivados de ácidos graxos presentes em diferentes fontes oleaginosas, onde os valores abaixo do nome de cada composto correspondem ao número de carbonos da cadeia e o número de insaturações, respectivamente.¹⁰

Tabela 1 - Composição média de derivados de ácidos graxos presentes em óleos (%).

Matéria-Prima	Palmítico 16:0	Estearico 18:0	Oleico 18:1	Linoleico 18:2	Linolênico 18:3
Soja	11,0	4,0	23,4	53,2	7,8
Canola	3,9	1,9	64,1	18,7	9,2
Girassol	6,8	4,7	18,6	68,2	0,5
Milho	9,9	3,1	29,1	56,8	1,1

Fonte: Adaptado pelo autor.¹⁰

Os derivados de ácidos graxos podem conter insaturações ao longo da cadeia carbônica, as quais variam de acordo com a fonte oleaginosa.⁶ Os ácidos graxos saturados organizam-se com facilidade devido às fortes atrações de van der Waals, fazendo com que apresentem ponto de fusão relativamente elevado. O ponto de fusão, por sua vez, aumenta com o aumento do peso molecular.¹¹

O uso de óleos vegetais como fonte para produção de biocombustíveis apresenta várias vantagens, tais como elevado poder calorífico, não apresenta enxofre em sua composição e fonte de origem renovável.⁶ Os óleos vegetais podem ser obtidos de diversas fontes como soja, mamona, macaúba, dendê, girassol, canola e milho. A utilização direta desses óleos nos

motores pode causar diversos problemas, pois estes apresentam alta viscosidade, densidade relativa elevada e baixa volatilidade. Estas propriedades físico-químicas podem provocar combustão incompleta, entupimento nos bicos injetores, baixa taxa de lubrificação, entupimento nos filtros de óleo, comprometendo assim a vida útil do motor.^{7; 12}

A transformação dos óleos e gorduras – de origem vegetal ou animal – em biodiesel é de grande importância para o setor energético, pois o biodiesel possui características físico-químicas semelhantes às do óleo diesel. Quando comparados, a queima do biodiesel forma menos fuligem do que o diesel convencional, isto pode ser devido ao biodiesel ser composto por ésteres e possuir pequena quantidade de compostos aromáticos, responsáveis pela queima incompleta de combustível.¹³

Para o Brasil, o biodiesel é uma opção atraente devido ao grande potencial de nosso território para a produção de oleaginosas. Assim a produção de biodiesel fortalece a produção de oleaginosas nas lavouras tanto de grandes quanto de pequenos produtores.¹⁰

As propriedades físico-químicas dos biodieseis derivados de óleos vegetais e gordura animal são influenciadas pelos tipos e teores de ácidos graxos presentes em sua composição. Estudos reportam que o biodiesel quando armazenado é mais susceptível ao processo de oxidação do que o diesel fóssil, a menos que sua composição seja alterada por aditivos, que retardam o processo oxidativo.^{14; 15}

2.2 Biodiesel

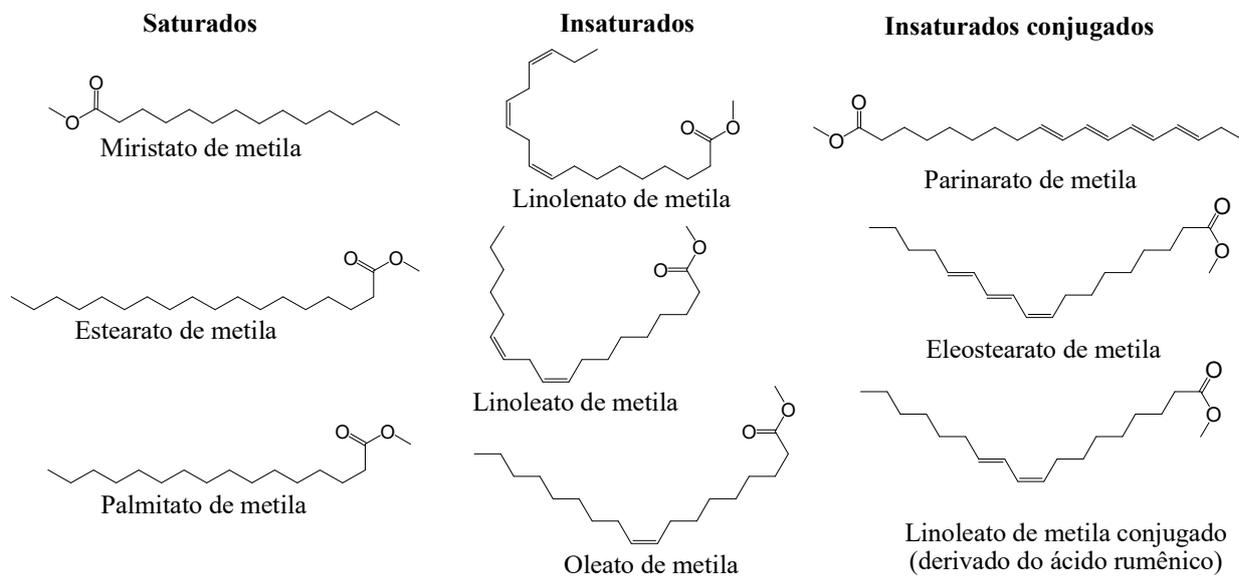
No Brasil os principais biocombustíveis líquidos usados são o etanol, o qual é produzido a partir da fermentação da cana-de-açúcar, e o biodiesel que é produzido a partir de óleos e gorduras, podendo ser adicionado ao diesel comum em proporções regulamentadas pela ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis).¹⁶

O biodiesel é classificado segundo a ANP como derivado de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia, conforme estabelecido pela lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005.

Por sua vez, segundo a Resolução ANP nº 45, o biodiesel é definido com um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (Figura 1), derivados de óleos vegetais ou gorduras animais.¹⁷ Este é obtido geralmente pela reação de transesterificação dos triglicerídeos, constituintes destas matérias primas, com metanol ou etanol, na presença de base forte, denominado B100.^{1; 4; 6}

No Brasil, desde novembro de 2014 o biodiesel é utilizado na mistura com diesel na concentração de 7% (v/v), determinado pela ANP pela lei nº 13.033.¹⁸

Figura 1 – Ésteres metílicos presentes em biodiesel.



Fonte: Próprio autor.

2.3 Produção do biodiesel

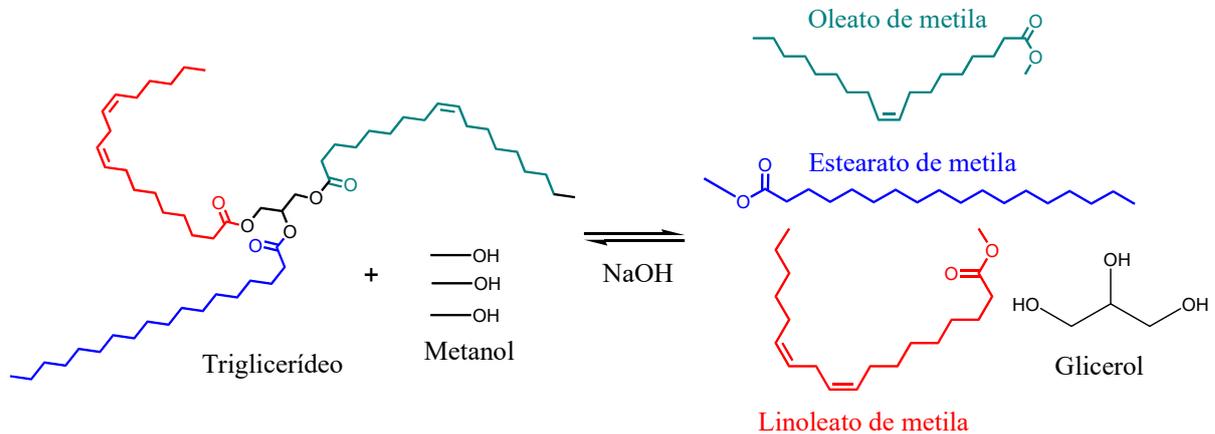
O biodiesel tem sido produzido principalmente por meio da reação de transesterificação via catálise ácida ou básica, dependendo da matéria-prima utilizada. Outros processos como craqueamento térmico-catalítico e esterificação de ácidos graxos também são utilizados para a obtenção do biodiesel, porém em menor escala devido ao maior consumo energético e menor rendimento. A transesterificação é a forma de produção mais difundida por fornecer alto rendimento, baixo investimento em equipamentos utilizados para a produção, e por ser baseada em uma tecnologia simples e de fácil assimilação.^{4;6}

A transesterificação ocorre através de reações consecutivas e reversíveis, onde são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como compostos intermediários. Apesar da estequiometria geral da equação requerer apenas três mols de álcool para cada mol de triglicerídeo, adota-se excesso de álcool no meio reacional para promover um aumento no rendimento.^{4;6}

A Figura 2 ilustra a reação de transesterificação via catálise homogênea básica, onde um triglicerídeo reage com três moléculas de metanol levando à formação de três moléculas de

ésteres metílicos e uma molécula de glicerol. O triglicerídeo é composto por três derivados de ácidos graxos, como o ácido oleico, linoleico e esteárico (Figura 2).¹⁹

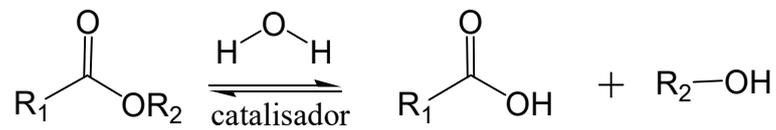
Figura 2 – Representação da reação de transesterificação via catálise básica.



Fonte: Adaptado pelo autor.¹⁹

Na presença de água é possível verificar o equilíbrio entre os diferentes ésteres e seus respectivos ácidos graxos e álcoois (glicerina e/ou álcoois),¹⁹ conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Representação da reação de hidrólise do éster.



Fonte: Adaptado pelo autor.¹⁹

A reação de formação de ésteres a partir de ácidos graxos é denominada de esterificação (Figura 4), sendo necessário o álcool para que a reação se processe. A reação pode ser catalisada por ácidos, bases ou enzimas.¹⁹

Figura 4 – Ilustração da reação de esterificação de um ácido graxo.



Fonte: Adaptado pelo autor.¹⁹

O processo de craqueamento ou pirólise de óleos e gorduras pode ocorrer em temperaturas acima de 450 °C, na presença ou ausência de catalisador. Nesta reação, a quebra

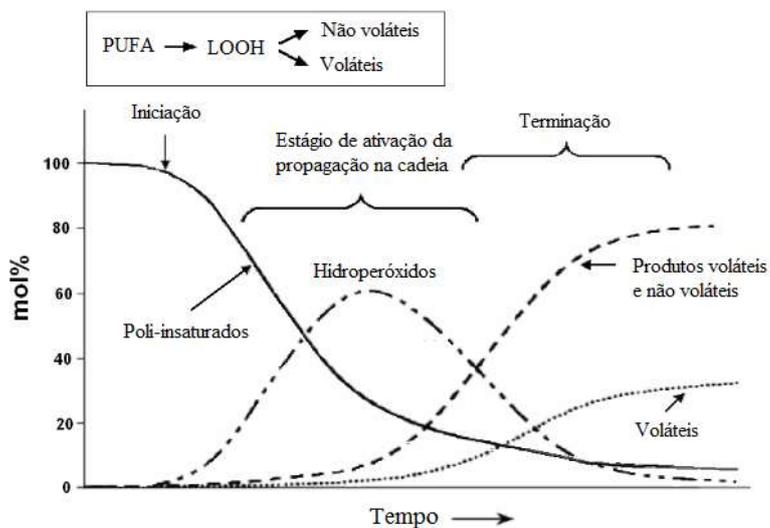
das moléculas dos triglicerídeos leva à formação de uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, lineares ou cíclicos, tais como alcanos, alcenos, cetonas, ácidos carboxílicos e aldeídos, além de monóxido e dióxido de carbono e água. O tamanho e o número de insaturações dos compostos obtidos dependem da estrutura química dos triglicerídeos e das reações consecutivas dos produtos formados.^{6; 19}

2.4 Estabilidade do biodiesel

A manutenção da qualidade do biodiesel produzido a partir de oleaginosas, durante o armazenamento e no momento de uso, constitui um importante aspecto técnico a ser avaliado. A resistência à oxidação é um parâmetro relevante dentro do ciclo de existência do biodiesel já que os óleos vegetais contendo ésteres de ácidos graxos insaturados tais como linoleico e linolênico são sensíveis à oxidação.^{20; 21} Esses ésteres sob condições de aumento de temperatura, radiação UV, umidade, ar atmosférico e metais, mesmo que por pouco tempo, oxidam (formação de radicais livres, combinação com oxigênio, formação e clivagem de peróxidos nas insaturações, formação de aldeídos, ácidos carboxílicos; e, formação de polímeros).²² Os produtos gerados causam, por exemplo, corrosão no motor e obstrução dos filtros e sistema de injeção.

A Figura 5 ilustra o comportamento cinético global de auto-oxidação de ácidos graxos poli-insaturados PUFA do inglês, *polyunsaturated fatty acid*, indicando os principais estágios da etapa de oxidação provocada por radicais livres em função do tempo.²³ Inicialmente ocorre a degradação dos poli-insaturados (PUFA), levando à formação de hidroperóxidos (LOOH) e posteriormente à formação de compostos voláteis e não voláteis na etapa de terminação.

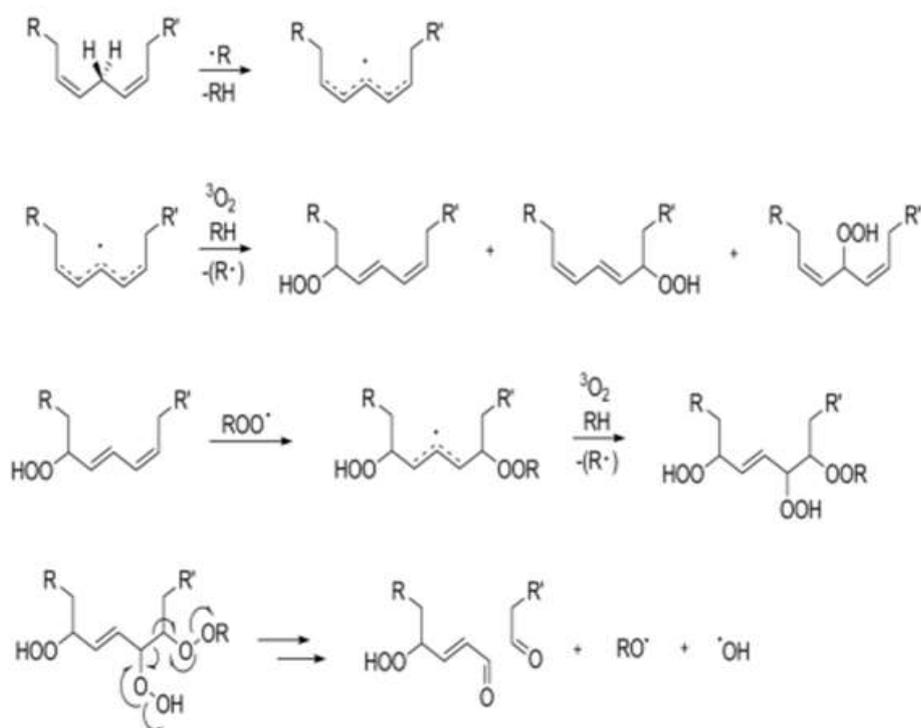
Figura 5 – Ilustração da auto-oxidação de ácidos graxos poli-insaturados em função do tempo.



Fonte: Adaptado pelo autor.²³

A Figura 6 apresenta o mecanismo de auto-oxidação de um dieno não conjugado, levando à formação de intermediários conjugados e produtos de degradação voláteis e não voláteis.²³

Figura 6 – Mecanismo geral de auto-oxidação do derivado do ácido linoleico.

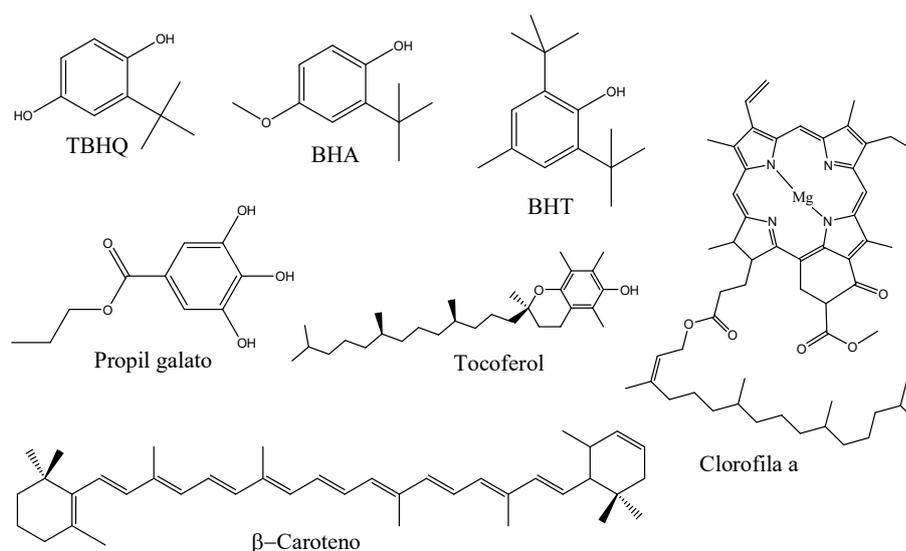


Fonte: Adaptado pelo autor.²³

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na oxidação do biodiesel, dentre eles: reações hidrolíticas, oxidação enzimática, foto-oxidação e auto-oxidação. As reações hidrolíticas levam à formação de ácidos graxos livres, gerando peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem também se envolver em diferentes reações de degradação.^{22; 24}

Os processos de degradação do biodiesel podem ser retardados com a utilização de agentes antioxidantes, os quais são adicionados a fim de aumentar o tempo de estocagem e evitar a formação de subprodutos prejudiciais ao biodiesel. Antioxidantes sintéticos como BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-Tolueno), TBHQ (terc-butil-hidroquinona) e PG (propil-galato) são mais difundidos na indústria e conhecidos por retardarem os efeitos da oxidação (aumento da viscosidade, acidez e índice de peróxido).^{20; 25}

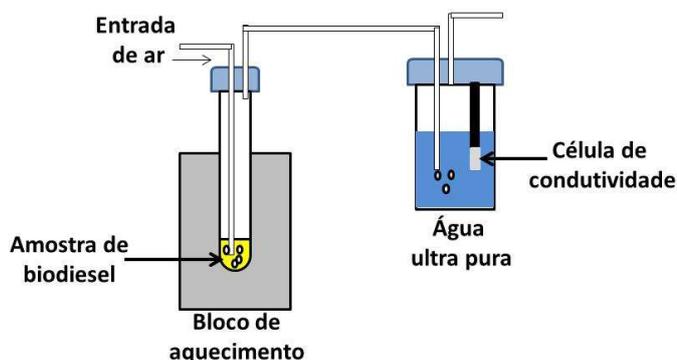
Além dos ésteres, ácidos graxos e compostos fenólicos, os óleos e seus respectivos biodieseis contêm antioxidantes naturais em sua composição, dentre eles: tocoferóis, tocotrienóis, carotenoides e clorofila. A Figura 7 apresenta as estruturas dos principais antioxidantes sintéticos adicionados ao biodiesel e outros que podem estar naturalmente presentes em óleos e no biodiesel.



Fonte: Adaptado pelo autor.²⁰

O método padrão utilizado na avaliação da estabilidade térmica do biodiesel é o método *Rancimat*.²⁶ O equipamento avalia a estabilidade à oxidação do biodiesel submetendo-o a um fluxo de ar (oxigênio) em temperaturas pré-determinadas (Figura 8).

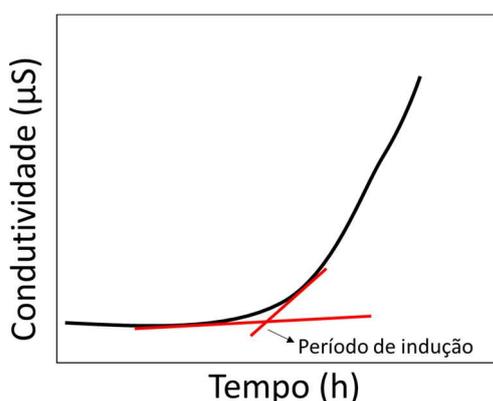
Figura 8 – Representação esquemática do método *Rancimat*.



Fonte: Adaptado pelo autor.²⁷

Desta forma a auto-oxidação é induzida em poucas horas pelo equipamento; este processo pode consumir semanas e até mesmo meses, quando a exposição acontece somente à temperatura ambiente. O método *Rancimat* se fundamenta na determinação do tempo transcorrido para alteração da taxa máxima de oxidação da amostra, determinada através do aumento da condutividade da água ultra pura contida em um recipiente adjacente. A amostra presente no tubo de reação, quando recebe o oxigênio (proveniente do ar insuflado na amostra), inicia o processo de oxidação, formando ácidos orgânicos de baixo peso molecular, estes ácidos então deixam a amostra e são enviados para a célula de medição, a qual permite avaliar alterações na condutividade da água. O período de indução é determinado pelo ponto de inflexão da curva de condutividade da água em função do tempo (Figura 9).²⁷

Figura 9 – Representação da curva típica de condutividade elétrica em função do tempo para determinação do período de indução.



Fonte: Adaptado pelo autor.

Apesar das vantagens apresentadas pelo *Rancimat*, como facilidade de operação e análise, quando comparados à métodos cromatográficos, tem sido observado que as curvas de condutividade elétrica podem exibir formatos que se distanciam do apresentado na Figura 9, dificultando a determinação do período de indução.

O potencial de diversas técnicas ópticas vem sendo avaliado para monitorar a estabilidade térmica do biodiesel, dentre elas a absorção na região UV-Vis-IV. As técnicas de absorção e fluorescência no UV-Vis têm sido propostas para determinação de tempos de indução oxidativa do biodiesel e óleos, identificando produtos secundários de oxidação (produtos aldeídos cetônicos α , β etilênicos).^{25; 28-40}

2.5 Espectroscopia óptica

A espectroscopia é o estudo das interações da radiação eletromagnética com a matéria. Esta área é amplamente estudada em química analítica e diversas outras áreas da química, física, biologia e medicina. Os métodos espectroscópicos de análise têm como base a medida da quantidade de radiação que é produzida ou absorvida por moléculas, íons ou átomos. Os métodos espectroscópicos podem ser classificados conforme a região do espectro eletromagnético envolvida na medida. As regiões espectrais amplamente utilizadas para diversos fins, incluem os raios X, ultravioleta (UV), visível (Vis), infravermelha (IV), microondas e ressonância magnética nuclear (RMN).⁴¹ A Tabela 2 lista os diferentes tipos de espectroscopia e comprimentos de onda envolvidos em cada caso.

Tabela 2 – Tipos de espectroscopia e mecanismos envolvidos.

Tipo de Espectroscopia	Mecanismo	Faixa de comprimento de onda
Raios gama	Nuclear	0,005 - 1,4 Å
Raios-x	Elétrons internos	0,1 - 100 Å
Ultravioleta no vácuo	Elétrons ligados	10 - 180 nm
Absorção, Fluorescência e fosforescência no UV-Vis	Elétrons ligados	180 - 780 nm
Absorção no infravermelho e espalhamento Raman	Rotação/vibração de moléculas	0,78 - 300 μ m
Absorção de micro-ondas	Rotação de moléculas	0,75 - 375 mm
Ressonância Magnética Nuclear	Spin de núcleos em um campo magnético	0,6 - 10 m

Fonte: Adaptado pelo autor.⁴¹

Os métodos de espectroscopia são ferramentas mais amplamente empregadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como na determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos. Muitos elementos químicos e moléculas foram descobertos por meio da espectroscopia de RMN, absorção e fluorescência e absorção no infravermelho, por exemplo.⁴¹

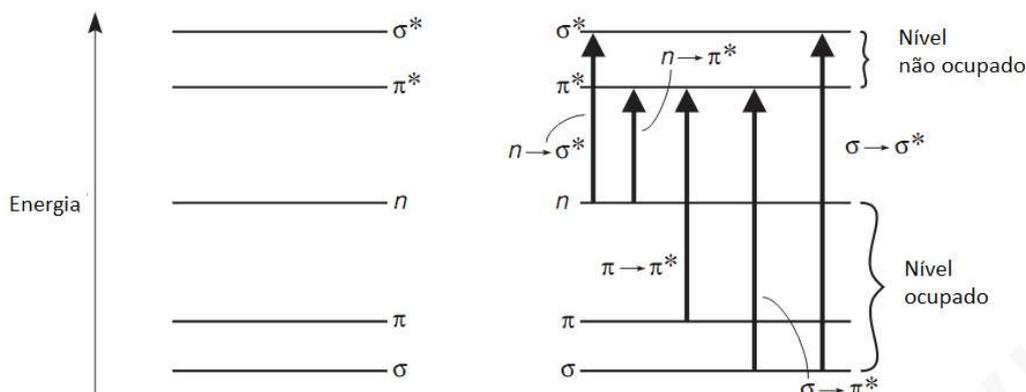
A amostra pode ser estimulada aplicando-se energia na forma de calor, energia elétrica, luz, partículas ou por uma reação química. Antes do estímulo aplicado, o analito em estudo se encontra predominantemente em seu estado de energia mais baixo. O estímulo faz com que o analito sofra uma transição para um estado de maior energia. As informações sobre as características particulares do analito são dadas medindo-se a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou a quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação.^{41; 42}

2.5.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

Absorção UV-Vis é um dos processos de interação da radiação eletromagnética com a matéria, onde parte da energia radiante que incide sobre um material é transferida para determinados elétrons que compõem as moléculas, os quais se apresentam antes da interação em estados de menor energia. A transição eletrônica ocorre por meio de absorção de fótons que apresentam energia correspondente à diferença energética associada aos estados eletrônicos envolvidos na transição.⁴¹

Uma ligação química leva a formação de dois orbitais moleculares, um sigma ligante (σ) e um sigma antiligante (σ^*) ou pi ligante (π) e um pi antiligante (π^*). Os orbitais moleculares do tipo σ estão relacionados às ligações simples, os orbitais do tipo π , são decorrentes de ligações duplas e triplas, enquanto elétrons não ligantes (n) são provenientes dos pares livres vinculados aos heteroátomos, como oxigênio, nitrogênio e enxofre. As transições eletrônicas envolvidas na região UV-Vis são dos seguintes tipos: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ e $\sigma \rightarrow \pi^*$. A Figura 10 representa o ordenamento dos orbitais em termos de energias relativas, com as representações das transições eletrônicas.⁴²

Figura 10 – Ilustração de níveis de energia envolvidos em transições eletrônicas.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁴²

Compostos nos quais os elétrons da camada de valência estão envolvidos na formação de ligações simples (σ), como os hidrocarbonetos saturados, não apresentam absorção na região UV (200 a 400 nm), pois a energia da transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é muito alta; por exemplo, o hexano apresenta um máximo de absorção em torno de 135 nm.⁴² Por sua vez, compostos que contêm elétrons não ligantes em átomos de oxigênio, enxofre ou halogênios podem absorver energia em comprimentos de onda entre 150 a 250 nm como consequência da transição $n \rightarrow \sigma^*$, a qual envolve energia menor do que transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$. As transições eletrônicas do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ envolvem menor quantidade de energia e podem ser observadas numa região do espectro que vai do ultravioleta ao infravermelho próximo.^{41; 42}

A ocorrência de cada processo depende da molécula. Uma molécula que pode ser excitada pela absorção de luz é chamada de cromóforo.^{41; 42} A Tabela 3 lista alguns cromóforos orgânicos.

Tabela 3 – Cromóforos típicos que apresentam absorção na região UV.

Cromóforo	$\lambda_{\text{Máx}}$ (nm)	Tipo de transição
C-C	<180	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
C=O	280	$n \rightarrow \pi^*$
C=C	180	$\pi \rightarrow \pi^*$
Dienos conjugados	220	$\pi \rightarrow \pi^*$
Trienos conjugados	262, 272, 283	$\pi \rightarrow \pi^*$
Tetraenos conjugados	291, 304, 318	$\pi \rightarrow \pi^*$
Pentaenos Conjugados	317, 331, 350	$\pi \rightarrow \pi^*$
Hexaenos Conjugados	340, 358, 380	$\pi \rightarrow \pi^*$
Benzeno	260	$\pi \rightarrow \pi^*$

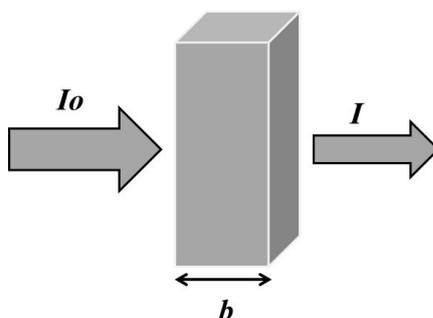
Fonte: Adaptado pelo autor.⁴²

A lei de absorção, conhecida como lei de Lambert-Beer, revela quantitativamente como a absorção da energia por cromóforos depende das características físico-químicas e da concentração das moléculas absorventes assim como do caminho óptico percorrido pela radiação no interior da amostra. Conforme a radiação atravessa o meio que contém o analito, que absorve em uma dada frequência, um decréscimo de intensidade é detectado na medida em que o analito é excitado. Em uma solução com uma dada concentração de analito, quanto maior o comprimento do caminho óptico, mais centros absorventes estarão interagindo com a radiação, logo maior será a absorção de radiação. Por outro lado, para um caminho óptico fixo, quanto maior for a concentração de grupos absorvedores, mais intensa será a atenuação do feixe incidente.^{41; 42}

A Figura 11 ilustra o processo envolvido na atenuação de um feixe de radiação monocromática que atravessa uma solução com espessura b (cm) contendo um analito absorvente de concentração igual a c (mol L⁻¹). Devido às interações entre os fótons e os grupos absorventes, a intensidade da radiação decresce de I_0 para I , após a passagem pela amostra.⁴¹ A equação 1 expressa a transmitância (T) da solução.

$$T = \log \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Figura 11 – Ilustração da transmissão de radiação pela matéria.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁴¹

A Equação 2 mostra a relação logarítmica da absorbância (A) e a transmitância (T) de uma solução que contém um grupo absorvente.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

A absorvância é diretamente proporcional à concentração da espécie absorvente c e ao caminho óptico b , como expresso pela Equação 3.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = abc \quad (3)$$

Na Equação 3, a é uma constante de proporcionalidade denominada absorvidade. Como a absorvância é uma grandeza adimensional a absorvidade deve ter unidades que cancelam as unidades de b e c . Quando a concentração usada na Equação 3 é dada em mol L⁻¹ e b em cm, a constante de proporcionalidade é chamada absorvidade molar, ϵ , e sua unidade é expressa em L mol⁻¹ cm⁻¹.

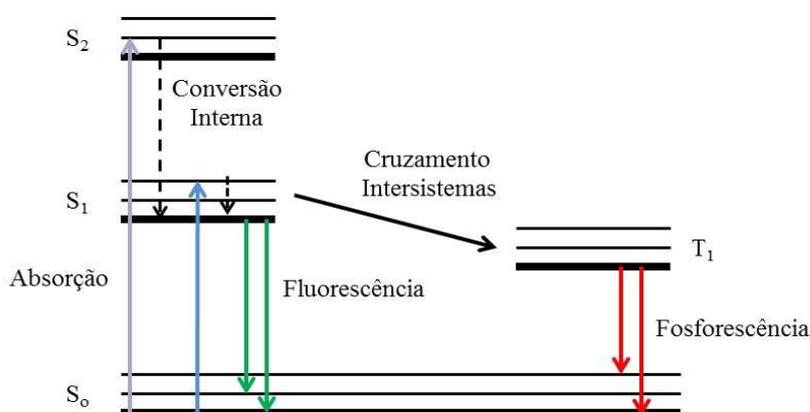
$$A = \epsilon bc \quad (4)$$

As características do espectro de absorção de uma dada molécula (comprimento de onda máxima, intensidade e largura da banda) podem depender, por exemplo, da polaridade e viscosidade do solvente. Essas mudanças resultam das interações físicas intermoleculares analito-solvente tais como íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e ligação de hidrogênio, que tendem a alterar a diferença de energia entre o estado fundamental e excitado envolvidos. Esse fenômeno está intimamente associado à natureza dos cromóforos presentes na molécula.⁴¹

2.5.2 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência é a emissão de luz vinculada a transições eletrônicas a partir de estados excitados, após a absorção de um fóton por uma molécula ou íon, denominado fluoróforo.⁴³ A Figura 12 apresenta o diagrama simplificado de Jablonski, onde são mostradas esquematicamente as diferentes formas de decaimento para elétrons excitados.

Figura 12 – Diagrama simplificado de Jablonski.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁴³

Os processos radiativos são classificados em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. Na fluorescência o estado excitado envolvido é singleto, pois o spin do elétron no orbital excitado mantém a mesma orientação que apresentava no estado fundamental. Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto).⁴³

A fluorescência é um fenômeno no qual os átomos ou moléculas são excitados após a absorção de radiação eletromagnética, ao relaxar, a espécie que se encontra no estado excitado retorna ao estado fundamental, liberando o excesso de energia na forma de fótons. O tempo de vida de uma espécie no estado excitado é relativamente curto, pois existem diversos mecanismos pelos quais um átomo ou molécula excitada podem liberar seu excesso de energia e relaxar para o estado fundamental.⁴³

O processo de absorção normalmente ocorre em 10^{-15} s, enquanto a relaxação vibracional em um mesmo estado excitado acontece na escala de tempo entre 10^{-11} e 10^{-10} s. A conversão interna entre estados eletrônicos diferentes ocorre em torno de 10^{-12} s e finalmente os tempos de vida para a fluorescência estão tipicamente em torno de 10^{-9} a 10^{-8} s. A fosforescência apresenta tempo de vida longo no estado excitado, entre 10^{-4} e 10^2 s.^{41,43} Como

essas emissões ocorrem com maior probabilidade do nível vibracional menos energético, após ocorrer relaxações vibracionais, na maioria dos casos, a energia do fóton emitido é menor que a do fóton absorvido.⁴³ A Tabela 4 lista alguns compostos fluorescentes que apresentam emissão no UV-Vis.

Tabela 4 – Fluoróforos típicos que apresentam absorção na região UV-Vis.

Fluoróforo	λ_{Exc} (nm)	λ_{Em} (nm)	Tipo de transição
Tetraenos conjugados	291, 304 e 318	420	$\pi^* \rightarrow \pi$
Pentaenos Conjugados	317, 331 e 350	445 e 470	$\pi^* \rightarrow \pi$
Hexaenos Conjugados	327, 343, 360 e 381	475, 508, 543	$\pi^* \rightarrow \pi$
Benzeno	240-260	270-290	$\pi^* \rightarrow \pi$
Naftaleno	220, 250, 270 e 290	310-370	$\pi^* \rightarrow \pi$

Fonte: Adaptado pelo autor.^{44; 45}

Uma vantagem da espectroscopia de fluorescência é a seletividade quando comparada a outros métodos de espectroscopia óptica, como absorção UV-Vis. Fluoróforos podem ser excitados por diferentes fontes, apresentando emissão característica e podendo ser detectada em diferentes ângulos, a qual possibilita ser utilizada na detecção e quantificação de células ou moléculas em sistemas biológicos, por exemplo.⁴¹

A Fluorescência é diretamente proporcional à concentração de um fluoróforo que apresente absorvância máxima de 0,1. No entanto, mudanças na geometria do experimento podem permitir que amostras com elevada densidade óptica sejam avaliadas.⁴¹⁻⁴³

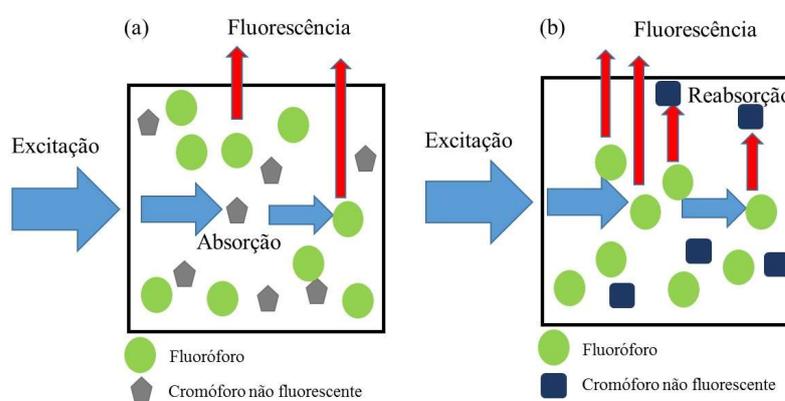
Processos de reabsorção de energia podem ocorrer durante a medição de fluorescência em amostras diluídas ou não diluídas, e dessa forma provocar distorções no espectro de emissão ou ainda a atenuação da intensidade de emissão do fluoróforo. Esse processo recebe o nome de efeito de filtro interno, do inglês *inner filter effect*.⁴³

Esse efeito pode ocorrer em duas vias durante as medições de fluorescência: com a radiação de excitação e/ou com a radiação de emissão.

Quando a radiação proveniente da fonte de excitação incide sobre a amostra, esta tem sua intensidade atenuada progressivamente devido à absorção de cromóforos presentes no meio, os quais podem não apresentar fluorescência, competindo com os fluoróforos no processo de absorção (Figura 13). Este processo é designado efeito de filtro interno primário (PIFE – do inglês *Primary Inner Filter Effect*).⁴⁶

Um outro efeito de filtro interno ocorre envolvendo a radiação de emissão do fluoróforo. Neste processo um cromóforo não fluorescente ou outro fluoróforo pode reabsorver a radiação fluorescente emitida pelo fluoróforo alvo, reduzindo assim a intensidade de emissão e provocando distorções no espectro de emissão (Figura 13). Este processo é denominado efeito de filtro interno secundário (SIFE – do inglês *Secondary Inner Filter Effect*).⁴⁶

Figura 13 – Representação do mecanismo ao efeito de filtro interno. (a) efeito de filtro interno primário (PIFE) e (b) efeito de filtro interno secundário (SIFE).



Fonte: Adaptado pelo autor.⁴⁶

Os efeitos de filtro interno podem ser atenuados com a diluição da amostra ou adotando uma diferente geometria no experimento.⁴³ Tratamentos matemáticos que envolvem quimiometria também são utilizados como auxílio no tratamento de tais dados.⁴⁷

2.5.3 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Como discutido anteriormente, a fluorescência molecular é um fenômeno que envolve a perda de energia de uma molécula a partir de seu estado excitado pela emissão de fótons.⁴³ Os tempos de vida de estado excitado de moléculas pode ser determinados por meio de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. Este parâmetro pode fornecer, por exemplo, informações sobre a formação de novos produtos de reação, a análise da transferência de energia entre analito e solvente, e investigação de distâncias moleculares e difusão rotacional de fluoróforos.^{43; 48; 49} Detalhes sobre o ambiente ao redor do fluoróforo assim como dos rearranjos moleculares podem ser descritos conhecendo a natureza do

decaimento temporal da fluorescência e também o comportamento espectral da fluorescência em função do tempo.⁴³

A dinâmica dos estados excitados moleculares pode ser determinada por técnicas de fluorescência resolvida no tempo e/ou em frequência, a fim de compreender os processos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos.⁴⁸⁻⁵⁰

A medição de fluorescência resolvida no tempo pode ser realizada utilizando pulsos de luz, promovendo uma dada população inicial n_0 de fluoróforos para um determinado estado excitado. A população no estado excitado decai para o estado eletrônico fundamental, por exemplo, com uma taxa de decaimento $(\Gamma + k_{nr})$. A equação 5 destaca os parâmetros envolvidos no processo.⁴³

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr}) \cdot n(t) \quad (5)$$

Onde $n(t)$ é o número de moléculas excitadas em um dado tempo t , Γ é a taxa de decaimento radiativo (fluorescência ou fosforescência) e k_{nr} é a taxa de decaimento não radiativo. A emissão é um evento aleatório, e cada fluoróforo tem a mesma probabilidade de emitir num dado instante de tempo. Isso pode resultar em um decaimento exponencial da população excitada descrito por:

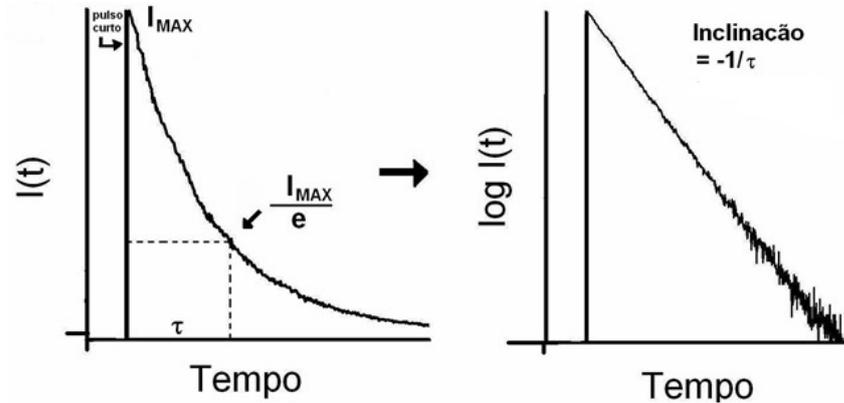
$$n(t) = n_0 \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (6)$$

Sendo τ o tempo de vida dado pelo inverso da taxa de decaimento total, então $\tau = (\Gamma + k_{nr})^{-1}$. Como a intensidade de fluorescência (I) é proporcional a n_t podemos concluir que:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{(-t/\tau)} \quad (7)$$

Onde I_0 é a intensidade inicial de radiação. O tempo de vida de fluorescência é o tempo necessário para a intensidade decair para 63,2%, ou $(1-1/e)$, de seu valor inicial. O tempo de vida de fluorescência pode ser determinado, no caso que houver decaimento monoexponencial, pelo coeficiente angular da curva de $\log I$ em função de t (Figura 14).^{43; 48;}

Figura 14 – Descrição esquemática de uma curva de decaimento temporal de fluorescência.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁵¹

A abordagem multiexponencial é a mais adequada para analisar o tempo de vida de estados eletrônicos em uma amostra com várias espécies de fluoróforos, pois considera a intensidade de fluorescência em função do tempo como uma soma das exponenciais (Equação 8).^{43; 51}

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \cdot e^{(-t/\tau_i)} \quad (8)$$

Onde τ_i é o tempo de decaimento e α_i é o fator pré-exponencial (amplitude) para um dado número i de componentes exponenciais independentes. A partir do ajuste da curva de decaimento é possível determinar o tempo de vida de cada componente.⁵¹

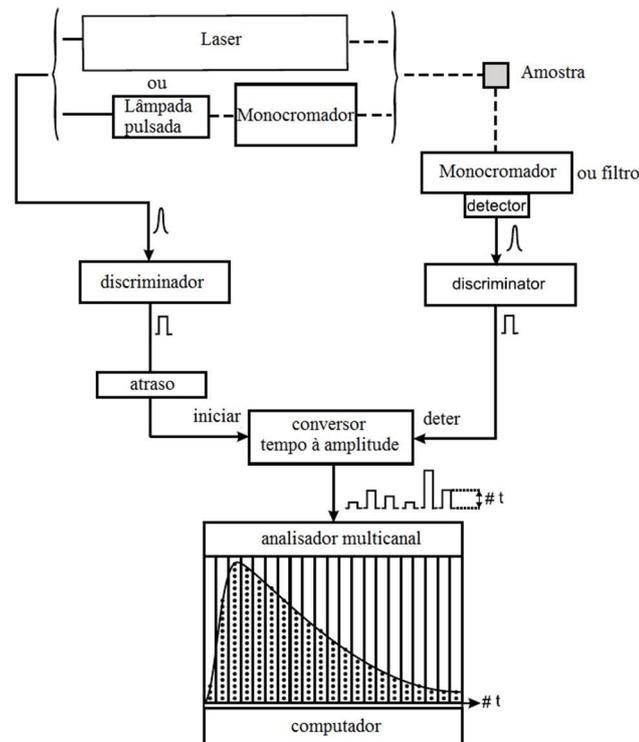
Para um decaimento multiexponencial com n componentes, o tempo de vida também pode ser analisado em termos do valor médio de tempo de vida, dado pela equação 9.^{43; 52; 53}

$$\tau_m = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i} \quad (9)$$

A comparação dos tempos de vida médio e as respectivas taxas de transição vinculadas a diferentes amostras permite avaliar, por exemplo, mudanças nas taxas de decaimentos em decorrência da conversão óleo/biodiesel e da degradação do biodiesel.

O equipamento de fluorescência resolvida no tempo usado nas medições de tempo de vida se baseia no método de contagem de fóton único correlacionado no tempo, TCSPC, do inglês *Time Correlated Single Photon Counting*.⁴³ A Figura 15 apresenta o esquema de funcionamento de um fluorímetro de contagem de um único fóton.⁵¹

Figura 15 - Esquema de funcionamento de um fluorímetro de contagem de um único fóton.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁵¹

O método se fundamenta no fato de que a probabilidade de se detectar um fóton único no tempo t depois de um pulso de excitação é proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo. Após a sincronização e gravação de fótons únicos, depois de um grande número de pulsos de excitação, a curva de decaimento da intensidade de fluorescência é construída. A fonte de excitação pode ser uma lâmpada, LED do inglês *Light Emitting Diode* ou laser. Esse equipamento permite a obtenção da intensidade de fluorescência em um dado comprimento de onda em função do tempo e também possibilita o acompanhamento da evolução temporal do espectro de fluorescência de uma dada amostra.⁴³

Um pulso elétrico associado com o pulso óptico é gerado e encaminhado (através de um discriminador) para a entrada “iniciar” do conversor tempo-amplitude. Por outro lado, a amostra é excitada pelo pulso óptico e emite fluorescência. Os sistemas ópticos são ajustados de modo que o fotomultiplicador detecte não mais de um fóton por cada pulso de excitação. O pulso elétrico correspondente é encaminhado (através de um discriminador) para a entrada de “deter” do conversor tempo-amplitude. Este último gera um pulso de saída cuja amplitude é diretamente proporcional ao intervalo de tempo entre os pulsos “iniciar” e “deter”. O intervalo

de tempo é convertido a um valor digital por meio de um conversor analógico-digital. Depois de um grande número de eventos de excitação-deteção, forma-se o histograma dos fótons detectados, que representa a curva de decaimento de fluorescência. Obviamente, quanto maior o número de eventos melhor é a precisão da curva de decaimento. Geralmente, as fontes luminosas disponíveis fornecem pulsos de diferentes intervalos de duração. Como consequência, o decaimento de fluorescência observado deve de ser corrigido pela largura do pulso da lâmpada. Este procedimento é geralmente denominado de deconvolução espectral. Quando a deconvolução é necessária, o perfil temporal da lâmpada do pulso de excitação é gravado sob as mesmas condições por substituição da amostra por um dispersante. Esta dificuldade causada pela largura (duração) do pulso pode ser minimizada pelo uso de lasers com pulsos de curta duração (picosegundos).⁵¹

2.5.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio

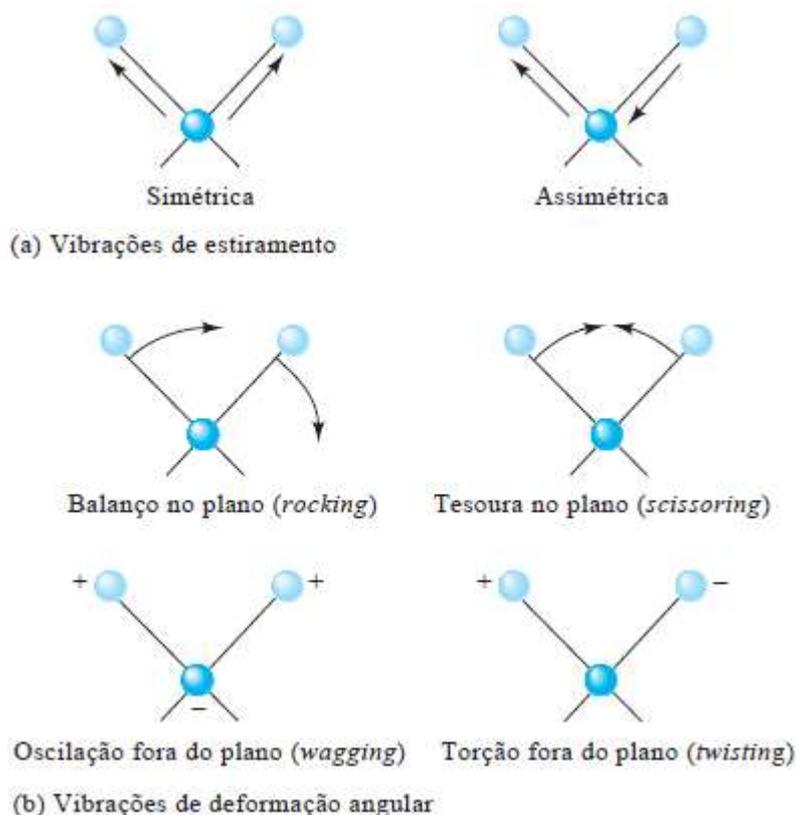
A radiação na região do infravermelho geralmente não possui energia suficiente para produzir transições eletrônicas nas moléculas, mas é capaz de fazer com que os átomos ou moléculas oscilem. Quando essas vibrações moleculares resultam em alteração do momento de dipolo e, conseqüentemente, da variação do arranjo eletrônico das ligações, pode-se induzir transições entre os níveis vibracionais tornando possível sua deteção por um espectrofotômetro.^{42; 54}

O espectro de absorção na região do infravermelho de uma dada substância é característico de cada molécula. A presença de bandas de absorção permite, por exemplo, a identificação de grupos moleculares específicos.⁵⁴ A região espectral do infravermelho pode ser dividida em infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) de 12.500 a 4.000 cm^{-1} , infravermelho médio (MIR, do inglês *Mid Infrared*) na faixa 4.000 a 400 cm^{-1} e infravermelho longínquo (FIR, do inglês *Far Infrared*) de 400 a 10 cm^{-1} .

As vibrações moleculares podem ser classificadas vibrações de estiramento e vibrações de deformação angular. A vibração de estiramento é uma oscilação radial ao longo do eixo de ligação da molécula que faz com que as distâncias interatômicas aumentem e diminuam. Já a vibração de deformação angular envolve mudanças dos ângulos de ligação em relação a um átomo comum ou conjunto de átomos, sem que as posições relativas dos átomos se alterem.^{42;}

⁵⁴ A Figura 16 apresenta os principais tipos de vibrações moleculares.

Figura 16 – Tipos de vibrações moleculares. O sinal positivo significa a movimentação do plano da página em direção ao leitor; o sinal negativo significa a movimentação na direção oposta.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁴¹

O espectro de absorção no infravermelho é dado em termos da absorbância ou transmitância em função do número de onda (cm^{-1}). As características de um espectro no infravermelho estão diretamente relacionadas à estrutura molecular de um composto, dependendo do tipo de ligação química, no entanto outros fatores como polaridade do analito e do solvente, viscosidade, e concentração também podem afetar o espectro de absorção.^{42; 54} A Tabela 5 apresenta alguns grupos orgânicos e suas características absorções no infravermelho.

Tabela 5 – Grupos orgânicos que apresentam absorção na região do infravermelho médio.

Faixa Espectral, cm ⁻¹	Grupo Químico	Grupo vibracional
3700-3200	-OH	Estiramento -OH
3065-3030	-C-H _{arom}	Estiramento C-H
3020-2950	-CH ₃	Estiramento assimétrico
2960-2910	-CH ₂	Estiramento assimétrico
2970-2860	-CH ₃	Estiramento simétrico
2860-2840	-CH ₂	Estiramento simétrico
1760-1720	-C=O	Estiramento
1660-1640	-C=C-	Estiramento
1600-1595	-COO ⁻	Estiramento assimétrico
1390-1370	-CH ₃	Deformação
1330-1250	-CH	Deformação
1265-1250	-CO-OH	Estiramento
1300-1100	-C-O-	Estiramento
1150-950	-C-C-	Estiramento
930-930	-COC-	Estiramento simétrico

Fonte: Adaptado pelo autor.⁵⁵

Tendo em vista o potencial das técnicas baseadas em espectroscopia óptica para o estudo de diferentes interações entre moléculas, neste trabalho avaliamos a possibilidade do monitoramento da estabilidade termo-oxidativa do biodiesel, assim como um estudo para determinação dos principais cromóforos e fluoróforos presentes no biodiesel, utilizando estas técnicas. Torna-se necessário investigar metodologias alternativas aos métodos convencionais, que sejam simples, robustas e de baixo custo que possam ser utilizadas no monitoramento da degradação termo-oxidativa sofrida pelo biodiesel durante o armazenamento.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os principais compostos cromóforos e fluoróforos presentes no biodiesel e avaliar como as propriedades ópticas desses compostos se alteram em decorrência do tratamento térmico do biodiesel.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os principais cromóforos e fluoróforos presentes no biodiesel;
- Avaliar a formação e quebra dos principais cromóforos e fluoróforos durante a termodegradação do biodiesel em estufa sem fluxo de ar induzido;
- Avaliar o potencial destes compostos como sondas para o estudo e monitoramento da termo-oxidação à temperatura fixa em função do tempo;
- Monitorar a termo-oxidação em tempo real a partir de medições de fluorescência induzida por um LED.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção do Biodiesel

As amostras de biodiesel foram obtidas a partir do óleo de soja, canola, girassol e milho (LIZA[®]) através do processo de transesterificação, utilizando rota metílica, como descrito por Magalhães e colaboradores.⁵⁶ Como catalisador foi utilizado hidróxido de sódio (NaOH) dissolvido em metanol PA, para formar o metóxido de sódio, utilizando-se uma chapa de agitação magnética à temperatura ambiente. Em seguida, ao óleo previamente aquecido a 60 °C, foi adicionado o catalisador. Sob agitação, a reação de transesterificação se processou durante 60 minutos.

Após este procedimento, a mistura passou a ser constituída de duas fases, separáveis por decantação. A fase mais densa é composta por glicerina, catalisador e resíduos de álcool e óleo, já a fase menos densa é composta principalmente por uma mistura de ésteres metílicos (Figura 17). Depois de 24 horas de decantação, a fase mais pesada foi removida. O biodiesel foi submetido a um processo de lavagem com água a fim de remover resíduos do álcool, catalisador e glicerina. Na etapa de lavagem a fase aquosa foi separada do biodiesel por decantação. Após lavagem, o biodiesel foi filtrado com papel de filtro qualitativo na presença de sulfato de sódio anidro para retirada da água remanescente.

Figura 17 – Separação do biodiesel de soja (fase superior) e resíduos (fase inferior).



Fonte: Próprio autor.

4.2 Identificação dos Fluoróforos Presentes no Biodiesel

4.2.1 Preparo das amostras

Espectros de absorção UV-Vis e fluorescência foram obtidos utilizando padrões de ésteres metílicos nas concentrações: palmitato de metila ($0,81 \text{ mmol L}^{-1}$), estearato ($0,74 \text{ mmol L}^{-1}$), oleato ($1,05 \text{ mmol L}^{-1}$), linoleato ($2,17 \text{ mmol L}^{-1}$), linolenato ($0,74 \text{ mmol L}^{-1}$), e β -caroteno ($0,28 \text{ mmol L}^{-1}$). Todos os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich apresentando pureza acima de 99%. Padrões de α -tocoferol ($0,39 \text{ mmol L}^{-1}$, pureza $> 67\%$), adquiridos da Sigma-Aldrich, foram avaliados, pois são compostos presentes nos óleos, e respectivos biodieseis. Dois lotes de cada éster padrão foram avaliados nestes estudos, a fim de fortalecer os resultados obtidos.

A clorofila foi obtida pelo processo adotado por Falco e colaboradores,⁵⁷ a partir do extrato de folhas das plantas de soja. Uma quantidade de 3 g de folhas foram picotadas e deixadas em repouso em 30 mL de metanol PA. Posteriormente, a mistura foi agitada a frio por 20 minutos e então, centrifugada a 2000 RPM por 5 minutos. Para as medições de fluorescência, 1 mL do extrato de clorofila foi diluído em 10 mL de metanol PA.⁵⁷ O antioxidante TBHQ comercial foi diluído em etanol grau HPLC na concentração de 1 mg mL.

Por sua vez, amostras de biodiesel de milho soja, canola e girassol foram diluídas nas concentrações de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ em hexano grau HPLC, a fim de evitar efeitos de filtro interno, discutidos na seção 2.7. As amostras foram preparadas usando diferentes lotes para garantia de maior reprodutibilidade.

4.2.2 Absorção UV-Vis

Espectros de absorção na região de 200 a 800 nm foram obtidos para todos os padrões e biodieseis. Amostras diluídas foram analisadas em espectrofotômetro Cary 50 (Varian). Uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm foi utilizada. Todas as medidas foram feitas à temperatura ambiente.

4.2.3 Fluorescência

Mapas de contorno excitação/emissão das amostras foram obtidos em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). A excitação foi feita de 280 a 450 nm, com passos de 5 nm e a emissão coletada entre 300 a 800 nm em intervalos de 2 nm. Para todos os experimentos as fendas de excitação e emissão foram fixadas em 10 nm. Uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e quatro faces polidas foi utilizada. O ângulo de 90° entre o feixe incidente e a parede da cubeta (configuração 90°) foi adotado no aparato experimental para a obtenção dos espectros. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

4.2.4 Cromatografia a gás com detector de ionização em chama (CG-DIC).

Na cromatografia a gás a amostra é vaporizada e os componentes (grupos) químicos presentes são separados em uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Um gás inerte promove a eluição da amostra pela coluna. Diferente de outros métodos cromatográficos, a fase móvel não interage com as moléculas do analito.⁴¹

O detector de ionização em chama (DIC) pode ser empregado na detecção de compostos orgânicos. O eluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio. A maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolisados a temperatura de uma chama ar/hidrogênio. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida por esses portadores de carga. O DIC é sensível a grupos funcionais como carboxila, hidroxila, halogênicos e amínicos. No entanto, esse detector não é sensível a gases como H₂O, CO₂, SO₂ e NO_x. Essas propriedades tornam o DIC conveniente para a análise de amostras orgânicas.⁴¹ Os sistemas de cromatografia possuem bibliotecas com espectros de massas de vários compostos. Assim, o espectro de massas de um determinado composto é comparado com os contidos na biblioteca, então através da similaridade dos espectros, o programa indica a provável estrutura do composto com certo nível de confiabilidade.

Medidas de cromatografia a gás foram realizadas nas amostras de biodiesel diluídas em hexano HPLC na concentração de 1,2 mg mL⁻¹. O equipamento utilizado nos experimentos foi o FOCUS GC (Thermo Scientific), equipado com DIC. As condições experimentais são descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Condições experimentais utilizadas para as medições de CG-DIC.

Parâmetros	Condições
Coluna Capilar (OV-5, Thermo Scientific)	30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme
Pressão constante	0,8 bar mL ⁻¹
Volume de injeção	1 µL e razão de injeção de (1:20)
Temperatura do injetor	250 °C
Programação do forno	70 °C por 5 min; 5 °C min ⁻¹ até 100 °C; 20 °C min ⁻¹ até 260 °C; 0,1 °C min ⁻¹ até 261 °C; 20 °C min ⁻¹ até 270 °C
Temperatura do detector	280 °C

Fonte: Próprio autor.

As amostras de biodiesel foram quantificadas utilizando uma curva de calibração com os padrões descritos na seção 4.2.1. Foram criadas curvas de calibração para cada padrão avaliado. As concentrações das amostras foram ajustadas para permanecerem dentro do intervalo de confiança da curva de calibração de cada padrão.

Os experimentos foram realizados em parceria com Prof^ª. Dr^ª. Margarete S. Silva da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

4.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Nesses experimentos cerca de 80 mg dos padrões de ésteres metílicos foram solubilizados em clorofórmio deuterado (CDCl₃) até volume total da solução de 500 µL. Medições de RMN unidimensional (1D) e bidimensional (2D) foram realizadas em espectrômetros Bruker DPX 300 (7,05 T) e Avance III 500 (11,75 T), respectivamente. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos com 128 varreduras (NS), 64 k pontos (TD), 6,84 s de aquisição (AQ) e tempo de espera de 1 s (d1). Os espectros de RMN de ¹³C foram realizados com 32 k pontos (TD), 0,87 s de aquisição (AQ) e tempo de espera de 2 s. Todos os espectros foram processados com a utilização de multiplicação exponencial (¹H, 0,30 Hz; ¹³C, 1 Hz), e correções manuais de fase e de linha de base. Experimentos bidimensionais como gTOCSY, do inglês, *gradient Total Correlation Spectroscopy*, gHSQC, do inglês, *gradient Heteronuclear Single Quantum Correlation* e gHMBC, do inglês, *gradiente Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, foram realizadas para elucidar os compostos minoritários.

Os experimentos de RMN foram realizados em parceria com a Prof^a. Dr^a Glaucia B. Alcantara do Grupo de RMN e Quimiometria do Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.2.6 Absorção no infravermelho médio (FT-IR)

Medidas de absorção na região do infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro modelo 4100 (JASCO), equipado com um acessório de refletância total atenuada com cristal de Seleneto de Zinco (ZnSe). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa entre 400 e 4000 cm^{-1} , a temperatura ambiente. A resolução de 2 cm^{-1} e 64 varreduras foi adotada em todas as medições a fim de se verificar a presença de ácidos graxos e água no biodiesel, bem como avaliar a reação de transesterificação.

4.3 Estudo espectroscópico da degradação do biodiesel em função da temperatura

4.3.1 Preparo das amostras

Em um béquer, 220 g de amostra de biodiesel de soja e canola foram submetidos ao teste acelerado de degradação em estufa sem fluxo de ar induzido (Figura 18). A temperatura da estufa foi alterada desde 25 até 210 °C (25, 40, 50, 70, 90, 110, 120, 135, 150, 170, 190, 210 °C) a cada uma hora, durante 11 horas. Uma alíquota de 5 mL da amostra foi retirada em intervalos de 1 h para as medições de absorção UV-Vis e fluorescência. As alíquotas foram colocadas em frascos âmbar de 10 mL e armazenadas em geladeira.

Figura 18 – Figura ilustrativa do procedimento utilizado para degradação da amostra de biodiesel de soja em estufa.



Fonte: Próprio autor

4.3.2 Absorção UV-Vis

Espectros de absorção das amostras foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Cary 50 (Varian). Para evitar os efeitos da reabsorção sobre os espectros de absorção, devido à elevada concentração de cromóforos, as amostras foram diluídas a concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em hexano. Nestas medições foi utilizada uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

Uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm foi utilizada para obtenção dos espectros de absorção das amostras não diluídas a fim de avaliar, se mesmo no regime de alta concentração, os espectros de absorção indicariam a ocorrência da degradação. Todas as medições foram feitas em temperatura ambiente.

4.3.3 Fluorescência

Espectros de fluorescência das alíquotas foram registrados em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian), usando como fonte de excitação uma lâmpada de xenônio de 75 W. As amostras foram excitadas em 360 nm e a fluorescência foi mensurada no intervalo entre 370 e 800 nm.

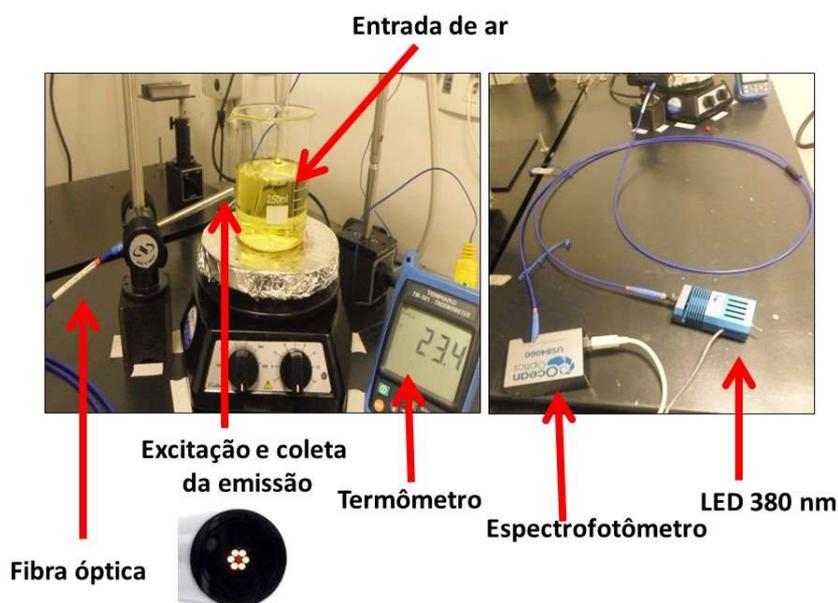
Mapas de contorno de fluorescência (excitação/emissão) foram obtidos usando o mesmo equipamento. As amostras foram excitadas de 250 a 450 nm a cada 5 nm e a emissão registrada entre 300 e 800 nm. Para todos os experimentos as fendas de excitação e emissão foram fixadas em 10 nm. Uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e quatro faces polidas foi utilizada. A configuração utilizada foi a mesma descrita na seção 4.2.3. As medições foram conduzidas a temperatura ambiente.

4.4 Estudo da degradação do biodiesel sob fluxo de ar em função do tempo

4.4.2 Fluorescência em tempo real induzida com LED

As medições de fluorescência em tempo real foram realizadas utilizando um LED operando em torno de 380 nm como fonte de excitação. A extremidade de uma fibra bifurcada foi acoplada ao LED e outra a um espectrofotômetro USB 4000 (Ocean Optics) (Figura 19).

Figura 19 – Foto ilustrativa do aparato experimental usado no experimento de termo-oxidação do biodiesel e monitoramento da fluorescência em tempo real.



Fonte: Próprio autor.

Esse sistema de fibras possui na extremidade seis fibras responsáveis pela excitação e uma fibra para a coleta da emissão no mesmo ponto (do inglês *front face*). A ponteira do sistema foi colocada em relação a superfície do béquer em um ângulo que minimizasse o espalhamento de luz proveniente da fonte de excitação. Os espectros de emissão do biodiesel foram automaticamente coletados a cada 5 minutos. Ao final do tratamento térmico a intensidade de fluorescência foi monitorada até a amostra retornar à temperatura ambiente, após aproximadamente 12 h de medições.

Experimentos foram conduzidos em temperaturas fixas de 80 e 110 °C utilizando uma chapa aquecedora para o aquecimento e agitação do biodiesel, com a temperatura da amostra sendo monitorada por um termômetro digital TM-361 (Tenmars).

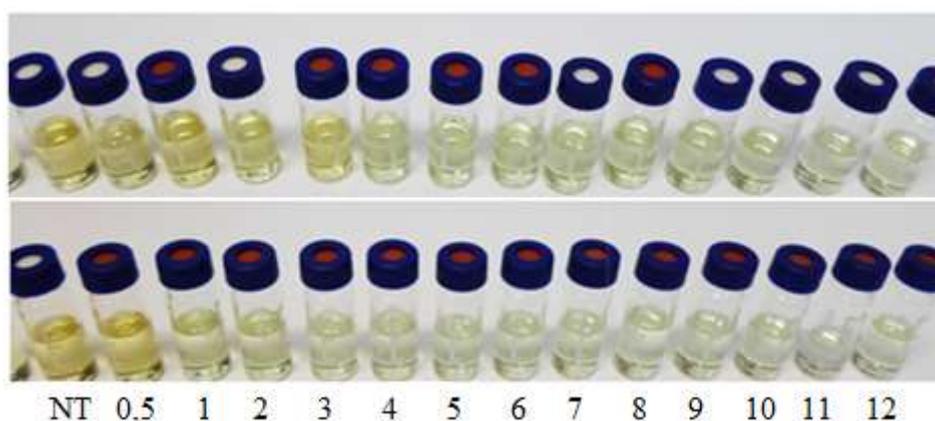
Amostras de biodiesel foram submetidas a fluxos de ar constante de 0; 0,1 e 0,5 L min⁻¹ para cada temperatura estabelecida. Esses fluxos foram controlados por meio de um fluxômetro (RMR) para ar comprimido (faixa de trabalho de 0 a 4,0 L min⁻¹).

Alíquotas de 5,0 mL de amostra foram retiradas a cada 1 hora para análises de absorção e fluorescência. As alíquotas foram colocadas em frascos âmbar de 10 mL, envolvidos em papel alumínio e mantidas refrigeradas em geladeira.

A Figura 20 exhibe, da esquerda para a direita, uma amostra de biodiesel de soja não tratada e posteriormente as alíquotas das amostras tratadas. Na parte inferior da figura são

apresentadas as amostras tratadas a 110 °C sob fluxo de ar de 0,5 L min⁻¹; na parte inferior, amostras tratadas a 80 °C sem fluxo de ar induzido.

Figura 20 – Alíquotas de biodiesel retiradas durante experimentos de fluorescência em tempo real. Amostra não tratada (NT). Tratamento: 80 °C sem fluxo de ar induzido (superior) e 110 °C e 0,5 L min⁻¹ (inferior).



Fonte: Próprio do autor.

4.4.3 Absorção UV-Vis

Os espectros das amostras não diluídas e diluídas foram registrados por um espectrofotômetro Cary 3bio (Varian) na região entre 200 e 500 nm. Cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 e 10 mm foram utilizadas nas medições das amostras não diluídas e diluídas na concentração de 0,8 mg.mL⁻¹ em hexano HPLC, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente.

4.4.4 Fluorescência

Os espectros de fluorescência das alíquotas foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Fluoromax4 (Jobin Yvon – Horiba), o qual possui como fonte de excitação uma lâmpada de xênon de 150 W. Os espectros de emissão das amostras submetidas à excitação em 315 nm foram registrados no intervalo entre 300 e 600 nm. Em todas as medições as fendas de excitação e emissão foram mantidas a 5 nm e o tempo de integração de 100 ms.

Mapas de contorno de excitação/emissão foram também obtidos usando o mesmo equipamento. As amostras foram excitadas na região 250-340 nm a cada 5 nm e a emissão foi

registrada entre 300 e 600 nm, adotando abertura da fenda de excitação e emissão de 5 nm. Todas as medições foram realizadas em ângulo fixo de 90° entre a superfície da cubeta e o feixe de excitação.

Compostos presentes em óleos e biodiesel podem sofrer fotodegradação causada pela luz proveniente da fonte de excitação. Para contornar esse problema foi utilizado um filtro de malha UV-Vis-IV (2% transmitância – 200-800 nm) a fim de atenuar a luz de excitação proveniente da lâmpada. As medições foram feitas nas amostras diluídas usadas para as medições de absorção descritas na sessão 4.4.3. Uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico foi usada em todos os experimentos. A fim de favorecer a homogeneidade da amostra durante a medição, a solução foi agitada com auxílio de uma barra magnética e um agitador acoplado ao sistema de fluorescência. As medições foram feitas a temperatura ambiente.

4.4.5 Fluorescência resolvida no tempo

Experimentos para determinar o tempo de vida de estado excitado das alíquotas foram realizados em um espectrofluorímetro Fluoromax4 (Jobin Yvon – Horiba), com sistema de detecção operando em modo de contagem de um único fóton (TCSPC, do inglês *Time-correlated single-photon counting*). Esse aparato permite medições com resolução temporal entre 200 ps e 0,1 ms.

Nestes experimentos foi utilizado um LED de 340 ± 10 nm com pulsos $< 1,2$ ns como fonte de excitação. A janela temporal utilizada para a aquisição da intensidade de fluorescência em função do tempo foi de 200 ns (4090 canais). Um filtro de interferência com máximo em 340 ± 10 nm (densidade óptica de 3,0) foi ajustado no caminho do feixe de excitação. Um filtro com transmitância entre 395 e 900 nm foi utilizado antes da entrada para o monocromador de emissão, para garantir a exclusão de luz proveniente da fonte de excitação.

Realizou-se uma medição em uma cubeta de quartzo contendo tubos capilares de vidro para originar espalhamento da luz e registrar as características do sinal proveniente somente da luz de excitação para cada lote de amostras. Este sinal foi usado na correção da intensidade de fluorescência produzido pela amostra, uma vez que o *software* necessita desse sinal para correções das curvas de decaimento temporal de estados excitados com tempo de decaimento três vezes menores do que o pulso da fonte de excitação. Todas as medições foram realizadas em duplicata para verificação da reprodutibilidade dos experimentos.

A intensidade de fluorescência assim como o perfil do decaimento temporal, podem depender da absorvância e da geometria de iluminação da amostra. A geometria comumente utilizada para a observação de fluorescência tem por base o estabelecimento de um ângulo de 90° entre a parede da cubeta e o feixe de excitação.⁴³ Outros arranjos geométricos incluem a configuração de iluminação e coleta da emissão na mesma face (do inglês, *front face*), a qual geralmente é utilizada para diminuir os efeitos de filtro interno (discutidos na seção 2.7) devido às altas densidades ópticas dos cromóforos.⁴³ Frequentemente, a iluminação frontal é realizada utilizando cubetas triangulares ou quadradas com suas superfícies orientadas em torno de 30 ou 60° em relação ao feixe incidente.⁴³

As medições de fluorescência resolvida no tempo foram realizadas adotando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de $1,0$ mm em ângulo de 56° entre a face da cubeta e o caminho de emissão (Figura 21). Esse ângulo foi escolhido a fim de minimizar o espalhamento de luz e por não requerer a diluição da amostra, uma vez que a interação da luz ocorre em uma fina camada superficial da amostra. Para a orientação da cubeta foi utilizado um goniômetro como suporte para a cubeta, como apresentado na Figura 21.

Figura 21 – Cubeta de quartzo de $1,0$ mm e porta cubetas usado nas medições de fluorescência resolvida no tempo com ângulo de 56° .



Fonte: Próprio autor.

Os espectros de absorção UV-Vis, fluorescência e fluorescência resolvida no tempo foram realizados no *Grupo de Sensores Ópticos Químicos y Fotoquímica Aplicada* sob supervisão do Prof. Dr. Guillermo Orellana Moraleda, na Universidade Complutense de Madrid.

4.4.6 Cromatografia a gás com detector de massas

Os cromatogramas das amostras foram obtidos utilizando um cromatógrafo a gás 6890N Network (Agilent) acoplado a um detector de massas 5973N Network (Agilent). Os parâmetros experimentais são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Condições experimentais utilizadas para as medições de CG-EM.

Parâmetros	Condições
Coluna capilar (HP-5MS – 5% fenil siloxano).	30 m x 250 μm x 0,25 μm
Gás de arraste	Hélio a 3,0 mL min^{-1}
Volume de injeção	0,1 μL e razão de injeção (50:1)
Temperatura do injetor	250 $^{\circ}\text{C}$
Programa de aquecimento	50 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min, 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 248 $^{\circ}\text{C}$ – 6 min.
Modo de detecção	IE (70 eV)

Fonte: Próprio autor.

As amostras usadas nas medições foram diluídas em diclorometano grau HPLC na concentração de 20 mg mL^{-1} e enriquecidas com 4,30 mg mL^{-1} de padrão interno (Heptadecanoato de metila - pureza > 99%). As concentrações relativas dos ésteres metílicos presentes nas amostras de biodiesel foram determinadas através da integração da área do pico de cada componente, e comparados com a área do pico do padrão interno.

As medições cromatografia a gás com detector de massas foram realizadas no *Grupo de Sensores Ópticos Químicos y Fotoquímica Aplicada* sob supervisão do Prof. Dr. Guillermo Orellana Moraleda, na Universidade Complutense de Madrid.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos cromóforos e fluoróforos presentes no biodiesel

A determinação da composição química dos óleos e biodiesel é de grande importância para o entendimento de suas propriedades físico-químicas. Neste trabalho foi utilizada a cromatografia a gás com detector de ionização em chama para a determinação da concentração dos ésteres metílicos que constituem as amostras estudadas (Tabela 8). Os resultados mostram que o linoleato e oleato de metila são os ésteres que estão presentes em maiores proporções nos biodieseis estudados.¹⁰

Tabela 8 – Composição média dos ésteres metílicos nos biodieseis obtidas via CG-DIC.

Éster metílico	Milho (%)	Canola (%)	Girassol (%)	Soja (%)
Miristato de metila (14:0)	0,1	0,2	0,1	0,1
Palmitato de metila (16:0)	12,6	6,3	5,9	10,8
Estearato de metila (18:0)	2,1	1,8	3,8	3,6
Oleato de metila (18:1)	31,6	53,5	21,7	21,4
Linoleato de metila (18:2)	45,1	25,4	60,3	52,8
Linolenato de metila (18:3)	2,0	3,1	0,5	5,7

Fonte: Próprio autor.

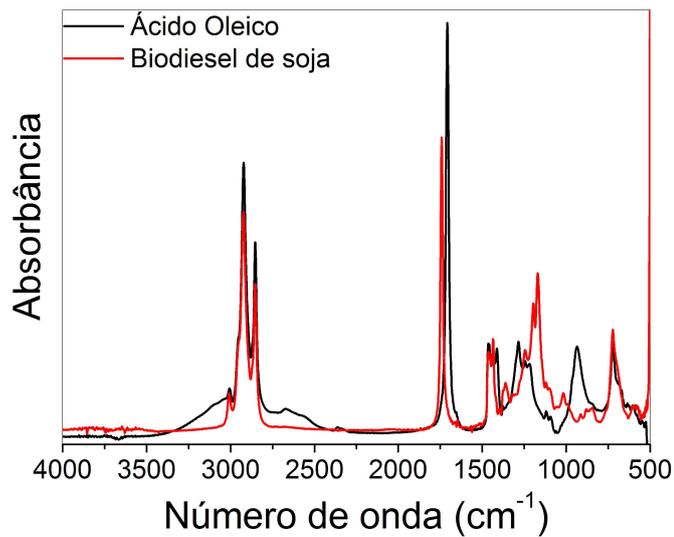
Com a finalidade de verificar a presença de ácidos graxos livre e água na amostras de biodieseis estudadas, foram realizadas medições de absorção no infravermelho médio. Óleos e biodieseis de diferentes origens podem conter ácidos graxos livres, como ácido oleico e linoleico. Um dos ácidos graxos presentes na grande maioria dos óleos de origem vegetal e animal é o ácido oleico, que é um ácido carboxílico presente em óleos brutos responsável por sua acidez.⁵⁸ Os óleos utilizados nos estudos foram refinados, logo possuem uma reduzida quantidade de ácidos graxos livres. Para verificar a presença de ácidos graxos livres nas amostras de biodiesel, medições de absorção na região do infravermelho foram realizadas.

A Figura 22 mostra o espectro de absorção no infravermelho médio para as amostras de biodiesel de soja e ácido oleico PA. O ácido oleico é um ácido graxo insaturado (18:1) que possui o grupo R-COOH na extremidade da cadeia carbônica. Devido à presença do grupo hidroxila ligado ao carbono da carboxila, pode-se observar uma absorção na faixa entre 3300 e 2500 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento da ligação desse grupo.^{42; 54} Esse

estiramento não ocorre nos óleos refinados devido à substituição do grupo –OH pelo grupo –OR. Essa mudança de grupo promove também o deslocamento da banda de absorção em 1708 cm^{-1} – atribuída ao estiramento da carboxila presente no ácido oleico – para números de onda maiores. A banda em torno de 934 cm^{-1} é observada na amostra de ácido oleico devido à vibração fora do plano do –OH dos ácidos graxos, que por sua vez não ocorre no biodiesel estudado.

A Figura 22 revela ainda que a amostra não apresentou bandas de absorção decorrentes da presença da molécula de água, devido ausência do estiramento –OH na faixa entre 3150 e 3500 cm^{-1} , e 1650 cm^{-1} devido a ligação HO–H.⁵⁹ O mesmo estudo foi conduzido para as demais amostras obtendo conclusões similares (dados não mostrados).

Figura 22 – Espectros de absorção no infravermelho médio do ácido oleico e biodiesel de soja. Amostras não diluídas.

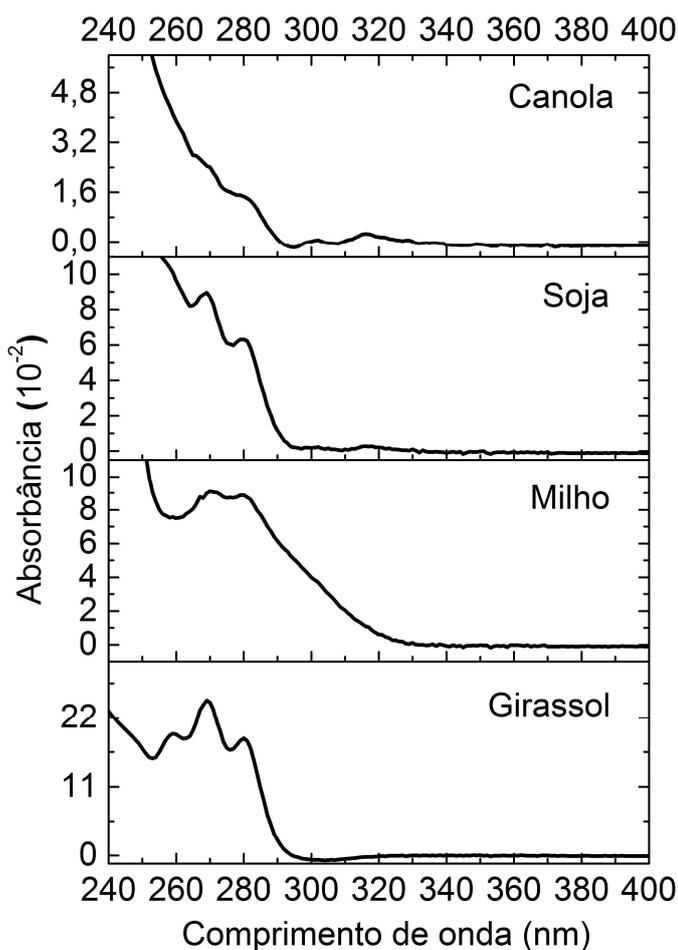


Fonte: Próprio autor.

5.1.1 Absorção UV-Vis

A Figura 23 mostra os espectros de absorção dos biodieseis de soja, canola, girassol e milho, diluídos nas concentrações de $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$ em hexano.

Figura 23 – Espectros de absorção no UV-Vis dos biodieseis obtidos de diferentes fontes oleaginosas. Amostras diluídas em hexano grau HPLC na concentração de $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

Compostos presentes no biodiesel possuem ligações químicas que podem sofrer transições eletrônicas do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, e estas podem contribuir para absorção na região do UV-Vis. Moléculas insaturadas que contêm heteroátomos como oxigênio ou nitrogênio podem sofrer transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$. Um composto carboxílico típico apresenta a transição $n \rightarrow \pi^*$ na faixa espectral entre 280 e 290 nm. As transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ são proibidas e, portanto, apresentam baixa probabilidade de ocorrência.⁴²

Moléculas que possuem ligações duplas apresentam bandas de absorção desde 150 nm, devido as transições $\pi \rightarrow \pi^*$, as quais dependem do número de ligações e do número de conjugações presentes na cadeia carbônica (Tabela 3).^{42; 60; 61; 62}

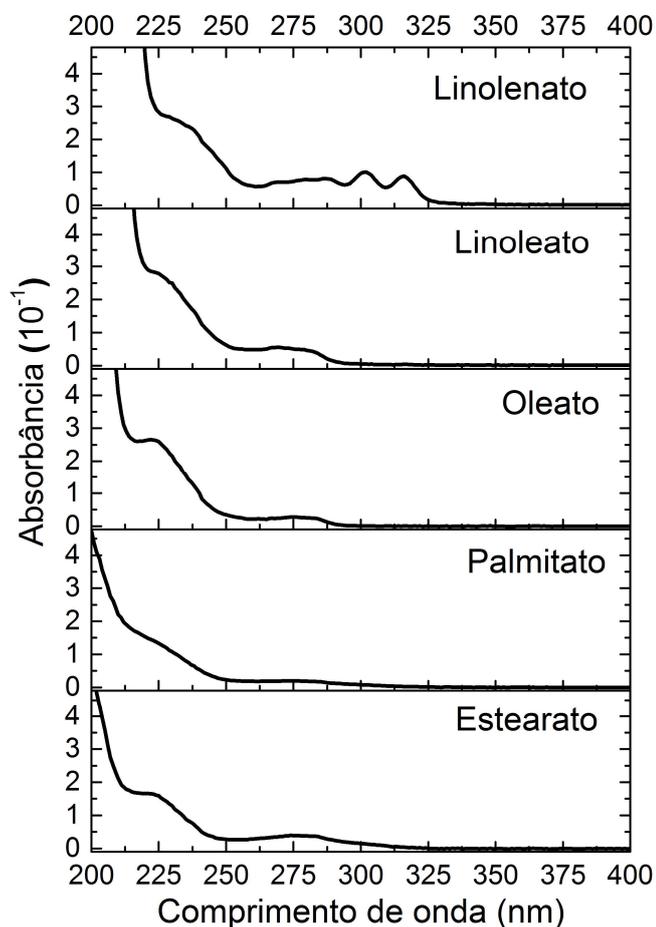
Todas as amostras de biodiesel apresentaram absorção entre 200 e 330 nm, decorrentes da presença de inúmeros cromóforos, como dienos, trienos e tetraenos conjugados, assim como hidroperóxidos e aldeídos cetônicos, os quais apresentam absorção nesta região. Dienos conjugados apresentam absorção característica em torno de 232 nm, por sua vez os trienos conjugados absorvem com máximos entre 260, 270 e 290 nm. Os responsáveis pelas bandas de absorção em 300 e 315 nm são compostos tetraenos conjugados, uma vez que estas moléculas podem ser formadas durante o tratamento ou serem oriundas do óleo de partida.

Para identificar as transições eletrônicas responsáveis pelas bandas de absorção nas amostras de biodieses produzidos, medições de absorção UV-Vis de padrões de ésteres metílicos foram realizadas utilizando as mesmas condições experimentais descritas para as medições das amostras de biodiesel.

De forma similar ao observado nas amostras de biodiesel, os padrões apresentaram absorção nas regiões entre 200 e 330 nm (Figura 24). A banda em torno de 232 nm é possivelmente associada à presença de dienos conjugados, outra em torno de 250 e 290, devido à presença de trienos conjugados.

O padrão de linolenato de metila (18:3) apresenta uma banda em torno de 300 e 315 nm, também sugerindo a presença de tetraenos conjugados. A presença de tetraenos conjugados pode ser devido à degradação do linolenato de metila padrão, o que leva a formação de duplas conjugadas. Uma segunda possibilidade é a presença destes compostos devido a ineficiência processo de purificação, uma vez que esses padrões são sintetizados a partir de óleos de origem vegetal.

Figura 24 – Espectros de absorção dos padrões de ésteres metílicos diluídos em hexano grau HPLC. Palmitato ($0,81 \text{ mmol L}^{-1}$), estearato ($0,74 \text{ mmol L}^{-1}$), oleato ($1,05 \text{ mmol L}^{-1}$), linoleato ($2,17 \text{ mmol L}^{-1}$), linolenato ($0,74 \text{ mmol L}^{-1}$).



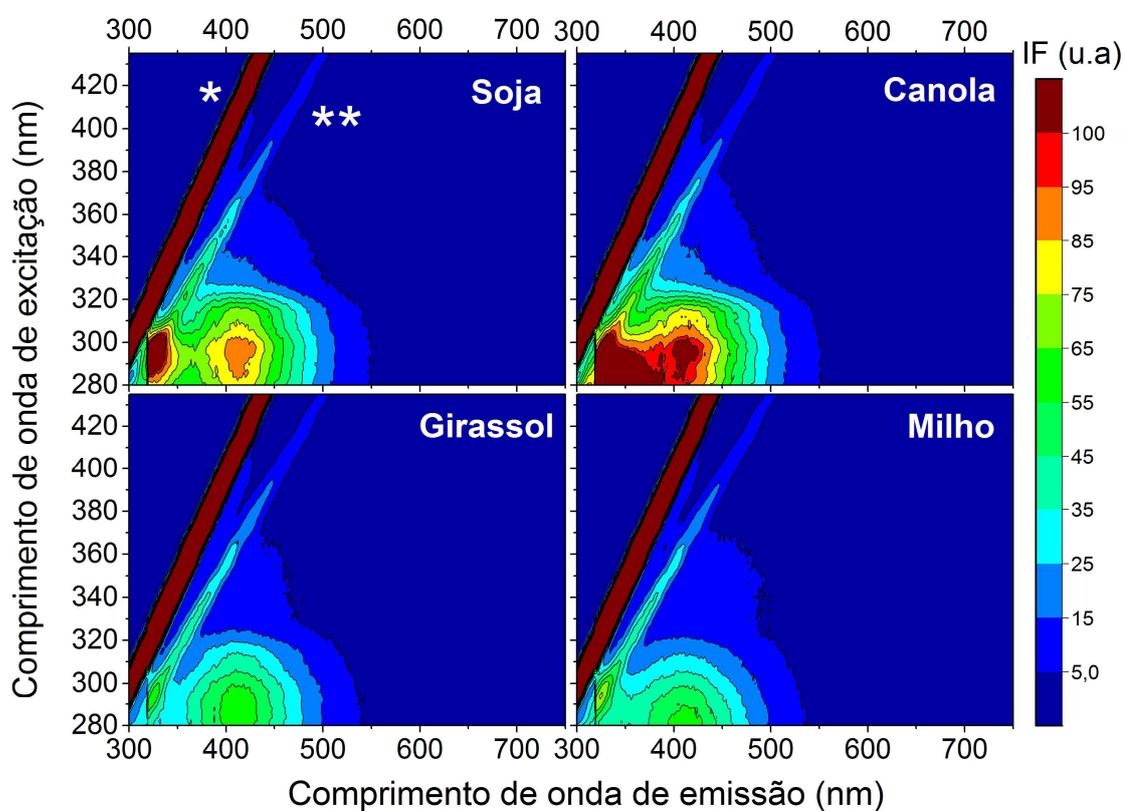
Fonte: Próprio autor.

Os biodieseis analisados também possuem em sua composição outros compostos que podem contribuir para a absorção e fluorescência molecular na região do UV-Vis.⁶³ Compostos como tocoferol e clorofila absorvem energia na mesma região de dienos e trienos conjugados, entre 220 e 300 nm, podendo dessa forma contribuir para a absorção.^{64; 65} Todavia, devido ao óleo utilizado para a produção de biodiesel ter passado por processos de purificação, a clorofila presente nos biodieseis não foi detectada por meio dos espectros de absorção UV-Vis das amostras na diluição adotada, uma vez que a clorofila apresenta absorção desde 200 a 500 nm com máximo em torno de 450 nm e outra banda característica com máximo em 650 nm.⁵⁷ Tocoferóis apresentam absorção com máximos em 225 e 292 nm.⁶⁶ Carotenoides podem estar presentes em biodiesel dependendo da fonte de produção. Estes compostos apresentam máximo de absorção em torno de 450 nm, os quais não apresentaram bandas de absorção nas amostras avaliadas.^{67; 68; 69}

5.1.2 Fluorescência

A Figura 25 exibe os mapas de contorno (excitação/emissão) das amostras de biodiesel diluídas. Uma região de emissão entre 350 e 550 nm com máximo em torno de 420 nm foi identificada em todas as amostras quando submetidas à excitação entre 280 e 330 nm.

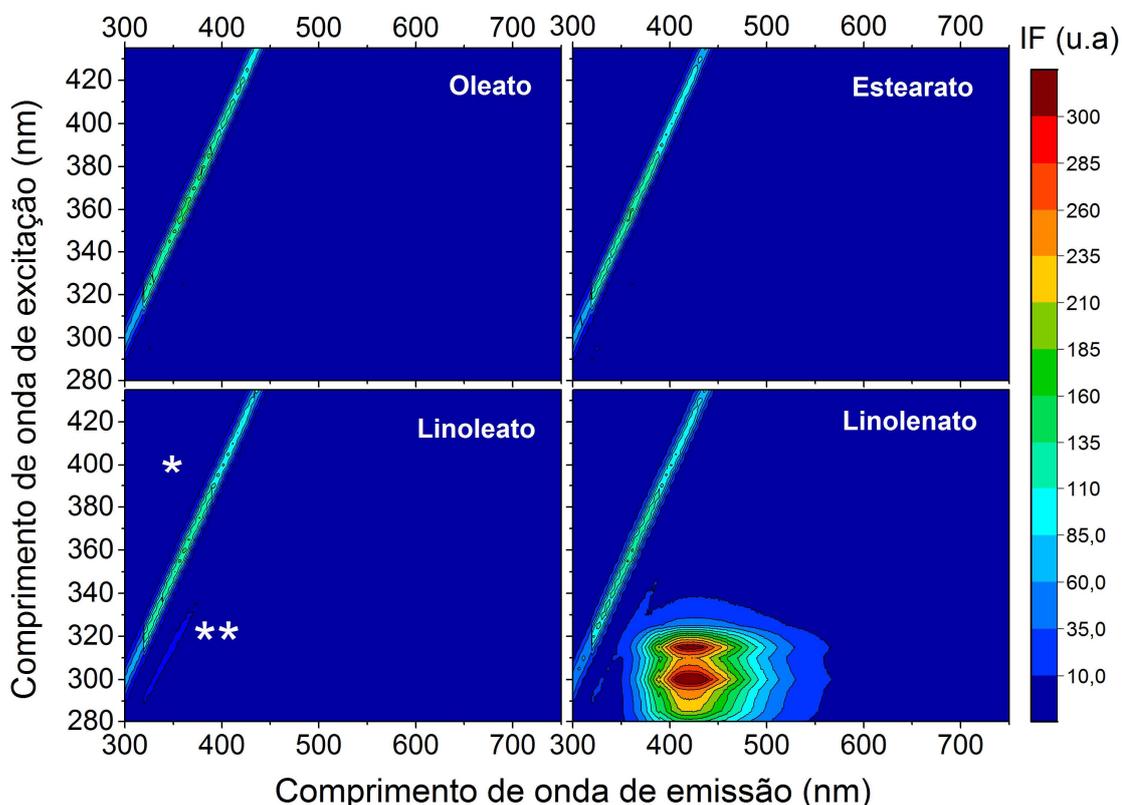
Figura 25 – Mapas de contorno de excitação/emissão dos biodieseis diluídos em hexano grau HPLC. $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Os espalhamentos Rayleigh (*) e Raman (**), também são mostrados nos gráficos.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 26 exibe os mapas de contorno de excitação/emissão obtidos para os padrões dos ésteres metílicos. Os padrões de estearato, oleato e linoleato de metila não apresentaram emissão nos intervalos espectrais investigados. Por sua vez, o mapa de contorno revela que a amostra de linolenato de metila (18:3) apresenta uma região de emissão entre 350 e 550 nm quando excitado na faixa 280-330 nm. Essas características de excitação/emissão são similares às aquelas observadas nas amostras de biodiesel (Figura 25).

Figura 26 – Mapas de contorno de excitação/emissão dos ésteres metílicos (padrão) diluídos em hexano. $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Os espalhamentos Rayleigh (*) e Raman (***) também são mostrados nos gráficos.



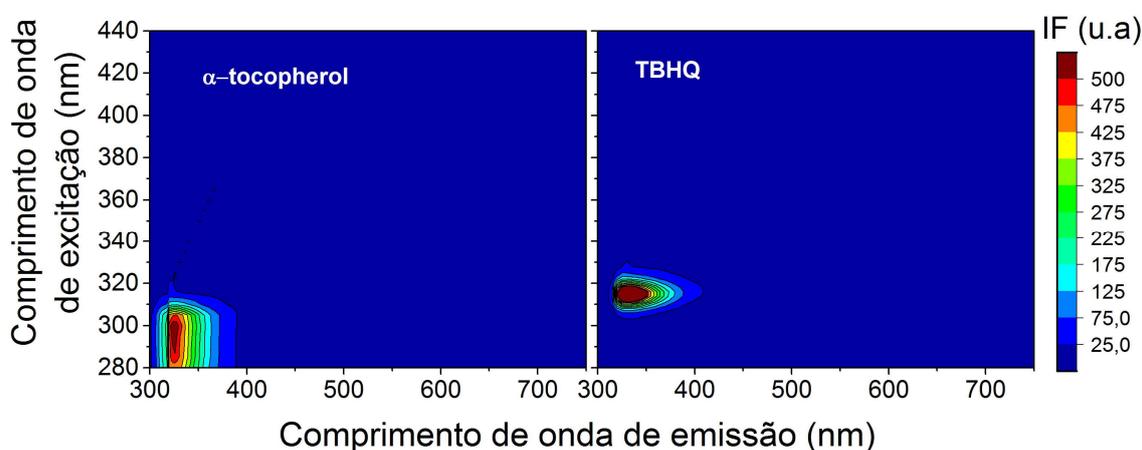
Fonte: Próprio autor.

A associação direta da emissão observada no biodiesel não pode ser atribuída à presença de éster linolênico uma vez que moléculas orgânicas lineares com um número de conjugações menores do que quatro não apresentam fluorescência. Portanto, os resultados obtidos indicam, assim como observado nos espectros de absorção UV-Vis, a possível presença de compostos minoritários, não só no biodiesel como também nos padrões de linoleato metílicos. Vale ressaltar que o perfil de excitação/emissão para padrão de linolenato de metila foi observado para duas amostras de lotes diferentes. Sabe-se que compostos tetraenos conjugados apresentam emissão na região de 420 nm quando excitados em 300 e 315 nm, de forma que tais moléculas podem ser, possivelmente, os cromóforos e fluoróforos detectados nas medições de absorção e fluorescência.

Embora pesquisadores tenham associado à emissão em torno de 420 nm a tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos como os antioxidantes sintéticos, tais compostos não

fluorescem nessa faixa.^{70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77} A Figura 27 mostra o mapa de contorno obtido para a amostra de α -tocoferol diluída em hexano grau HPLC. Uma região de emissão em torno de 300 e 380 nm é verificada quando a amostra é excitada entre 280 e 320 nm. A Figura 27 mostra ainda que o TBHQ diluído em etanol apresenta um mapa de contorno com máximo de emissão entre 315 e 400 nm com excitação em torno de 300 e 325 nm. Fica evidente que os espectros de emissão das amostras de biodiesel não são afetados significativamente pela presença destes compostos que podem estar presentes nas amostras.

Figura 27 – Mapas de contorno de excitação/emissão do tocoferol diluídos em hexano grau HPLC $0,39 \text{ mmol L}^{-1}$. Antioxidante TBHQ diluído em etanol grau HPLC $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.



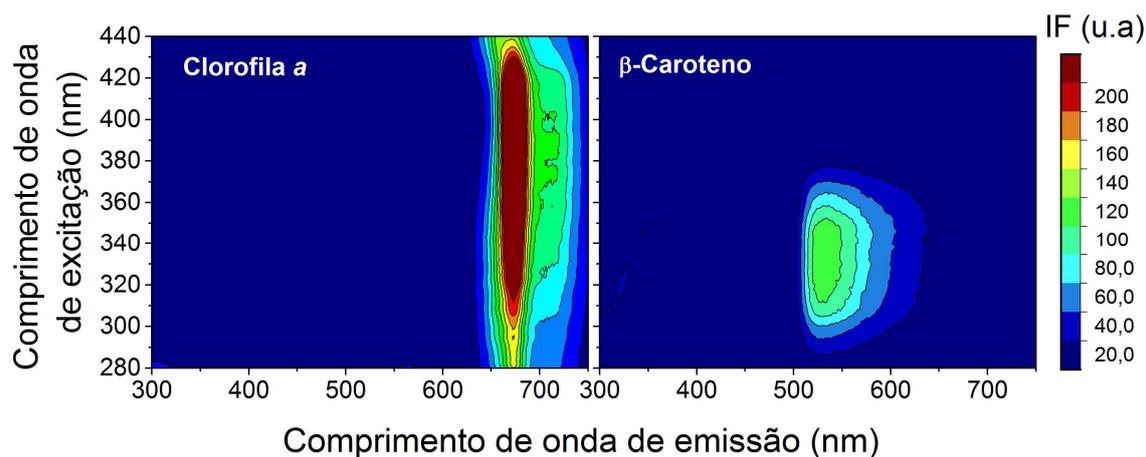
Fonte: Próprio autor.

A Figura 28 apresenta os mapas de contorno de excitação/emissão obtido para as amostras de β -caroteno e clorofila *a*. O espectro de excitação/emissão do β -caroteno diluído em hexano apresenta uma região de emissão entre 500 e 650 nm quando excitadas entre 280 e 380 nm. Verifica-se que a região de excitação/emissão é distinta daquela observada nos ésteres estudados, compostos fenólicos e tocoferóis.⁶³ Portanto, o β -caroteno não apresenta significativa contribuição para os espectros de absorção e excitação/emissão das amostras estudadas.

Para também avaliar uma possível contribuição da clorofila no mapa de excitação/emissão das amostras de biodiesel, uma medição na mesma região espectral foi realizada em uma amostra de clorofila purificada (Figura 28). Os resultados indicam que a clorofila apresenta uma emissão característica das porfirinas³² com máximo de fluorescência em torno de 660 nm. Esta emissão pode contribuir para a fluorescência observada em biodieseis com alta concentração de clorofila, devido à absorção da clorofila na mesma região

de tetraenos conjugados. Neste estudo não se observou uma contribuição detectável da fluorescência da clorofila nas amostras avaliadas. Ademais, o regime de excitação/emissão da clorofila ocorre em faixas distintas daquelas verificadas nas amostras de biodiesel.

Figura 28 – Mapas de contorno de excitação/emissão da clorofila a purificada diluída em metanol e β -caroteno diluído em hexano grau HPLC 0,28 mmol L⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

5.1.4 Ressonância magnética nuclear (RMN de ¹³C e ¹H)

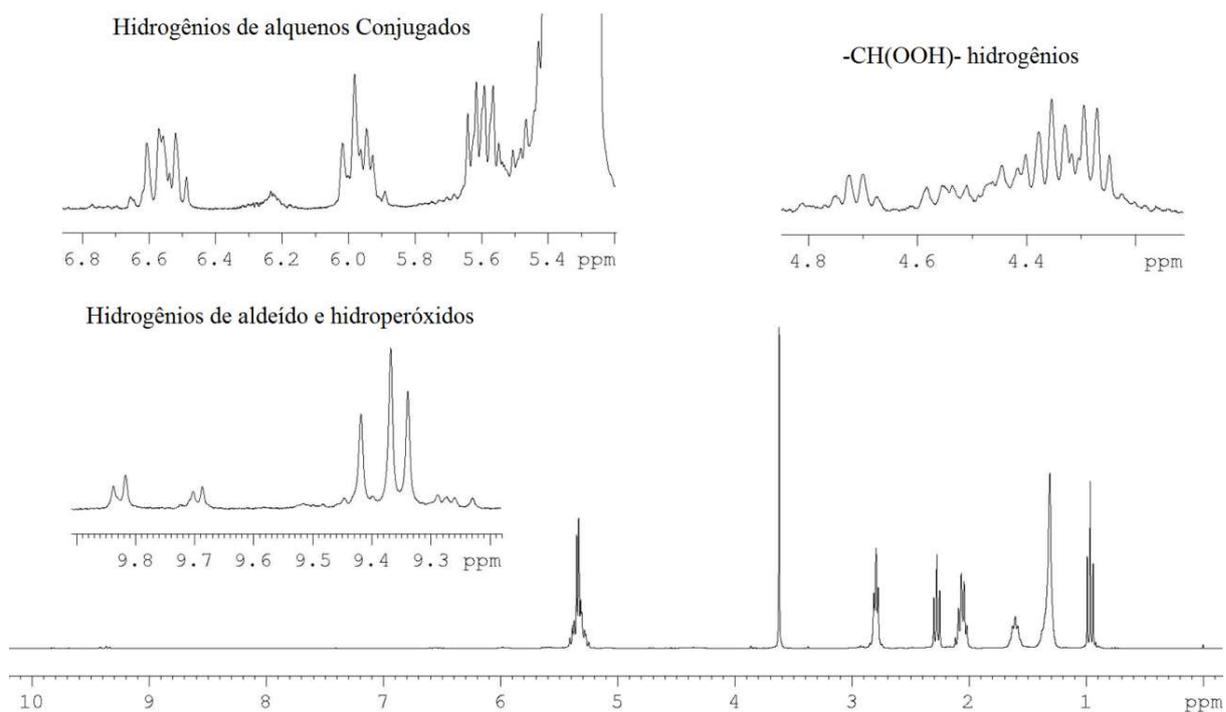
Os espectros de fluorescência observados nos padrões dos ésteres metílicos, principalmente no padrão linolenato de metila, são semelhantes aos produzidos pelas amostras de biodiesel, sugerindo que os fluoróforos, em ambos os casos, estão estreitamente relacionados. As medições de RMN foram usadas para identificar os compostos minoritários presentes nos padrões de ésteres metílicos utilizados neste trabalho, os quais podem justificar os resultados de absorção UV-Vis e fluorescência.

A Figura 29 mostra o espectro de RMN de ¹H do linolenato de metila padrão. A Tabela 9 apresenta as atribuições de RMN de ¹H de ésteres metílicos padrão estudados: palmitato, estearato, oleato, linoleato, e linolenato. A Tabela 10 mostra as atribuições de RMN de alguns fragmentos de produtos possivelmente relacionados com a decomposição dos ésteres metílicos insaturados, linoleato e linolenato, confirmando a presença de compostos minoritários nos ésteres metílicos padrão.

A decomposição dos ésteres metílicos insaturados é semelhante à oxidação dos óleos comestíveis.⁷⁸ A oxidação destes compostos produz ligações duplas carbono-carbono conjugadas, que podem ser responsáveis pela fluorescência observada nos padrões.

A partir dos dados de RMN podem ser observados sinais correspondentes a fragmentos de hidroperóxi-alcenos, alcenais e hidroperóxi-alcenais. Os espectros de RMN de ^{13}C dos ésteres metálicos padrão também foram obtidos.

Figura 29 – Espectros de RMN de ^1H do padrão de linolenato de metila.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 – Atribuições de RMN de ^1H dos ésteres metílicos padrão estudados: palmitato, estearato, oleato, linoleato e linolenato.

^1H (multiplicidade, J)	Atribuições
<i>Palmitato de metila</i>	
0,88 (t, 6,9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,26 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,62 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,30 (t, 7,47)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
3,66 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
<i>Estearato de metila</i>	
0,88 (t, 6,9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,26 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,62 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,30 (t, 7,47)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
3,66 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
<i>Oleato de metila</i>	
0,80 (t, 6,9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,20 e 1,23 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,53 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,93 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,20(t, 7,47)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
3,55 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
5,16-5,32 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
<i>Linoleato de metila</i>	
0,89 (t, 6,9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,31 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,60 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,04 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,27 (t, 7,47)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,76(m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
3,62 (s)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
5,24-5,41 (m)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
<i>Linolenato de metila</i>	
0,96 (t, 6,9)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,31 (s)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
1,60 (m)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,06 (m)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,27 (t, 7,47)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
2,79 (m)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
3,62(s)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
5,23-5,42 (m)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$

Abreviações: s, simpleto; m, multipeto; t, tripleto.

Fonte: Próprio Autor.

Tabela 10 – Atribuições de RMN de alguns fragmentos possivelmente originados a partir da decomposição dos ésteres metílicos insaturados (linoleato e linolenato).

¹ H (multiplicidade, J)	¹³ C ^a	gHMBC ¹ H- ¹³ C	gTOCSY ¹ H- ¹ H	Atribuições
0,93 (t)	9,7	25,5; 86,9	1,51; 1,67; 4,30	CH ₃ CH ₂ CH(OOH)-
2,93 (m)	25,9	127,4; 130,7	5,38; 5,60; 6,00; 6,55	-CH=CHCH=CHCH ₂ CH=CH- ou -CH=CHCH=CHCH ₂ -
4,30 (m)	87,2	9,7; 25,5; 128,7	5,44; 5,60; 6,00; 6,55	CH ₃ CH ₂ CH(OOH)CH=CHCH=CH-
4,36 (m)	86,0	30,4; 128,7	5,44; 5,60; 6,00; 6,55	-CH=CHCH=CHCH(OOH)CH ₂
4,45 (m)	82,8	48,6	4,75	-
4,75 (m)	82,5	130,7	2,21; 2,48; 4,45; 5,60; 6,00; 6,55	CH=CHCH=CHCH(OOH)CH ₂ CH(OOH)-
5,44 (m)	ss	ss	4,36; 5,60; 6,00; 6,55	-CH=CHCH=CHCH(OOH)CH=CH- ou -CH=CHCH=CH-CH ₂ -
5,50 (m)	131,5	45,9; 86,0; 128,6	4,30	-CH=CHCH=CHCH(OOH)-
5,60 (dd; J ⁹⁻¹⁰ e ¹⁵⁻¹⁶ 8 Hz; J ¹⁰⁻¹¹ e ¹⁴⁻¹⁵ 15 Hz)	132,4	25,5; 30,5; 32,3; 86,0; 127,3	1,35; 2,93; 4,36; 5,38; 6,00; 6,55	-CH=CHCH=CHCH(OOH)-
6,00 (t; J ¹¹⁻¹² e ¹³⁻¹⁴ = J ¹²⁻¹³ 11 Hz)	127,7	20,8; 25,9; 27,1; 56,0; 86,5; 128,5; 132,0	1,35; 2,17; 2,93; 4,36; 5,41; 5,60; 6,55	-CH=CHCH=CHCH(OOH)- ou -CH=CHCH=CHCH=CHCH(OOH)-
6,55 (dd; J ¹⁰⁻¹¹ e ¹⁴⁻¹⁵ 15 Hz; J ¹¹⁻¹² e ¹³⁻¹⁴ 11 Hz)	129,0	85,6; 86,9; 127,7; 130,6	1,35; 2,93; 4,36; 5,44; 5,60; 6,00	-CH=CHCH=CHCH(OOH)-
9,34/ 9,37/ 9,42 (s)	-	-	2,25; 9,70; 9,78	-CH=CHCHO ou -CH=CHCH(OOH)CH ₂ - ou -CH=CHCH(OOH)CH=CH- ou -CH=CHCH=CHCH(OOH)-
9,70 (d, 7,76)	-	-	2,25; 9,37	-CH=CHCH=CHCHO ou -CH=CHCHO ou -CH(OOH)CH=CHCHO ou -CH=CHCH(OOH)CH=CH-
9,78 (d, 10,26)	-	-	2,25; 9,37	-CH=CHCH=CHCHO ou -CH=CHCHO ou -CH(OOH)CH=CHCHO ou -CH=CHCH(OOH)CH=CH-
-	174,0	-	-	R-COOCH ₃

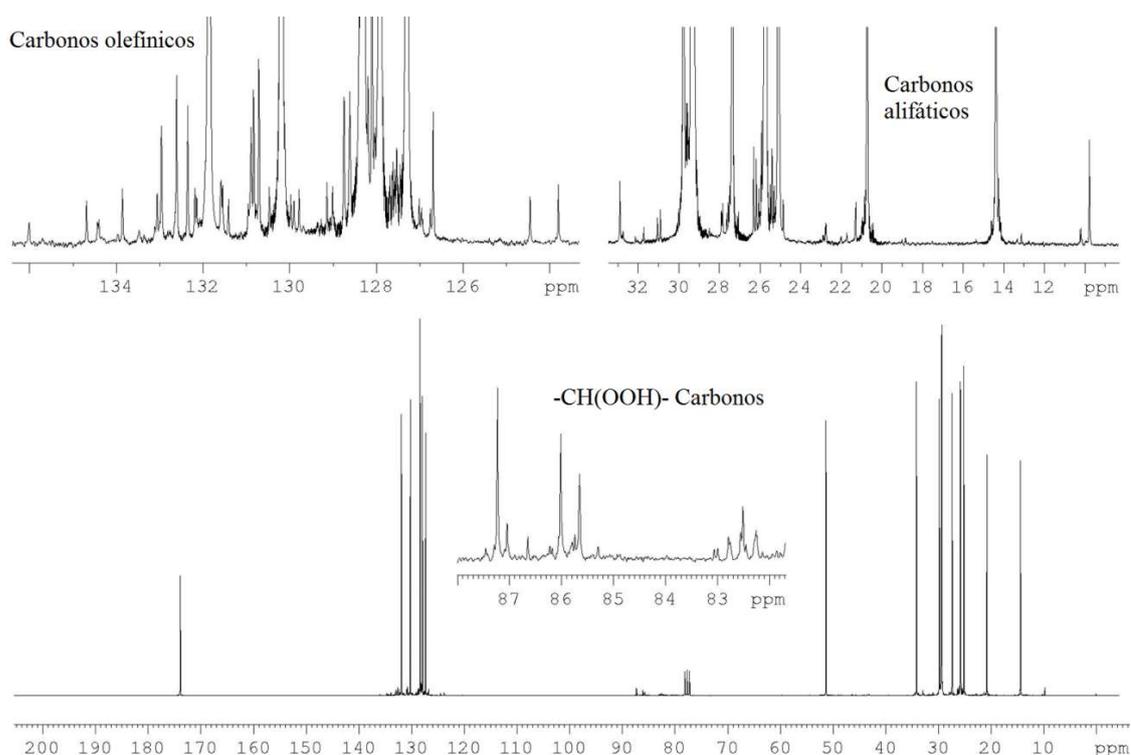
^a Atribuição confirmada pelo experimento de gHSQC.

Abreviaturas: s, simpleto; d, duplete; dd, duplo duplete; m, multiplete; t, tripleto; ss, sinal sobreposto com éster metílico.

Fonte: Próprio Autor.

A Figura 30 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do linolenato de metila, enquanto que a Tabela 10 resume os resultados de RMN para o linoleato e linolenato de metila com as respectivas atribuições.

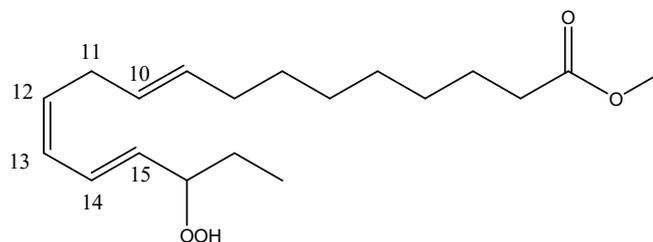
Figura 30 – Espectro de RMN de ^{13}C do linolenato de metila padrão.



Fonte: Próprio autor.

Entre os vários sinais de RMN dos produtos minoritários, o composto principal possui o grupo hidropoxi-alcenos, devido à alta intensidade em aproximadamente 86 ppm de átomos de carbono (Figura 30). Estes carbonos estão diretamente correlacionados com hidrogênios hidropoxi em 4,30 - 4,74 ppm.⁷⁸ Hidrogênios olefinicos (sinais 5,50; 5,60; 6,00 e 6,55 ppm) apresentaram correlação à longa distância (gHMBC) com carbonos entre 82 e 87 ppm, sugerindo a sua proximidade com os carbonos ligados ao grupo hidropoxi (-OOH). Os hidrogênios *bis*-alílicos em 2,93 ppm correlacionados com hidrogênios olefinicos, a partir dos experimentos de gTOCSY (Tabela 10), confirmam a estrutura do produto principal minoritário de decomposição do linolenato de metila (Figura 31).⁷⁹ Esse produto principal de degradação também foi detectado para o linoleato de metila, no entanto, em menor concentração (ver apêndice para as figuras dos dados obtidos a partir dos experimentos de RMN bidimensionais).

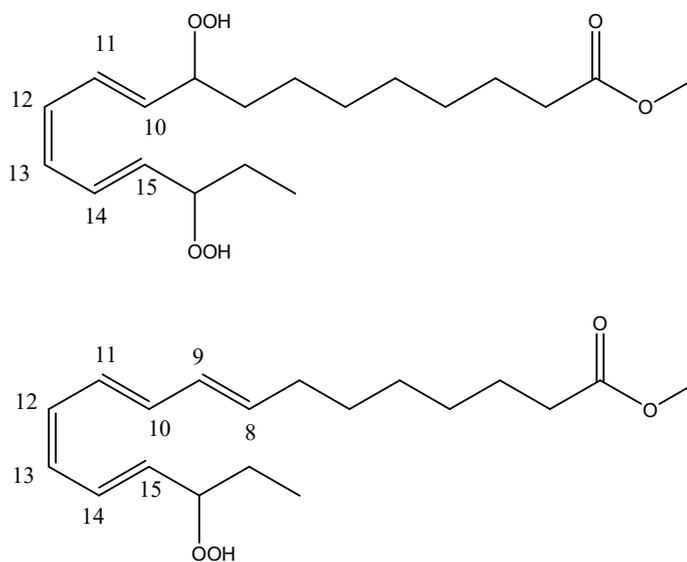
Figura 31 – Produto principal entre os compostos minoritários, originado a partir da decomposição do linolenato.



Fonte: Próprio autor.

Por outro lado, o grande número de sinais de RMN próximos a hidroperóxidos, olefínicos e carbonos alifáticos evidenciou diversas estruturas semelhantes, entre as quais hidroperoxi-alcenos tetra-conjugados (Figura 32). Para os trienos conjugados, as atribuições de RMN de ^1H foram δ 5,56 (dd; H-10 e H-15; $J^{9-10 \text{ e } 15-16}$ 8 Hz; $J^{10-11 \text{ e } 14-15}$ 15 Hz); δ 6,00 (t; H-12 e 13; $J^{11-12 \text{ e } 13-14} = J^{12-13}$ 11 Hz); δ 6,52 (dd; H-11 e H-14; $J^{10-11 \text{ e } 14-15}$ 15 Hz; $J^{11-12 \text{ e } 13-14}$ 11 Hz). Para os compostos tetraenos conjugados (Figura 32), as atribuições de RMN de ^1H foram δ 5,44 (m; H-8); δ 5,50 (m; H-9 e 10); δ 5,60 (dd; H-15; $J^{9-10 \text{ e } 15-16}$ 8 Hz; $J^{10-11 \text{ e } 14-15}$ 15 Hz); δ 6,08 (t; H-12 e 13; $J^{11-12 \text{ e } 13-14} = J^{12-13}$ 11 Hz); δ 6,55 ppm (dd; H-11 e 14; $J^{10-11 \text{ e } 14-15}$ 15 Hz; $J^{11-12 \text{ e } 13-14}$ 11 Hz). Estas estruturas foram propostas baseadas em resultados reportados na literatura.^{80; 81; 82}

Figura 32 – Possíveis estruturas de trienos (superior) e tetraenos (inferior) conjugados derivados da decomposição do linolenato de metila (padrão).



Fonte: Próprio autor.

Portanto, os dados de RMN apontaram a presença de compostos minoritários nas amostras de ésteres metílicos padrão, incluindo dienos, trienos e tetraenos conjugados. Logo, pode-se afirmar que tendo como base todos os estudos conduzidos, os cromóforos podem ser identificados como dienos em torno de 232 nm, trienos em torno de 260 e 290 nm e tetraenos conjugados com absorção em 300 e 315 nm. Ademais, indica-se os tetraenos como fluoróforos responsáveis pela emissão no intervalo 400 e 500 nm. Dessa forma, o potencial dessas moléculas como sonda no monitoramento da degradação do biodiesel foi avaliado, com resultados apresentados nas seções subseqüentes.

5.2 Estudo espectroscópico da degradação do biodiesel em função da temperatura

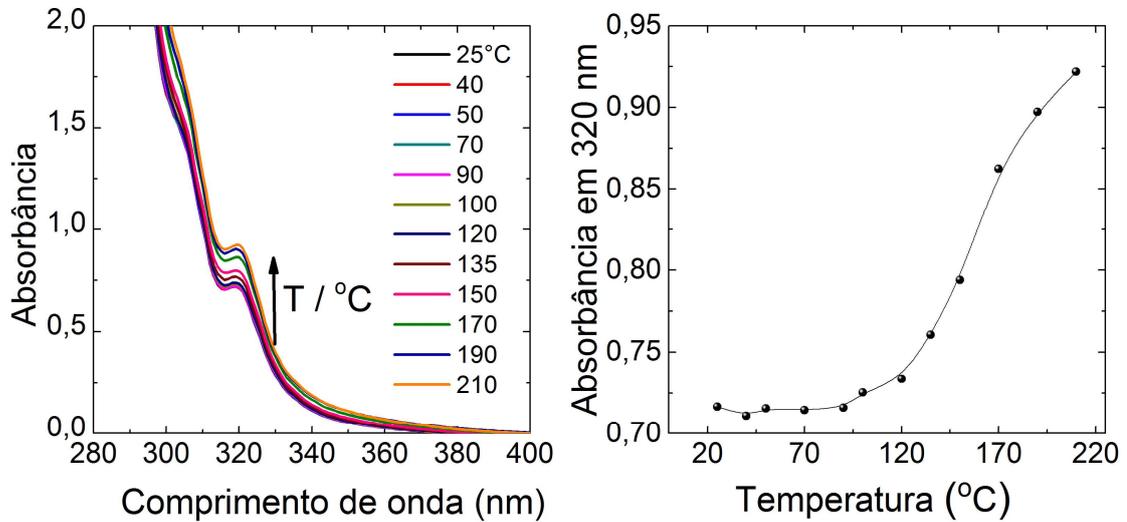
Sabendo-se que a fluorescência das amostras de biodiesel está associada à presença de tetraenos conjugados em sua composição, propõe-se avaliar o potencial da emissão como sonda para o monitoramento de processos de degradação de biodiesel produzido a partir de diferentes fontes oleaginosas. Amostras de biodiesel de soja e canola foram submetidas ao teste acelerado para promover a degradação em estufa sem fluxo de ar induzido. Assim, buscou-se avaliar possíveis mudanças, induzidas por esse tratamento, na características da absorção UV-Vis e fluorescência e possíveis justificativas para as alterações.

5.2.1 Absorção UV-Vis

Os espectros de absorção UV-Vis das amostras não diluídas em função da temperatura de tratamento são exibidos na Figura 33. No espectro de absorção destaca-se a banda em torno de 300 e 320 nm atribuída à presença de tetraenos conjugados.^{42; 54}

Nota-se que essa banda sofre um aumento significativo em decorrência do tratamento das amostras. A Figura 33 mostra também que a absorbância em 320 nm em função da temperatura foi alterada nas amostras submetidas ao aquecimento em temperaturas superiores a 100 °C. Esse aumento na absorção molecular está associado à formação de compostos decorrentes da degradação do biodiesel como formação de tetraenos com ligações duplas conjugadas, as quais absorvem energia nessa faixa do espectro.

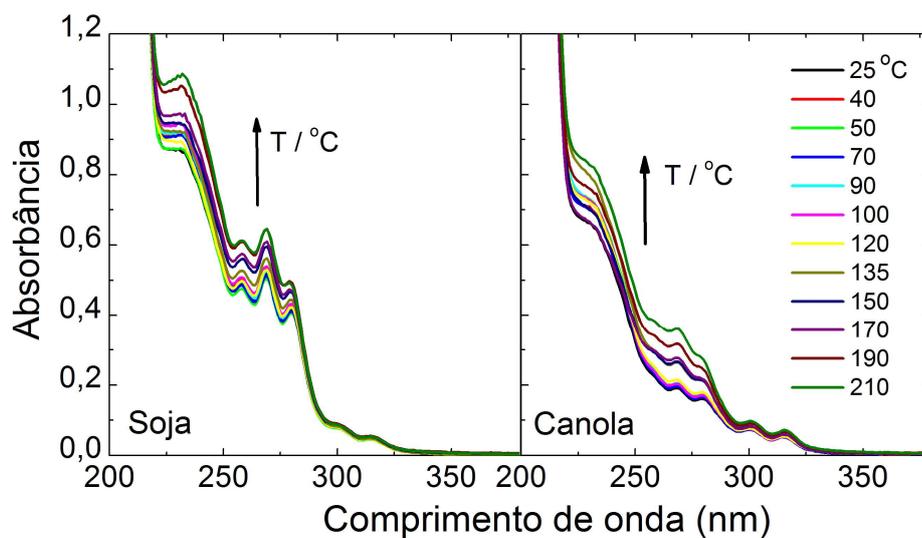
Figura 33 – Espectros de absorção UV-Vis do biodiesel de soja e absorbância em 320 nm em função da temperatura. Amostras não diluídas.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 34 são apresentados os espectros de absorção UV-Vis das amostras de biodiesel de soja e canola diluídas em hexano em função da temperatura. A diluição permite evidenciar os perfis das bandas de absorção sem efeitos provocados por reabsorção de energia.

Figura 34 - Espectro de absorção das amostras de biodiesel de soja e canola em função da temperatura, diluídos em hexano grau HPLC, $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.



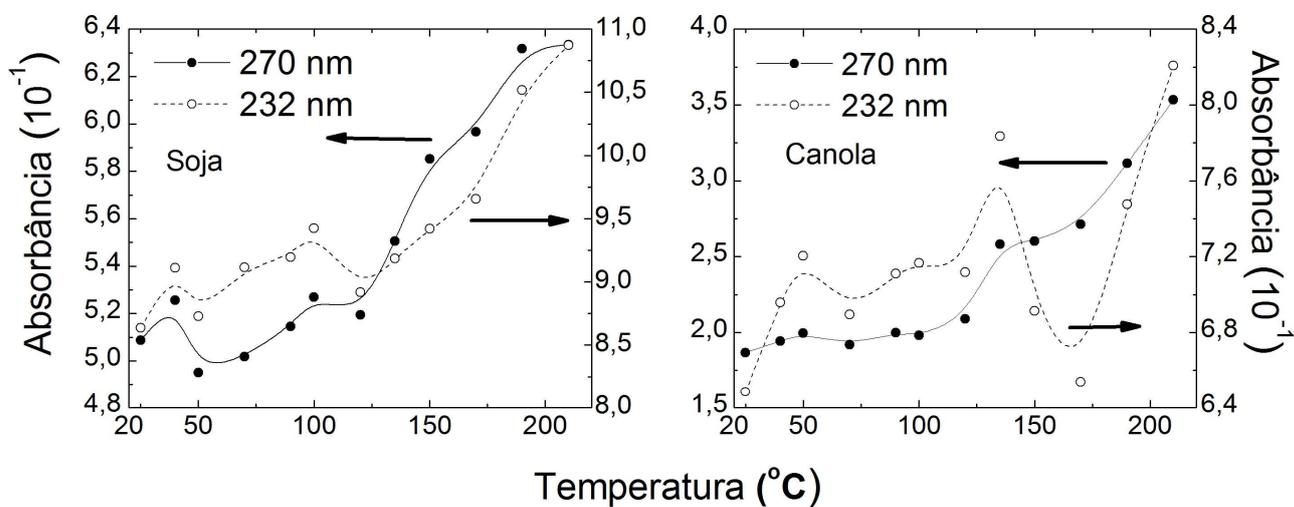
Fonte: Próprio autor.

Bandas de absorção com máximos em torno de 232, 260, 270, 280, 300 e 315 nm foram observadas em todas as amostras, indicando que os compostos responsáveis por tais absorções tanto no biodiesel de soja como no biodiesel de canola são similares. Contudo, percebe-se que as concentrações desses cromóforos no biodiesel de soja e canola são distintas, uma vez que as intensidades de absorção em torno de uma dada região espectral são diferentes.

A banda de absorção em torno de 232 nm pode ser atribuída a compostos hidroperóxidos com duas ligações duplas conjugadas C=C (dienos conjugados), os quais são produtos das etapas iniciais do processo de oxidação dos ésteres metílicos.^{60; 61; 62} A absorção na região 260-290 nm se deve à presença de produtos secundários, como trienos conjugados, decorrentes do mecanismo de degradação.^{83; 84} Por sua vez, as bandas de absorção em aproximadamente 300 e 315 nm estão associadas a compostos tetraenos conjugados.⁵⁶ A Figura 33 também revela a presença de dienos, trienos e tetraenos conjugados nos biodieseis que não sofreram tratamento térmico, indicando que os óleos vegetais utilizados como matéria-prima continham tri-ésteres de ácidos graxos insaturados com ligações duplas conjugadas inerentes da composição do óleo ou da eventual degradação dos mesmos.

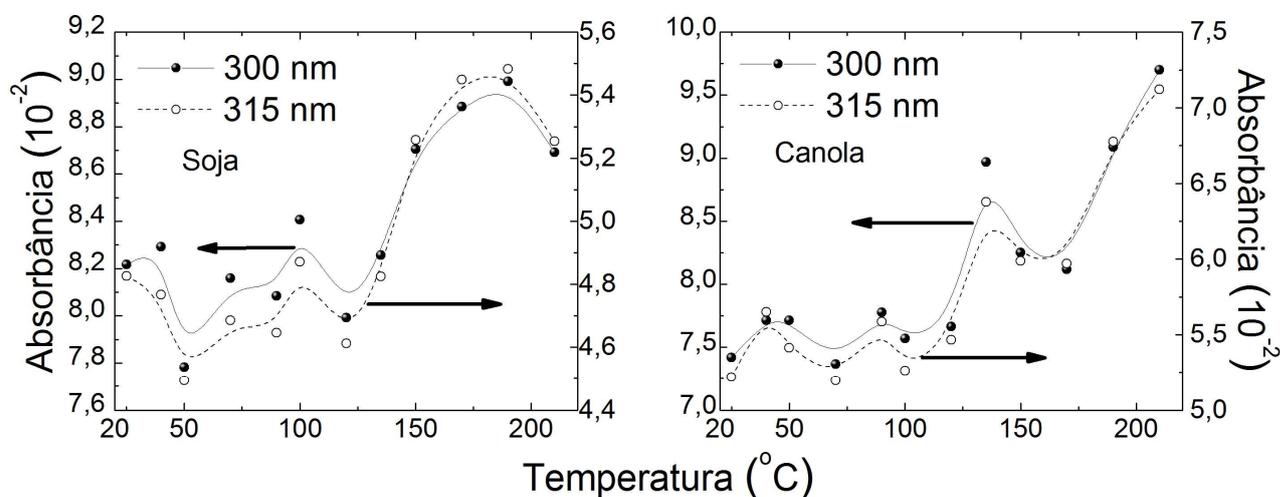
O efeito da temperatura nos espectros de absorção do biodiesel de soja e canola diluídos pode ser melhor avaliado usando os dados exibidos na Figura 35 e 36. A absorbância em torno de 232, 270, 300 e 315 nm aumentou nas amostras de biodiesel de soja e canola submetidas a temperaturas superiores a 100 °C. Esse aumento pode ser atribuído ao mecanismo de oxidação, como previamente discutido, responsável por alterações na posição das duplas ligações dos ésteres de ácidos graxos insaturados, e conseqüentemente à formação de moléculas com duas, três e quatro ligações duplas conjugadas (dienos, trienos e tetraenos conjugados).⁵⁶

Figura 35 – Absorbância em 232 e 270 nm para as amostras de biodiesel de soja e canola em função da temperatura, diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

Figura 36 – Absorbância em 300 e 315 nm para as amostras de biodiesel de soja e canola em função da temperatura diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

As suaves oscilações nos valores de absorbância podem estar associadas à competição entre a formação de espécies absorvedoras e a cinética de oxidação lipídica. Portanto, o monitoramento da absorção UV dos cromóforos presentes no biodiesel diluído (dienos, trienos e tetraenos conjugados) permite, de fato, acompanhar claramente a evolução da concentração dos compostos de degradação decorrentes do aquecimento do biodiesel. Além disso, verificou-se que mesmo as medições de absorção UV-Vis nas amostras não diluídas

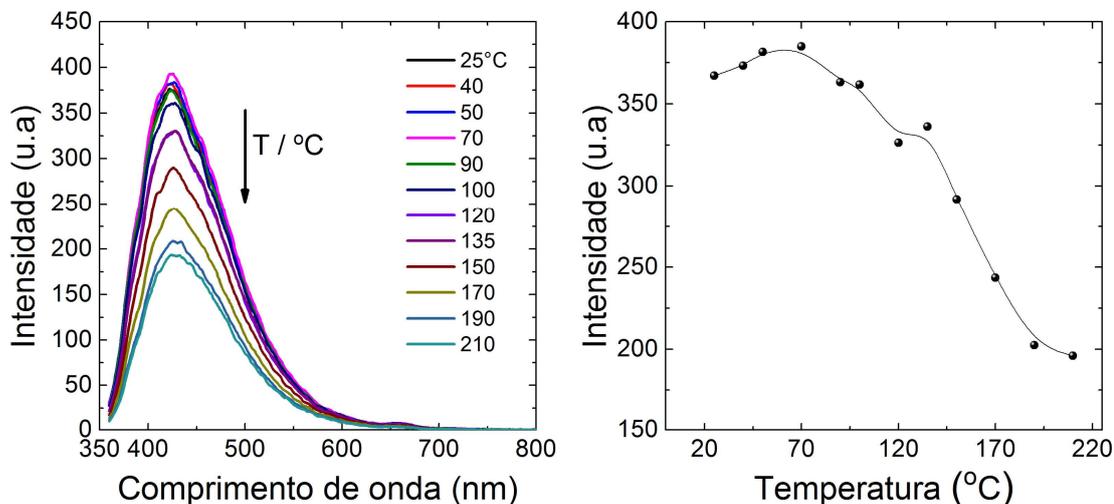
proporcionaram um indicativo de modificações na estrutura eletrônica das amostras devido à formação de novos compostos tetraenos conjugados.

Vale destacar que os resultados obtidos mostram que as amostras de biodiesel sofrem alterações nos espectros de absorção em temperatura acima de 100 °C, temperatura essa utilizada no método *Rancimat* devido à formação de compostos voláteis decorrentes da degradação de óleos e biodiesel, corroborando assim com os resultados obtidos neste trabalho.

5.2.2 Fluorescência

Os espectros de fluorescência das amostras de biodiesel de soja não diluídas excitadas em 350 nm para diferentes temperaturas são apresentados na Figura 37. As amostras apresentam o espectro de emissão em torno de 350 e 550 nm. A Figura 37 destaca ainda a dependência entre intensidade de fluorescência em 430 nm e a temperatura.

Figura 37 – Espectro de fluorescência em excitação em 350 nm e intensidade de emissão em 430 nm em função da temperatura de degradação. Amostras não diluídas.



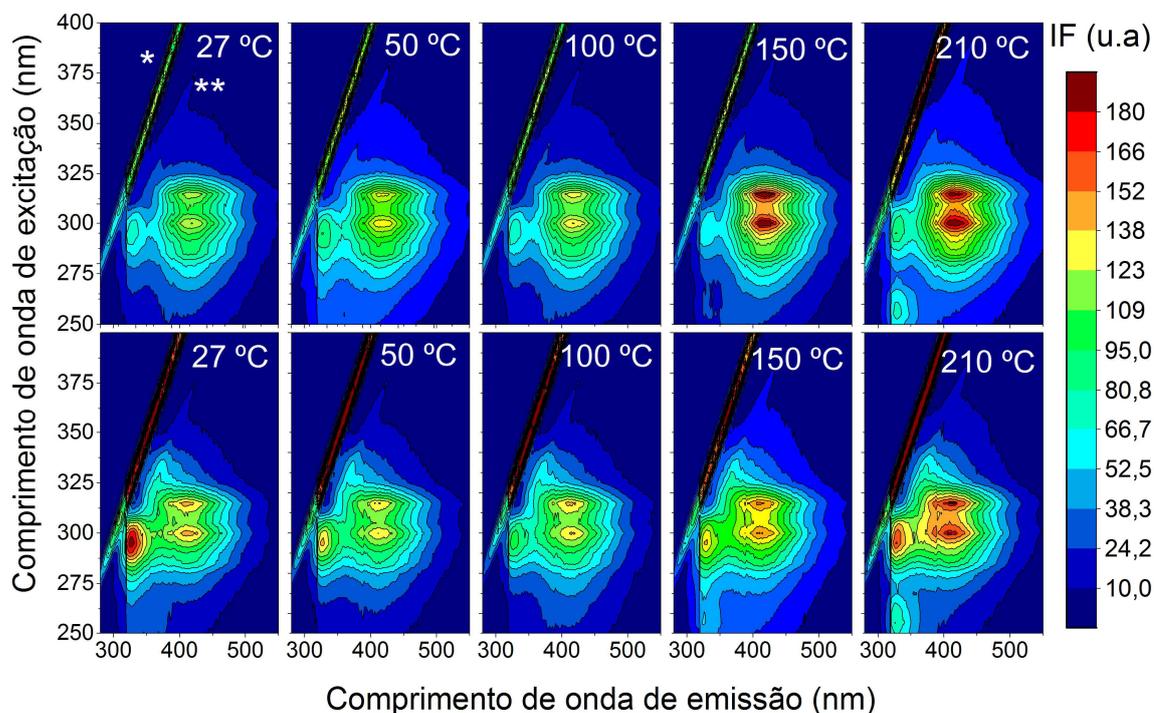
Fonte: Próprio autor.

Verifica-se que as intensidades de fluorescência em 430 nm em função da temperatura diminuem significativamente a partir de 100 °C, indicando que os processos de degradação, ao afetarem os espectros de absorção molecular, provocam mudanças no perfil de intensidade dos espectros de fluorescência no mesmo intervalo de temperaturas. Resultados similares foram observados para as amostras de biodiesel de canola (dados não mostrados).

Os resultados obtidos anteriormente relatam a identificação dos tetraenos conjugados como responsáveis pela fluorescência do biodiesel no intervalo entre 350 e 600 nm.⁵⁶ Os resultados de absorção UV-Vis indicam que a concentração dessas moléculas aumenta como resultado da degradação dos compostos presentes nesse biocombustível. Os dados exibidos na Figura 37 revelam um comportamento de diminuição da intensidade de fluorescência, efeito este que pode ser devido as amostras não estarem diluídas e apresentarem processos de reabsorção, que contribuem para alteração do espectro de emissão, alterando máximos de excitação e emissão. Portanto, para avaliar adequadamente a evolução de processos oxidativos em sistemas complexos faz-se necessária a diluição das amostras em concentrações que apresentem absorvância menor do que 0,1 para fins de correlação com resultados de fluorescência.

Diante desse cenário, mapas de contorno de excitação/emissão das amostras de biodiesel de soja e canola diluídas, submetidas a aquecimento, foram obtidos. A Figura 38 mostra alguns mapas representativos do conjunto de medições.

Figura 38 – Mapas de contorno de excitação/emissão das amostras de biodiesel de soja (superior) e canola (inferior) em função da temperatura. As amostras foram diluídas em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL⁻¹. Espalhamentos Rayleigh (*) e Raman (***) também são exibidos.

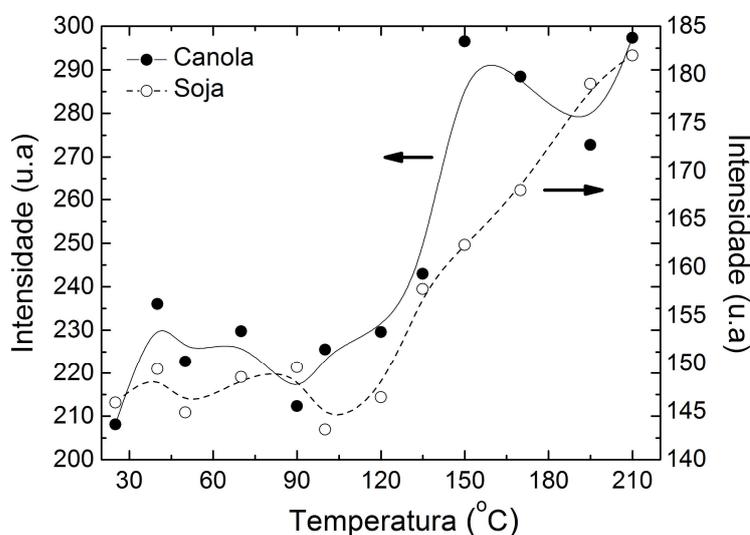


Fonte: Próprio autor.

De modo geral, os resultados indicaram que os mapas de contorno tanto do biodiesel de soja quanto de canola apresentaram perfil espectral similar em função do tratamento térmico, destacando-se três regiões de excitação/emissão. Uma região com emissão entre 300 e 350 nm, característica de compostos fenólicos e tocoferóis, associada à excitação na faixa entre 270 e 310 nm.⁸⁵ Duas outras regiões com emissão entre 350 e 550 nm foram observadas quando as amostras foram excitadas em torno de 300 e 315 nm, as quais são associadas com absorção dos tetraenos e fluorescência de tetraenos conjugados.

A Figura 38 também revela diferenças nas intensidades de fluorescência nas amostras submetidas a tratamento em temperaturas acima de 100 °C. Para destacar as mudanças na fluorescência do biodiesel de soja e canola diluídos como resultado do tratamento térmico, a Figura 39 exibe a intensidade de emissão em 420 nm, sob excitação em 300 nm, em função da temperatura.

Figura 39 – Intensidade de fluorescência em 420 nm com excitação em 300 nm obtido para as amostras de biodiesel de soja em função da temperatura, diluídos em hexano grau HPLC, 1,0 mg mL⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

As intensidades de emissão do biodiesel de soja e canola apresentam a mesma dependência com a temperatura de tratamento. Um aumento sistemático na intensidade de fluorescência do biodiesel com a temperatura foi observado a partir de 100 °C. Similar comportamento pode ser verificado para a intensidade de fluorescência das amostras excitadas em 315 nm (dados não mostrados). O comportamento da intensidade de fluorescência com a temperatura de tratamento é semelhante àquele verificado a partir das medições de absorção

UV-Vis. Portanto, os dados corroboram a formação de tetraenos conjugados como resultado da degradação dos ésteres metílicos, uma vez que essas moléculas absorvem em torno de 300 e 315 nm e emitem em torno de 420 nm.

Os resultados demonstram a viabilidade de se utilizar tanto a absorção quanto a fluorescência dos tetraenos conjugados para monitoramento da degradação de compostos presentes no biodiesel.

Os resultados mostraram ainda que as amostras diluídas ou não apresentam mudanças significativas nos espectros de absorção em fluorescência. Portanto, um método simples, de baixo custo e potencialmente robusto pode ser desenvolvido utilizando essas técnicas. Diante de tais resultados, faz-se necessária a avaliação das técnicas para o monitoramento da degradação em tempo real adotando uma metodologia semelhante aos métodos convencionais de avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel.

5.3 Estudo espectroscópico da degradação do biodiesel sob fluxo de ar em função do tempo

Visando investigar a possibilidade de se empregar a absorção e fluorescência para monitorar a estabilidade oxidativa do biodiesel submetido a um tratamento térmico a temperatura fixa em função do tempo, uma série de experimentos foram realizados, onde a temperatura e fluxo de ar foram fatores avaliados neste processo.

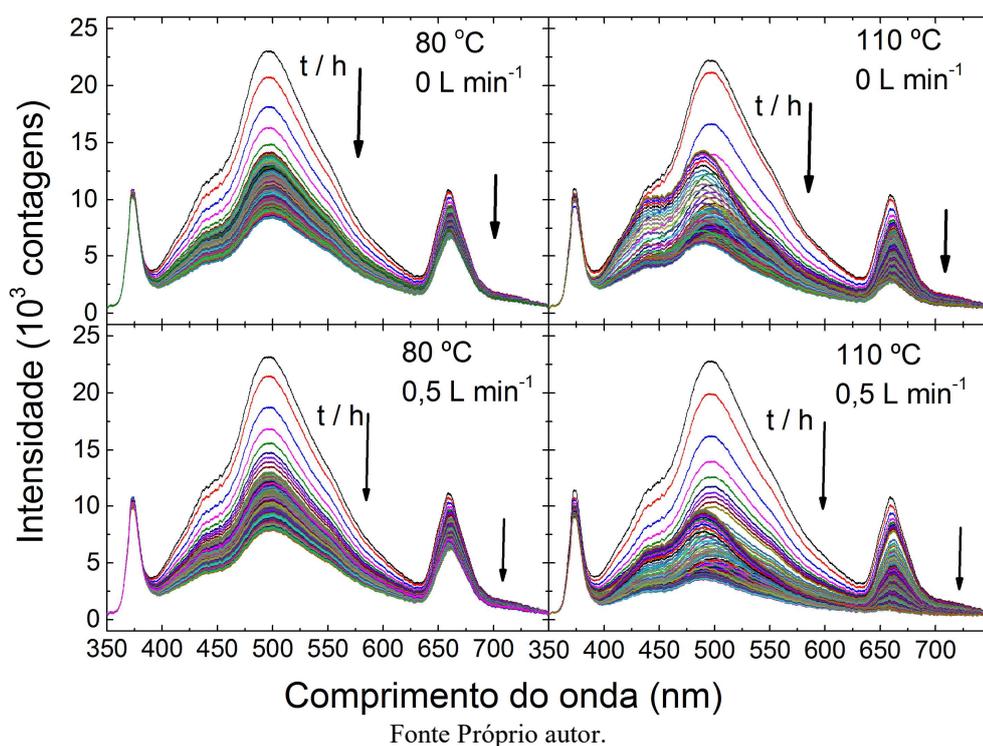
Neste estudo as amostras de biodiesel foram submetidas a temperaturas distintas, 80 e 110 °C durante 11 horas, conforme descrito na sessão 4.4. A temperatura de 110 °C foi escolhida devido aos resultados obtidos com a degradação da amostra em função da temperatura (seção 5.2), que indicaram que os espectros de absorção e fluorescência sofrem alterações acima desta temperatura. Nos métodos tradicionais de oxidação acelerada, como o método *Rancimat* também são utilizadas as temperaturas estudadas neste trabalho. Os experimentos também foram conduzidos a temperatura de 80 °C para verificar se a presença de oxigênio induziria alterações na absorção e fluorescência mesmo abaixo de 110 °C.

5.3.1 Fluorescência em tempo real induzida com LED

A Figura 40 mostra os espectros de fluorescência em função do tempo para as amostras de biodiesel de soja tratadas em 80 e 110 °C sem fluxo de ar e com fluxo de ar. Em todos os casos os espectros de fluorescência apresentam uma banda de emissão com máximo em torno

de 495 nm devido à presença de tetraenos conjugados, e outra banda em torno de 660 nm devido à presença de clorofila na amostra de biodiesel de soja proveniente do óleo precursor. Nestes experimentos, a presença da clorofila pode ser constatada em decorrência da amostra não estar diluída no béquer. Os resultados demonstram uma diminuição da intensidade de fluorescência tanto para a banda em 495 nm quanto para a banda em 660 nm, indicando que as bandas de emissão são afetados pela temperatura e fluxo de ar. Verifica-se também que o perfil da banda de emissão com máximo em torno de 495 nm sofre uma mudança mais acentuada quando tratada a 110 °C.

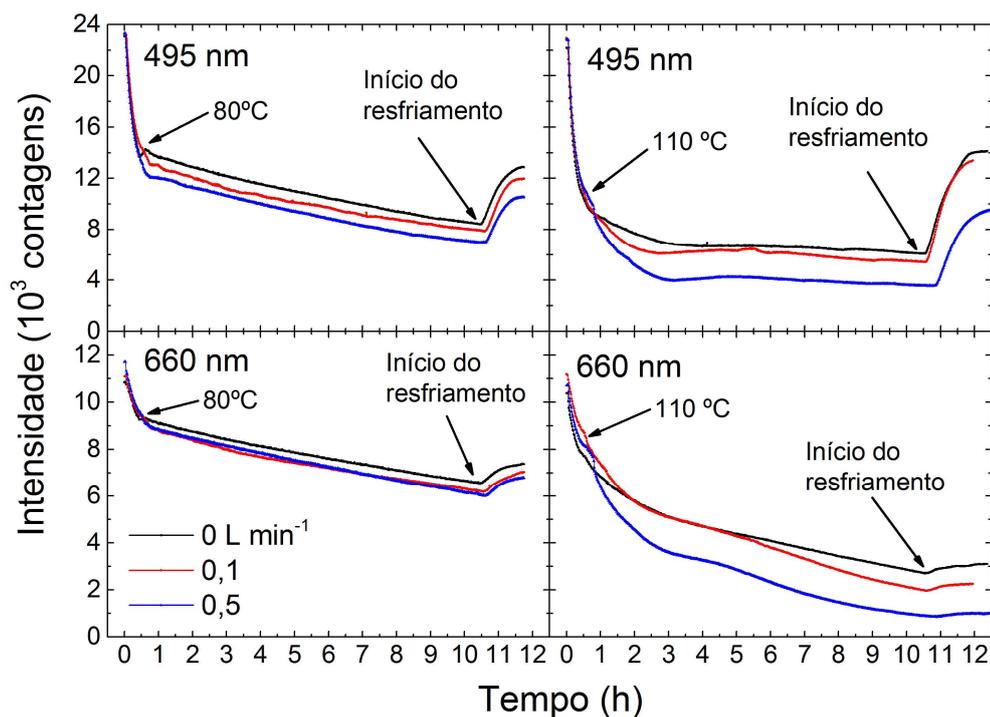
Figura 40 – Espectros de fluorescência do biodiesel de soja em função do tempo de tratamento, com excitação em 380 nm obtidos para as amostras tratadas a 80 e 110 °C, com e sem fluxo de ar. A banda em 380 nm é decorrente da fonte de excitação. Amostras não diluídas.



A Figura 41 apresenta a intensidade de fluorescência em 495 e 660 nm em função do tempo para os experimentos a 80 e 110 °C em variados fluxos de ar. Os resultados mostram que a intensidade de fluorescência sofre uma queda acentuada durante os 40 minutos iniciais, devido à mudança de viscosidade do meio vinculada ao aquecimento desde temperatura ambiente até 80 ou 110 °C. Sabe-se que a intensidade de fluorescência é diretamente afetada pela viscosidade do meio, pois são favorecidos processos de desativação da fluorescência,

onde o fluoróforo perde energia por processos vibracionais/colisionais.⁴³ Por sua vez, a viscosidade de óleos e biodieséis é fortemente relacionada a temperatura do meio, de forma que é sabido que à medida que a temperatura aumenta, a viscosidade do meio diminui.⁴³

Figura 41 – Intensidade de fluorescência a 495 e 660 nm das amostras tratadas a 80 e 110 °C em função do tempo, sob fluxo de ar de 0, 0,1 e 0,5 L min⁻¹.

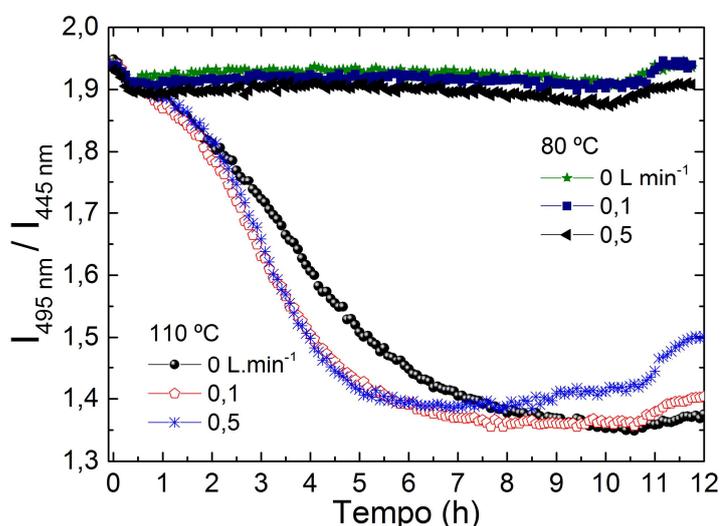


Fonte: Próprio autor.

A Figura 41 também indica que depois de atingida a temperatura pré-estabelecida (80 ou 110 °C) a intensidade de fluorescência em 495 e 660 nm continuou diminuindo até 11 h, contudo de forma menos pronunciada. O efeito do fluxo de ar sobre a intensidade de fluorescência pode ser constatado, uma vez que quanto maior o fluxo de ar maior a redução na intensidade de fluorescência, evidenciada no tratamento a 110 °C. Após 11 h o aquecimento e o fluxo de ar foram interrompidos, proporcionando um aumento discreto na intensidade de fluorescência em 495 e 660 nm até as amostras atingirem aproximadamente 30 °C. No entanto, ao final do resfriamento os valores das intensidades de fluorescência não retornaram ao início, o que pode ser devido à degradação da amostra provocando mudanças nos cromóforos presentes e devido à mudança da viscosidade do meio, fazendo com que os processos sejam desativados por outros meios não radiativos.

A Figura 42 mostra a razão entre as intensidades de fluorescência em 495 e 445 nm em função do tempo. Os resultados indicam que as razões vinculadas às amostras submetidas a 80 °C, independente do fluxo de ar, não foram afetadas consideravelmente pelo aquecimento, comportamento oposto ao observado nos biodieseis mantidos a 110 °C. Os resultados mostraram uma queda na razão para as amostras tratadas a 110 °C desde as primeiras horas de tratamento e estabilizando após 5 horas, indicando que as amostras tratadas com maior fluxo de ar apresentam uma queda mais acentuada quando comparada a amostra tratada sem fluxo de ar induzido.

Figura 42 – Razão da intensidade de fluorescência em 495 e 445 nm em função do tempo das amostras submetidas a 80 e 110 °C e diferentes fluxos de ar.



Fonte: Próprio autor.

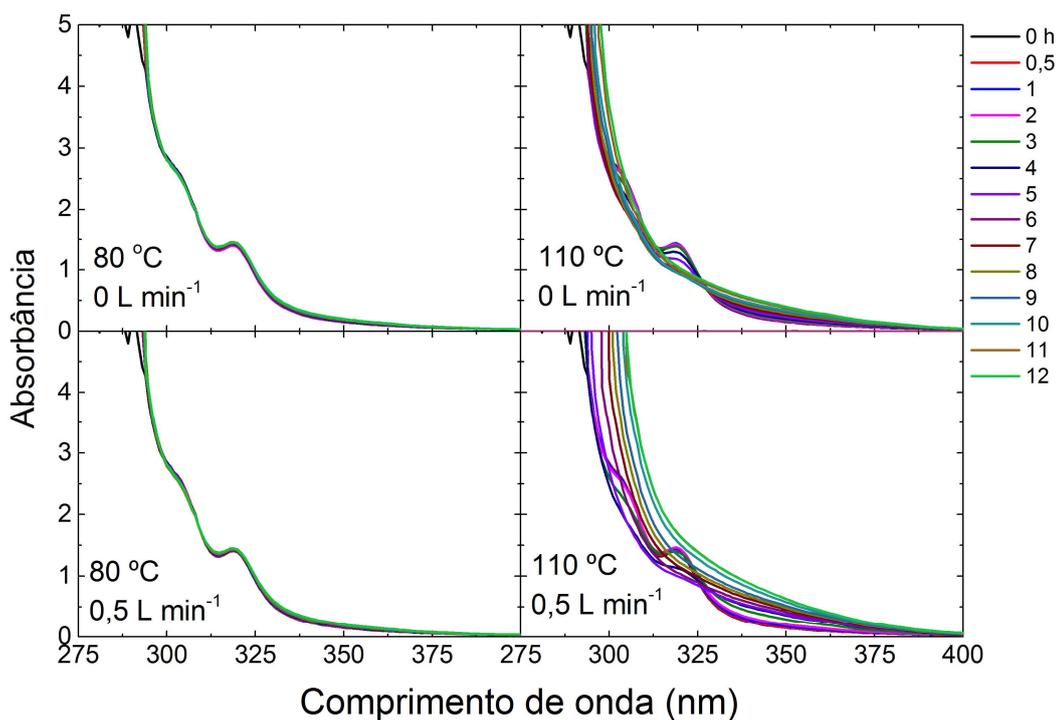
Neste cenário, experimentos de absorção UV-Vis, fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo foram realizados para elucidar os comportamentos observados das intensidades de fluorescência em função do tempo. Ademais, experimento de cromatografia a gás com detector de massas foi utilizado para verificar o comportamento de ésteres metílicos durante o tratamento das amostras.

5.3.2 Absorção UV-Vis

Espectros de absorção UV-Vis das amostras não diluídas tratadas a 80 e 110 °C são exibidas na Figura 43. Os espectros de absorção das amostras tratadas a 80 °C não são consideravelmente afetadas pelo tratamento térmico sem a presença de ar. Não obstante, as

amostras submetidas a 110 °C apresentaram mudanças nos valores de absorbância. Ademais, destaca-se alterações na linha de base desses espectros devido a maior influência das bandas de absorção atribuídas a compostos dienos e trienos conjugados.

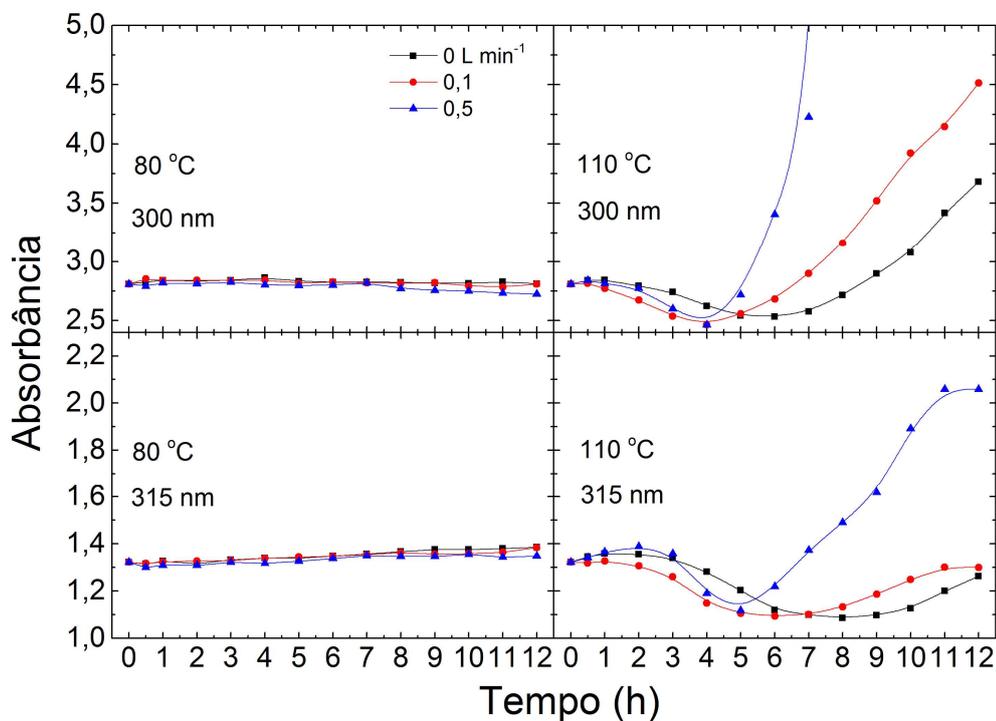
Figura 43 – Espectros de absorção UV das amostras tratadas a 80 °C e 110 °C, sob fluxo de ar de 0 e 0,5 L min⁻¹. Amostras não diluídas.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 44 exibe os valores de absorbância em 300 e 315 nm das amostras de biodiesel não diluídas. Verifica-se que os valores de absorbância da amostra 80 °C, independente do fluxo de ar, permaneceram praticamente constantes, indicando que a essas temperaturas não são provocadas mudanças nas intensidades ou nos perfis dos espectros de absorção. Por sua vez, alterações significativas são observadas nas amostras tratadas a 110 °C, indicando que a partir das primeiras horas de tratamento os tetraenos conjugados são degradados. A partir de 5 horas de tratamento um aumento acentuado é verificado devido à mudança da linha de base provocada pela formação de compostos que absorvem em torno de 300 nm, como trienos conjugados.

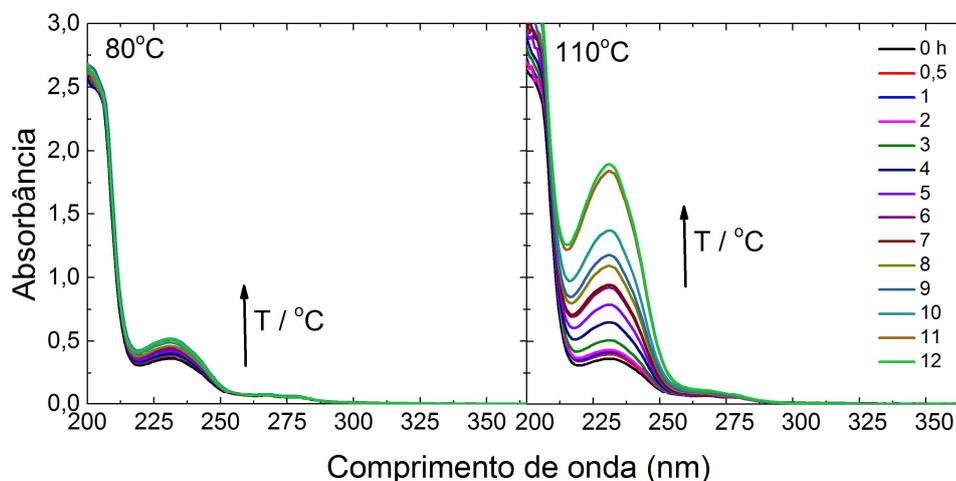
Figura 44 – Absorbância em 300 e 315 nm das amostras tratadas a 80 °C e 110 °C com diferentes fluxos de ar em função do tempo.



Fonte: próprio autor.

No intuito de avaliar os compostos presentes nos biodiéseis e a formação de novas moléculas em função do tratamento térmico, experimentos de absorção UV-Vis foram conduzidos em amostras diluídas em hexano. A Figura 45 mostra os espectros de absorção das amostras diluídas após o tratamento térmico a 80 e 110 °C sem fluxo de ar induzido. Destacam-se nos espectros as bandas de absorção em torno de 232 e 270 nm, as quais tem sido atribuídas a dienos e trienos conjugados, estruturas com duas e três duplas ligações conjugadas, respectivamente. Além disso, uma nítida diferença na evolução da absorbância em função do tempo das amostras tratadas a 80 e 100 °C é verificada.

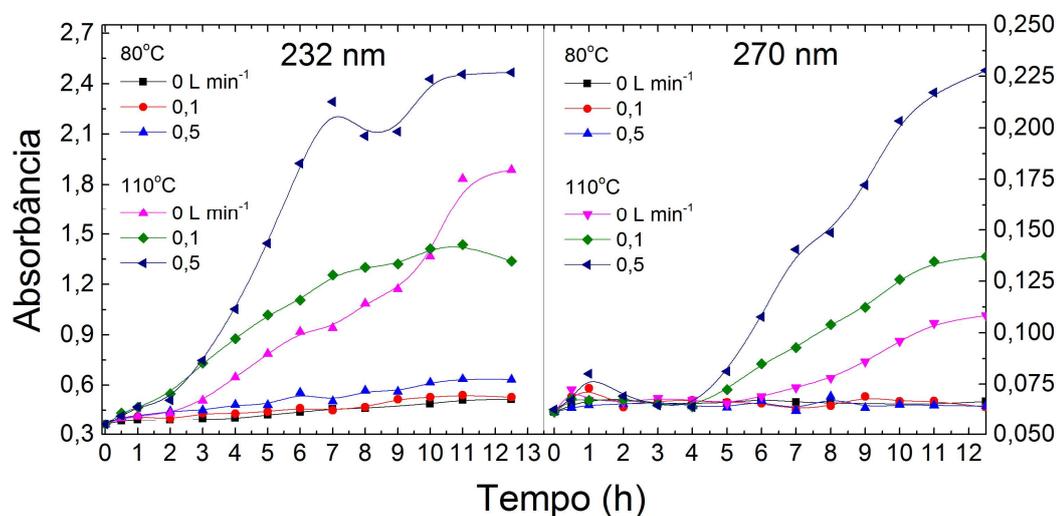
Figura 45 – Espectros de absorção UV das amostras diluídas tratadas a 80 e 110 °C sem fluxo de ar. Amostras diluídas em hexano grau HPLC ($0,8 \text{ mg mL}^{-1}$).



Fonte: Próprio autor.

A Figura 46 apresenta a absorbância em 232 e 270 nm das amostras em função do tempo de tratamento. Um aumento da absorbância em 232 nm ocorreu desde as primeiras horas de aquecimento das amostras tratadas a 110 °C em todos os valores de fluxo de ar adotados, indicando a formação de compostos dienos conjugados. No entanto, um incremento na absorbância em 270 nm é evidente (Figura 46), a partir de 5 horas de tratamento, devido à formação de trienos conjugados após os primeiros estágios de degradação. Em contrapartida não ocorreram mudanças significativas nos valores de absorbância das amostras submetida ao tratamento em 80 °C, quando comparadas com as amostras tratadas a 110 °C.

Figura 46 – Absorbância a 232 e 270 nm, das amostras tratadas a 80 °C e 110 °C em função do tempo a diferentes fluxos de ar.



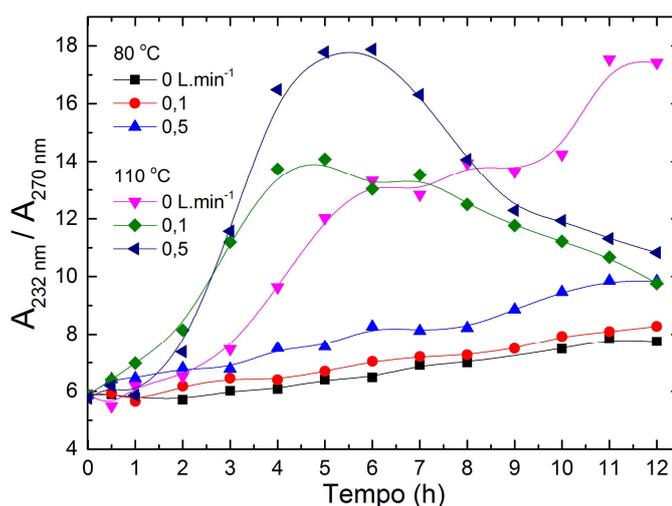
Fonte: Próprio autor.

Considerando que a banda de absorção em 270 nm pode ter como origem as moléculas originalmente responsáveis pela banda absorção em 232 nm, usualmente adota-se a razão entre os valores de absorbância associados a tais bandas para avaliar a formação de compostos de degradação tais como trienos conjugados a partir de dienos conjugados. Além disso, utiliza-se esta razão para tentar minimizar a influência da banda de 232 nm na banda em 270 nm com menor intensidade.

Os resultados, exibidos na Figura 47, indicam que ocorreu um aumento significativo na razão nas amostras tratadas a 110 °C até 5 h, seguido por um decréscimo até o momento em que foi desligado o aparato experimental. Esse perfil mostra um aumento na concentração de dienos conjugados até aprox. 5 h, após esse intervalo nota-se uma maior formação de trienos conjugados, sendo que essa razão é afetada pelo incremento no fluxo de ar e pela temperatura. Os dados indicam uma correlação com os resultados obtidos pelas medidas de fluorescência em tempo real e também as medidas de absorção para as amostras não diluídas.

Ademais, os resultados indicam que para o tratamento a 80 °C existe maior influência da banda de absorção em 232 nm, pois esta banda se deve a compostos facilmente formados nos primeiros estágios de degradação (dienos conjugados).

Figura 47 – Razão das absorbâncias em 232 e 270 nm das amostras tratadas em 80 e 110 °C com diferentes fluxos de ar em função do tempo de tratamento.

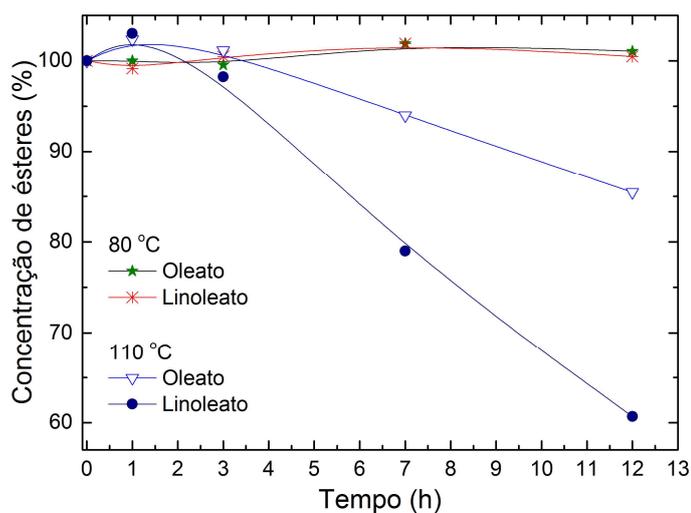


Fonte: Próprio autor.

Os resultados mostram que o fluxo de ar influencia no aumento da absorção nessas regiões devido ao favorecimento das reações do oxigênio com as duplas ligações de dienos e trienos não conjugados, levando à formação de seus isômeros conjugados.

As concentrações dos ésteres metílicos insaturados (oleato e linoleato de metila) foram determinadas por cromatografia a gás com detector de massas. Os dados apontam que as concentrações desses ésteres nos biodieseis submetidos a tratamento em 80 °C, independente do fluxo de ar, permaneceram constantes (Figura 48), corroborando os resultados de absorção e fluorescência. Por outro lado, verificou-se uma diminuição na concentrações desses ésteres nas amostra 110 °C após aproximadamente 3 horas devido à degradação dos mesmos, indicando que esses compostos podem ser precursores para a formação de compostos conjugados, que apresentam absorção em 232, 270, 300 e 315 nm. Segundo os resultados, vale destacar a maior taxa de variação para o linoleato de metila, devido à quebra da dupla ligação e formação de monosaturados, ou à conjugação e formação de trienos e tetraenos conjugados.

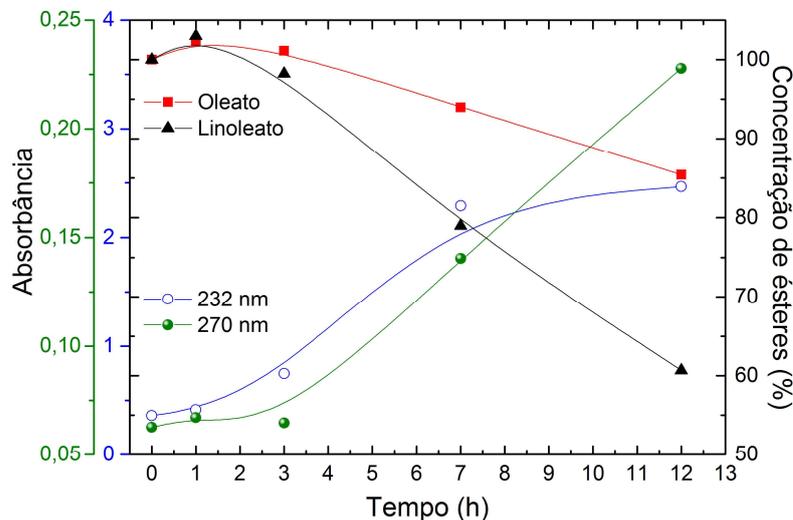
Figura 48 – Concentração de oleato (18:1) e linoleato (18:2) de metila em função do tempo de tratamento, para a amostra tratada a 80 e 110 °C com 0,5 L min⁻¹ de ar.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 49 apresenta os valores de absorbância em 232 e 270 nm quando comparados com as concentrações de oleato e linoleato de metila, todos em função do tratamento térmico. Nota-se que há relação direta entre absorbância e concentração dos ésteres, uma vez que a variação na concentração ocorre no mesmo intervalo, apresentando o mesmo perfil. Esses dados fortalecem os resultados de absorção apresentando um resultado global para as medições realizadas. Pode-se inferir que os ésteres não saturados iniciam os processos de degradação levando à formação de cromóforos e fluoróforos mensuráveis pelas medições discutidas neste trabalho.

Figura 49 - Porcentagem de oleato e linoleato de metila obtidos por CG-EM e absorbância em 232 e 270 nm em função do tempo, para a amostra tratada a 110 °C com 0,5 L min⁻¹ de ar.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados de absorção molecular e cromatografia a gás com detector de massas indicam uma grande correlação com os resultados de fluorescência em tempo real. Dessa forma, pode-se inferir que os compostos conjugados podem desempenhar um importante papel no monitoramento da estabilidade oxidativa do biodiesel

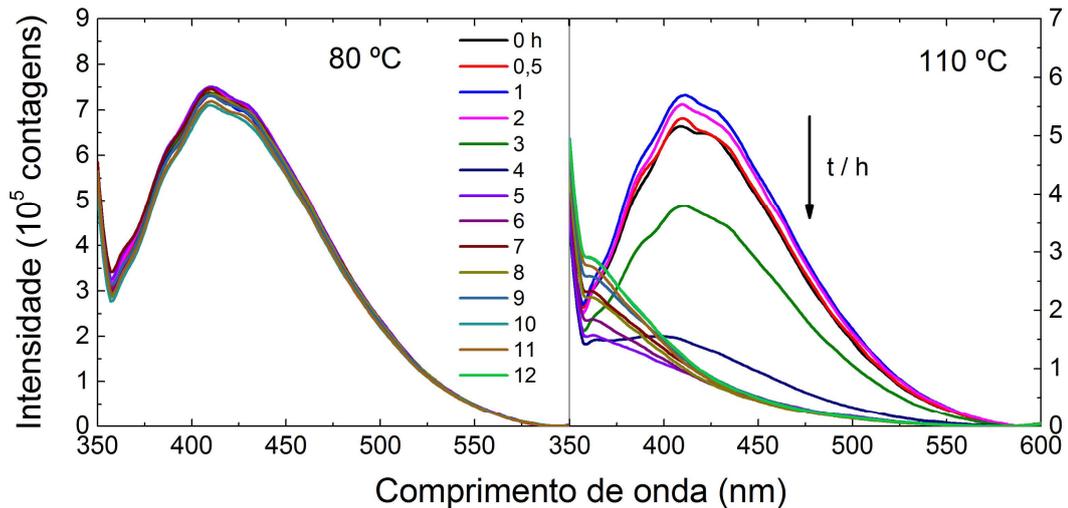
Medições de fluorescência nas alíquotas diluídas também foram realizadas a fim de verificar se o perfil cinético se mantém e se os efeitos de filtro interno interferem de maneira significativa nos experimentos de fluorescência em tempo real.

5.3.3 Fluorescência

Medições de fluorescência foram realizadas nas amostras diluídas para verificar o comportamento dos fluoróforos em função do tratamento térmico. Vale destacar que as amostras investigadas foram coletadas no decorrer do aquecimento e armazenadas em frascos âmbar para posterior análise. A Figura 50 mostra os espectros de emissão das amostras tratadas a 80 e 110 °C sem fluxo de ar, em função do tempo, quando excitados em 315 nm. Sabe-se que compostos tetraenos conjugados apresentam fluorescência com máximo em torno de 420 nm quando excitados entre 300 e 330 nm. Observa-se que para as amostras submetidas a tratamento em 80 °C não houve alterações significativas nos espectros comparadas as amostras tratadas a 110 °C, ao contrário do que pode ser observado nas amostras tratadas a

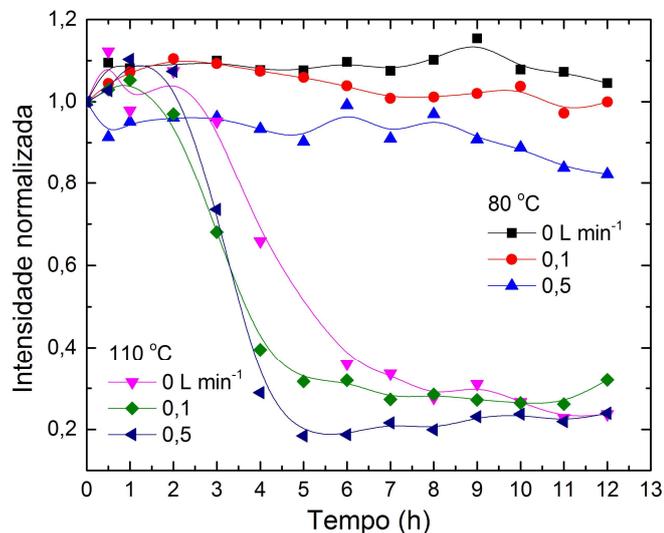
110 °C. As demais amostras submetidas ao tratamento térmico apresentam perfil espectral semelhante, no entanto com variações distintas nas intensidades de fluorescência.

Figura 50 – Espectros de fluorescência com excitação a 315 nm das amostras tratadas a 80 e 110 °C sem fluxo de ar. Amostras diluídas em hexano grau HPLC (0,8 mg mL⁻¹).



A Figura 51 mostra a intensidade de fluorescência em 420 nm em função do tempo, onde pode ser observada uma queda acentuada da intensidade após duas horas de tratamento térmico a 110 °C.

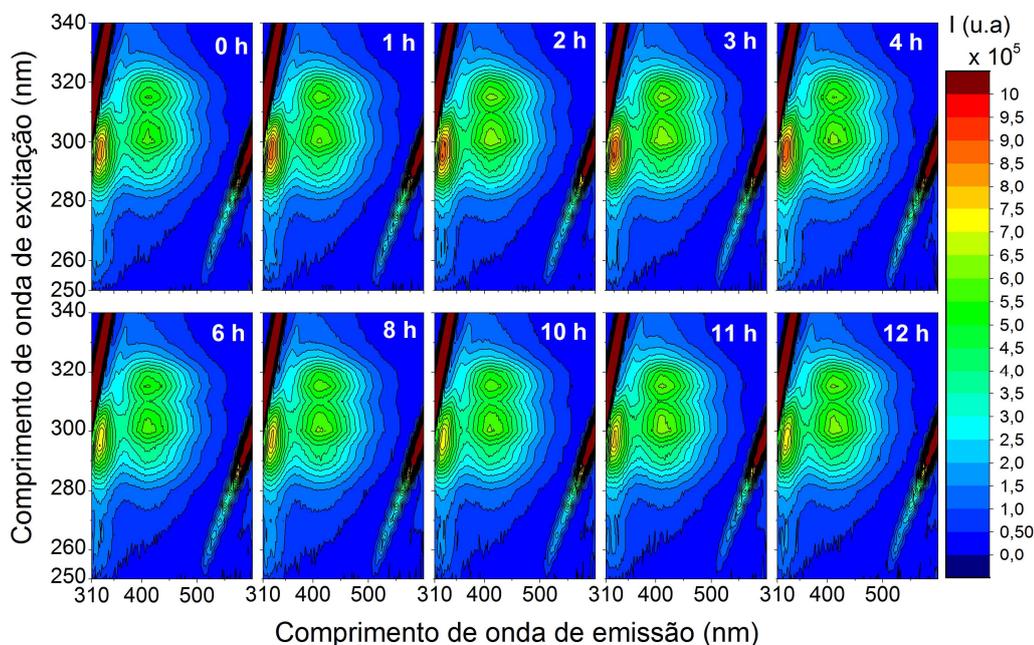
Figura 51 - Intensidade de fluorescência a 420 nm com excitação a 315 nm em função do tempo de tratamento a 80 e 110°C em diferentes fluxos de ar.



Percebe-se que o comportamento da fluorescência é influenciado pelo fluxo de ar. Este resultado corrobora os dados de absorção UV, já que as variações das bandas de absorção em 300 e 315 nm mostram uma correlação com a intensidade de fluorescência, indicando que os efeitos da temperatura sobre as características luminescentes observadas nas amostras estão diretamente relacionadas aos compostos tetraenos conjugados. Embora a intensidade de emissão das amostras tratadas a 80 °C sofra menor influência da temperatura do que aquelas submetidas a 110 °C, verifica-se a influência do fluxo de ar, conforme constatado também nos resultados de absorção.

A fim de verificar como as demais regiões de excitação/emissão das amostras são afetadas em função do tratamento térmico, mapas de contorno de excitação/emissão foram obtidos para as amostras diluídas em hexano. A Figura 52 apresenta os mapas de excitação/emissão das amostras tratadas a 80 °C sem fluxo de ar em função do tempo de tratamento.

Figura 52 – Mapas de excitação/emissão das amostras tratadas a 80 °C sem fluxo de ar. Amostras diluídas em hexano grau HPLC (0,8 mg mL⁻¹).



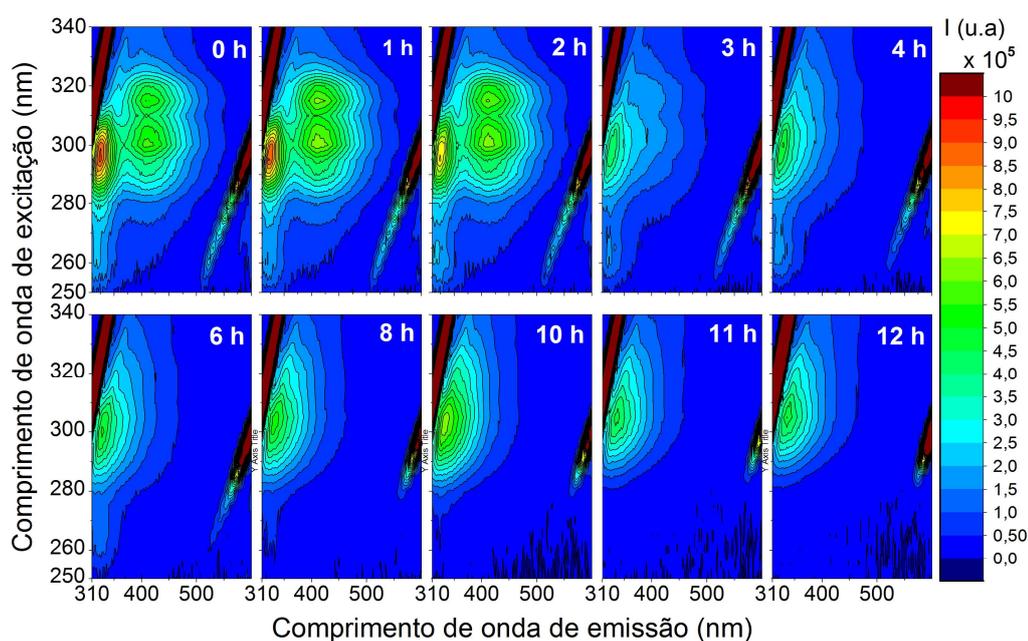
Fonte: Próprio autor.

Os mapas de contorno apresentam emissão máxima em torno de 350 e 500 nm devido à presença de tetraenos conjugados e outra em torno de 330 nm proveniente da presença de

compostos fenólicos e tocoferóis. Nota-se que para o tratamento a 80 °C, as regiões de excitação/emissão não apresentam mudanças significativas em função do tratamento térmico. As demais amostras tratadas a 80 °C com diferentes fluxos de ar apresentaram o mesmo perfil (dados não mostrados).

A Figura 53 mostra os mapas de excitação/emissão das amostras submetidas a 110 °C com fluxo de ar de 0,5 L min⁻¹. Verifica-se que a intensidade de emissão máxima, em torno de 420 nm, diminui a partir de 2 horas de degradação devido à quebra das moléculas de tetraenos conjugados, que levam à formação de novos produtos que não apresentam emissão na região 400-550 nm. Pode-se notar que a região com máximo de emissão em torno de 330 nm sofre menor influência do tratamento, possivelmente devido à formação de novos produtos que também apresentam emissão em torno dessa região.

Figura 53 – Mapas de excitação/emissão obtidos para as amostras degradadas a 110 °C com fluxo de ar de 0,5 L min⁻¹. Amostras diluídas em hexano grau HPLC (0,8 mg mL⁻¹).



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos a partir das análises de fluorescência registrados em tempo real durante o tratamento térmico mostraram que os dados apresentam íntima relação entre os resultados obtidos com as medições de absorção, fluorescência, mapas de excitação/emissão e dados cromatográficos com equipamentos de bancada (espectrofotômetro, espectrofluorímetro e cromatógrafo).

Todos esses resultados mostram que o acompanhamento da termo-oxidação do biodiesel pode ser realizado pelo método de fluorescência em tempo real proposto, uma vez que demais medidas convencionais suportam os resultados obtidos.

5.3.4 *Fluorescência resolvida no tempo*

Enquanto medições de fluorescência no estado estacionário são simples, medições resolvidas no tempo normalmente exigem instrumentação complexa e cara. No entanto, estas medições são úteis uma vez que muitas das informações moleculares disponíveis a partir da fluorescência de um composto são perdidas durante o tempo médio dos processos relacionados. Por exemplo, decaimentos de anisotropia de macromoléculas fluorescentes produzem curvas muitas vezes mais complexas do que aquela descrita por uma única exponencial. A forma exata do decaimento de anisotropia contém informação sobre a forma da macromolécula e a sua flexibilidade.

A intensidade do decaimento também contém informações que são perdidas durante o processo médio de fluorescência. Frequentemente, as macromoléculas podem existir em mais do que uma única conformação, e o tempo de decaimento de uma molécula pode depender da conformação. A intensidade do decaimento poderia revelar dois tempos de decaimento, e, portanto, a presença de mais de um estado conformacional. A intensidade de fluorescência do estado estacionário só irá revelar uma intensidade média dependente de uma média ponderada dos dois tempos de decaimento.

Em fluorescência, a maior parte do conteúdo de informação molecular está disponível apenas por meio de medições resolvidas no tempo. Dessa forma, medições de fluorescência resolvida no tempo nas amostras em função do tratamento térmico podem revelar a identidade dos fluoróforos presentes no biodiesel, bem como a contribuição dos processos oxidativos nos fluoróforos.

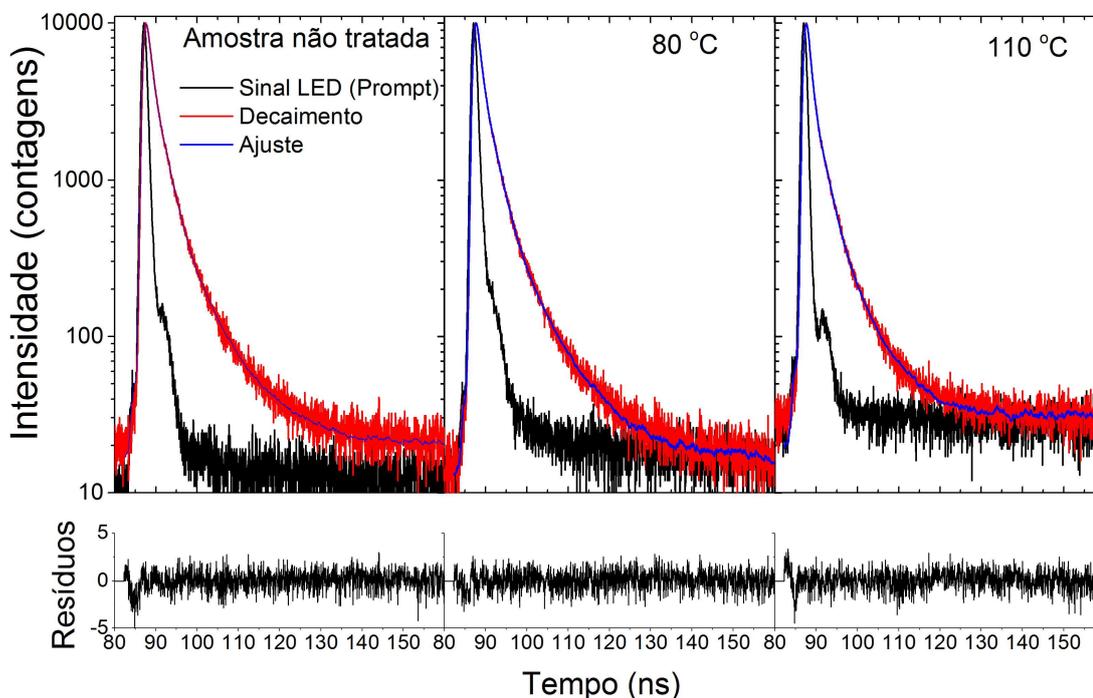
Medições de fluorescência resolvida no tempo utilizando o método de contagens de um fóton TCSPC (do inglês, *Time-correlated single photon counting*) foram realizadas nas alíquotas de biodiesel de soja retiradas no decorrer do tratamento a 80 e 110 °C. Um LED de 340 nm foi usado como fonte de excitação e a emissão coletada em 420 nm utilizando filtros para maior seletividade do comprimento de onda. Um modelo multiexponencial foi utilizado para determinação dos tempos de vida e dos demais parâmetros da fluorescência resolvida no tempo (Equações 8 e 9).

Para ajustar as curvas de decaimento temporal da fluorescência utilizamos um *software* (DAS6) de análise disponível no equipamento que permite realizar ajustes com até cinco exponenciais.

A Figura 53 apresenta os decaimentos obtidos para as amostras de biodiesel não tratada e tratada após 12 horas de aquecimento a 80 e 110 °C sob um fluxo de ar de 0,5 L min⁻¹. Uma função tri-exponencial ajustou adequadamente todos os decaimentos registrados (Equação 8), fornecendo os tempos de vida e fatores pré-exponenciais das amostras com valores de χ^2 (chi-quadrado) próximo a 1 e resíduos próximos de 0.

Para os decaimentos mostrados na Figura 54 os valores de χ^2 são 1,11; 1,07 e 1,15 para as amostras não tratada e para as amostras tratadas a 80 e 110 °C por 12 h, respectivamente. As medidas foram realizadas nas amostras não diluídas, porém utilizando uma cubeta de 1 mm em ângulo de 56° a fim de minimizar processos de reabsorção e espalhamento da luz de excitação.

Figura 54 – Decaimento temporal da fluorescência para as amostras sem tratamento e tratadas durante 12 h a 80 e 110 °C adotando um fluxo de ar de 0,5 L min⁻¹. Amostras não diluídas.



Fonte: Próprio autor.

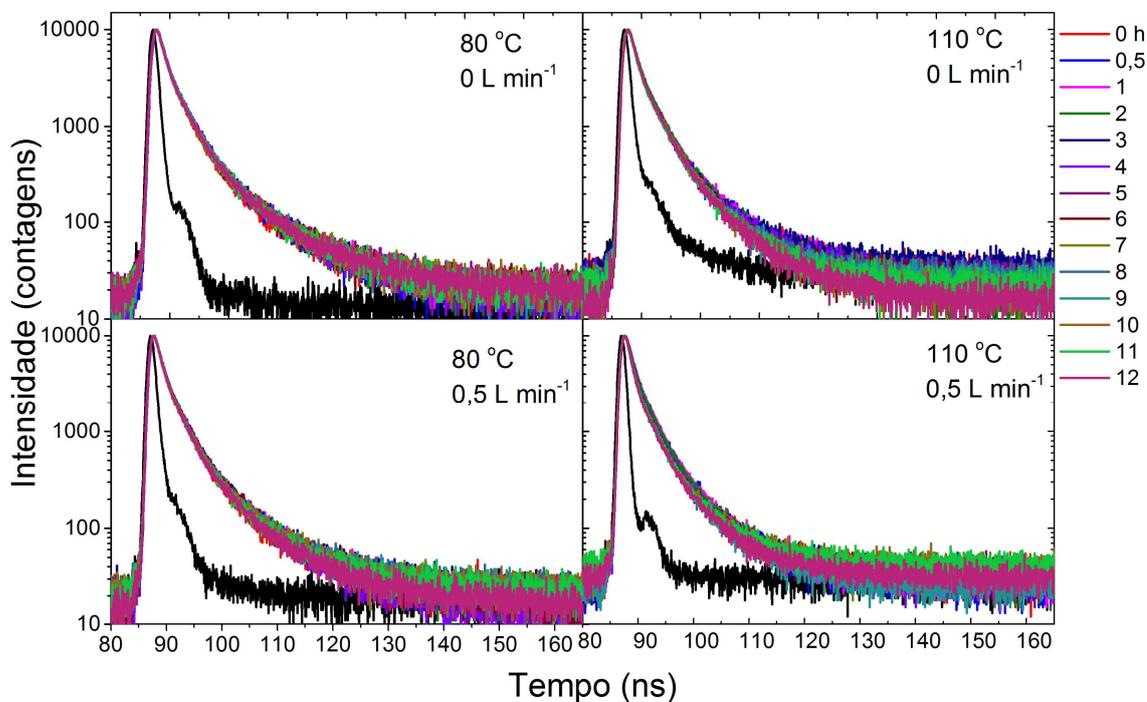
Os resultados mostraram que o biodiesel de soja não submetido a tratamento térmico apresentou 3 componentes com tempos de vida em torno de 0,65; 2,55 e 7,7 ns. Esses resultados foram obtidos utilizando uma função tri-exponencial para o tratamento dos decaimentos.

Smyk e colaboradores determinaram os tempos de vida em amostras de óleo rico em ácido parinárico, o qual é um ácido graxo com 18 carbonos e quatro duplas ligações conjugadas (tetraeno conjugado).⁸⁶ Naquele estudo as amostras de óleo foram diluídas em etanol e excitadas com LED operando em 340 nm, a emissão foi monitorada em 420, 430 e 455 nm. Em todos os estudos, a amostra apresentou uma evolução temporal de fluorescência descrita por 3 tempos de vida. O primeiro tempo de vida (maior amplitude) apresentou um valor em torno de 2,7 ns, o segundo com valor de 0,73 ns e o terceiro tempo de vida foi 9,4 ns. Os autores também realizaram as mesmas medições no ácido parinárico padrão, obtendo duas componentes com tempos de vida em torno de 2,1 ns (96% de contribuição) e outra componente com tempo de vida entre 0,55-0,79 ns.

Os resultados obtidos em nossos experimentos para as amostras de biodiesel de soja apresentaram uma grande correlação com os resultados apresentados por Smyk. As diferenças nos valores de tempo de vida se devem possivelmente a fatores como viscosidade, solvente utilizado, equipamento, temperatura ambiente e também devido à distinta composição química do óleo estudado, por exemplo a presença de triésteres e não monoésteres como nas amostras de biodiesel.

Todos os decaimentos obtidos para os conjuntos de amostras tratadas a 80 e 110 °C em função do tempo são exibidos na Figura 55. Verifica-se que os decaimentos para as amostras submetidas a 80 °C sem fluxo de ar não sofreram alterações significativas, contudo, as curvas associadas às amostras tratadas a 110 °C e fluxo de ar de 0,5 L min⁻¹ apresentam uma pequena diferença nas componentes de tempo de vida mais longos.

Figura 55 - Decaimento obtido para as amostras tratadas a 80 e 110 °C em diferentes fluxos de ar. Amostras não diluídas.

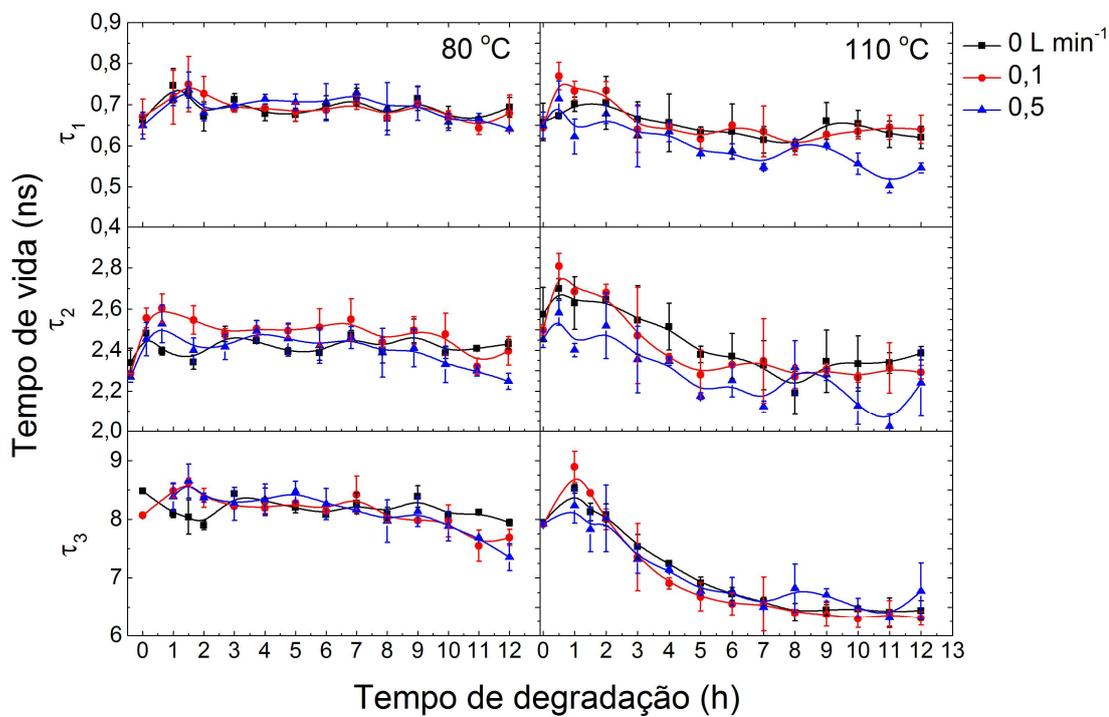


Fonte: Próprio autor.

A avaliação somente comparativa dos decaimentos não é um parâmetro adequado para a determinação de processos globais que ocorrem com os tempos de vida da amostra. Dessa forma torna-se necessário avaliar o comportamento dos tempos de vida e as amplitudes relativas em função do tempo de tratamento.

A Figura 56 apresenta os valores de τ_1 , τ_2 e τ_3 associados às amostras estudadas. Os resultados indicam que as amostras tratadas a 80 °C não apresentaram mudanças significativas nas três componentes avaliadas. Por sua vez, as amostras tratadas a 110 °C mostraram que a terceira componente τ_3 é mais afetada em função do tempo após as primeiras horas de tratamento. Uma das justificativas para tal efeito é a mudança na viscosidade das amostras, a qual afeta geralmente a componente do decaimento mais longa. A segunda componente τ_2 sofreu pequena variação em função do tratamento, mostrando que a molécula envolvida nesse processo não sofre influência do meio para o decaimento radiativo.

Figura 56 – Valores de tempo de vida (τ_1 , τ_2 e τ_3) obtidos para as amostras tratadas a 80 e 110 °C, sob diferentes fluxos de ar, em função do tempo.

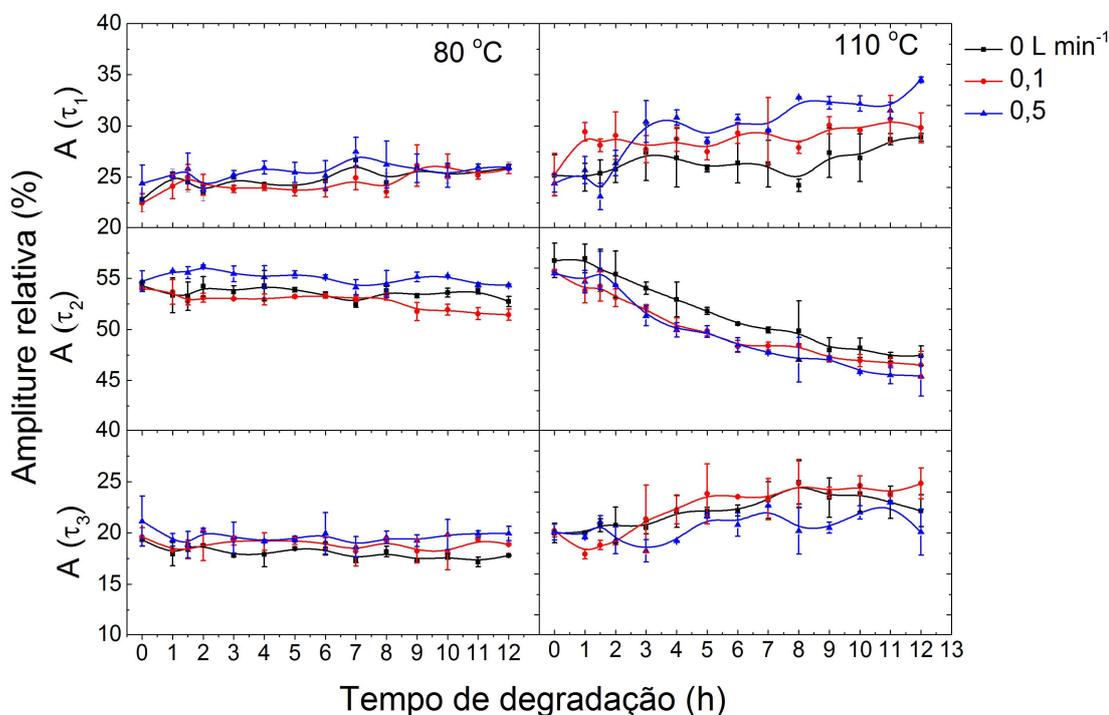


Fonte: Próprio autor.

A Figura 57 apresenta os resultados de amplitude relativa de cada componente temporal obtida a partir do ajuste tri-exponencial (Equação 8), isto é, o peso da contribuição de cada componente para o decaimento. Este fator está diretamente relacionado, dentre outros parâmetros, com a concentração de cada espécie fluorescente no meio, logo com a intensidade de fluorescência.

Os resultados apresentados indicam que as amplitudes relativas das componentes τ_1 , τ_2 e τ_3 para as amostras tratadas a 80 °C não sofreram influência durante o tratamento térmico. No entanto, para as amostras tratadas a 110 °C todas as componentes mostram variações, sugerindo que a concentração dos fluoróforos (tetraenos conjugados) é afetada consideravelmente pelo aquecimento, em concordância com os resultados de absorção e fluorescência previamente discutidos nas seções anteriores.

Figura 57 – Amplitudes relativas associadas a τ_1 , τ_2 e τ_3 obtidas para as amostras tratadas a 80 e 110 °C, sob diferentes fluxos de ar, em função do tempo.

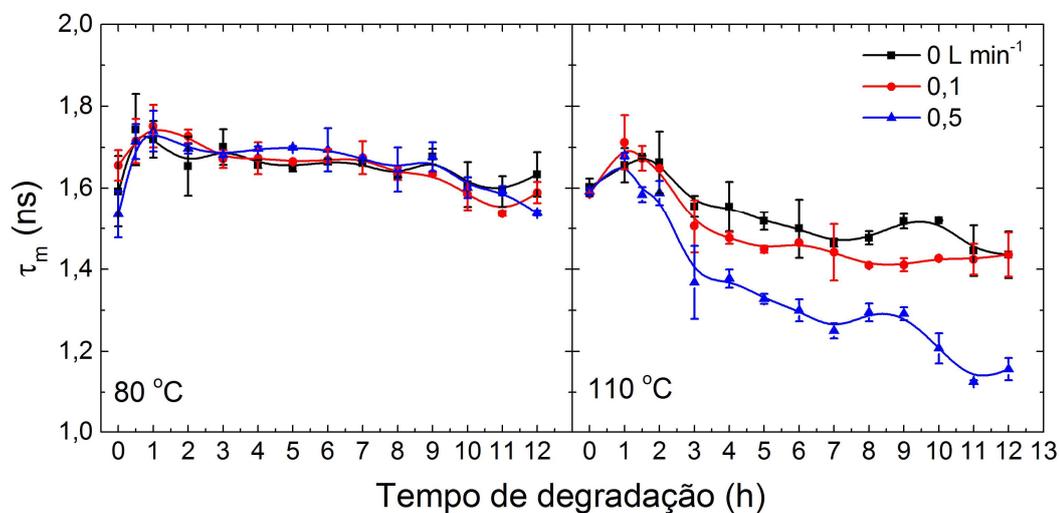


Fonte: Próprio autor.

A evolução temporal da fluorescência também pode ser avaliada em termos de um tempo de vida médio (τ_m), dado pela Equação 9. O τ_m com peso pré-exponencial é um parâmetro muito utilizado devido à robustez com que processa funções multiexponenciais de sistemas complexos, por exemplo, em meios que contêm mais de um composto fluorescente emitindo em uma determinada região. Esse parâmetro leva em consideração todos os tempos de vida obtidos e os fatores pré-exponenciais.

A Figura 58 apresenta os tempos de vida médio em função do tempo de tratamento determinados usando a Equação 9. As amostras mantidas a 80 °C apresentaram discreta diminuição no valor de (τ_m) em função do tempo de tratamento, independente do fluxo de ar adotado. Por sua vez, um nítido decréscimo nos valores de (τ_m) das amostras mantidas a 110 °C pode ser observado como resultado do aquecimento e do tempo de tratamento que promoveram a degradação da amostra, e conseqüentemente, modificações nas características eletrônicas das moléculas e estados excitados. Este efeito se torna mais significativo à medida que se aumenta a disponibilidade de oxigênio no meio – por meio do aumento no fluxo de ar.

Figura 58 – Tempo de vida médio (τ_m) das amostras submetidas a 80 e 110 °C, sob diferentes fluxos de ar, em função do tempo.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados de fluorescência resolvida no tempo confirmam a presença dos tetraenos conjugados e se coadunam com aqueles verificados por meio dos experimentos de absorção e fluorescência realizados tanto em tempo real quanto a partir das alíquotas coletadas. Verifica-se que o tempo de vida médio permanece praticamente constante até 2 horas e posteriormente diminui, sendo este processo fortemente influenciado pelo fluxo de ar.

Nota-se que através de medidas de (τ_m) é possível avaliar o efeito de diferentes condições as quais o biodiesel é submetido (nesse estudo, diferentes temperaturas e fluxos de ar), indicando que o tempo de vida também se mostra, como a absorção e fluorescência, adequado como parâmetro indicador do processo de degradação termo-oxidativa do biodiesel.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados mostram que compostos dienos, trienos e tetraenos conjugados apresentam importante papel na absorção entre 200 e 320 nm, e que tetraenos conjugados contribuem de forma significativa para a fluorescência do biodiesel em torno de 420 nm.

Nesta investigação o papel dos compostos conjugados foi evidenciado como sonda para monitorar a degradação termo-oxidativa do biodiesel. O processo de tratamento térmico do biodiesel resultou em mudanças na fluorescência e absorção molecular das amostras devido à degradação de compostos dienos, trienos e tetraenos conjugados, indicando que tetraenos conjugados podem ser usados como sondas fluorescentes no monitoramento da estabilidade oxidativa do biodiesel.

Os resultados obtidos mostram que um monitoramento da intensidade de emissão do biodiesel pode ser realizado com a configuração experimental adotada, com parâmetros controlados, tais como a temperatura e fluxo de ar.

As medidas de fluorescência resolvida no tempo auxiliaram na identificação de componentes que apresentam fluorescência no biodiesel, indicando ainda que os processos de termo-oxidação afetam as componentes principais de tempo de vida das amostras.

Os resultados indicam a potencialidade das técnicas apresentadas servindo como um estudo referencial para trabalhos futuros a fim de validar o método e desenvolver um dispositivo óptico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 GERPEN, J. V. **Biodiesel processing and production**. Fuel Processing Technology, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 6/25/ 2005.
- 2 MONYEM, A.; H. VAN GERPEN, J. **The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions**. Biomass and Bioenergy, v. 20, n. 4, p. 317-325, 4// 2001.
- 3 CORONADO, C. R.; DE CARVALHO JR, J. A.; SILVEIRA, J. L. **Biodiesel CO₂ emissions: A comparison with the main fuels in the Brazilian market**. Fuel Processing Technology, v. 90, n. 2, p. 204-211, 2// 2009.
- 4 MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 10, n. 3, p. 248-268, 6// 2006.
- 5 ANDRÉ CREMONEZ, P. et al. **Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 42, p. 415-428, 2// 2015.
- 6 MITTELBACH, M.; REMSCHMIDT, C. **Biodiesel: The comprehensive Handbook**. Vienna: 2004.
- 7 LANG, X. et al. **Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils**. Bioresource Technology, v. 80, n. 1, p. 53-62, 10// 2001.
- 8 KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. **Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 52, p. 1834-1846, 12// 2015.
- 9 LUTZ, I. A. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**. 3. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

- 10 GUNSTONE, F. D. **Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses.** In: GUNSTONE, F. D. (Ed.). Chemistry and technology of oils and fats.: Blackwell publishing, 2002.
- 11 SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica.** Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- 12 FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. D. S.; SCABIO, A. **Oxidative stability of biodiesel from soybean oil fatty acid ethyl esters.** Scientia Agricola, v. 62, p. 291-295, 2005.
- 13 DANTAS, M. B. et al. **Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel.** Fuel, v. 90, n. 2, p. 773-778, 2// 2011.
- 14 MCCORMICK, R. L. et al. **Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests.** Fuel Processing Technology, v. 88, n. 7, p. 651-657, 7// 2007.
- 15 KNOTHE, G. **Some aspects of biodiesel oxidative stability.** Fuel Processing Technology, v. 88, n. 7, p. 669-677, 7// 2007.
- 16 ANP. AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEL. LEI Nº 11.097, DE 13.1.2005 - DOU 14.1.2005. Brasília, 2005. Acesso em: 01/01/2016.
- 17 AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS. RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014. Brasília, 2014. Acesso em: 01/01/2016.
- 18 AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GAS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEL. LEI Nº 13.033, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014., Brasília, 2014. Acesso em: 01/01/2016.
- 19 SUAREZ, P. A. Z. et al. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica.** Química Nova, v. 30, p. 667-676, 2007.

- 20 DUNN, R. O. **Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel)**. Fuel Processing Technology, v. 86, n. 10, p. 1071-1085, 6/25/ 2005.
- 21 LIANG, Y. C. et al. **The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel**. Fuel, v. 85, n. 5–6, p. 867-870, 3// 2006.
- 22 ARAÚJO, S. V. et al. **A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration**. Fuel Processing Technology, v. 90, n. 10, p. 1272-1277, 10// 2009.
- 23 PAJUNEN I, T. **Autoxidation of conjugated linoleic acid methyl ester in the presence of tocopherol: the hydroperoxide pathway**. 2009. 66 (Master). Department of Chemistry, University of Helsinki, Finland.
- 24 HERBINET, O.; PITZ, W. J.; WESTBROOK, C. K. **Detailed chemical kinetic oxidation mechanism for a biodiesel surrogate**. Combustion and Flame, v. 154, n. 3, p. 507-528, 8// 2008.
- 25 NAVARRA, G. et al. **Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence**. Food Chemistry, v. 126, n. 3, p. 1226-1231, 6/1/ 2011.
- 26 AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014. Brasília, 2014. Acesso em: 01/01/2016.
- 27 BERTHIAUME, D.; TREMBLAY, A. **Study of the Rancimat Test Method in Measuring the Oxidation Stability of Biodiesel Ester and Blends**. OLEOTEK Inc., 2006.
- 28 BAETEN, V.; DARDENNE, P.; APARICIO, R. **Interpretation of Fourier Transform Raman Spectra of the Unsaponifiable Matter in a Selection of Edible Oils**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 11, p. 5098-5107, 2001/11/01 2001.

- 29 MAHAMUNI, N. N.; ADEWUYI, Y. G. **Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Method To Monitor Soy Biodiesel and Soybean Oil in Transesterification Reactions, Petrodiesel–Biodiesel Blends, and Blend Adulteration with Soy Oil.** *Energy & Fuels*, v. 23, n. 7, p. 3773-3782, 2009/07/16 2009.
- 30 GHESTI, G. F. et al. **FT-Raman Spectroscopy Quantification of Biodiesel in a Progressive Soybean Oil Transesterification Reaction and Its Correlation with ¹H NMR Spectroscopy Methods.** *Energy & Fuels*, v. 21, n. 5, p. 2475-2480, 2007/09/01 2007.
- 31 LIANG, J.-H.; LIN, C.-C. **Fluorescence kinetics of soybean flour oxidation.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, n. 7, p. 709-713, 2000/07/01 2000.
- 32 CHRISTENSEN, J. et al. **Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems.** *Chemical Reviews*, v. 106, n. 6, p. 1979-1994, 2006/06/01 2006.
- 33 FRANCESCA, G.; JOAN, F.; RICARD, B. **Study of oils from the protected denomination of origin “Siurana” using excitation-emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis.** *Grasas y Aceites*; Vol 56, No 4 (2005).
- 34 SÁDECKÁ, J.; TÓTHOVÁ, J. **Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification – a review.** *Czech Journal of Food Sciences*, v. 25, p. 159-174, 2005.
- 35 CHEIKHOUSMAN, R. et al. **Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 382, n. 6, p. 1438-1443, 2005/07/01 2005.
- 36 SAYAGO, A.; MORALES, M. T.; APARICIO, R. **Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by a spectrofluorimetric method.** *European Food Research and Technology*, v. 218, n. 5, p. 480-483, 2004/04/01 2004.

- 37 **GUIMET, F. et al. Excitation–Emission Fluorescence Spectroscopy Combined with Three-Way Methods of Analysis as a Complementary Technique for Olive Oil Characterization.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 24, p. 9319-9328, 2005/11/01 2005.
- 38 **CHIMENEZ, T. A. et al. Fluorescence as an Analytical Tool for Assessing the Conversion of Oil into Biodiesel.** *Journal of Fluorescence*, v. 22, n. 4, p. 1177-1182, 2012/07/01 2012.
- 39 **MEIRA, M. et al. Determination of the oxidation stability of biodiesel and oils by spectrofluorimetry and multivariate calibration.** *Talanta*, v. 85, n. 1, p. 430-434, 7/15/ 2011.
- 40 **MEIRA, M; et al. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das componentes principais.** *Química Nova*, v. 34, p. 621-624, 2011.
- 41 **SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Análise Instrumental.** 6ª. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836
- 42 **PAVIA, D. L. et al. Introdução à espectroscopia.** 4ª. São Paulo: Centage Learning, 2010.
- 43 **LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Third edition. New York: Springer, 2006.
- 44 **PATALAG, L. J.; WERZ, D. B. Fluorescent Penta- and Hexaene Fatty Acids by a Wittig–Horner/Elimination Strategy.** *The Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 12, p. 5297-5304, 2012/06/15 2012.
- 45 **SCHWARZ, F. P.; WASIK, S. P. Fluorescence measurements of benzene, naphthalene, anthracene, pyrene, fluoranthene, and benzo[e]pyrene in water.** *Analytical Chemistry*, v. 48, n. 3, p. 524-528, 1976/03/01 1976.

- 46 MENDONÇA, A. et al. **The inner filter effects and their correction in fluorescence spectra of salt marsh humic matter.** *Analytica Chimica Acta*, v. 788, p. 99-107, 7/25/ 2013.
- 47 GIL, D. B. et al. **Second-Order Advantage Achieved by Unfolded-Partial Least-Squares/Residual Bilinearization Modeling of Excitation–Emission Fluorescence Data Presenting Inner Filter Effects.** *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 23, p. 8051-8058, 2006/12/01 2006.
- 48 ORELLANA, G. **Fluorescence-based sensors.** In: BALDINI, F.;CHESTER, A. N., *et al* (Ed.). *Optical Chemical Sensors: Springer Netherlands*, v.224, 2006. cap. 6, p.99-116. (NATO Science Series II: Mathematics, Physics and Chemistry).
- 49 HAIGH-FLÓREZ, D. et al. **Microalgae dual-head biosensors for selective detection of herbicides with fiber-optic luminescent O₂ transduction.** *Biosensors and Bioelectronics*, v. 54, p. 484-491, 4/15/ 2014.
- 50 ORELLANA, G. **Luminescent optical sensors.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 379, n. 3, p. 344-346, 2004/06/01 2004.
- 51 VALEUR, B. Introduction. In: (Ed.). **Molecular Fluorescence.** Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. p.3-19.
- 52 CARRAWAY, E. R. et al. **Photophysics and photochemistry of oxygen sensors based on luminescent transition-metal complexes.** *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 4, p. 337-342, 1991/02/01 1991.
- 53 CARRAWAY, E. R.; DEMAS, J. N.; DEGRAFF, B. A. **Luminescence quenching mechanism for microheterogeneous systems.** *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 4, p. 332-336, Feb 15 1991.
- 54 SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.; MORRIL, T. C. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994. 387

- 55 GAUGLITZ, G.; VO-DINH, T. **Handbook of Spectroscopy.** Wiley, 2003.
- 56 MAGALHAES, K. F. et al. **Endogenous fluorescence of biodiesel and products thereof: Investigation of the molecules responsible for this effect.** Fuel, v. 119, p. 120-128, Mar 2014.
- 57 FALCO, W. F. et al. **In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles.** Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v. 225, n. 1, p. 65-71, 12/1/ 2011.
- 58 MAHAJAN, S.; KONAR, S. K.; BOOCOCK, D. G. B. **Determining the acid number of biodiesel.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 83, n. 6, p. 567-570.
- 59 MIRGHANI, M. E. S. et al. **Rapid Method for the Determination of Moisture Content in Biodiesel Using FTIR Spectroscopy.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 88, n. 12, p. 1897-1904, 2011// 2011.
- 60 ARUDI, R. L.; SUTHERLAND, M. W.; BIELSKI, B. H. **Purification of oleic acid and linoleic acid.** Journal of Lipid Research, v. 24, n. 4, p. 485-488, 1983.
- 61 SKLAR, L. A. et al. **Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: spectroscopic characterization.** Biochemistry, v. 16, n. 5, p. 813-819, 1977/03/01 1977.
- 62 SKLAR, L. A.; HUDSON, B. S.; SIMONI, R. D. **Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: binding to bovine serum albumin.** Biochemistry, v. 16, n. 23, p. 5100-5108, 1977/11/01 1977.
- 63 ALBUQUERQUE, M. L. S. et al. **Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, p. 1113-1117, 2005.

- 64 ARANDA, F. J. et al. **Fluorescence study of the location and dynamics of α -tocopherol in phospholipid vesicles.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 985, n. 1, p. 26-32, 10/2/ 1989.
- 65 GOMEZ-FERNANDEZ, J. C. et al. **Localization of α -Tocopherol in Membranes.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 570, n. 1, p. 109-120, 1989.
- 66 GIACOMELLI, C. et al. **Electrochemistry of vitamin E hydro-alcoholic solutions.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 748-755, 2004.
- 67 FIESER, L. F. **Absorption spectra of carotenoids; structure of vitamin a2.** *The Journal of Organic Chemistry*, v. 15, n. 5, p. 930-943, 1950/09/01; 1950.
- 68 ZSCHEILE, F. P. et al. **The preparation and absorption spectra of five pure carotenoid pigments.** *Plant Physiology*, v. 17, n. 3, p. 331-346, 1942.
- 69 LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. **Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy.** In: (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- 70 DUPUY, N. et al. **Origin of French Virgin Olive Oil Registered Designation of Origins Predicted by Chemometric Analysis of Synchronous Excitation–Emission Fluorescence Spectra.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 24, p. 9361-9368, 2005/11/01 2005.
- 71 SIKORSKA, E. et al. **Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy.** *Food Chemistry*, v. 89, n. 2, p. 217-225, 2// 2005.
- 72 SIKORSKA, E; et al. **Characterization of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy.** *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, Olsztyn, v. 12, n. Suppl.2, p. 108-112, 2003.
- 73 POULLI, K. I. et al. **Synchronous Fluorescence Spectroscopy: Tool for Monitoring Thermally Stressed Edible Oils.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 18, p. 8194-8201, 2009/09/23 2009.

- 74 HURTUBISE, R. J. **Selective fluorescence quenching and determination of phenolic antioxidants.** Analytical Chemistry, v. 48, n. 14, p. 2092-2094, 1976/12/01 1976.
- 75 ZANDOMENEGHI, M.; CARBONARO, L.; CAFFARATA, C. **Fluorescence of Vegetable Oils: Olive Oils.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 3, p. 759-766, 2005/02/01 2005.
- 76 ESCUDEROS, M. E. et al. **Evaluation of α -tocopherol in virgin olive oil by a luminescent method.** Grasas y Aceites; Vol 60, No 4 (2009). 2009.
- 77 SIKORSKA, E. et al. **Characterization of Edible Oils Using Total Luminescence Spectroscopy.** Journal of Fluorescence, v. 14, n. 1, p. 25-35, 2004/01/01 2004.
- 78 GUILLEN, M. D.; GOICOECHEA, E. **Oxidation of corn oil at room temperature: Primary and secondary oxidation products and determination of their concentration in the oil liquid matrix from ^1H nuclear magnetic resonance data.** Food Chemistry, v. 116, n. 1, p. 183-192, 9/1/ 2009.
- 79 GUILLÉN, M. D.; URIARTE, P. S. **Study by ^1H NMR spectroscopy of the evolution of extra virgin olive oil composition submitted to frying temperature in an industrial fryer for a prolonged period of time.** Food Chemistry, v. 134, n. 1, p. 162-172, 9/1/ 2012.
- 80 CAO, Y. et al. **Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC-MS and NMR.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 145, n. 2, p. 128-133, 2// 2007.
- 81 KUKLEV, D. V.; SMITH, W. L. **Synthesis of long chain n-3 and n-6 fatty acids having a photoactive conjugated tetraene group.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 130, n. 2, p. 145-158, 7// 2004.
- 82 YURAWECZ, M. P. et al. **Estimation of conjugated octadecatrienes in edible fats and oils.** Journal of the American Oil Chemists Society, v. 70, n. 11, p. 1093-1099.

- 83 FYGLE, K. E.; MELO, T. B. **Optical absorption studies of the kinetics of UV- and self-initiated autoxidation of linoleate micelles.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 79, n. 1, p. 39-46, 1/25/ 1996.
- 84 REKDAL, K.; MEL, T. B. **UV-initiated autoxidation of methyl linoleate in micelles studied by optical absorption.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 75, n. 2, p. 127-136, 2/28/ 1995.
- 85 SIKORSKA, E. et al. **Synchronous Fluorescence Spectroscopy of Edible Vegetable Oils. Quantification of Tocopherols.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, n. 18, p. 6988-6994, 2005/09/01 2005.
- 86 SMYK, B.; WIECZOREK, P.; ZADERNOWSKI, R. **A method of concentration estimation of trienes, tetraenes, and pentaenes in evening primrose oil.** European Journal of Lipid Science and Technology, v. 113, n. 5, p. 592-596, 2011.

8 - APÊNDICE

Artigos publicados durante o desenvolvimento do doutorado.

J Fluoresc
DOI 10.1007/s10895-012-1057-x

ORIGINAL PAPER

Fluorescence as an Analytical Tool for Assessing the Conversion of Oil into Biodiesel

T. A. Chimenez · K. F. Magalhães · A. R. L. Caires ·
S. L. Oliveira

Received: 14 November 2011 / Accepted: 4 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012



Fuel

Volume 119, 1 March 2014, Pages 120–128



Endogenous fluorescence of biodiesel and products thereof: Investigation of the molecules responsible for this effect

K.F. Magalhães^a, A.R.L. Caires^b, M.S. Silva^c, G.B. Alcantara^d, S.L. Oliveira^a,  

 [Show more](#)

doi:10.1016/j.fuel.2013.11.024

[Get rights and content](#)

Highlights

- An investigation of the origin of the visible fluorescence in biodiesel was performed.
- Visible fluorescence in biodiesel should be related to tetra-conjugated molecules.
- This study may assist the development of methods to assess the quality of biodiesel.



Sensors and Actuators B: Chemical

Volume 178, 1 March 2013, Pages 581–585



Quantification of water in ethanol using a photothermal transparent transducer

C.R. Omido^{a, b, c}, S.L. Oliveira^b, R.S. Shiraishi^b, K.F. Magalhães^b, V.S. Ferreira^b, A.A. de Carvalho^a, C. Kitano^a, M.H. de Paula^{b, 1}

[Show more](#)

doi:10.1016/j.snb.2012.12.121

[Get rights and content](#)

Abstract

Ethanol with added water may be found during the process of assessing its physical and chemical properties. This addition can damage automotive vehicle engines and also may contribute to tax evasion. The present contribution describes a method based on a photothermal transparent transducer to determine the water content in ethanol. A chamber with a window of lithium tantalate coated with a thin layer of indium tin oxide was



Fuel

Volume 157, 1 October 2015, Pages 122–125



Short communication

Water content in hydrated ethanol fuel measured by a photothermal chamber with a transparent transducer

Cleudson R. Omido^{a, b, c}, Samuel L. Oliveira^b, Juliete R. Lima^b, Keurison F. Magalhães^b, Aparecido A. de Carvalho^a, Cláudio Kitano^a

[Show more](#)

doi:10.1016/j.fuel.2015.04.045

[Get rights and content](#)

Highlights

- The water content in ethanol fuel was assessed by a transparent transducer.
- The data were compared with reference values certified by Karl-Fischer titration.
- A good agreement between these two methodologies was achieved.
- Low-cost and portable devices for *in situ* and *on-line* analysis may be developed.

Figura 1 - Correlações à longa distância de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Figura sem ampliações.

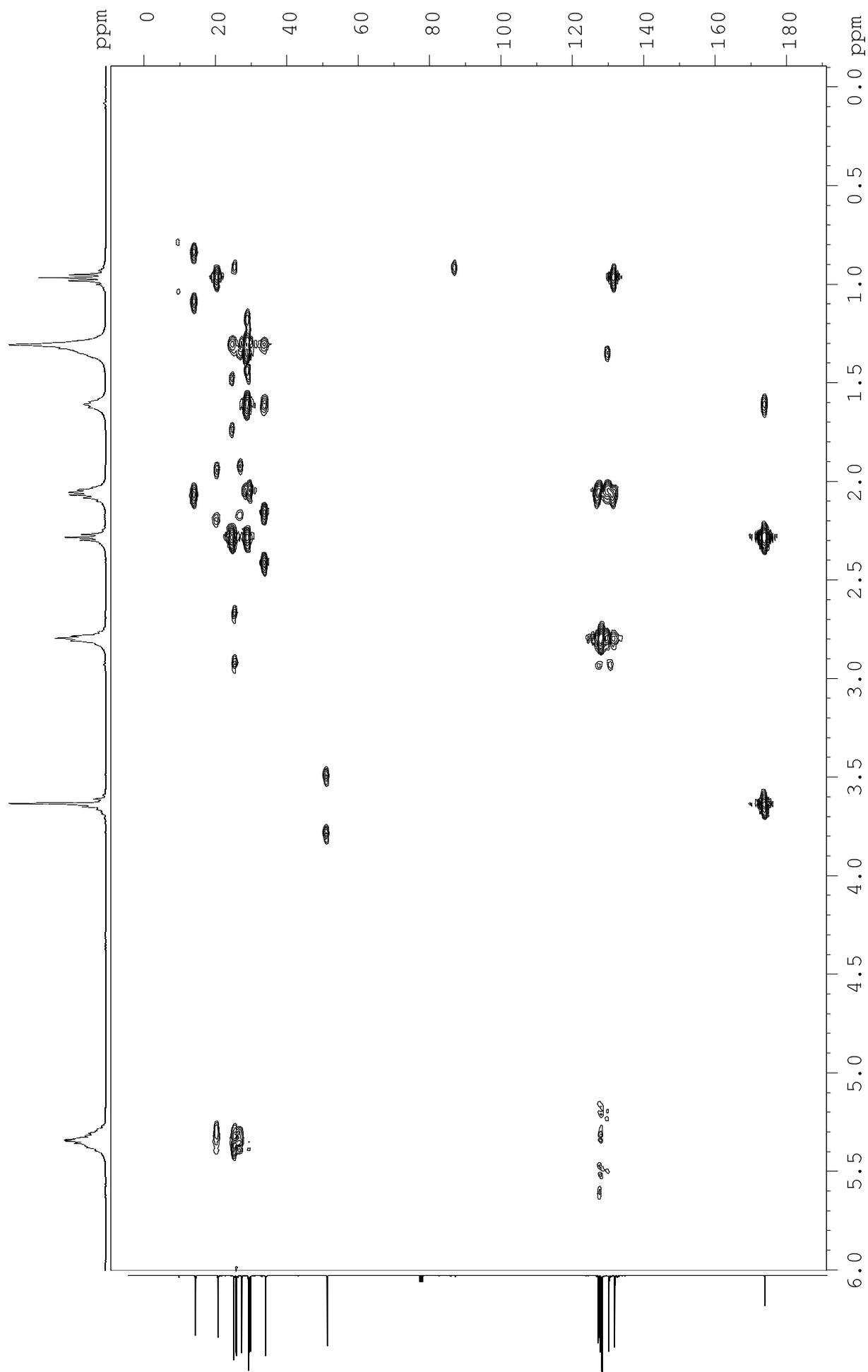


Figura 2 - Correlações à longa distância de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 1) 0 a 5 ppm.

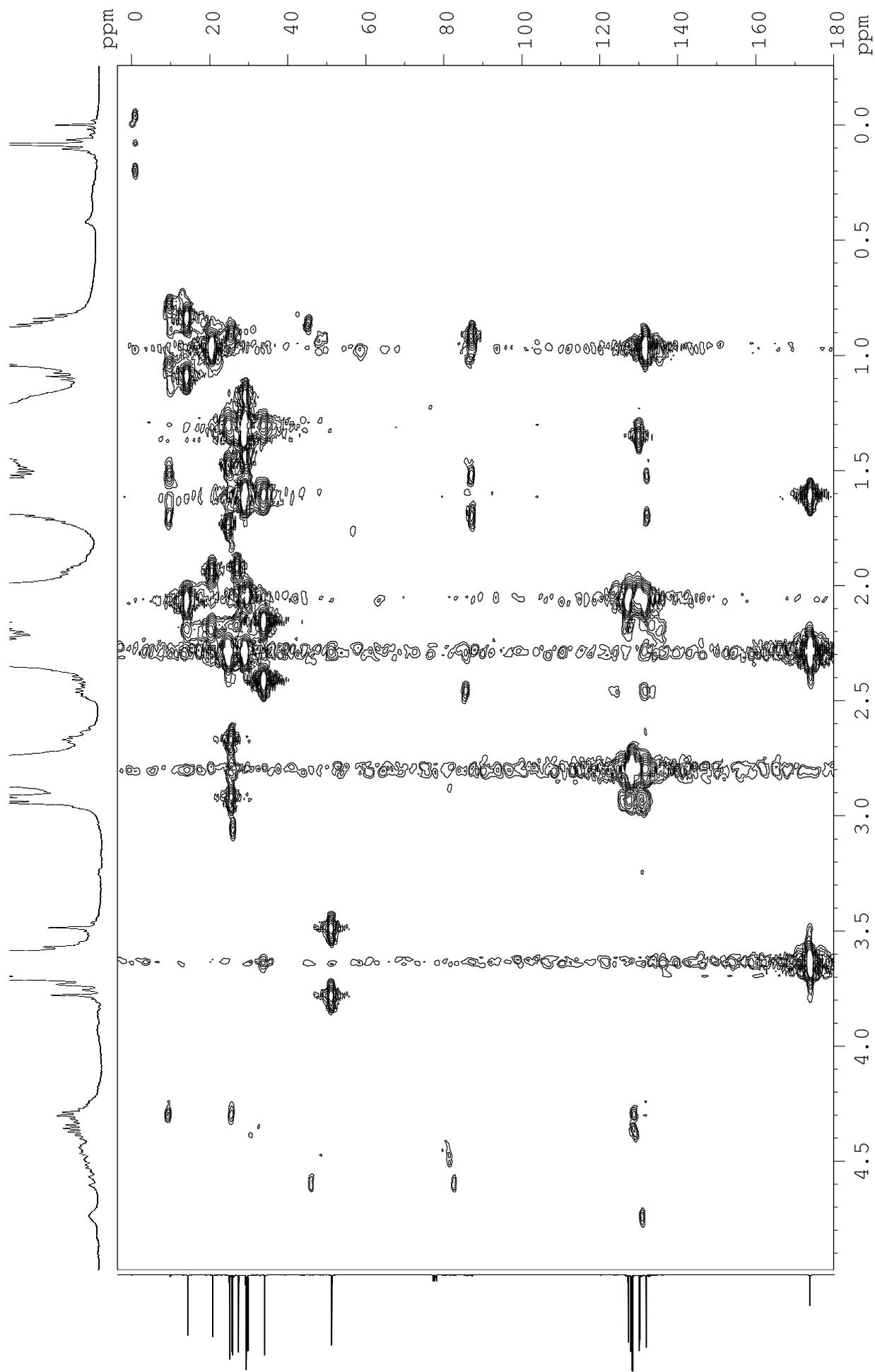


Figura 3 - Correlações à longa distância de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHMBC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 2) 5 a 7 ppm.

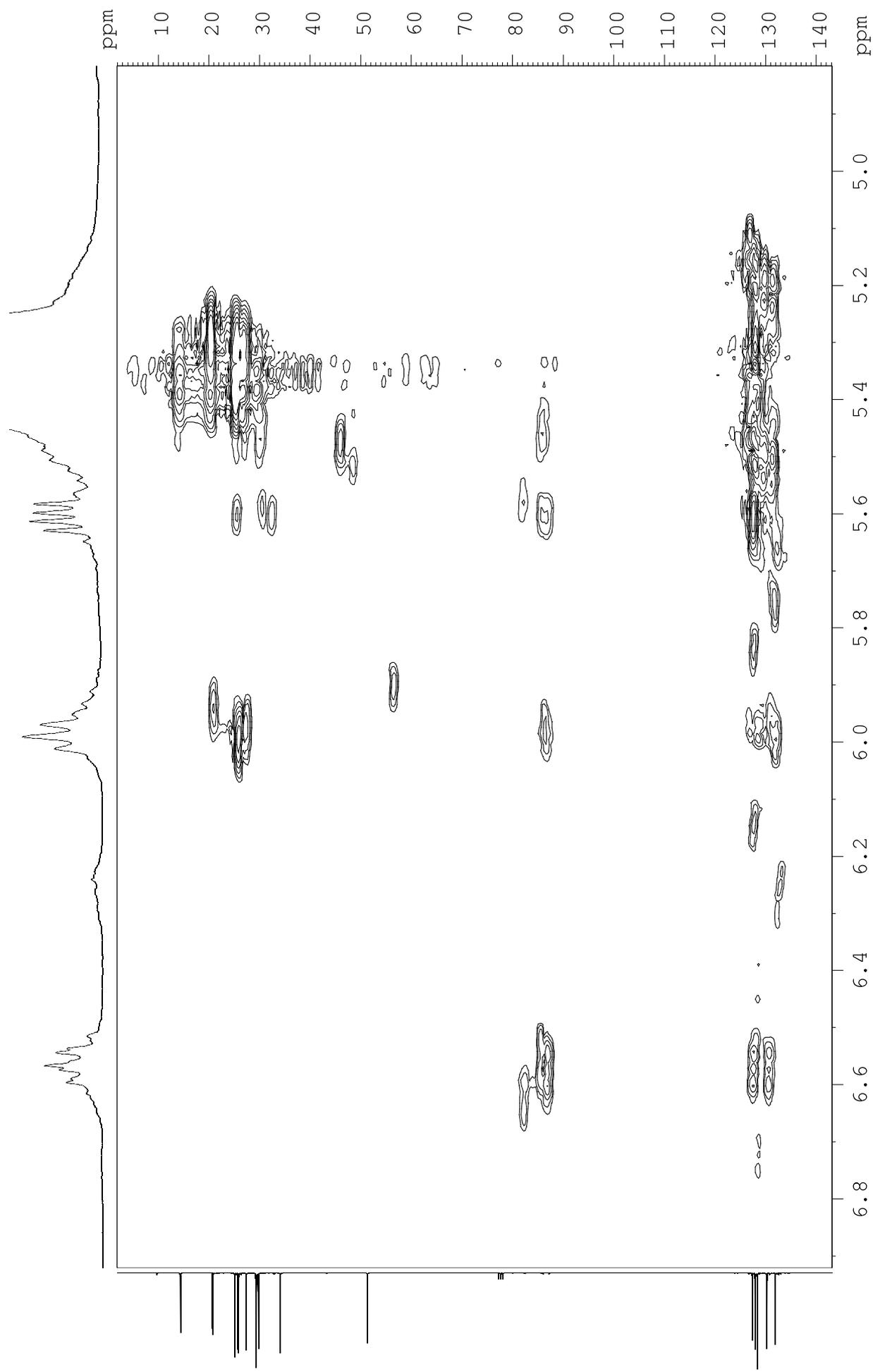


Figura 4 - Correlações diretas de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Figura sem ampliações.

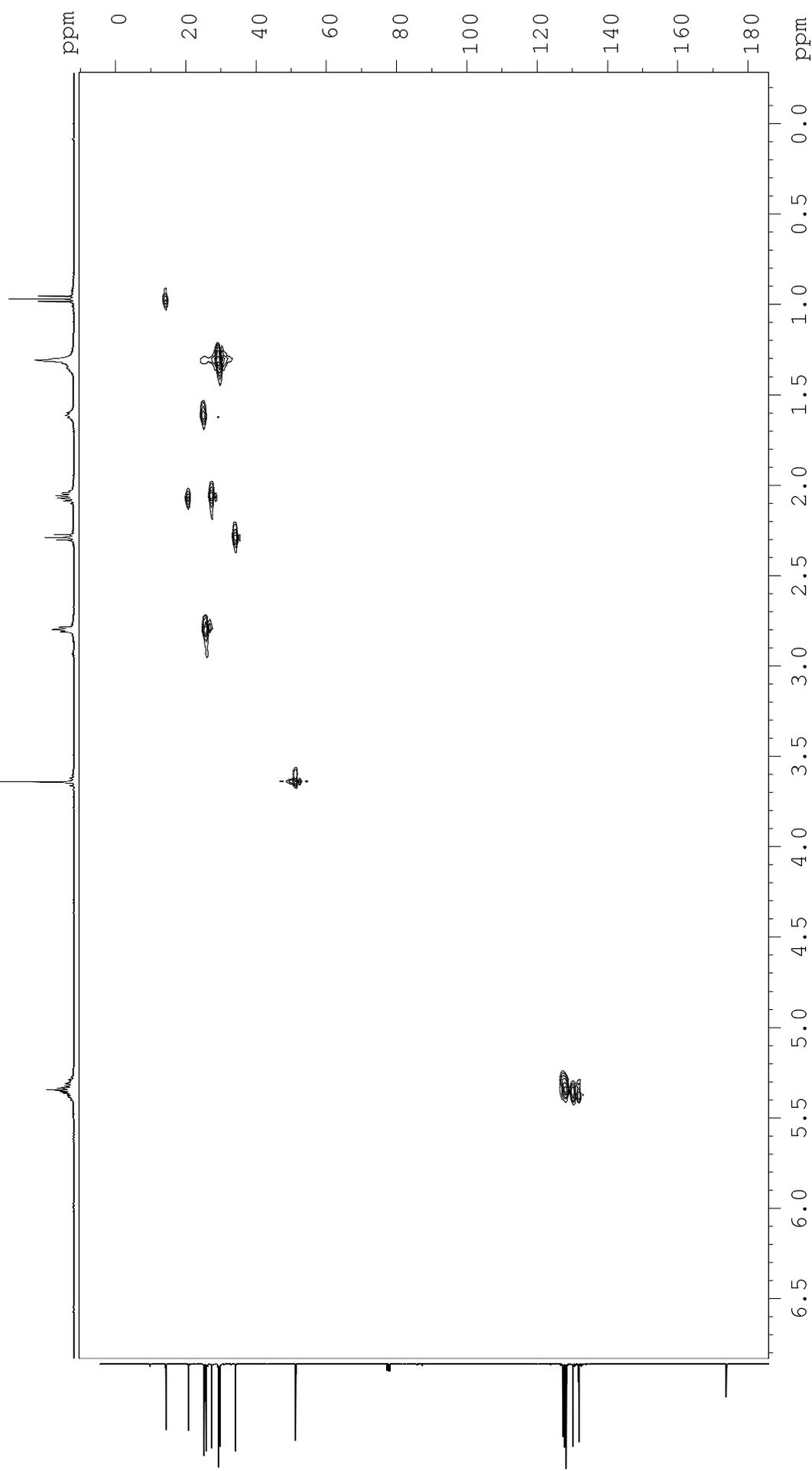


Figura 5 - Correlações diretas de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 1) 0 a 4 ppm.

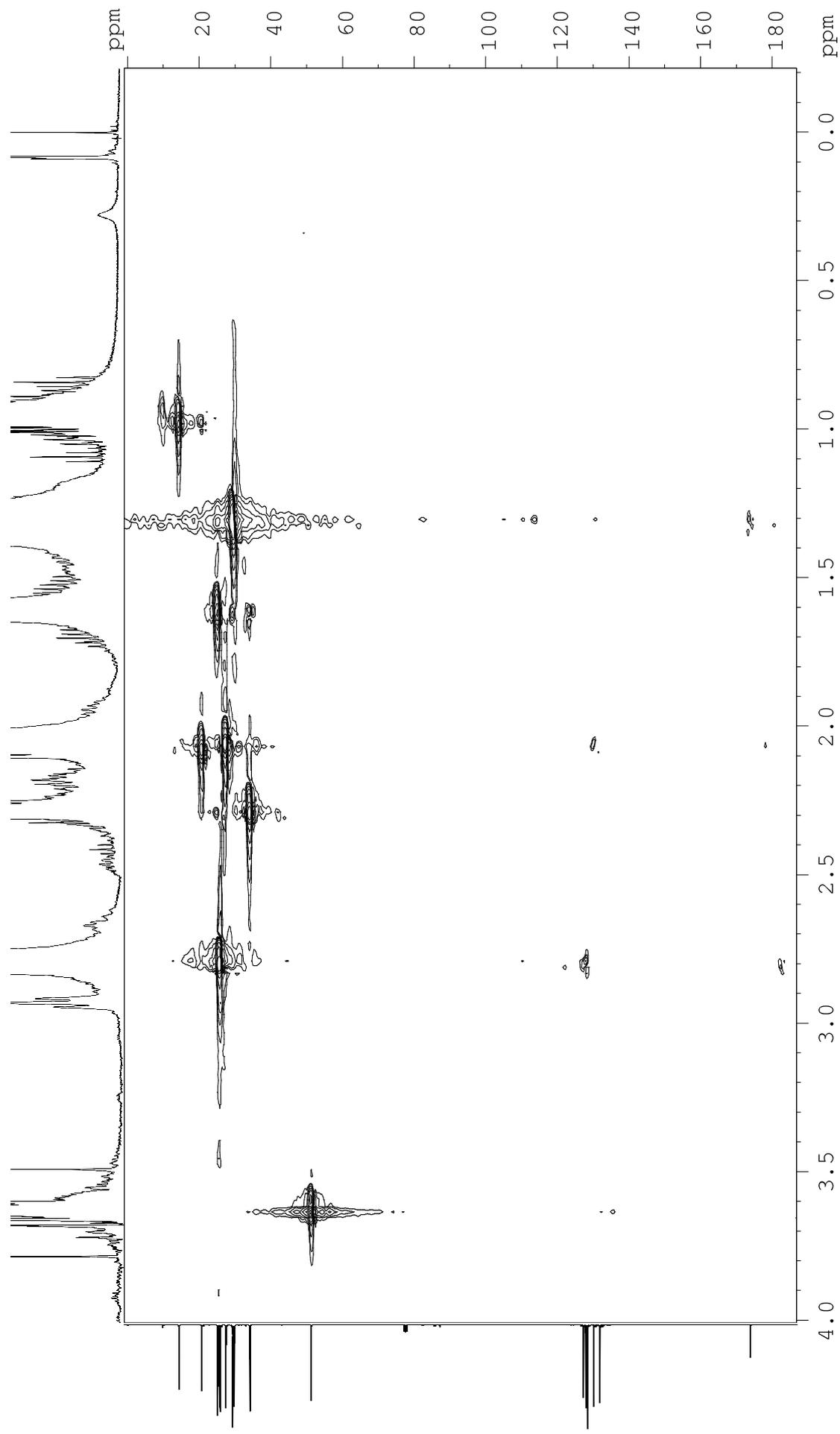


Figura 6 - Correlações diretas de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 2) 3 a 7 ppm.

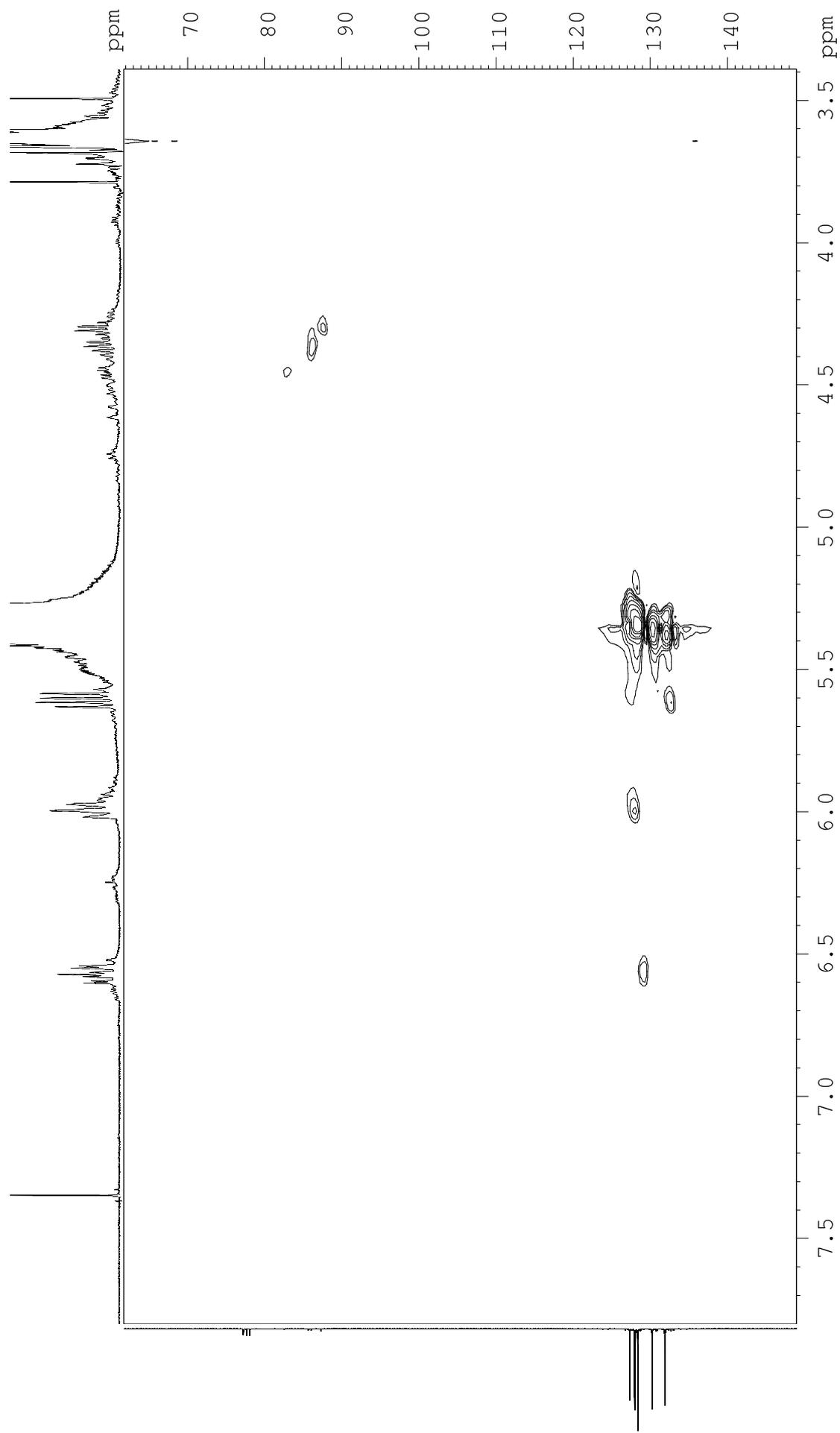


Figura 7 - Correlações diretas de ^1H - ^{13}C , obtidas através do experimento de gHSQC (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 2) 4 a 5 ppm.

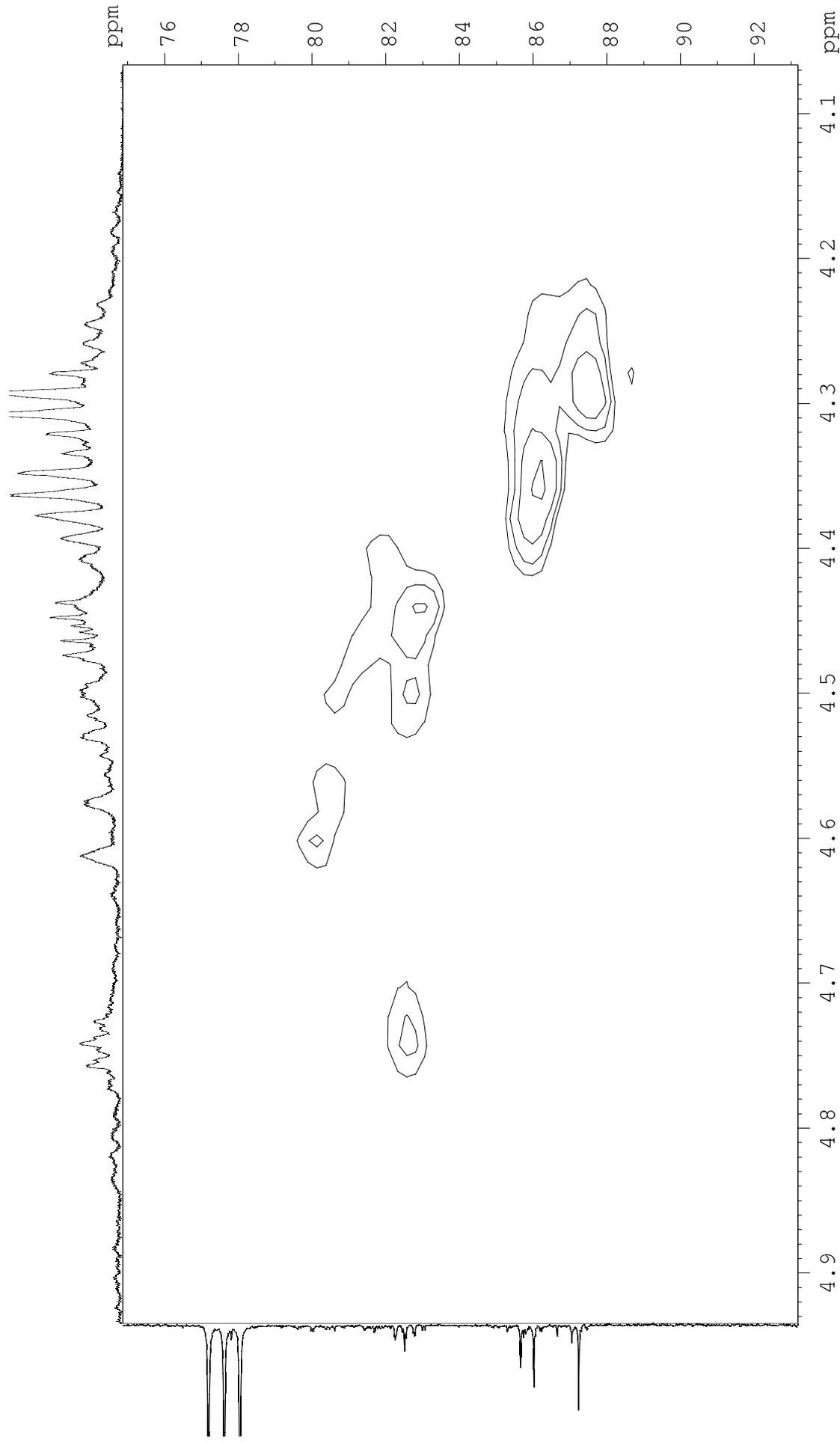


Figura 8 - Correlações diretas de ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gTOCSY (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Sem Ampliação.

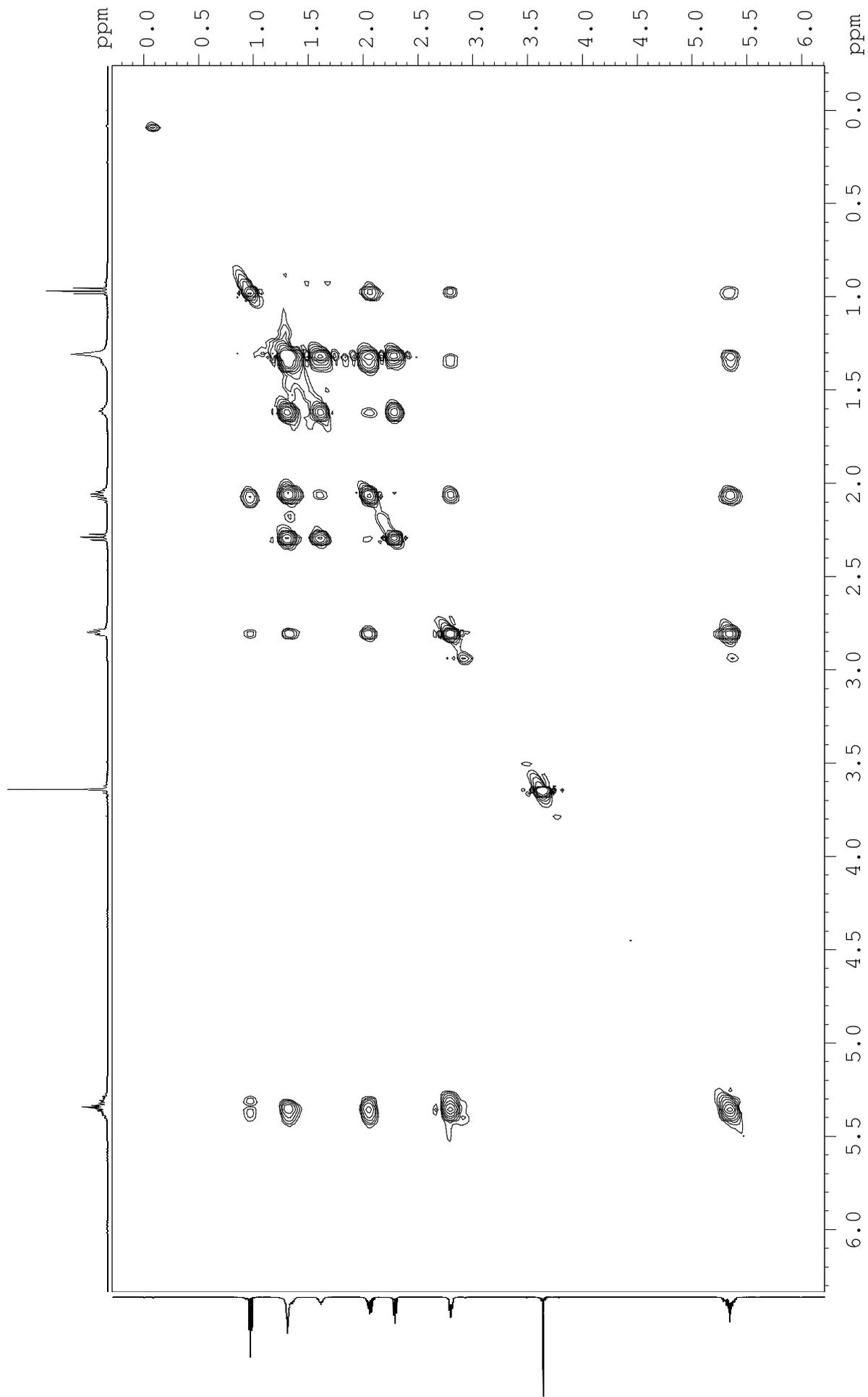


Figura 9 - Correlações diretas de ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gTOCSY (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 1) 0 a 5 ppm.

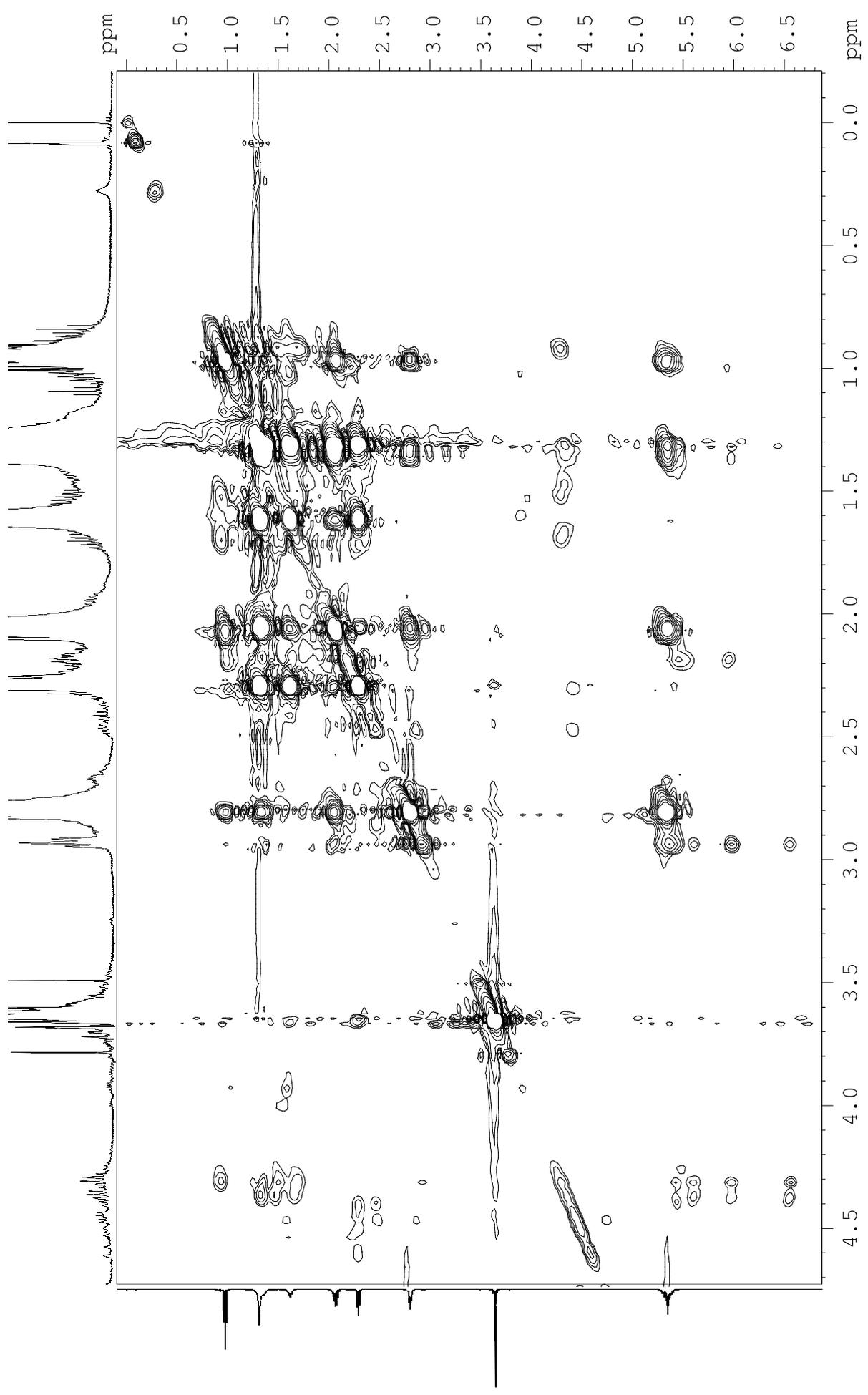


Figura 10 - Correlações diretas de ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gTOCSY (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 1) 4 a 7 ppm.

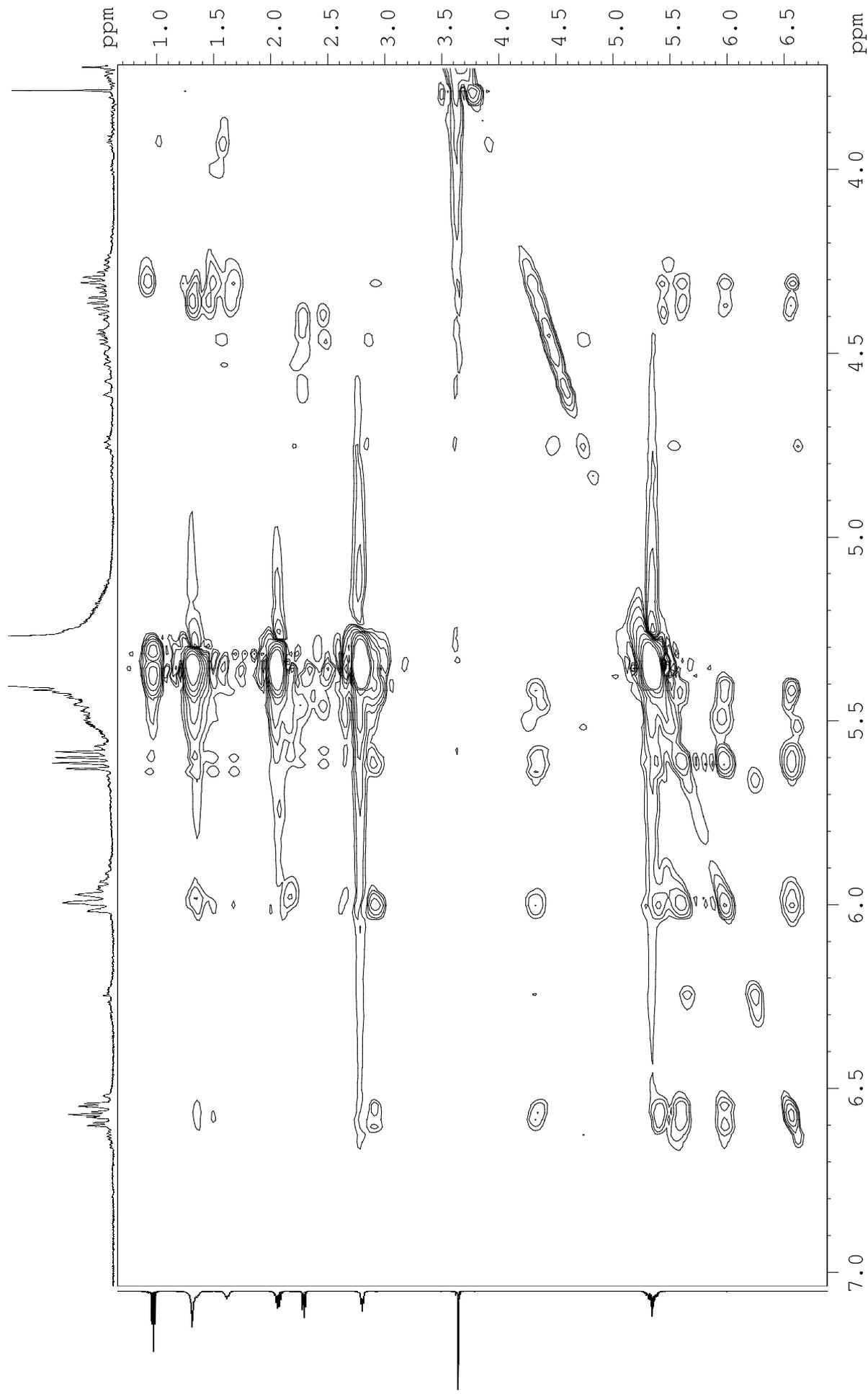


Figura 11 - Correlações diretas de ^1H - ^1H , obtidas através do experimento de gTOCSY (CDL3, Bruker Avance III 500, 11,75 T) da amostra de linolenato de metila. Ampliação 1) 6 a 9 ppm.

