



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

JOSÉ NILSON DA CONCEIÇÃO

CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA E ESTUDO DE
DEGRADAÇÕES DE ÓLEOS E BIODIESEIS
OBTIDOS A PARTIR DO
GERGELIM BRANCO (*Sesame indicum* L.)
E DO PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

DOURADOS
MARÇO/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

JOSÉ NILSON DA CONCEIÇÃO

CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA E ESTUDO DE
DEGRADAÇÕES DE ÓLEOS E BIODIESEIS
OBTIDOS A PARTIR DO
GERGELIM BRANCO (*Sesame indicum* L.)
E DO PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Ciência Ambiental.

DOURADOS
MARÇO/2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C744c	<p>Conceição, José Nilson da. Caracterização óptica e estudo de degradações de óleos biodieseis obtidos a partir do gergelim branco (<i>Sesame indicum</i> L.) e do pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.). / José Nilson da Conceição. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 110f.</p> <p>Orientadora: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Imagem de fluorescência. 2. Fluorescência. 3. Biodiesel. 4. Óleo vegetal. 5. Acidez. I. Título.</p> <p>CDD – 662.669</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Caracterização óptica e estudo de degradações de óleos e biodieseis obtidos a partir da cultivares: *Sesame indicum L.* e *Jathropa curcas L.***”, de autoria de **José Nilson da Conceição**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. Sandro Márcio Lima
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 27 de Março de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa Tatiane, ao
meu filho João Vitor, aos meus pais Jovenília e
Teodolindo e aos meus irmãos Anderson, Anízia e
José Nelson.

“Nada é evidente. Nada é gratuito. Tudo é construído.” (Gaston Bachelard)

AGRADECIMENTOS

- Ao Meu Senhor e Meu Deus por me conceder forças para que eu combatesse um bom combate ao final da jornada.
- À minha companheira, esposa, Vida Minha, Tatiane Souto e meu filho João Vitor pelo incentivo, paciência, orações e compreensão da minha ausência devido às longas horas de análises.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.
- Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires, por acreditar em mim, pela orientação, pela amizade. Sobretudo por me incentivar e capacitar a prosseguir por caminhos nunca antes imaginados que seriam possíveis trilhar.
- Aos integrantes do Grupo de Óptica Aplicada (GOA) e principalmente aos integrantes da “Família Caires”.
- Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.
- Ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães da USP – São Carlos, pela colaboração com o nosso grupo.
- À Prof^a Dr. Rozanna Muzzi por ceder o espaço do laboratório e equipamentos para extração do óleo via solvente e aos seus alunos de mestrado Maydla e Wilson pela ajuda.
- À Vanessa e Diany pela paciência ao ensinar como sintetizar o biodiesel.
- Aos amigos Flávio, Cícera, Deluana e Alessandra pela força na metodologia para determinação do índice de acidez das amostras.
- Ao técnico de laboratório e amigo William, que não é o “Shakespeare”, nem muito menos o “Bonner”, mas é o Falco, pela ajuda com os equipamentos e discussões.
- Por fim, a todos aqueles, que de uma maneira ou de outra, contribuíram para que eu chegasse ao final desta jornada.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
AG – Ácido Graxo
AGL – Ácido Graxo Livre
ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOAC – Associação de Químicos Analíticos Oficiais
AOM - Método de Oxigênio Ativo
ASTM - American Society for Testing and Materials
ATR – Atenuador de Reflectância Total
BOGB – Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco
BOPM – Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso
CCD – Dispositivo de Carga Acoplada
CEN - Comité Européen de Normalisation
Chl - Clorofila
EF - Espectroscopia de Fluorescência
EFI - Espectroscopia de Fluorescência por Imagem
EN – Norma Europeia
FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier
GOA - Grupo de Óptica Aplicada
IA – Índice de Acidez
ISO - International Organization for Standardization
OGB – Óleo do Gergelim Branco
OPM – Óleo do Pinhão-Manso
OSI - Índice de Estabilidade Oxidativa
P-DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada
PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
TAG – Triacilglicerol
UV – Radiação Ultravioleta
Vis – Radiação Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações e métodos propostos pela ANP para análise do biodiesel.....	6
Tabela 2 – Composição dos principais ácidos graxos presentes no OGB e no OPM.....	10
Tabela 3 – Comparação IA do OGB via prensa com o OGB via solvente.....	84
Tabela 4 – IA do OPM antes e depois da neutralização	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas dos principais ésteres metílicos presentes em óleos vegetais e gorduras	4
Figura 2. Ilustração de uma reação de transesterificação	5
Figura 3. Estruturas moleculares da sesamina, sesamolina, sesamol e γ -tocoferol	7
Figura 4. Estrutura molecular da Chl.....	8
Figura 5. Estruturas moleculares dos principais carotenoides presentes em óleos vegetais: (a) xantofilas e (b) carotenos	9
Figura 6. Ácidos graxos comuns de ésteres metílicos presentes em moléculas do biodiesel.....	11
Figura 7. Ilustração resumida do mecanismo de autoxidação de ácidos graxos insaturados	12
Figura 8. Diagrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente.....	15
Figura 9. Etapas da extração do OGB. (a) Prensagem, (b) filtragem a vácuo, (c) óleo pronto para estudo.....	18
Figura 10. Síntese do BGB. (a) Reação de transesterificação, (b) separação das fases, (c) retirada glicerol e (d) biodiesel pronto para estudo	19
Figura 11. Etapas da extração do OPM. (a) Trituração das sementes, (b) cartucho com sementes trituradas, (c) extrator Soxhlet, (d) OPM na bomba de alto vácuo e (e) óleo pronto para estudo.....	20
Figura 12. Síntese do BPM. (a) Reação de neutralização, (b) extração da água após a neutralização, (c) reação de transesterificação, (d) separação das fases e (e) biodiesel pronto para estudo.....	22
Figura 13. (a) Degradação acelerada em estufa de amostras de óleos e biodieseis. (b) Amostras termodegradadas e prontas para armazenamento em geladeira	23
Figura 14. (a) EFP acoplado ao Closed FluorCam. (b) Porta-amostras. (c) Amostras sendo excitadas dentro do Closed FluorCam.....	25
Figura 15. Diagrama esquemático do Closed FluorCam usado na geração das imagens de Fluorescência da Chl acoplado ao laser de 405 nm do espectrofluorímetro portátil.....	25
Figura 16. Espectros de absorção do OGB e do BGB na faixa do infravermelho médio.	

Deslocamento da banda de absorção de 1745 cm ⁻¹ (OGB) para 1742 cm ⁻¹ (BGB) indica a formação dos ésteres metílicos	28
Figura 17. Espectros de absorção do OPM e do BPM na faixa do infravermelho médio. Deslocamento da banda de absorção de 1743 cm ⁻¹ (OPM) para 1742 cm ⁻¹ (BPM) indica a formação dos ésteres metílicos	29
Figura 18. Espectros de absorção UV/Vis das amostras termodegradadas do OGB com um pico máximo em torno 233 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 288 nm (sesamol e produtos de segunda degradação)	30
Figura 19. Razão absorbâncias x tempo de aquecimento das amostras de OGB mostrando um aumento na absorbância com o passar do tempo	31
Figura 20. Espectros de absorção UV/Vis das amostras termodegradadas do BGB com um pico máximo em torno 233 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 288 nm (sesamol e produtos de segunda degradação)	32
Figura 25. Absorbância x Tempo de Aquecimento no pico máximo de absorbância (233 nm) das amostras de BGB mostrando um aumento na absorbância. Possivelmente associado à formação dos compostos de primeira degradação com o passar do tempo.	37
Figura 21. Razão absorbâncias x tempo de aquecimento das amostras de BGB mostrando um aumento na absorbância com o passar do tempo	33
Figura 22. Espectros de absorção UV/Vis das amostras termodegradadas do OPM com um pico máximo em torno 233 nm (produtos de primeira degradação) e outro . em torno de 271 nm (produtos de segunda degradação)	34
Figura 23. Razão absorbâncias x tempo de aquecimento das amostras de OPM mostrando um aumento na absorbância com o passar do tempo até as 12 primeiras horas	35
Figura 24. Espectros de absorção UV/Vis das amostras termodegradadas do BPM com um pico máximo em torno 230 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 270 nm (produtos de segunda degradação)	36
Figura 25. Razão absorbâncias x tempo de aquecimento das amostras de BPM mostrando um aumento na absorbância com o passar do tempo até as 12 primeiras horas	37

Figura 26. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de OGB diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	38
Figura 27. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do OGB associado aos tocoferóis compreendido entre 290 nm e 400 nm e pico máximo em torno de 320 nm quando excitado em 285	39
Figura 28. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (320 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de OGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência dos tocoferóis com o passar do tempo.....	40
Figura 29. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do OGB associado à Chl compreendido entre 590 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm.....	41
Figura 30. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (625 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de OGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência da Chl com o passar do tempo.....	42
Figura 31. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de BGB diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	43
Figura 32. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do BGB associado aos tocoferóis compreendido entre 290 nm e 400 nm e pico máximo em torno de 318 nm quando excitado em 285 nm	44
Figura 33. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (318 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de BGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência dos tocoferóis com o passar do tempo.....	45
Figura 34. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do BGB associado aos tocoferóis compreendido entre 590 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm.....	46
Figura 35. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão(625 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de BGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência da Chl com o passar do tempo.....	47

Figura 36. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de OPM diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	48
Figura 37. Possível estrutura molecular dos tetraenos conjugados gerados pela decomposição do éster metílico linolenato durante o processo de degradação.....	57
Figura 38. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do OPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 325 nm quando excitado em 260 nm.....	49
Figura 39. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (325 nm) quando excitado em 260 nm das amostras de OPM mostrando um aumento na intensidade de fluorescência dos tetraenos conjugados com o passar do tempo.....	50
Figura 40. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de OPM diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	51
Figura 41. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do BPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 313 nm quando excitado em 265 nm.....	52
Figura 42. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (313 nm) quando excitado em 265 nm das amostras de BPM mostrando um aumento na intensidade de fluorescência dos tetraenos conjugados com o passar do tempo.....	53
Figura 43. Comparação física entre os óleos de gergelim . branco: (a) OGB via solvente e (b) OGB via prensa.....	54
Figura 44. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D dos óleos de gergelim branco: (a) OGB via solvente e (b) OGB via prensa.....	55
Figura 45. Espectros de fluorescência do OGB extraído via prensa e via solvente associados à Chl compreendidos entre 655 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 674 nm quando excitado em 405 nm.....	56
Figura 46. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de Óleo de Gergelim Branco (OGB) que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	57

Figura 47. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do OGB associado aos tocoferóis compreendido entre 300 nm e 420 nm e pico máximo em torno de 354 nm quando excitado em 315 nm	58
Figura 48. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (354 nm) quando excitado em 315 nm das amostras de OGB mostrando uma diminuição na intensidade de fluorescência dos tocoferóis com o passar do tempo.....	59
Figura 49. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do OGB associado à clorofila compreendido entre 650 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 674 nm quando excitado em 405 nm	60
Figura 50. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (674 nm) das amostras de OGB excitadas em 405 nm. Mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência da Chl com o passar do tempo	60
Figura 51. Espectro de fluorescência das amostras termodegradadas do OGB associado aos compostos de degradação compreendido entre 390 nm e 600 nm e pico máximo em torno de 460 nm quando excitado em 380 nm.....	62
Figura 52. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (460 nm) das amostras de OGB excitadas em 380 nm.....	70
Figura 53. Flutuações nas intensidades de fluorescência (máximo em 354 nm .associado aos tocoferóis em função do máximo em 460 nm associado aos tetraenos).....	63
Figura 54. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de Biodiesel de Gergelim Branco (BGB) que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	64
Figura 55. Espectro de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB associado aos tocoferóis compreendido entre 300 nm e 420 nm e pico máximo em torno de 337 nm quando excitado em 315 nm	66
Figura 56. Intensidade x Tempo de Aquecimento no pico máximo de emissão (337 nm) das amostras de BGB quando excitado em 315 nm.....	67
Figura 57. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB associado à clorofila (Chl) compreendido entre 650 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 671 nm quando excitado em 405 nm.....	68
Figura 58. Intensidade x Tempo de Aquecimento no pico máximo de emissão (671 nm) das amostras de BGB quando excitado em 405 nm.....	69

Figura 59. Espectro de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB associado aos compostos de degradação compreendido entre 390 nm e 600 nm e pico máximo em torno de 450 nm quando excitado em 380 nm.....	70
Figura 60. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (450 nm) das amostras de BGB quando excitado em 380 nm.....	71
Figura 61. Flutuações nas intensidades de fluorescência (máximo em 354 nm associado aos tocoferóis em função do máximo em 460 nm associado aos tetraenos).....	72
Figura 62. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de Óleo de Pinhão-Manso (OPM) que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	73
Figura 63. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas não-diluídas do OPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 445 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 498 nm quando excitado em 435 nm.....	74
Figura 64. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (498 nm) das amostras de OPM quando excitado em 435 nm.....	75
Figura 65. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de BPM diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.....	76
Figura 66. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas não-diluídas do BPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 370 nm e 660 nm e pico máximo em torno de 434 nm quando excitado em 365 nm.....	77
Figura 67. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (434 nm) das amostras de BPM quando excitado em 365 nm.....	78
Figura 68. Imagem da fluorescência da Chl do OGB quando excitada com laser de 405 nm do sistema de EFP e gerada pelo sistema Closed FluorCam.....	80
Figura 69. Imagem da fluorescência da Chl do BGB quando excitada com laser de 405 nm do sistema de EFP e gerada pelo sistema Closed FluorCam.....	81
Figura 70. Imagens de fluorescência da Chl em amostras não degradadas (0 Hora) excitadas em 405 nm e geradas pelo sistema Closed FluorCam. (a) OGB via prensa (b) OGB via solvente e (c) BGB.....	82
Figura 71. IA das amostras de OGB termodegradadas.....	83
Figura 72. IA das amostras de BGB termodegradadas.....	85

Figura 73. IA das amostras de OPM termodegradadas.	86
Figura 74. IA das amostras de BPM termodegradadas.....	88

RESUMO

Diante da possível escassez mundial de combustíveis fósseis os biocombustíveis emergem como fontes de energia extremamente promissoras por apresentarem reduzida emissão de poluentes e serem renováveis. Em meio a esta necessidade o biodiesel é um potencial candidato. Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis), o biodiesel pode ser descrito como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos, é biodegradável e pode ser produzido a partir de gorduras animais, óleos vegetais ou microbianos. O biodiesel está suscetível a processos de oxidação ou degradação que interferem na sua qualidade e estão relacionados à estabilidade oxidativa. O monitoramento da estabilidade oxidativa do biodiesel é feito por técnicas tradicionais como: Índice de Estabilidade Oxidativa (OSI), Rancimat®, Índice de Iodo e Índice de Acidez. Todavia, essas técnicas apresentam algumas limitações, e a Espectroscopia de Fluorescência (EF) vem sendo utilizada e tem se mostrado capaz de superá-las na avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel. Recentemente a EF foi proposta como uma nova metodologia para determinar o teor de biodiesel em blends de biodiesel/diesel, bem como para monitorar o processo de conversão do óleo em biodiesel. Neste sentido, o presente trabalho objetivou caracterizar e monitorar a termodegradação acelerada de óleos e biodieseis a partir do gergelim branco (*Sesame indicum* L.) e do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) através de técnicas ópticas: Absorção FT-IR-ATR, Absorção UV-Vis, Espectroscopia de Fluorescência (EF), Espectroscopia de Fluorescência por Imagem (EFI) e determinação do Índice de Acidez (IA). Os espectros de absorção no FT-IR-ATR mostram um estiramento do grupo carbonila (C=O) e indicam que ocorreu a conversão dos óleos em biodieseis devido aos deslocamentos das bandas de absorção, em torno de 1745 cm^{-1} (óleo do gergelim branco (OGB)) para 1742 cm^{-1} , (biodiesel do óleo do gergelim branco (BOGB)) e de 1743 cm^{-1} (óleo do pinhão-manso (OPM)), para 1742 cm^{-1} , (biodiesel do óleo do pinhão-manso (BOPM)). A absorção apresenta as bandas (232 nm e 280 nm) associadas aos produtos de primeira e segunda degradação. Já a EF mostra uma supressão na fluorescência das amostras indicando que estão sendo degradadas ao passo que aumenta o tempo de aquecimento e um aumento na fluorescência (350-500 nm), possivelmente associado aos tetraenos conjugados. Por sua vez a EFI, uma técnica inovadora resultante de um depósito de Patente de Invenção, mostra-se capaz de indicar a supressão na fluorescência da Clorofila (Chl) por meio de imagens. Por outro lado, o IA corrobora com os resultados obtidos pelas técnicas ópticas por apresentar um aumento no IA das amostras analisadas. Em suma, nossos resultados indicam que foi possível monitorar a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e do biodiesel de forma imediata por meio das técnicas ópticas, pela obtenção de imagem de fluorescência emitida pela Chl e na constatação do aumento no IA das amostras termodegradadas.

Palavras-chave: Imagem de Fluorescência, Fluorescência, Biodiesel, Óleo Vegetal, Acidez

ABSTRACT

Given the possible global shortage of fossil fuels biofuels emerge as extremely promising energy sources for having reduced emissions and be renewable. Amid this need biodiesel is a potential candidate. According to ANP (National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels), biodiesel can be described as a mixture of alkyl esters of fatty acids, is biodegradable and can be produced from vegetable oils or animal fats. Biodiesel is susceptible to oxidation or degradation processes that interfering with their quality and are related to oxidative stability. The monitoring of the oxidative stability of biodiesel is made by traditional techniques as: Oxidative Stability Index (OSI), Rancimat®, Iodine Value and Acid Value. However, these techniques have some limitations, and Fluorescence Spectroscopy (FS) has been used and has been able to transpose them to evaluate the oxidative stability of biodiesel. FS has been recently proposed as a new method to determine the content of biodiesel blends of biodiesel / diesel fuel as well as to monitor the conversion process oil into biodiesel. Within this context, this study aimed to characterize and monitor the accelerated thermodegradation oils and biodiesels from two cultivars: *Sesame indicum* L. and *Jatropha curcas* L. using optical techniques: FT-IR-ATR absorption, absorption, Fluorescence Spectroscopy (FS), Fluorescence Spectroscopy Imaging (FSI) and determining the Acid Value (AV) (AOAC 940.28 method). In this way, the FT-IR-ATR absorption show a stretch carbonyl group (C = O), indicating that conversion occurred biodiesels oils due to shifts in the absorption bands around 1745 cm^{-1} (white sesame oil (WSO)) 1742 cm^{-1} (white sesame oil biodiesel (WSOB)) and 1743 cm^{-1} (jatropha oil (JO)), 1742 cm^{-1} , (jatropha oil biodiesel (JOB)). The absorption features bands (232 nm and 280 nm) associated with the first and second degradation products. SF shows quenching in the fluorescence of the samples indicating that they are being degraded to whereas increases the heating time and an increase in fluorescence (350-500 nm) most likely associated with conjugated tetraene. In turn FSI, a resultant innovative technique of a Patent deposit Invention, proven able to indicating the quenching of chlorophyll (Chl) fluorescence through images. On the other hands AV agrees with the results obtained by optical techniques for presenting an increase in the AV of the analyzed samples. In conclusion, our results indicate that it was possible to monitor the oxidative stability of the vegetable oil and biodiesel immediately by optical techniques for obtaining fluorescence imaging emitted by Chl and verification of the increase in AV of thermodegraded samples.

Keywords: Fluorescence Imaging, Fluorescence, Biodiesel, Vegetable Oil, Acidity

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Figuras.....	v
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
Sumário.....	xiv
Capítulo 1. Introdução	1
Capítulo 2. Fundamentação Teórica	4
2.1 Biodiesel	4
2.2 Fontes Oleaginosas	6
2.3 Estabilidade Oxidativa do Biodiesel.....	10
2.4 Técnicas de Caracterização Óptica	12
2.4.1 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho.....	12
2.4.2 Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis.....	12
2.4.3 Espectroscopia de Fluorescência	13
2.4.4 Espectroscopia de Fluorescência por Imagem.....	15
2.5 Análise Físico-Química	16
2.5.1 Índice de Acidez	16
Capítulo 3. Objetivos	17
3.1 Objetivos específicos	17
Capítulo 4. Procedimento Experimental.....	18
4.1 Extração dos Óleos e Síntese dos Biodieseis.....	18
4.2 Termodegradação das Amostras	22
4.3 Caracterização das Amostras de Óleos e Biodieseis	23
4.3.1 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho.....	23
4.3.2 Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis.....	24
4.3.3 Espectroscopia de Fluorescência	24
4.3.4 Espectroscopia de Fluorescência por Imagem.....	24
4.3.5 Índice de Acidez	26
Capítulo 5. Resultados e Discussão	27
5.1 Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho.....	27

5.1.1 Estudo da Transesterificação	27
5.2 Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis	29
5.2.1 Caracterização do Óleo do Gergelim Branco (OGB-Diluído).....	29
5.2.2 Caracterização do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BOGB-Diluído).....	32
5.2.3 Caracterização do Óleo do Pinhão-Manso (OPM-Diluído).....	33
5.2.4 Caracterização do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BOPM-Diluído).....	35
5.3 Espectroscopia de Fluorescência	37
5.3.1 Caracterização do Óleo do Gergelim Branco (OGB-Diluído).....	38
5.3.2 Caracterização do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BOGB-Diluído).....	42
5.3.3 Caracterização do Óleo do Pinhão-Manso (OPM-Diluído).....	47
5.3.4 Caracterização do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BOPM-Diluído).....	50
5.3.5 Caracterização do Óleo do Gergelim Branco (OGB-Não-Diluído).....	54
5.3.6 Caracterização do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BOGB-Não-Diluído).....	63
5.3.7 Caracterização do Óleo do Pinhão-Manso (OPM-Não-Diluído).....	72
5.3.8 Caracterização do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BOPM-Não-Diluído)...	75
5.4 Espectroscopia de Fluorescência po Imagem (EFI)	79
5.5 Índice de Acidez (IA)	82
5.5.1 Determinação do IA do Óleo do Gergelim Branco (OGB)	82
5.5.2 Determinação do IA do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BOGB)	85
5.5.3 Determinação do IA do Óleo do Pinhão-Manso (OPM)	86
5.5.4 Determinação do IA do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BOPM).....	87
Capítulo 6. Conclusão.....	89
Capítulo 7. Referências.....	90

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Diante da possibilidade finita na produção mundial de combustível derivado de petróleo, os biocombustíveis, provenientes de matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana, como as algas, emergem como fontes de energia extremamente promissoras por apresentarem reduzida emissão de poluentes e serem renováveis. Neste contexto, destaca-se o biodiesel¹.

O biodiesel é caracterizado como um combustível biodegradável e sua produção provêm de fontes como gorduras animais ou óleos vegetais. Sua utilização como fonte energética proporciona redução na emissão de poluentes, diminui a compra de óleo diesel de petróleo de outros países pelo Brasil, e ainda possibilita, além de vantagens econômicas e ambientais, a geração de renda e inclusão social².

Buscando implementar a cadeia de produção de biodiesel no Brasil, em dezembro de 2004, foi apresentado pelo Governo Federal o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Em janeiro de 2005 a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) passou a regulamentar e fiscalizar as atividades relacionadas a cadeia do biodiesel. Atualmente o biodiesel tem substituído o óleo diesel em motores automotivos à combustão, sendo utilizado puro (B100) ou na mistura biodiesel/diesel (B5). Diante disso, a regulamentação vigente determinada pela ANP torna obrigatória a adição do percentual de 7% de biodiesel ao óleo diesel vendido em todos os postos de combustível do Brasil.³

Todavia o biodiesel, assim como os óleos vegetais, microbianos e gorduras, está suscetível a processos de oxidação. Estudos vêm sendo realizados para conhecer e entender esses processos que promovem a degradação de óleos e biodieseis e têm mostrado que eles estão relacionados com a estabilidade oxidativa do biodiesel e quando exposto a altas temperaturas está sujeito a sofrer uma degradação térmica.^{4, 5, 6, 7} Já se for exposto à luz, à fotodegradação.^{8, 9, 10}

Knothe (2006)¹¹ e Knothe et al. (2006)¹² ressaltam o biodiesel está propenso a oxidar ou degradar e isso promove alteração em sua qualidade. Durante o complexo processo de oxidação ocorrem reações em cadeia formando hidroperóxidos que resultam em aldeídos, ácidos, dentre outros compostos oxigenados.

Neste sentido, diversas metodologias tradicionais para avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel têm sido utilizadas, como: Método de Oxigênio Ativo (AOM), Índice de Estabilidade Oxidativa (OSI), Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC), Rancimat, Índice de Iodo e Índice de Acidez.¹² Em meio a esses métodos avaliativos, a ANP, por meio da Resolução nº 07/2008, recomenda a norma europeia EN 14112, método Rancimat, como parâmetro para determinar a estabilidade oxidativa do óleo e do biodiesel.

Devido algumas limitações dessas técnicas, como por exemplo, necessidade de um pré-preparo das amostras, destruição das amostras durante as análises, tempos de processamentos, etc., torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas para o controle da qualidade de óleos e biodieseis que possibilite facilidade em seu manuseio, rapidez e precisão nos resultados, alta sensibilidade, baixo custo na análise da amostra e ainda, proporcione realizar medidas diretas, *in situ* e sem a necessidade de preparo prévio das amostras.

Diante destas necessidades e do crescente avanço na produção e uso do biodiesel como biocombustível, o método baseado na Espectroscopia de Fluorescência (EF) vem sendo utilizado e tem se mostrado capaz de atender os requisitos elencados e vencer algumas limitações apresentadas pelas técnicas tradicionais para estudos e análises envolvendo o biodiesel.

Em meio a este quadro, o Grupo de Óptica Aplicada (GOA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) tem publicado recentemente relevantes trabalhos que utilizam a técnica óptica de Espectroscopia de Fluorescência (EF) como metodologia inovadora no estudo e caracterização de óleos e biodieseis. O trabalho apresentado por Scherer e colaboradores em 2011¹³ foi pioneiro no estudo de biodieseis e misturas por meio da EF e determinaram a quantidade de biodiesel presente nas blendas biodiesel/diesel. Em 2012 Caires e colaboradores¹⁴ determinaram o teor de biodiesel contido em blendas de biodiesel/diesel.

Já Chimenez e colaboradores¹⁵ em 2012 monitoraram o processo de conversão do óleo em biodiesel. Em 2014, Magalhães e colaboradores¹⁶ identificaram os tetraenos conjugados, compostos presentes nos produtos de degradação, como fluoróforos responsáveis pela emissão de fluorescência. Nesse mesmo ano, Caires e colaboradores¹⁷ mostraram que o aumento da fluorescência em misturas biodiesel/diesel estava

associado ao aumento da viscosidade das blendas à medida que aumentava-se o teor de biodiesel no diesel.

Dado o grande potencial apresentado pela Espectroscopia de Fluorescência Convencional, ainda em 2014, Caires e colaboradores¹⁸ avançam na utilização dessa ferramenta óptica na análise de óleos e biodieseis e depositam um pedido de Patente de Invenção (nº BR 1020140138960) que consiste no uso da Imagem de Fluorescência da Chl para o monitoramento da degradação de óleos vegetais e biodieseis, tendo aplicação dentro da área de controle de qualidade, com a vantagem de não ser um método destrutível, não necessitar um pré-preparo das amostras e um pós-processamento dos resultados, remetendo resultados imediatos.

No presente trabalho realizou-se a caracterização óptica (Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio por Transformada de Fourier acoplado ao Atenuador de Reflectância Total (FT-IR-ATR), Espectroscopia de Absorção (UV-Vis), Espectroscopia de Fluorescência (EF), Espectroscopia de Fluorescência por Imagem (EFI)), o estudo da degradação térmica do óleo e biodiesel extraído das cultivares gergelim branco (*Sesamum indicum* L.) e pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) via técnicas ópticas e análise química das amostras através do cálculo do Índice de Acidez (IA).

Neste sentido, o desenvolvimento desse trabalho foi importante porque a aplicação dessas técnicas ópticas no estudo da termodegradação de óleos e biodieseis é inovador e torna-se necessário para validá-las como ferramentas de avaliação da estabilidade oxidativa desses produtos possibilitando garantir que estão dentro do padrão de qualidade e de acordo com as normas estabelecidas pela ANP.

O Capítulo 2 desta dissertação apresenta a fundamentação teórica utilizada como alicerce para este trabalho. Já o Capítulo 3 mostra os objetivos, seguido do Capítulo 4 que relata os materiais e métodos usados no trabalho. Por sua vez o Capítulo 5 trata dos resultados e discussão e, finalmente, o Capítulo 6 aborda as conclusões e considerações finais.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – BIODIESEL

Os triacilgliceróis ou triglicerídeos (TAG), são substâncias que compõem os óleos vegetais e gordura animal. Os TAG¹¹ possuem propriedades químicas intrínsecas e sob o ponto de vista químico, são ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol. Eles compõem a matéria-prima primordial para a produção de biodiesel e podem ser oriundos das mais diversas fontes como: óleo de soja, amendoim, gergelim, palma, canola, girassol, dendê, óleo de frituras (origem vegetal) e sebo (origem animal).¹²

A Figura 1 mostra a estrutura molecular dos padrões dos principais ésteres metílicos, saturados e insaturados, presentes em óleos vegetais e gorduras.¹⁶

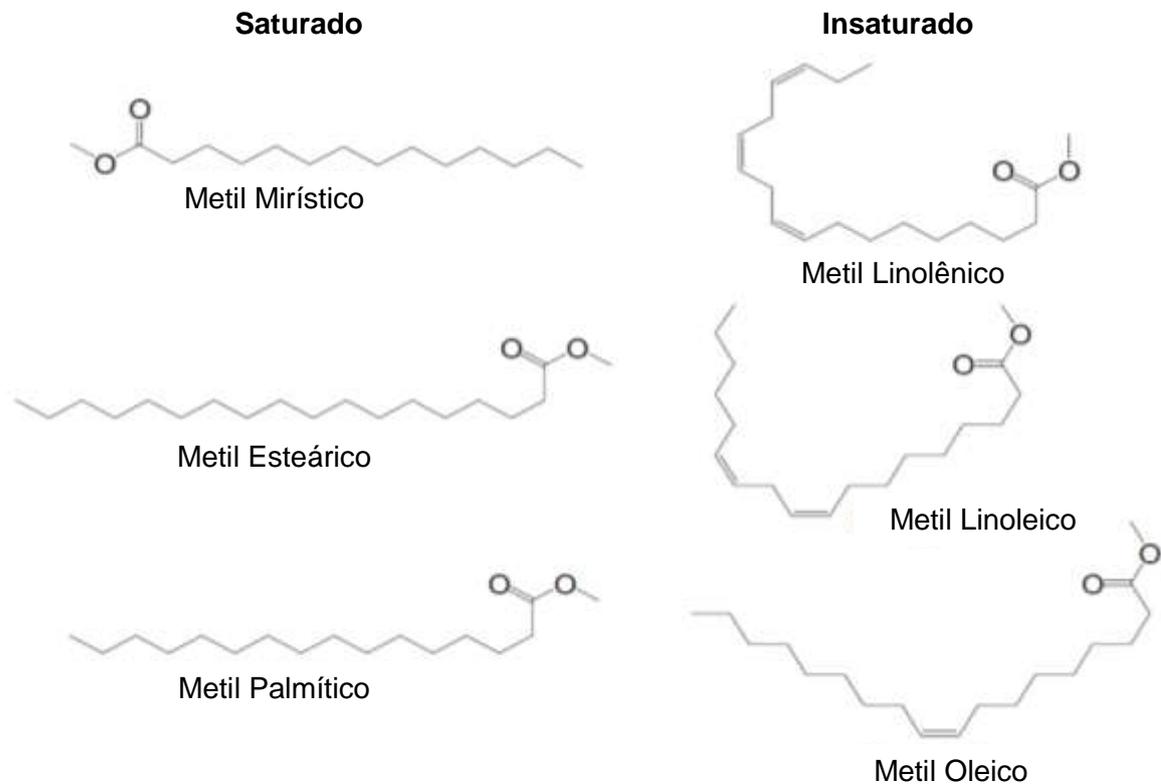


Figura 1. Moléculas dos principais ésteres metílicos.¹⁶

A presença ou não de ligações duplas na longa cadeia de um AG é uma característica que possibilita sua classificação. Assim, ele é dito saturado quando não possui dupla ligação entre os carbonos de sua cadeia, por isso estão fortemente ligados por atrações de van der Waals. Por outro lado, é insaturado quando possui uma ou mais ligações entre os carbonos de sua cadeia.¹⁹

A utilização direta de um óleo ou gordura como combustível é inviabilizada porque esses ácidos graxos possuem contaminantes como fosfolipídios, esteróis, água entre outras impurezas. Diante disso, o óleo para ser utilizado como combustível e não prejudicar os componentes do motor necessita passar por uma reação química que pode ser pirólise, emulsificação ou transesterificação. Dentre esses processos, a transesterificação é apontada como a mais importante para produzir um combustível limpo e seguro para o meio ambiente.^{12, 19}

A Figura 2 ilustra a reação de transesterificação que consiste na utilização de um óleo vegetal ou animal (triglicerídeo). Um tri-éster reage com três moléculas de um álcool, que pode ser metílico ou etílico, sendo o metanol, por fatores econômicos, o mais utilizado. Utiliza-se um catalisador (ácido ou base), geralmente uma base forte como hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH), cuja função é acelerar o processo da reação. Como resultado da reação tem-se três moléculas provenientes dos ésteres metílicos (biodiesel) e uma molécula de glicerol, um subproduto da reação.²⁰

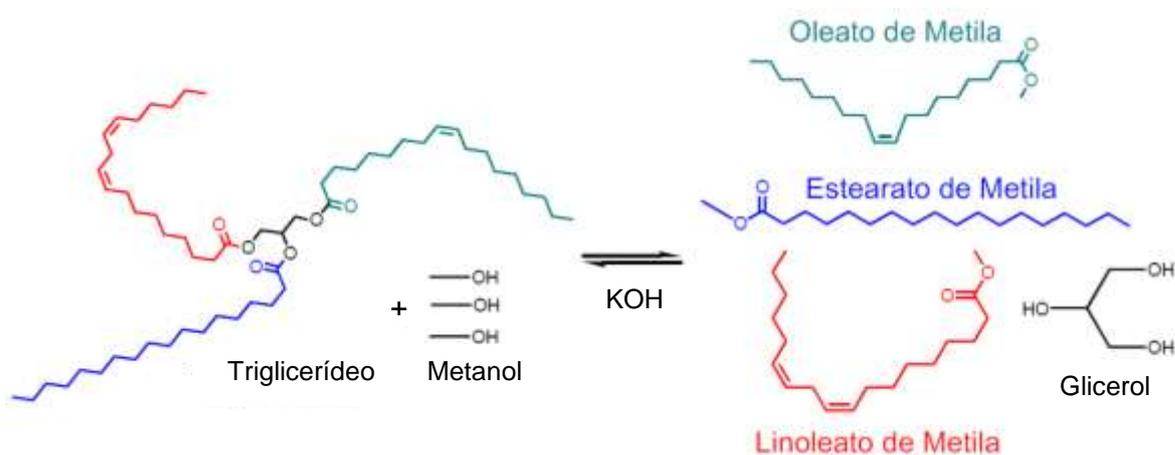


Figura 2. Ilustração de uma reação de transesterificação.²⁰

Neste contexto, a produção e comercialização do biodiesel no Brasil deve seguir as especificações propostas pela ANP de acordo com a Resolução ANP nº 14/2012. Essa resolução prevê que o biodiesel deve possuir características físico-químicas que estão relacionadas diretamente com um padrão de qualidade e estejam de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da "American Society for Testing and Materials" (ASTM), da "International Organization for Standardization" (ISO) e do "Comité Européen de Normalisation" (CEN).³ A Tabela 1 traz algumas especificações que o biodiesel deve ter e os métodos de análise propostos pela ANP.

Tabela 1 – Especificações e métodos propostos pela ANP na análise do biodiesel

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850 a	7148	1298	EN ISO 3675
		900	14065	4052	EN ISO 12185
Viscosidade cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
					EN ISO 12662
Contaminação total, máx.	mg/kg	24	-	-	NBR 15995
					EN 14103
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14104
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104
					EN 14111
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14112
					EN 15751
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín	h	6	-	-	EN 15751

Adaptação: Especificação do Biodiesel - RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.5.2012 - DOU 18.5.2012³

2.2 – FONTES OLEAGINOSAS

O gergelim branco (*Sesamum indicum* L.) é uma oleaginosa que apresenta grande potencial econômico e é utilizada, dentre outras aplicações, como matéria prima

na produção de biodiesel. Esta cultivar é uma herbácea da Família Pedaliaceae, originária da África e Turquia. É amplamente cultivada em inúmeras partes do mundo, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais como os continentes africano e asiático.

No Brasil é cultivada nas regiões semiáridas do nordeste brasileiro e regiões de cerrado. O óleo extraído das sementes apresenta altos índices nutricionais e é rico em ácidos graxos insaturados, como o oleico (47%) e linoleico (41%).²¹.

Possui lignanas, antioxidantes naturais, que atribuem ao óleo de gergelim alta estabilidade oxidativa, portanto apresenta maior resistência à degradação quando comparado aos demais óleos de origem vegetal. Isso porque agem como anti-radical doando hidrogênio ao radical lipídico, finalizam a cadeia e inibem a propagação da oxidação.²² A Figura 3 mostra a estrutura molecular desses antioxidantes mais relevantes presentes no óleo de gergelim.

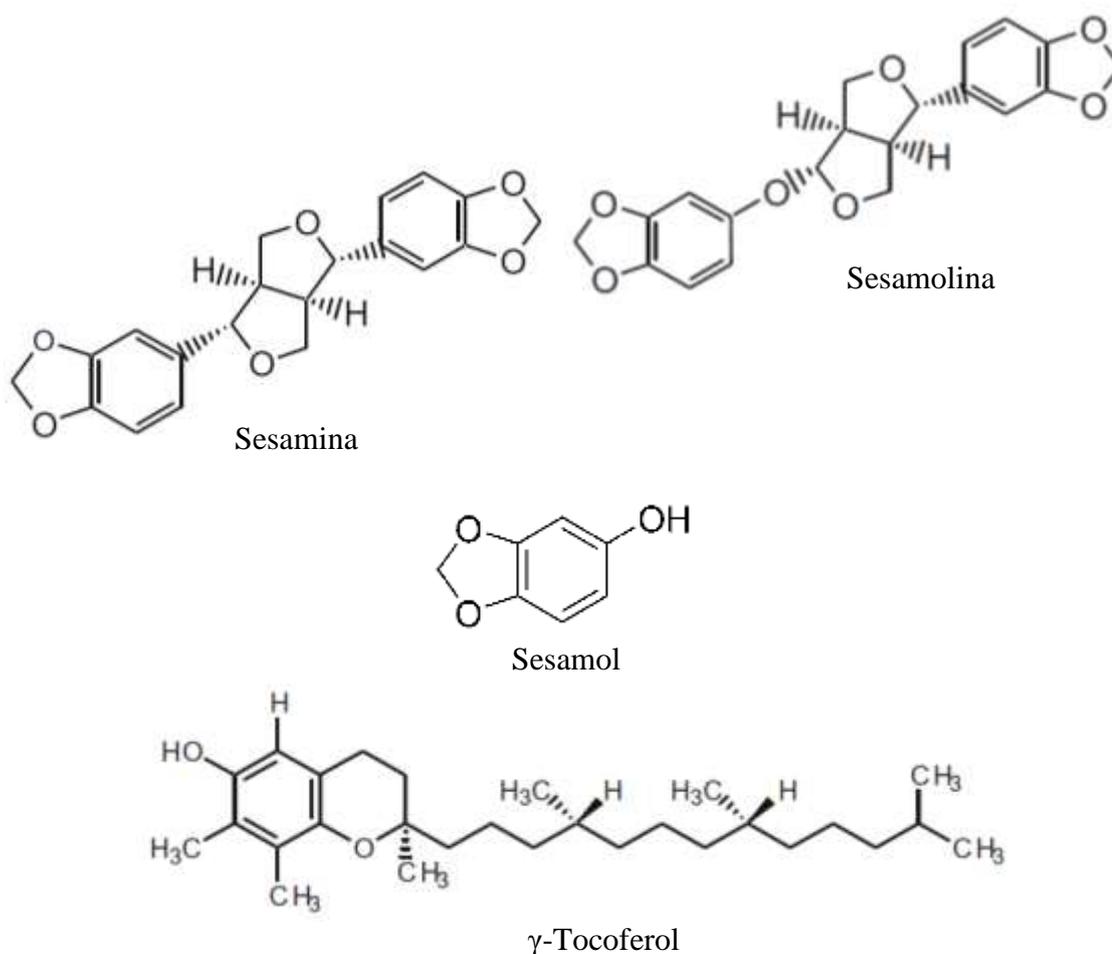


Figura 3. Estruturas moleculares da sesamina, sesamolina, sesamol e γ -tocoferol.²⁴

As principais lignanas presentes na semente do gergelim são a sesamina e a sesamolina. Quando submetidas a um estresse térmico ou aquecimento (90-105°C), a sesamolina forma o sesamol e a sesamina. Juntamente com esses antioxidantes naturais presentes na semente e no óleo do gergelim, os tocoferóis também se destacam, principalmente o γ -tocoferol.^{23, 24}

Uma outra molécula bastante abundante em óleos vegetais que não passaram por nenhum processo de refino é a clorofila (Chl). É um pigmento fotossintético presente nas plantas, proveniente de complexos das porfirinas e possui um átomo metálico central de magnésio.

De acordo com a ligação do grupo funcional no segundo anel (**R**) pode ser denominada Chl *a* se a ligação for um grupo metil. Por outro lado, se a ligação for um grupo aldeído é denominada Chl *b*. A estrutura da molécula desse pigmento é apresentada na Figura 4.²⁵

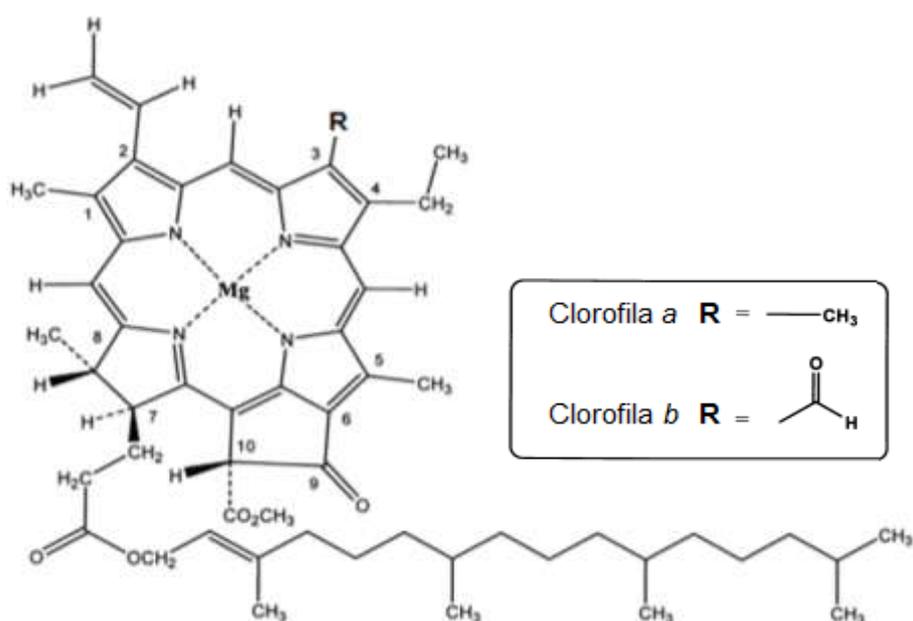


Figura 4. Estrutura molecular da Chl.²⁵

Existem outros pigmentos naturais que têm a característica de dar a cor amarela laranja e vermelha e que estão nos óleos vegetais, chamados carotenoides. Na natureza são encontrados cerca de 600, divididos em xantofilas – hidrocarbonetos com grupos funcionais oxigenados e carotenos – hidrocarbonetos puros.²⁵

A Figura 5 mostra a estrutura molecular de alguns desses carotenoides que, assim como as estruturas já citadas, possuem anel aromático e por isso são moléculas que possibilitam um aumento na fluorescência.

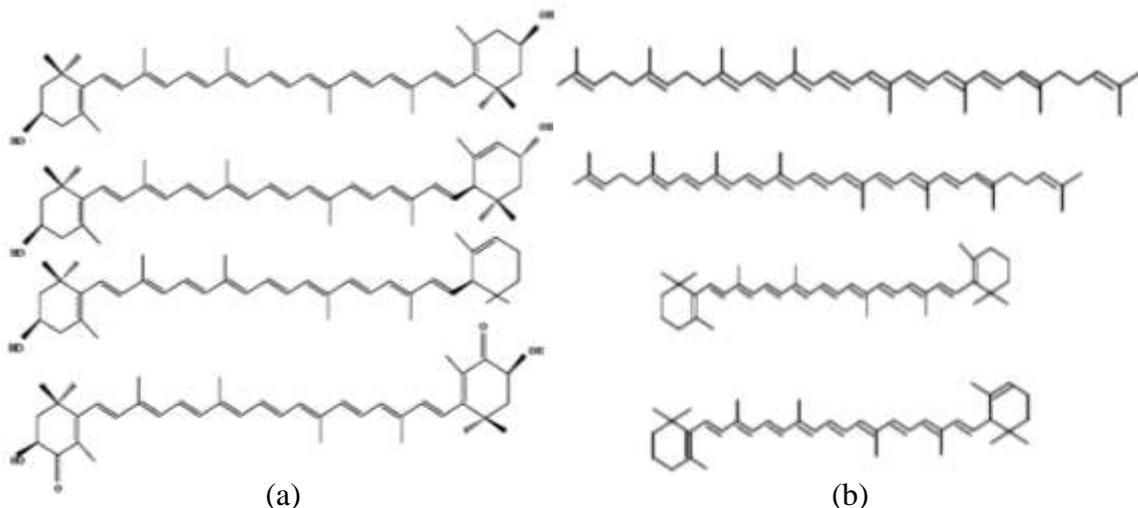


Figura 5. Estruturas moleculares dos principais carotenoides presentes em óleos vegetais: (a) xantofilas e (b) carotenos.²⁵

Além do gergelim branco, a outra fonte oleaginosa da qual se extraiu óleo que serviu de objeto de estudo neste trabalho foi o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Trata-se de um arbusto pertencente à Família das Euforbiáceas e, dependendo da região, pode ser conhecido como pinhão do Paraguai, purgueira, pinhão-de-cerca, medicineira e pinhão bravo.²⁶

A origem do pinhão-manso, apesar de não ser bem definida, provavelmente seja atribuída ao norte da América Central e atualmente ocorre em praticamente todas as regiões intertropicais, tropicais e temperadas. No Brasil ocorre, dada sua rusticidade e resistências a longos períodos de estiagens, desde a região Nordeste passando pelos estados de São Paulo, Paraná e parte do Centro-Oeste.^{26, 27, 28}

Assim como o óleo do gergelim, o óleo do pinhão-manso é composto por ácidos graxos insaturados, destacando-se o oleico (34-45%) e linoleico (29-44%).^{28, 29,}

30

Nesse contexto, a Tabela 2 traz a composição percentual dos principais ácidos graxos (saturados e insaturados) encontrados no óleo do gergelim branco (OGB) e no óleo do pinhão-manso (OPM). Assim como no OGB, o maior teor de ácidos graxos

insaturados presentes no OPM são o oleico, com uma insaturação e o linoleico com duas insaturações.^{24, 29}

Tabela 2 – Composição dos principais ácidos graxos presentes no Óleo de Gergelim Branco e no Óleo de Pinhão-Manso

Ácido graxo	Fórmula	Estrutura	OGB (%)	OPM (%)
Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	(C16:0)	8-17	14-15
Estearico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	(C18:0)	3-9	3-10
Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	(C18:1)	33-54	34-45
Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	(C18:2)	35-59	29-44

2.3 – ESTABILIDADE OXIDATIVA DO BIODIESEL

A estabilidade oxidativa é uma propriedade de suma importância para um combustível. No caso do biodiesel, sintetizado a partir de oleaginosas, apresenta uma menor resistência à oxidação quando comparado com o diesel de petróleo. Isso porque os óleos vegetais são ricos em ácidos graxos insaturados, como o linoleico e linolênico.²⁰

A oxidação sofrida pelos biodieseis pode ocorrer por meio de diversos processos, como reações por hidrólise, oxidação enzimática, fotooxidação e autooxidação. A oxidação inicia-se nas posições alílicas e bisalílicas próximas às duplas ligações dos ésteres insaturados do biodiesel.^{31, 20}

A Figura 6 mostra os ésteres insaturados comumente encontrados em óleos vegetais, gorduras e conseqüentemente, no biodiesel. Os círculos pontilhados indicam as posições de vulnerabilidade à oxidação dos ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico. Assim, a susceptibilidade à oxidação dos ésteres insaturados presentes no biodiesel pode ser ordenada como linolenatos > linoleatos > oleatos.³¹

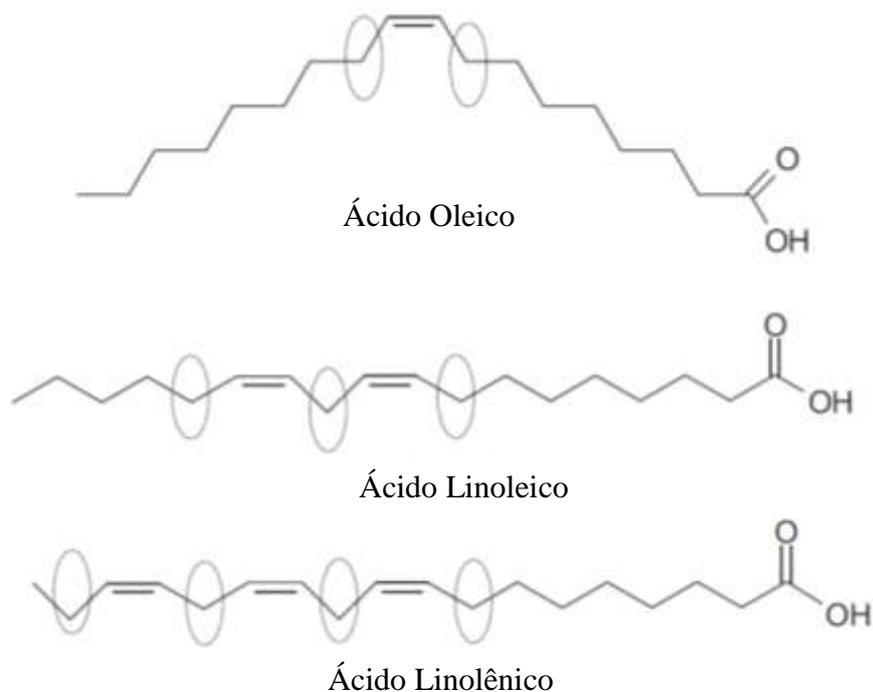


Figura 6. Ácidos graxos comuns de ésteres metílicos presentes em moléculas do biodiesel.³¹

O principal mecanismo que afeta a estabilidade oxidativa de óleos, gorduras e biodieseis é a autoxidação. A degradação do biodiesel por autoxidação é uma reação em cadeia dos radicais dos ácidos graxos ao entrar em contato com o oxigênio e é caracterizada por três etapas: iniciação, propagação e terminação.

Na primeira etapa ocorre uma reação do radical iniciador (I^\bullet) com o ácido graxo insaturado (RH) formando o radical livre (R^\bullet) do ácido graxo devido à abstração de um hidrogênio da cadeia carbônica da molécula do ácido graxo, reações favorecidas por luz e calor.

Na etapa de propagação, o radical (R^\bullet) reage com uma molécula de oxigênio formando os radicais peróxidos (ROO^\bullet) nos quais apresentam instabilidade e reagem com o substrato RH abstraindo um hidrogênio e formando hidroperóxidos ($ROOH$), além de outros radicais livres (R^\bullet) que agem como propagadores autosustentando a reação.

Na última etapa da autoxidação a reação em cadeia termina quando dois radicais livres reagem um com o outro formando produtos secundários estáveis como cetonas, aldeídos, álcoois, trienos, tetraenos, entre outros.^{16, 28, 31, 32} O mecanismo de autoxidação é ilustrado sucintamente na Figura 7.

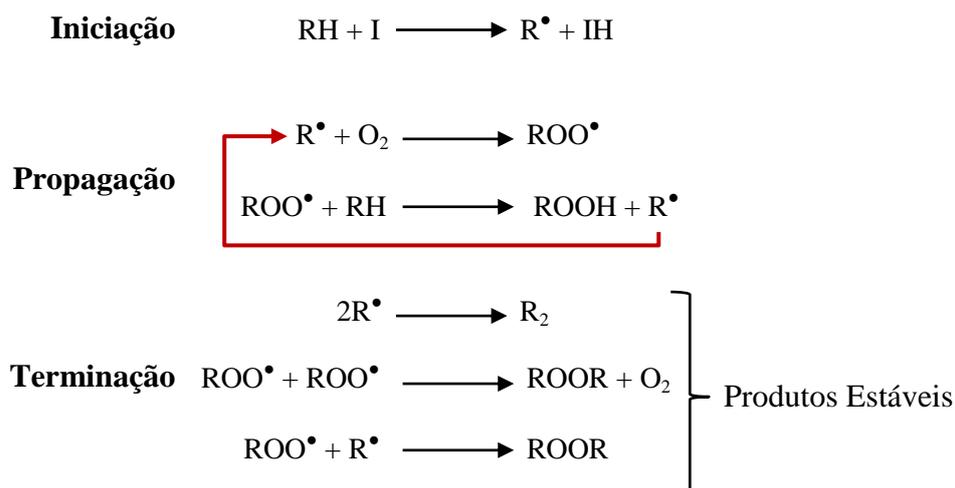


Figura 7. Ilustração resumida do mecanismo de autoxidação de ácidos graxos insaturados.^{28, 31, 32}

2.4 – TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

2.4.1 – Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho

A técnica espectroscópica de absorção molecular na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) está relacionada com a absorção de luz da maioria das moléculas nessa região do espectro eletromagnético o que provoca transições entre estados de energia vibracional ou rotacional. Apresenta uma região que possibilita analisar e quantificar componentes de uma mistura não conhecida compreendida no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .³³

2.4.2 - Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis

A técnica espectroscópica de absorção na região do UV-Vis está relacionada com transições eletrônicas quando uma molécula absorve um fóton e passa para um estado de maior energia. Essa absorção ocorre na região compreendida entre 200 e 700 nm, onde no intervalo de 200 a 400 nm compreende a região do ultravioleta, enquanto que de 400 a 700 nm a região do visível.³³

2.4.3 - Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência (EF) é um método de análise que tem crescido amplamente nos últimos anos e tornou-se uma metodologia utilizada extensivamente em diversos campos do conhecimento como: biotecnologia, controle ambiental, sequencia de DNA, diagnóstico médico, análise de produtos alimentícios, etc.³⁴

Este método de análise vem sendo aplicado para estudar e caracterizar óleos e biodieséis. Em 2012 Tena e colaboradores verificaram mudanças em amostras de óleo de oliva virgem termodegradados.³⁵ Por outro lado, Tomazzoni e colaboradores, em 2014, identificaram a presença de óleo vegetal e biodiesel adicionados em amostras de diesel.³⁶

Dentro deste contexto, o GOA tem publicado relevantes trabalhos que utilizam a técnica óptica de EF. Destaca-se o trabalho apresentado por Scherer e colaboradores em 2011¹³ que determinou a quantidade de biodiesel presente nas blendas biodiesel/diesel. Já em 2014, Magalhães e colaboradores¹⁶ identificaram os tetraenos conjugados, presentes nos produtos de degradação, como fluoróforos responsáveis pela emissão de fluorescência.

Em 2014 Caires e colaboradores¹⁸ depositaram um pedido de Patente de Invenção (nº BR 1020140138960) que consiste em monitorar a degradação de biodiesel e óleo vegetal através de imagem de fluorescência, um método inovador.

Existem diversas características que tornam esse método mais atrativo do que outros. Dentre eles o fato de ser altamente sensível, com limites de detecção até três ordens de grandeza melhores em relação à absorção, e ainda, a ampla faixa de concentração do fluoróforo resulta em medidas de intensidade que possibilitam uma relação linear. Todavia, a limitação da técnica está relacionada ao fato que existe um número reduzido de estruturas moleculares que fluorescem. Assim sendo, a fluorescência possui maior intensidade e eficiência em compostos que possuem em sua estrutura grupos aromáticos funcionais com transições de baixa energia ($\pi \rightarrow \pi^*$).³³

O fenômeno da luminescência molecular ocorre quando os elétrons de uma molécula estão em seu estado eletrônico fundamental (S_0), de menor energia, chamado singlete, pois apresentam spins emparelhados ($\uparrow\downarrow$), absorvem energia e passam para um

estado singleto de maior energia (estado excitado) (S_1 , S_2 , etc.). Retornam rapidamente ao estado fundamental e perdem energia pela emissão de fótons. Neste caso, a taxa de emissão desses fótons é da ordem de nanossegundos (10^{-9} s) caracterizando o fenômeno da fluorescência.^{33, 34}

Por outro lado, se a molécula vai para um estado excitado com spins paralelos ($\uparrow\uparrow$) ela está em um estado excitado tripleto (T_1) e leva um tempo maior (da ordem de 10^{-3} a segundos) para voltar ao estado fundamental emitindo fótons. Neste caso trata-se da fosforescência.³⁴

Uma vez em um estado excitado o decaimento dos elétrons ou moléculas para o estado fundamental nem sempre ocorre por emissão de fótons (fluorescência ou fosforescência). Pode haver perda de energia por meio de processos chamados não-radiativos, como por exemplo conversão interna e externa, relaxação vibracional, cruzamento intersistema.^{33, 34}

A Figura 8 mostra um diagrama parcial de níveis de energia de uma molécula fotoluminescente, chamado diagrama de Jablonski. Nele é possível observar o tempo médio de absorção, fluorescência, fosforescência, conversão interna e os diversos processos de decaimento de elétrons em um estado excitado.

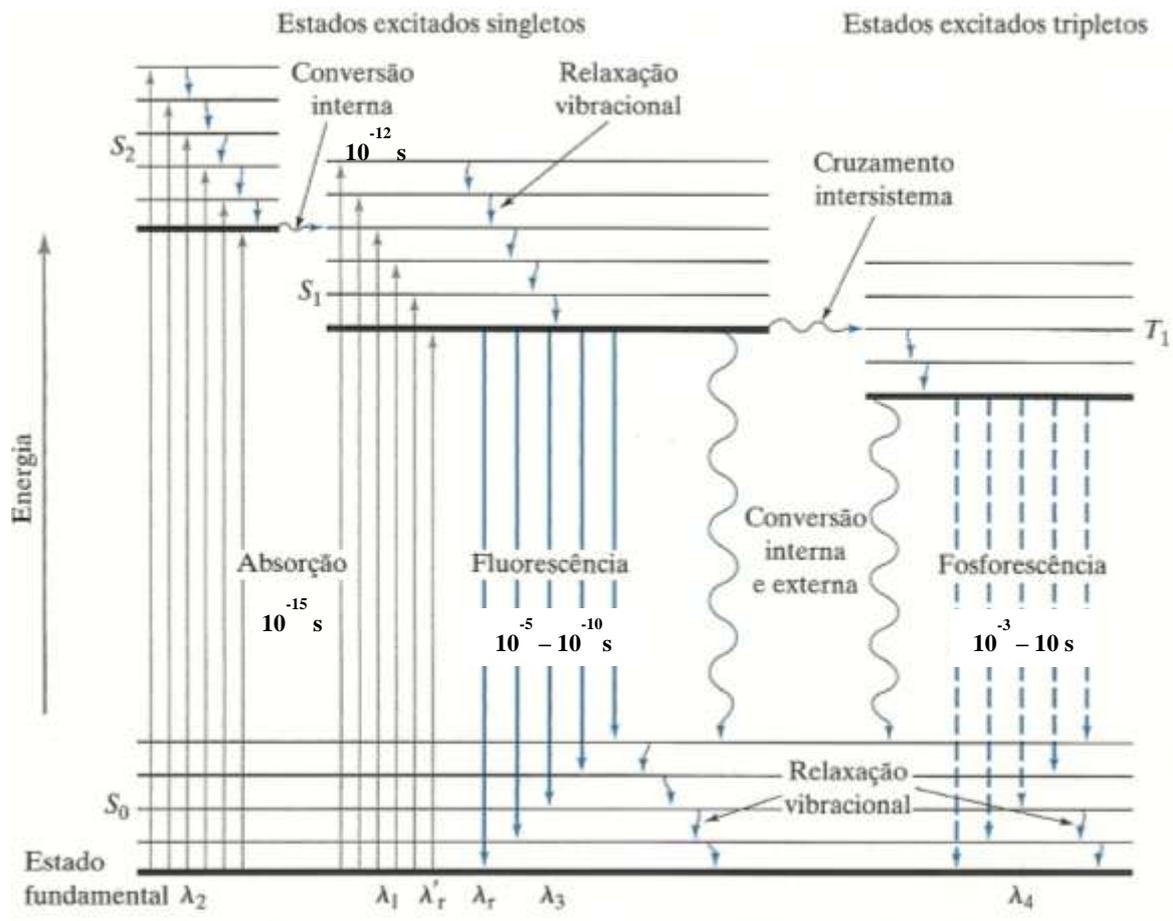


Figura 8. Diagrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente.³³

2.4.4 – Espectroscopia de Fluorescência por Imagem

Além da espectroscopia de fluorescência convencional, a espectroscopia de fluorescência por imagem (EFI) vem ganhando destaque e sendo utilizada nas mais diversas aplicações por meio da análise de imagens de fluorescência, como por exemplo, para monitorar o estresse sofrido por plantas devido, entre outros fatores, à escassez de água, alta temperatura, exposição excessiva à luz, poluição,³⁷ e à compatibilidade de enxerto.³⁸

As técnicas de análises de imagem de fluorescência podem trazer alguns ganhos bastante significativos, como por exemplo, a possibilidade de se ter uma resolução espacial na análise do material em estudo, enquanto que na fluorescência convencional a resolução é pontual.

A imagem de fluorescência foi proposta recentemente por meio de um depósito de Patente de Invenção junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) sob nº BR 1020140138960 como ferramenta de inovação para analisar amostras de óleo vegetal e biodiesel termodegradadas.¹⁸

Neste trabalho os autores excitaram amostras de óleos e biodieseis termodegradadas com um laser de 405 nm e geraram imagens de fluorescência da clorofila (Chl) por meio de uma câmera CCD do sistema FluorCam. Os resultados mostram que é possível monitorar a estabilidade oxidativa do biodiesel e do óleo vegetal de forma imediata por meio da técnica óptica baseada na obtenção da Imagem de Fluorescência emitida pela Chl.¹⁸

2.5 – ANÁLISE QUÍMICA

2.5.1 - Índice de Acidez

O índice de acidez (IA) é um método de análise físico-química de suma importância, pois mostra o estado de conservação do biodiesel. À medida que aumenta sua degradação, aumenta a quantidade de grupos de ácidos carboxílicos, ocorre uma mudança em sua composição química tornando-o mais ácido.³⁹ Então, por meio desse método é possível o ácido presente na amostra. O cálculo do IA é dado pela seguinte expressão:

$$IA = \frac{V.N.f.5,61}{m_a} \quad (1)$$

em que, V é o volume gasto de KOH na titulação (mL); N é a normalidade de KOH; f é o fator de correção para o KOH 0,1 M e m_a é a massa da amostra em gramas. A norma EN 14140 estabelece que o índice de acidez máximo aceito para o biodiesel seja de 0,50 mg de hidróxido de potássio por grama da amostra (0,50 mg KOH.g⁻¹).¹⁹

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho teve como objetivo caracterizar e estudar a degradação térmica de óleos e biodieseis via técnicas ópticas de Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Médio por Transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopia de Absorção no (UV-Vis), Espectroscopia de Fluorescência (EF) e Espectroscopia de Fluorescência por Imagem (EFI). Ainda, determinar o índice de acidez (IA) das amostras de óleos e biodieseis termodegradados via titulação clássica (método AOAC 940.28).

Dentro destes objetivos foi possível realizar as seguintes atividades:

- Extrair óleo de sementes de gergelim branco via prensagem e de sementes de pinhão-mansão via solvente (Sohxlet);
- Sintetizar biodiesel (rota metálica) a partir dos óleos obtidos;
- Submeter amostras de óleos e biodieseis a estresse térmico acelerado em uma temperatura de 110°C por um período de 0 a 48 h;
- Estudar e caracterizar as mudanças físico-químicas sofridas pelos óleos e biodieseis termodegradados via métodos espectroscópicos;
- Gerar imagens de fluorescência da clorofila (Chl) contida no óleo e biodiesel do gergelim branco via Closed FluorCam como indicador da estabilidade oxidativa das amostras termodegradadas.

CAPÍTULO 4

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 – EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS E SÍNTESE DOS BODIESEIS

As sementes do gergelim branco (*Sesamum indicum* L.), cultivar comum, foram obtidas junto aos produtores do Assentamento Itamarati no município de Ponta Porã – MS. Conforme a sequencia mostrada na Figura 9, a extração do óleo foi através do método de prensagem a frio utilizando-se uma mini-prensa (Ecirtec[®] - 5 CV). Em seguida, o óleo de gergelim branco (OGB) foi filtrado a vácuo em um funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo (MARCONI[®] – MA 059) e armazenado em um recipiente com tampa envolto em papel alumínio a 4°C no refrigerador.



(a)



(b)



(c)

Figura 9. Etapas da extração do OGB: (a) Prensagem, (b) Filtragem a vácuo e (c) óleo pronto para estudo.

Então, para a síntese do biodiesel de gergelim branco (BGB) e por meio de uma balança (Celtac[®] – BS 3000 A), mediu-se a massa de 550 g de óleo em um Becker, este foi colocado sobre uma placa agitadora com aquecimento (IKA[®]) e mantido em agitação com o auxílio de uma barra magnética a uma temperatura em torno de 50°C

monitorada por um termômetro (INCOTERM[®]). Em outro Becker mediu-se a massa do metanol (33,16% m/m) (Dinâmica[®] P.A.) e acomodou-se este sobre outra placa de agitação. Despejou-se o catalizador hidróxido de potássio (2% m/m) (KOH - Vetec[®] P.A.) dentro do metanol e a solução de metóxido de potássio permaneceu em agitação até as pastilhas de KOH dissolverem-se completamente. Depois disso, verteu-se esta solução no óleo pré-aquecido mantendo-os em agitação por 2 horas a fim de realizar a reação de transesterificação (Figura 10a). Após esse processo a solução foi transferida para um funil de decantação onde permaneceu por aproximadamente 24 horas para a separação das duas fases, a glicerina na parte inferior do funil e o biodiesel na parte superior (Figura 10b). Após separar o glicerol (Figura 10c), o BGB foi lavado com água destilada por três vezes (5,6% m/m) (com um intervalo de 30 min entre uma lavagem e outra) e em seguida com uma solução saturada de cloreto de sódio (5,6% m/m) (NaCl - Vetec[®] P.A.) por duas vezes (com um intervalo de 30 min entre uma lavagem e outra) afim de neutralizar o KOH. Em seguida foi transferido para um balão e rotaevaporado (IKA[®] – RV 10) a 60°C, rotação: 75 rpm, pressão: 500 mgHg, por 1 hora para eliminar eventuais traços do solvente.

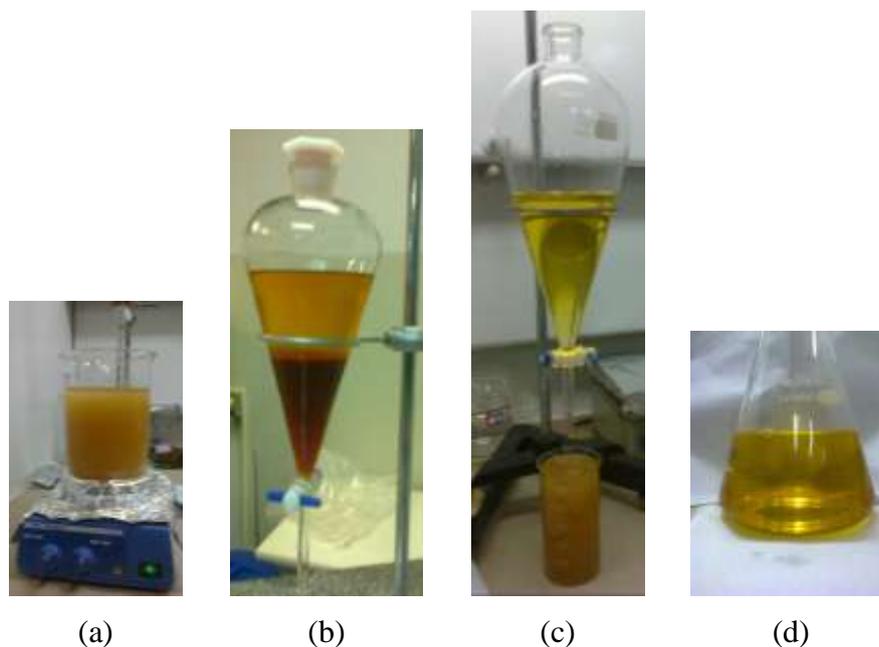


Figura 10. Síntese do BGB. (a) Reação de transesterificação, (b) separação das fases, (c) retirada glicerol e (d) biodiesel pronto para estudo.

Logo depois, o biodiesel passou pelo processo de secagem, ou seja, foi filtrado em papel filtro na presença de sulfato de magnésio anidro (MgSO_4 - Vetec[®] P.A.) previamente seco em estufa por 4 horas e após esse processo de purificação o BGB ficou pronto para ser utilizado nos estudos (Figura 10d) sendo armazenado em recipiente com tampa, envolto em papel alumínio e armazenado no refrigerador a 4°C.

O óleo de pinhão-manso (OPM) foi obtido a partir de 3 kg de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), cultivar comum, compradas da empresa BrSeeds Produção e Comércio de Sementes Ltda – Araçatuba – SP. Com o auxílio de um Becker de 500 ml, foram pesadas em uma balança de precisão (MARTE[®] – AL 500C) 200 g de sementes. Em seguida as sementes foram transferidas para o copo de um liquidificador comum de uso doméstico (WALITA[®]) (Figura 11a) para serem trituradas.

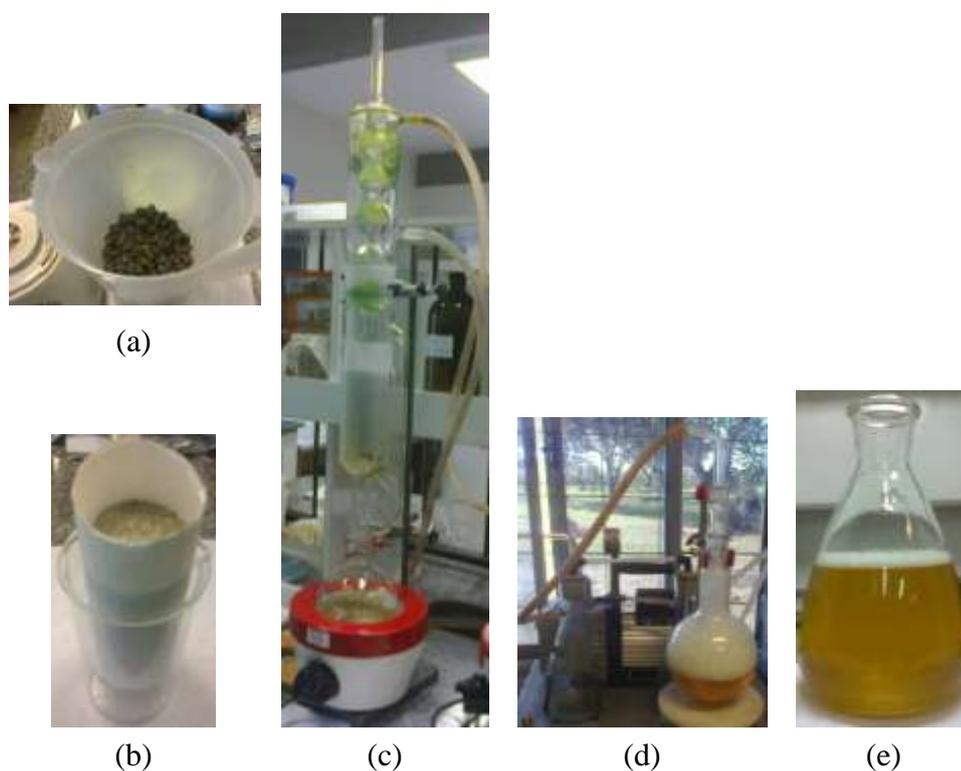


Figura 11. Etapas da extração do OPM. (a) Trituração das sementes, (b) cartucho com sementes trituradas, (c) extrator Soxhlet (d) OPM na bomba de alto vácuo e (e) óleo pronto para estudo.

Posteriormente, toda a massa triturada foi transferida para um cartucho (cilindro confeccionado de papel filtro) colocado sobre um Becker de 500 ml (Figura 11b) e pesada para o cálculo do rendimento. O cartucho foi submetido ao processo de extração em um extrator Soxhlet, por cerca de 4 horas e meia na presença de 500 mL de hexano

P.A. (NEON®) em torno de 70°C (Figura 11c). Após finalizar esse ciclo, preparou-se outro cartucho e procedeu-se da mesma maneira descrita até completar uma massa de sementes trituradas de $2\,995,9 \pm 0,1$ g.

Após a extração do óleo, o solvente foi retirado, primeiramente, por meio de um rotaevaporador (IKA®) a 60°C, rotação a 75 rpm e vácuo de 500 a 600 mmHg por 1 hora. Depois, o óleo foi submetido a uma bomba de alto vácuo (SOLAB®) por 2 horas (Figura 11d). Finalmente, para secagem, o óleo foi filtrado em papel filtro na presença de sulfato de magnésio, anteriormente seco em estufa por 4 horas e ficou pronto para o estudo (Figura 11e).

O óleo cru do pinhão-manso contém alto teor de ácidos graxos livres (AGL), cerca de 15%, fator que inviabiliza a sua utilização na síntese de biodiesel se não for feita uma neutralização para diminuir o teor de AGL.²⁹ Caso isso não seja feito, ao invés de se obter biodiesel ocorrerá a saponificação (obtenção de sabão).

Neste sentido, antes de proceder com a síntese do biodiesel o óleo do pinhão-manso passou por um processo de neutralização seguindo a metodologia apontada por Berchmans e Hirata (2007).²⁹

Para isso o primeiro passo foi medir a massa de 550 g de óleo em um Becker por meio de uma balança (Celtac® – BS 3000 A). Este foi colocado sobre uma placa agitadora com aquecimento (IKA®) e mantido em agitação com o auxílio de uma barra magnética a uma temperatura em torno de 50°C monitorada por um termômetro (INCOTERM®). Em outro Becker mediu-se a massa do metanol (60% m/m) (Dinâmica® P.A.). Em outro Becker mediu-se a massa de ácido sulfúrico (1% m/m) (Dinâmica® P.A.) e despejou-se essa massa e a do metanol no Becker contendo o óleo.

A solução óleo, metanol e ácido permaneceu sob agitação por 1 hora a uma temperatura em torno de 50°C (Figura 12a). Após esse processo a solução foi transferida para um funil de decantação onde permaneceu por aproximadamente 2 horas para a separação da água gerada durante a reação (Figura 12b).

Após a separação da água procedeu-se com o segundo passo que consistiu em verter a solução do funil de decantação em um Becker e este foi colocado sobre uma placa de aquecimento e agitação (IKA®). Nesta solução foi adicionado metanol (24% m/m) e hidróxido de potássio (1,4% m/m) (Dinâmica® P.A.). Toda a solução ficou em agitação por 2 horas a uma temperatura em torno de 65°C (Figura 12c).

Depois disso a solução foi transferida para um funil de decantação onde permaneceu por 24 horas para separação das fases (Figura 12d), parte superior biodiesel e inferior glicerina. Após a extração do glicerol a purificação do biodiesel do óleo do pinhão-manso (BPM) seguiu o mesmo procedimento adotado na purificação do biodiesel do óleo de gergelim branco (BGB) e ficou pronto para ser utilizado nos estudos (Figura 12e) sendo armazenado em recipiente com tampa, envolto em papel alumínio e armazenado no refrigerador a 4°C.

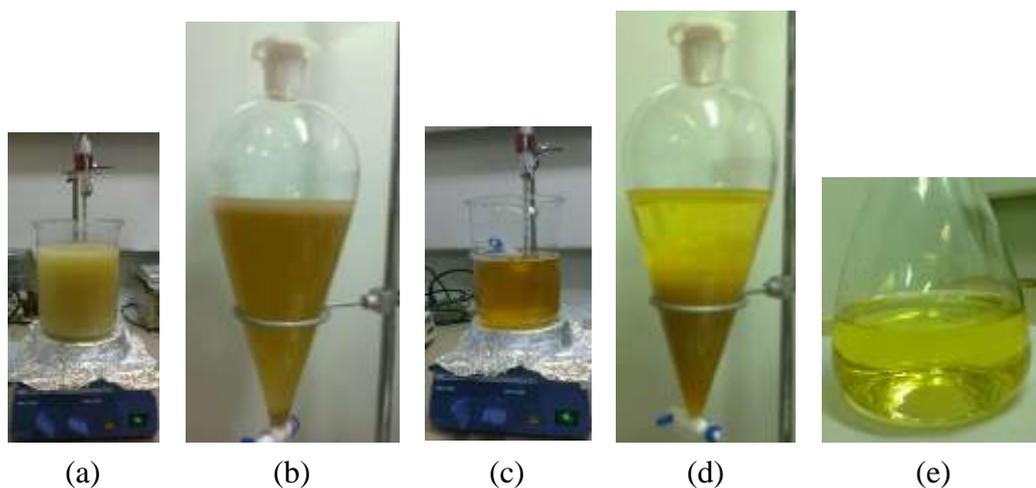


Figura 12. Síntese do BPM. (a) Reação de neutralização, (b) extração da água após a neutralização, (c) reação de transesterificação, (d) separação das fases (e) biodiesel pronto para estudo.

4.2 – TERMODEGRADAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização do processo de termodegradação separamos uma quantidade de 20 g de OGB, BGB, OPM e BPM em *I*, *J*, *K* e *L* frascos de âmbar, respectivamente. Como cada classe de frascos continha 15 amostras, totalizou 60 amostras.

O processo de termodegradação no qual estas amostras foram submetidas aconteceu em estufa com circulação de ar (Sterilifer[®] SXCR42) (Figura 13a) em temperatura constante de 110°C por um período de 0 a 48 horas, onde nas primeiras 12 horas foram retiradas alíquotas a cada 1 hora, depois após 24 e 48 horas, respectivamente.

Após a termodegradação as amostras foram identificadas, envoltas em papel alumínio (Figura 13b) e armazenadas no refrigerador a 4°C.



Figura 13. (a) Degradação acelerada em estufa de amostras de óleos e biodieseis. (b) Amostras termodegradadas e prontas para armazenamento em geladeira.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÓLEOS E BODIESEIS

As amostras de óleo e biodiesel foram analisadas por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia UV-Vis, Espectroscopia de Fluorescência (EF), Espectroscopia de Fluorescência por Imagem (EFI) e Índice de Acidez (IA) seguindo o método oficial AOAC 940.28 (Associação de Químicos Analíticos Oficiais).

4.3.1 – Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Infravermelho

A absorção molecular das amostras na região do infravermelho foram realizadas através de um espectrômetro infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-IR – 4100 – Jasco®) acoplado ao acessório ATR (Atenuador de Reflectância Total). Com excitação das amostras em uma região compreendida entre 4000 a 500 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras.

4.3.2 – Espectroscopia de Absorção UV-Vis

As medidas de absorção molecular foram feitas através de um espectrofotômetro (Cary 50 – Varian[®]). As amostras diluídas em n-hexano (Panreac[®] - HPLC) em uma concentração de 0,059% (em massa) foram depositadas em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e as quatro faces polidas e excitadas em um intervalo de 200 a 400 nm.

4.3.3 – Espectroscopia de Fluorescência

As análises de EF foram feitas por meio de um espectrofluorímetro de bancada (Cary Eclipse – Varian) com excitação das amostras em 250 nm, varredura com início em 260 nm e final em 800 nm, fenda com abertura de excitação e emissão em 5 nm, no modo 3D com excitação final em 550 nm, incremento de 5 nm com um controle de escaneamento médio e filtros de excitação e emissão abertos. As alíquotas de 3 mL foram depositadas em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e as quatro faces polidas.

4.3.4 – Espectroscopia de Fluorescência por Imagem

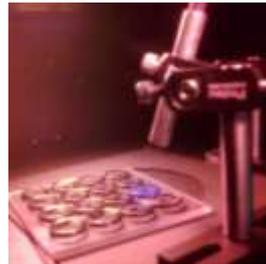
As imagens de fluorescência da Chl contida no OGB e no BGB foram obtidas utilizando-se o espectrofluorímetro portátil (EFP) (Ocean Optics[®]) com excitação das amostras em um comprimento de onda de 405 nm na presença de um filtro também de 405 nm acoplado ao Closed FluorCam (Photon Systems Instruments[®] - República Tcheca), um sistema capaz de gerar a Imagem da Fluorescência da Clorofila (Chl). Então, com o laser de 405 nm do sistema de EFP acoplado ao sistema Closed FluorCam (Figura 14a), em uma posição fixa, excitou as amostras depositadas em um porta-amostras (Figura 14b e Figura14c).



(a)



(b)



(c)

Figura 14. (a) EFP acoplado ao Closed FluorCam. (b) Porta-amostras. (c) Amostras sendo excitadas dentro do Closed FluorCam.

As imagens foram capturadas por uma câmera de alta resolução com Dispositivo de Carga Acoplada (CCD) que captura fluorescência na região entre 400 a 1000 nm, gerando imagens com resolução de 512 x 512 pixels a uma frequência máxima de 50 frames por segundo, composta por um carrossel de filtros específicos para a Chl, uma fonte de alimentação e um computador portátil. A Figura 15 mostra um

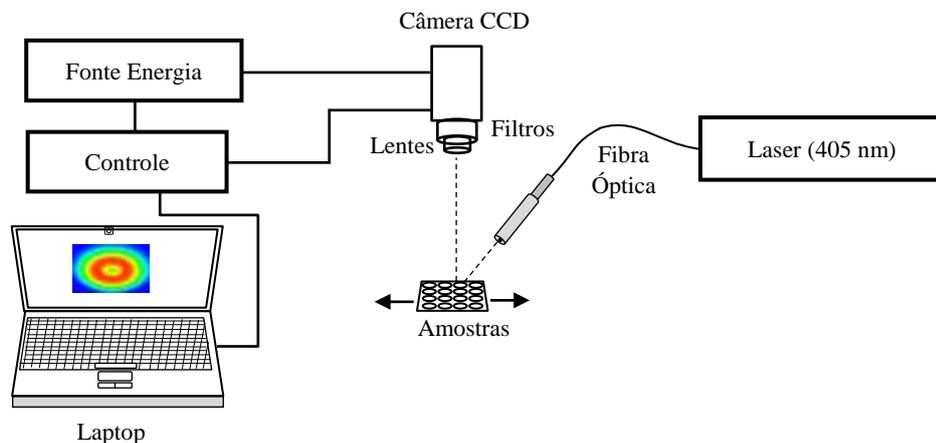


Figura 15. Diagrama esquemático do Closed FluorCam usado na geração das imagens de fluorescência da Chl acoplado ao laser de 405 nm do espectrofluorímetro portátil.

diagrama esquemático de como foi realizado o experimento.

4.3.5 - Índice de Acidez

O índice de acidez das amostras foi determinado por titulação clássica (método AOAC 940.28) utilizando-se uma solução éter:álcool (2:1) (Dinâmica[®] P.A.), uma solução aquosa padrão secundário de hidróxido de potássio (KOH) (Vetec[®] P.A.) com concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, previamente titulada com uma solução aquosa de biftalato de potássio (Dinâmica[®] P.A.), e uma solução alcoólica de fenolftaleína (1%) (Dinâmica[®]) como indicador. Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL foi medida a massa de 2,0 g da amostra em uma balança analítica (Bel Engineering[®] – M214 Ai). Em seguida foram adicionados 25 mL da solução éter:álcool, duas gotas de fenolftaleína e foi gotejada no frasco Erlenmeyer, por meio de uma bureta, contendo um volume de 50 mL da solução de KOH, até aparecer a cor rósea que permaneceu com essa cor por no mínimo 30 segundos. Então, foi feita a leitura do volume gasto (em mL) na titulação e os dados foram utilizados na equação (1) para calcular o IA das amostras. Esse processo foi feito em triplicata para cada amostra.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

5.1.1 – Estudo da Transesterificação

A espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho (FT-IR) é uma ferramenta de análise que pode ser usada para verificar o deslocamento da banda de absorção na região de 1700 a 1800 cm^{-1} , que indica a conversão do óleo em biodiesel devido ao estiramento do grupo carbonila (C=O) presente nos triacilglicerídeos.^{15,40}

Neste sentido, amostras de Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BGB) e de Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BPM) foram submetidas a análise de FT-IR antes passar pelo processo de termodegradação acelerado a fim de verificarmos a conversão de óleo em biodiesel.

A Figura 16 mostra os espectros de absorção com vibrações de 1720 cm^{-1} a 1770 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo carbonila (C=O). Ocorre um deslocamento da banda de absorção em torno de 1745 cm^{-1} , referente ao OGB, para 1742 cm^{-1} , relacionado ao BGB. Esse deslocamento da banda de absorção ocorre porque os grupos dos gliceróis são trocados pelo grupo $-\text{O}-\text{CH}_3$, resultante do processo de transesterificação. Logo, o espectro indica que ocorreu o processo de transesterificação, ou seja, a conversão do óleo em biodiesel.^{11,38}

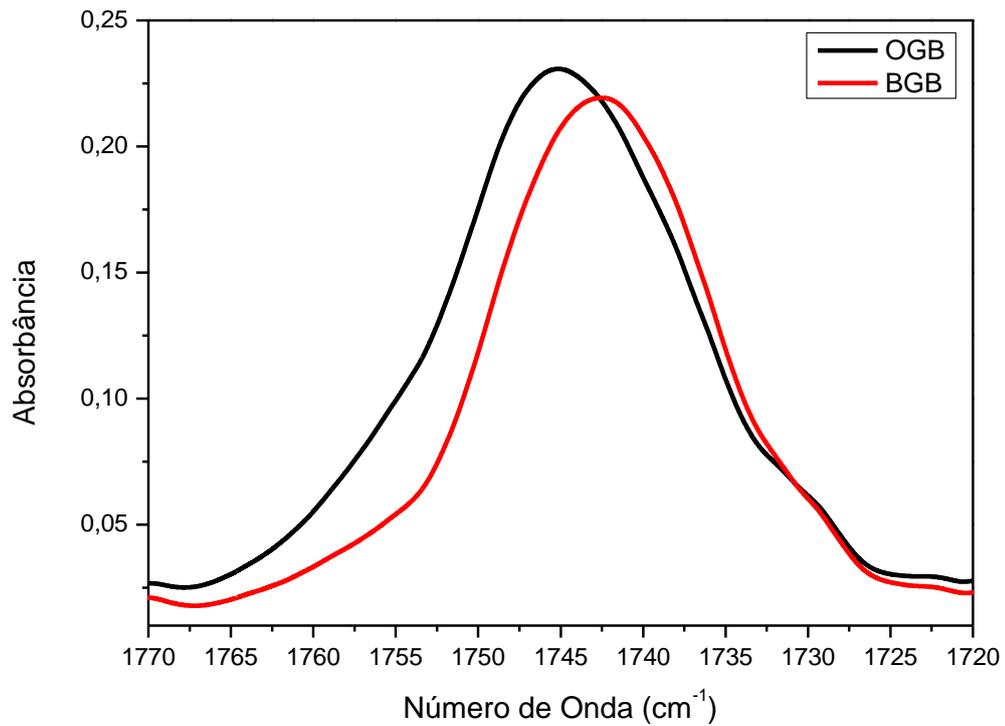


Figura 16. Espectros de absorção do OGB e do BGB na faixa do infravermelho médio. Deslocamento da banda de absorção de 1745 cm^{-1} (OGB) para 1742 cm^{-1} (BGB) indica a formação dos ésteres metílicos.

De forma análoga, realizamos medidas de FT-IR nas amostras de OPM e BPM. Assim sendo, na Figura 17 verificamos um deslocamento da banda de absorção em torno de 1743 cm^{-1} , associado ao OPM, para 1742 cm^{-1} , relacionado ao BGB. Fator que indica que ocorreu o processo de transesterificação, ou seja, a conversão do óleo em biodiesel.¹¹

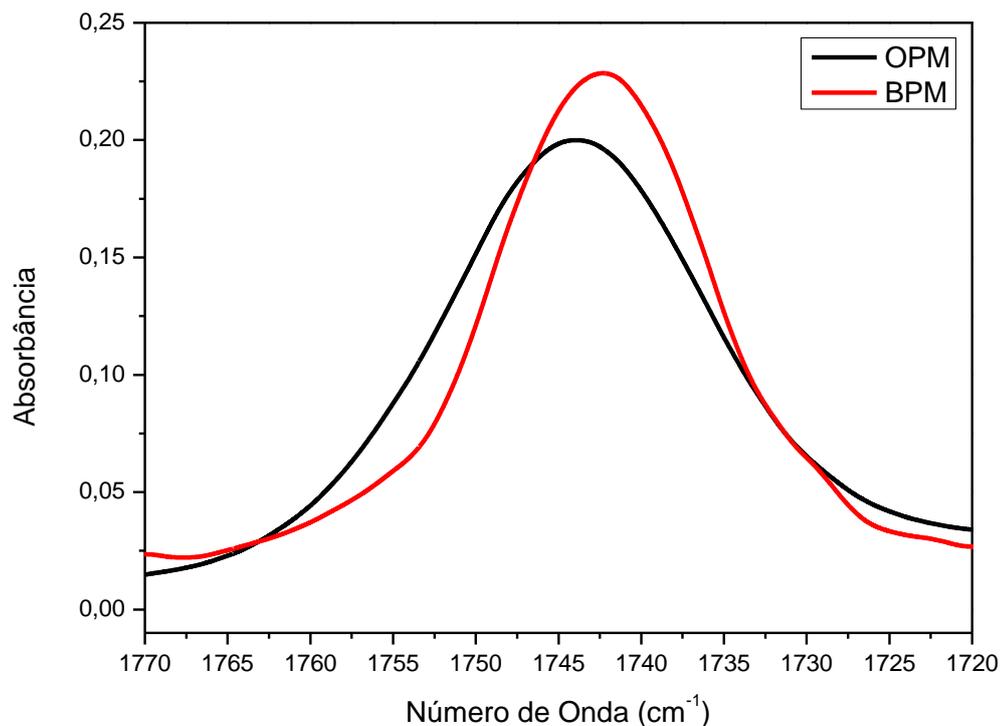


Figura 17. Espectros de absorção do OPM e do BPM na faixa do infravermelho médio. Deslocamento da banda de absorção de 1743 cm^{-1} (OPM) para 1742 cm^{-1} (BPM) indica a formação dos ésteres metílicos.

5.2 – ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS

5.2.1 - Caracterização do Óleo do Gergelim Branco (OGB - Diluído)

A estabilidade oxidativa de óleos e biodieseis submetidos a estresse térmico tem sido monitorado por meio da técnica de absorção molecular na região do UV-Vis. O comportamento desses analitos são observados por meio de duas bandas de absorção, uma em torno de 232 nm (produtos de degradação primário) associada aos dienos conjugados devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$; e uma outra em torno de 272 nm referentes aos produtos secundários, como aldeídos, dímeros, polímeros, trienos, cetonas insaturadas, também relacionadas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$.^{32,41}

Todavia, para que pudéssemos monitorar e observar bandas de absorção nestas regiões tivemos que realizar a diluição das amostras termodegradadas em n-hexano grau espectroscópico (0,059% m/m). Como se segue, estudamos as amostras do OGB, BGB, OPM e BPM na região compreendida entre 200 nm e 400 nm.

Na Figura 18, referente ao OGB, aparecem duas bandas de absorção, uma de 219 nm a 255 nm com pico máximo em torno de 233 nm (referente aos produtos de primeira degradação) e outra de 255 nm a 314 nm com pico máximo em torno de 288 nm (referente aos produtos de segunda degradação). No pico em torno de 233 nm percebe-se um aumento da absorbância indicando um aumento na formação dos produtos de degradação do OGB.

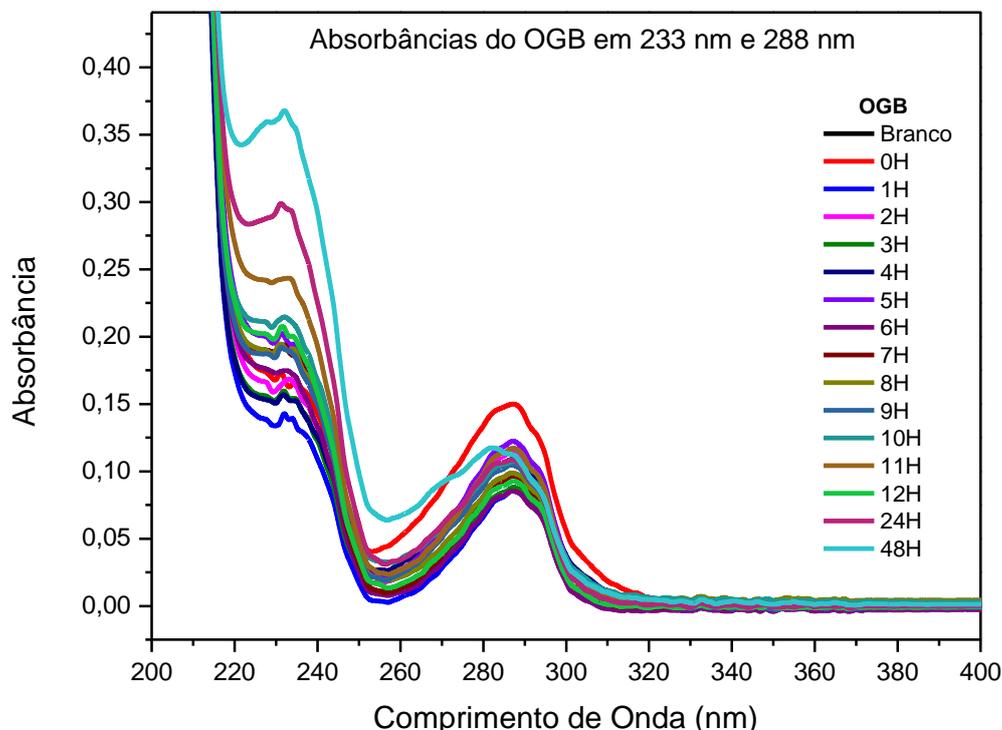


Figura 18. Espectros de absorção UV-Vis das amostras termodegradadas do OGB com um pico máximo em torno 233 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 288 nm (sesamol e produtos de segunda degradação).

Por outro lado, no pico associado aos produtos de segunda degradação, 288 nm, esperava-se um aumento da absorbância, no entanto isso só acontece após 6 horas de degradação.

Em um trabalho publicado em 2010 Konsoula e Kyriakides⁴² estudaram a ação do extrato de sesamol extraído do óleo de gergelim como antioxidante quando misturado a óleos comestíveis. O estudo mostrou que o sesamol contribuiu com a retenção da peroxidação do ácido linoleico e retardou o processo de deterioração oxidativa dos óleos.⁴⁰ Diante disso, possivelmente, o sesamol, principal antioxidante natural presente no OGB, possui absorção na região de 290 nm, como aponta recentes

trabalhos^{43, 44, 45, 46}, e então nas primeiras horas pode ser que ele iniba o aumento dos compostos de segunda degradação.

Como podemos observar na Figura 18, ocorre uma flutuação nas intensidades de absorvância (233 nm e 288 nm) durante o tempo de aquecimento no qual as amostras de OGB foram submetidas. Buscando entender melhor os resultados e para evitar essas flutuações fizemos a razão entre os produtos de primeira degradação e os produtos de segunda degradação.

Conforme aponta a Figura 19, a razão 233 nm/288 nm em função do tempo de aquecimento aumenta, exponencialmente. Isso indica que há uma degradação do OGB devido a formação dos compostos de primeira e segunda degradação.

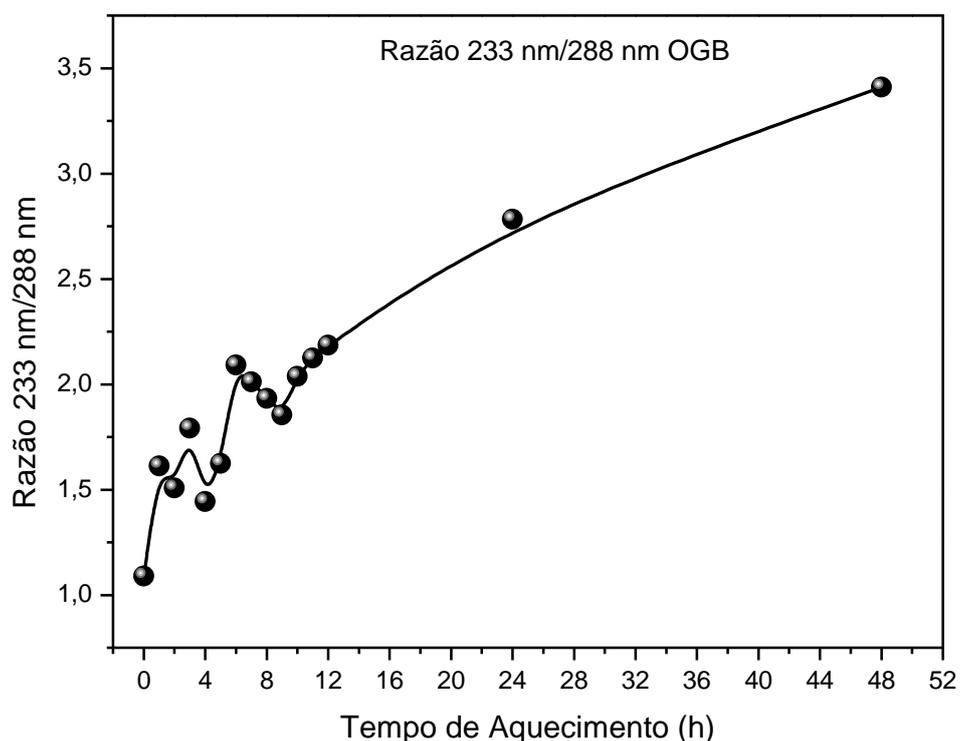


Figura 19. Razão absorvâncias x tempo de aquecimento das amostras de OGB mostrando um aumento na absorvância com o passar do tempo.

5.2.2 - Caracterização do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BGB - Diluído)

A caracterização do BGB via técnica óptica UV-Vis também foi realizada. A Figura 20 mostra o espectro de absorção UV-Vis das amostras de BGB termodegradadas na região compreendida entre 200 nm e 400 nm. Assim como no OGB, aparecem duas bandas de absorção: uma de 215 nm a 254 nm com pico máximo em torno de 233 nm (associado aos produtos de primeira degradação) e outra de 254 nm a 306 nm com pico máximo em torno de 288 nm (associado aos produtos de segunda degradação). No pico em torno de 233 nm percebe-se um aumento da absorbância indicando um aumento na formação dos produtos de degradação do BGB.

Da mesma forma que no OGB, o pico associado aos produtos de segunda degradação, 288 nm, sofre variação de absorbância provavelmente devido à presença do sesamol.

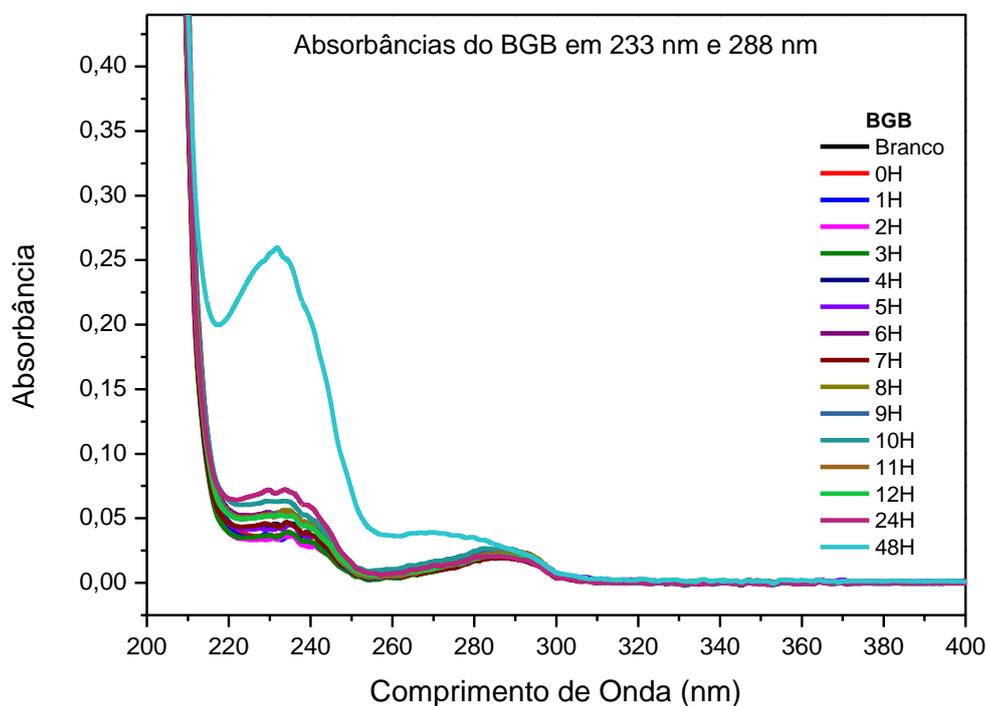


Figura 20. Espectros de absorção UV-Vis das amostras termodegradadas do BGB com um pico máximo em torno 233 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 288 nm (sesamol e produtos de segunda degradação).

Da mesma maneira que foi feita com o OGB, analisaram-se as flutuações nas intensidades de absorvância sofridas pelas amostras de BGB durante o tempo de aquecimento (Figura 19). Desse modo, a Figura 21 mostra a razão 233 nm/288 nm em função do tempo de Aquecimento. Nota-se um aumento da absorvância das amostras de BGB com o passar do tempo, inicialmente tendendo a uma estabilidade nas 12 primeiras horas e depois mais definido até 48 horas.

Isso sugere que há uma degradação do BGB devido a formação dos compostos de primeira e segunda degradação. Consequentemente aponta para uma alteração na estabilidade oxidativa e na qualidade do BGB.^{12, 35, 37}

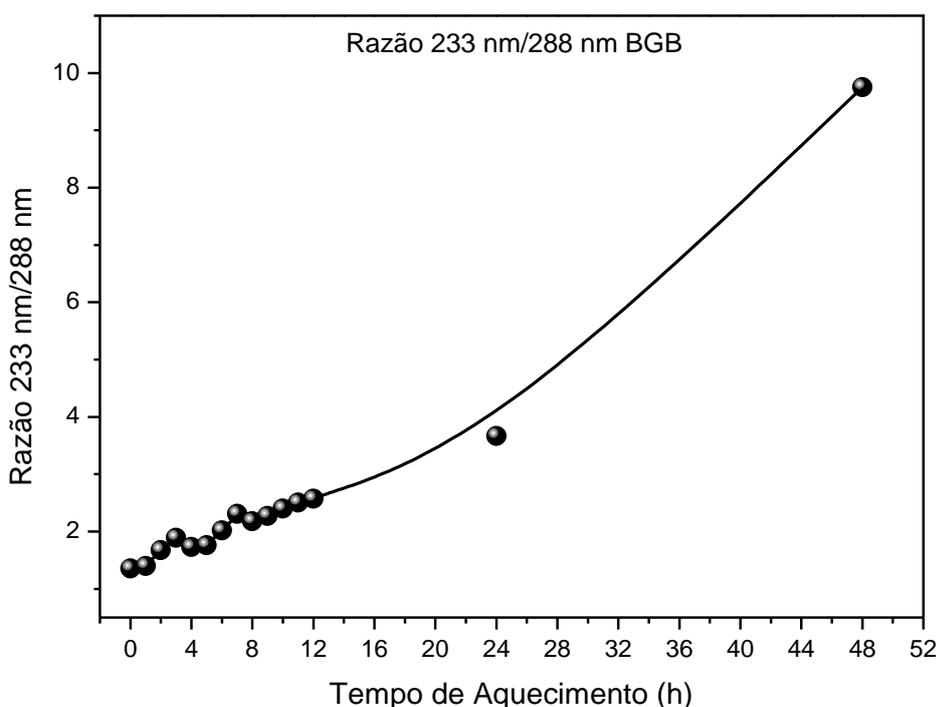


Figura 21. Razão absorvâncias x tempo de aquecimento das amostras de BGB mostrando um aumento na absorvância com o passar do tempo.

5.2.3 - Caracterização do Óleo do Pinhão-Manso (OPM - Diluído)

No monitoramento das amostras de OPM via análise de absorção diluídas temos a Figura 22 que mostra duas bandas de absorção, uma de 219 nm a 254 nm com pico máximo em torno de 233 nm (referente aos produtos de primeira degradação) e outra de 254 nm a 315 nm com pico máximo em torno de 271 nm (referente aos produtos de segunda degradação). No pico em torno de 233 nm e no pico em torno de

271 nm é possível perceber um aumento da absorbância indicando um aumento na formação dos produtos provenientes da termodegradação, como dienos conjugados, no primeiro pico. Já para o segundo é possivelmente devido a formação de compostos como cetonas e trienos conjugados.^{32, 37, 39}

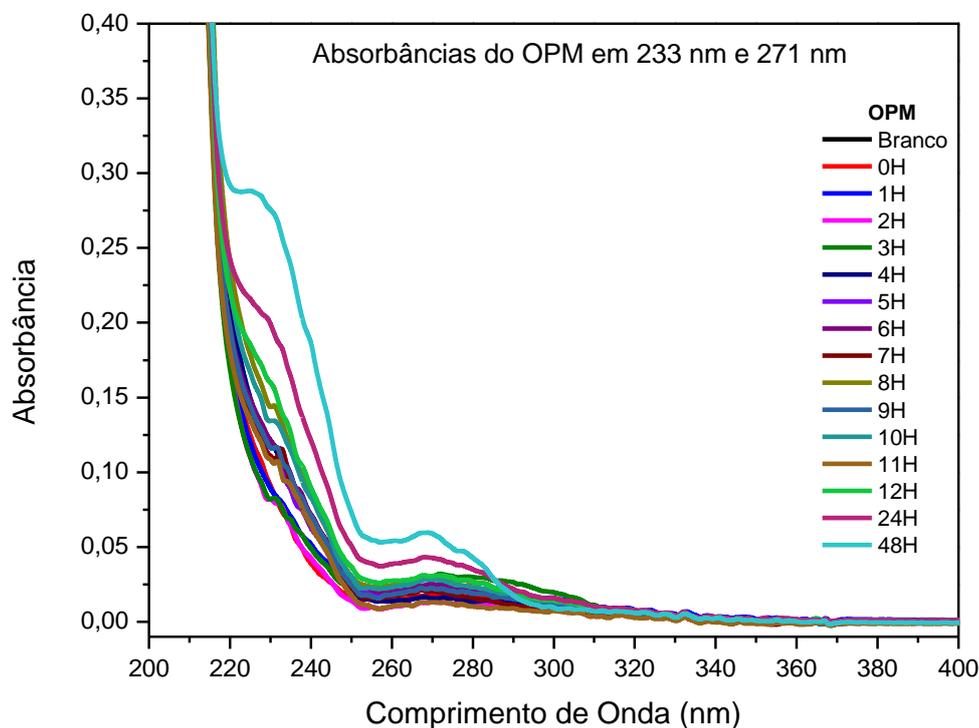


Figura 22. Espectros de absorção UV-Vis das amostras termodegradadas do OPM com um pico máximo em torno 233 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 271 nm (produtos de segunda degradação).

Analisando-se as flutuações nas intensidades de absorbância sofridas pelas amostras de OPM durante o tempo de aquecimento (Figura 22), foi feita a razão entre os aumentos, conforme mostra a Figura 23. Nota-se um aumento da absorbância até as 12 primeiras horas e depois uma diminuição. Isso sugere que há uma degradação do OPM devido a formação dos compostos de primeira e segunda degradação. Possivelmente depois disso, tende a diminuir indicando uma redução de produtos de degradação sendo formados.^{35, 39}

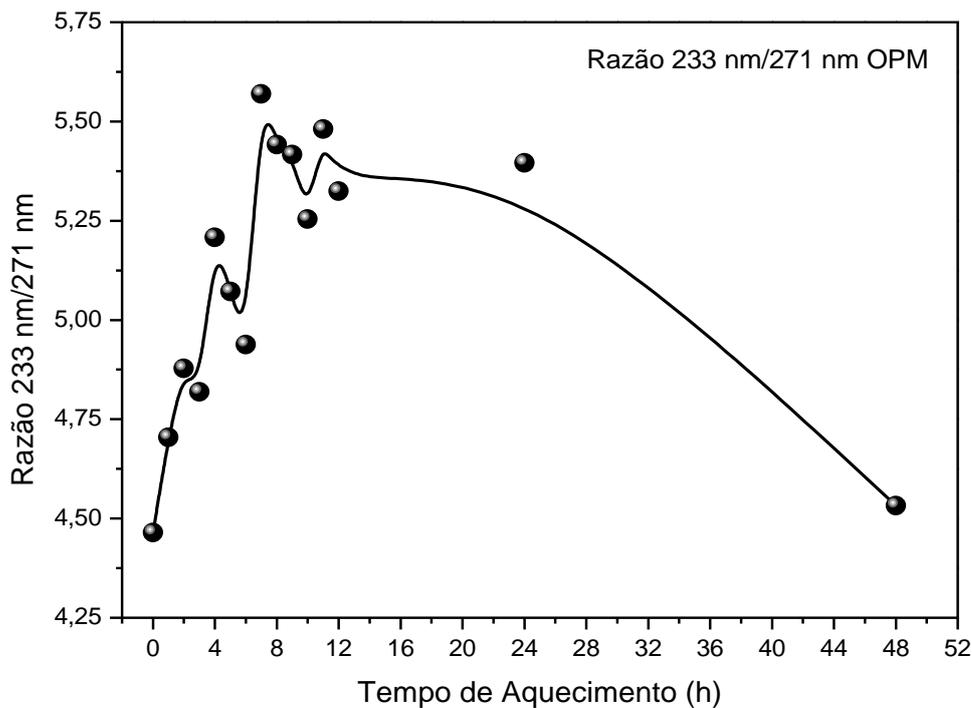


Figura 23. Razão absorvâncias x tempo de aquecimento das amostras de OPM mostrando um aumento na absorvância com o passar do tempo até as 12 primeiras horas.

5.2.4 – Caracterização do Biodiesel do Pinhão-Manso (BPM - Diluído)

A caracterização das amostras termodegradadas do BPM via técnica óptica UV-Vis foi realizada na região compreendida entre 200 nm e 400 nm, conforme mostra o espectro de absorção da Figura 24. De forma análoga às amostras de OPM, no espectro de absorção das amostras de BPM aparecem duas bandas de absorção: uma de 222 nm a 255 nm com pico máximo em torno de 230 nm (referente aos dienos, cetonas) e outra de 255 nm a 316 nm com pico máximo em torno de 270 nm (referente aos ácidos carboxílicos, trienos). O aumento de absorção nos picos máximos aponta para um aumento na formação dos compostos de degradação do BPM.^{32, 35, 39}

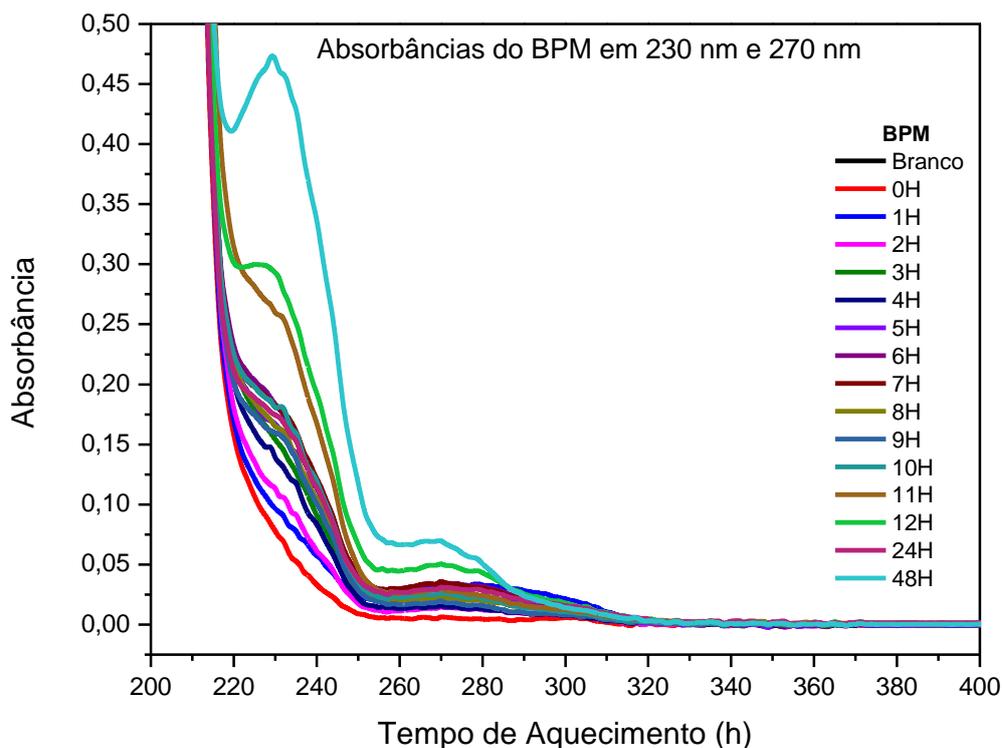


Figura 24. Espectros de absorção UV-Vis das amostras termodegradadas do BPM com um pico máximo em torno 230 nm (produtos de primeira degradação) e outro em torno de 270 nm (produtos de segunda degradação).

Dada as flutuações nos picos de absorção das amostras de BPM, foi feita a razão entre esses picos, conforme mostra a Figura 25. Nota-se um comportamento parecido em relação à razão dos picos associados ao OPM, ou seja, um aumento da absorbância até as 12 primeiras horas e depois uma inversão e diminuição. Isso sugere que há a formação dos compostos de primeira e segunda degradação e depois disso, tende a diminuir.^{37, 39}

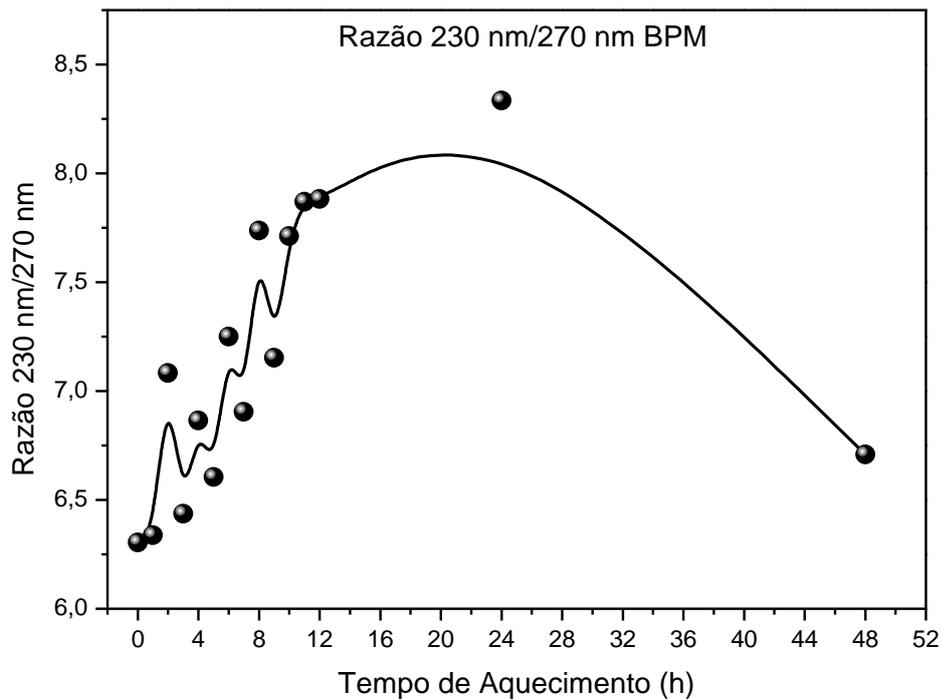


Figura 25. Razão absorvâncias x tempo de aquecimento das amostras de BPM mostrando um aumento na absorvância com o passar do tempo até as 12 primeiras horas.

Quando comparamos os dados de absorção UV-Vis apresentados até aqui é possível observar que as amostras de OGB e BGB apresentaram uma maior estabilidade oxidativa nas 48 horas de termodegradação do que as amostras de OPM e BPM. Talvez isto esteja relacionado ao sesamol presente no OGB e BGB que o tornam mais resistentes à degradação. Outro fator pode ser o processo de extração do OPM que é capaz de afetar a estabilidade oxidativa do mesmo gerando produtos de degradação.

5.3 – ESPETROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As análises de EF que se seguem foram realizadas primeiramente em todas as amostras de óleos e biodieses termodegradadas e diluídas em n-hexano (HPLC) (0,059% m/m) para eliminar o efeito de reabsorção. Na sequência discutiremos as análises de EF realizadas em todas as amostras de óleos e biodieses não-diluídas.

5.3.1 - Caracterização do Óleo do Gergelim Branco (OGB - Diluído)

Para as amostras de OGB termodegradadas e diluídas (15 no total) foram realizadas medidas de EF gerando mapas de contorno de excitação/emissão em 3D para identificarmos possíveis regiões que foram alteradas durante o processo de termodegradação acelerada. Neste sentido, dentre os quinze mapas de contorno de excitação/emissão em 3D, decidimos mostrar quatro intervalos que apresentam mudanças perceptíveis nos espectros de fluorescência, conforme mostra a Figura 26.

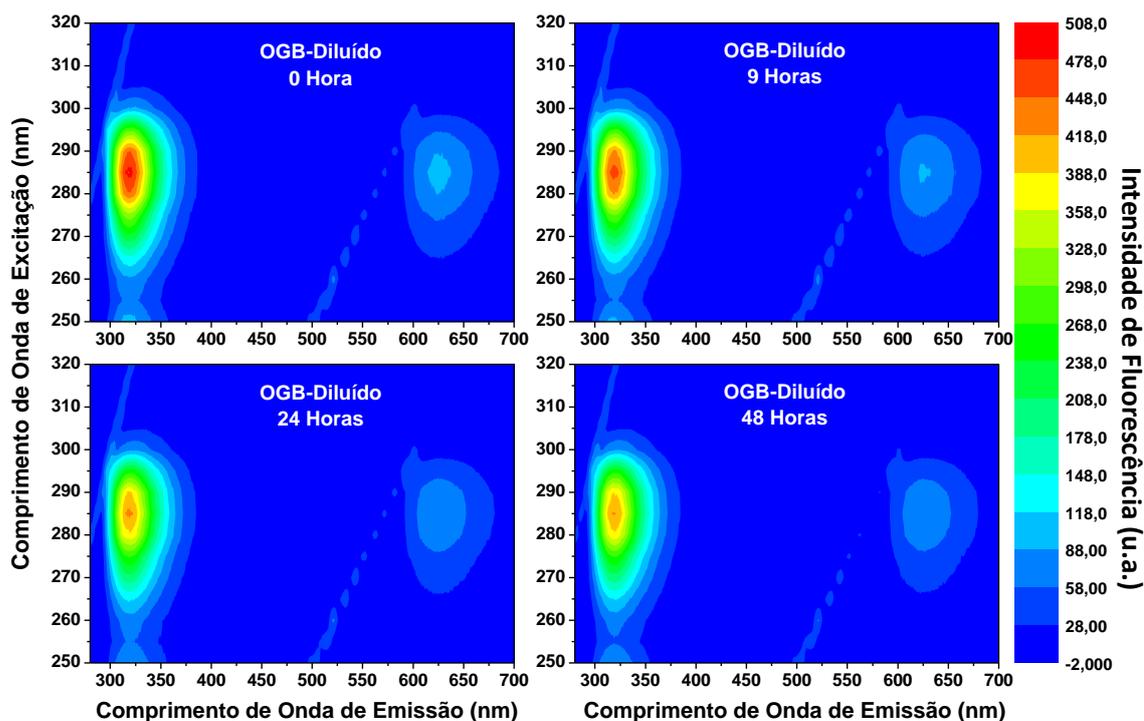


Figura 26. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de OGB diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

Neste sentido, nos intervalos 0 hora, 9 horas, 24 horas e 48 horas é possível observar alterações nas amostras de OGB em duas regiões: uma região compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 260 nm a 305 nm, emissão entre 293 nm a 385 nm e com pico máximo em torno de 320 nm quando excitado em 285 nm, possivelmente associado aos tocoferóis e na região de excitação compreendida entre 265 nm a 298 nm, emissão de 593 nm a 685 nm e com pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm, atribuído à clorofila (Chl).^{31,47}

Buscando entender a alteração na região apontada pela literatura como sendo dos tocoferóis, foram feitos espectros de fluorescência nas amostras termodegradadas do OGB com bandas de emissão compreendidas entre 290 nm e 400 nm e pico máximo em torno de 320 nm quando excitado em 285 nm.

Assim sendo, na Figura 27 é possível observar uma diminuição na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Isso pode estar associado à degradação dos tocoferóis, um antioxidante natural presente em óleos vegetais.³⁵

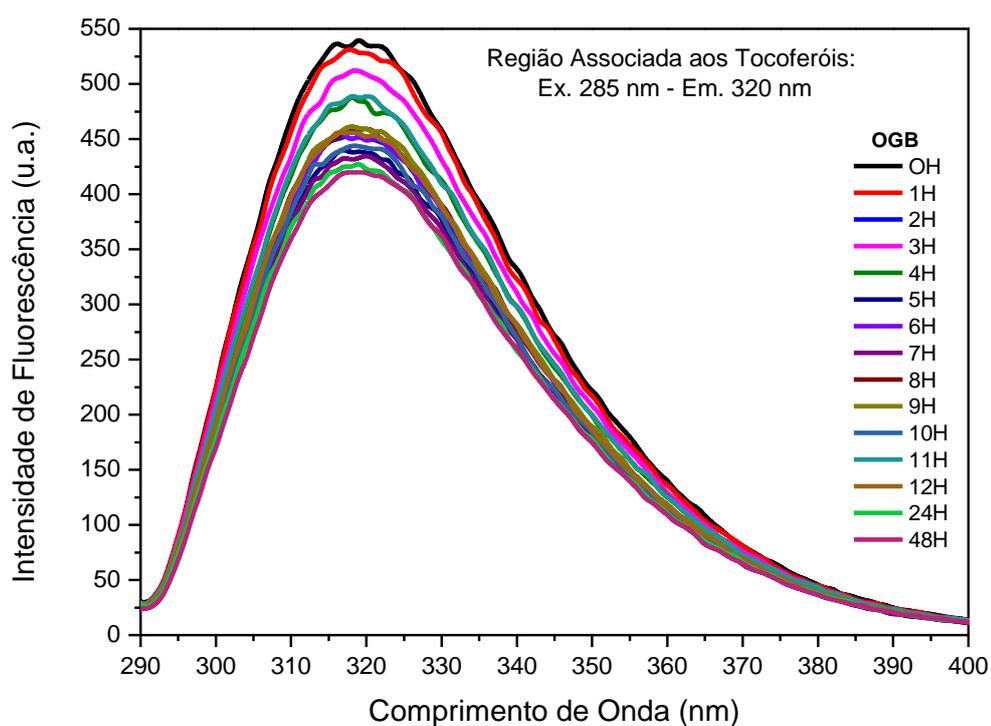


Figura 27. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do OGB associado aos tocoferóis compreendido entre 290 nm e 400 nm e pico máximo em torno de 320 nm quando excitado em 285.

Com o intuito de monitorar a supressão da fluorescência na região de 320 nm, traçamos o gráfico (intensidade de fluorescência em função do tempo de aquecimento) apresentado na Figura 28 utilizando os picos de maior intensidade (320 nm) quando excitamos as amostras em 285 nm. Então, tem-se uma supressão na intensidade de fluorescência na região associada aos tocoferóis apontando para a degradação das amostras de OGB à medida que o tempo passa.

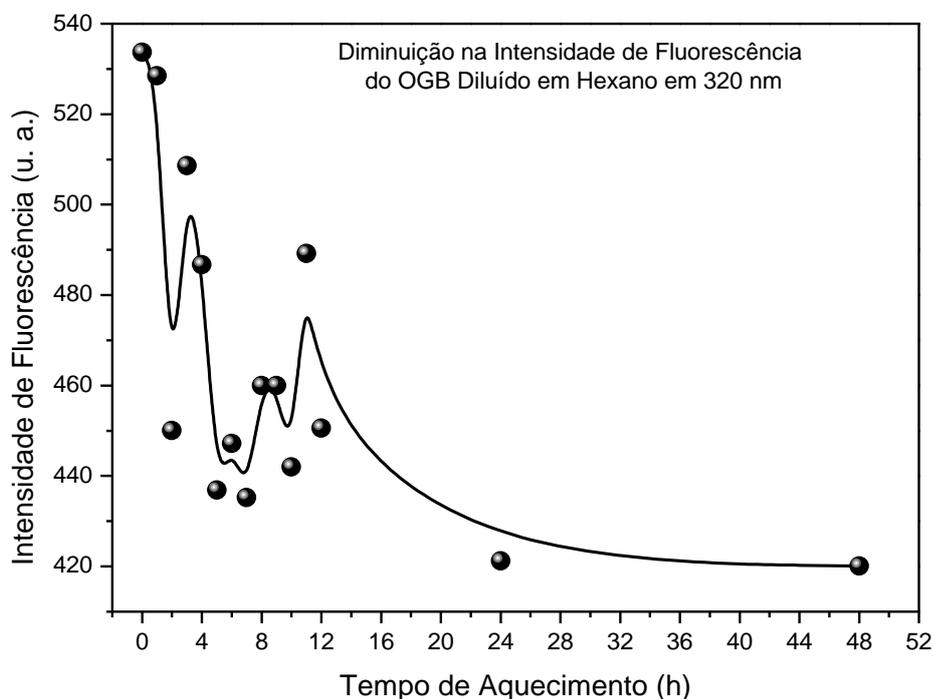


Figura 28. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (320 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de OGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência dos tocoferóis com o passar do tempo.

Para a segunda região que sofreu alteração durante a termodegradação, espectros de fluorescência das amostras de OGB apresentaram bandas de emissão compreendidas entre 590 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm.

Desse modo, a Figura 29 mostra uma supressão na fluorescência ao passo que aumenta o tempo de exposição das amostras de OGB a alta temperatura. Essa supressão aponta para a degradação da clorofila (Chl) presente nos óleos vegetais e que emitem nessa região.^{20, 37}

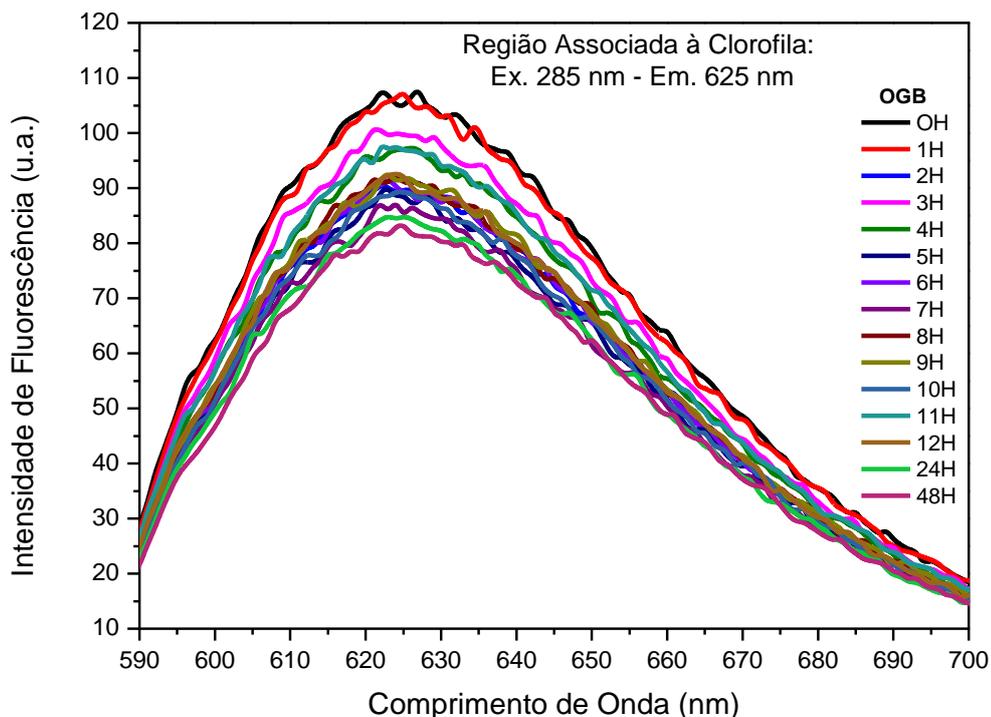


Figura 29. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do OGB associado à Chl compreendido entre 590 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm.

Buscando resultados que corroborem com a ideia da degradação da Chl e consequentemente das amostras de OGB, monitoramos a supressão da fluorescência nos picos de maior intensidade (625 nm) quando excitadas em 285 nm.

Para isso traçamos o gráfico (intensidade de fluorescência em função do tempo de aquecimento) apresentado na Figura 30 e assim pudemos observar que a intensidade de fluorescência diminui enquanto o tempo de aquecimento aumenta. Tal fato indica que isso está relacionado com a degradação sofrida pela Chl durante o processo de termodegradação e consequentemente aponta para a degradação do OGB.

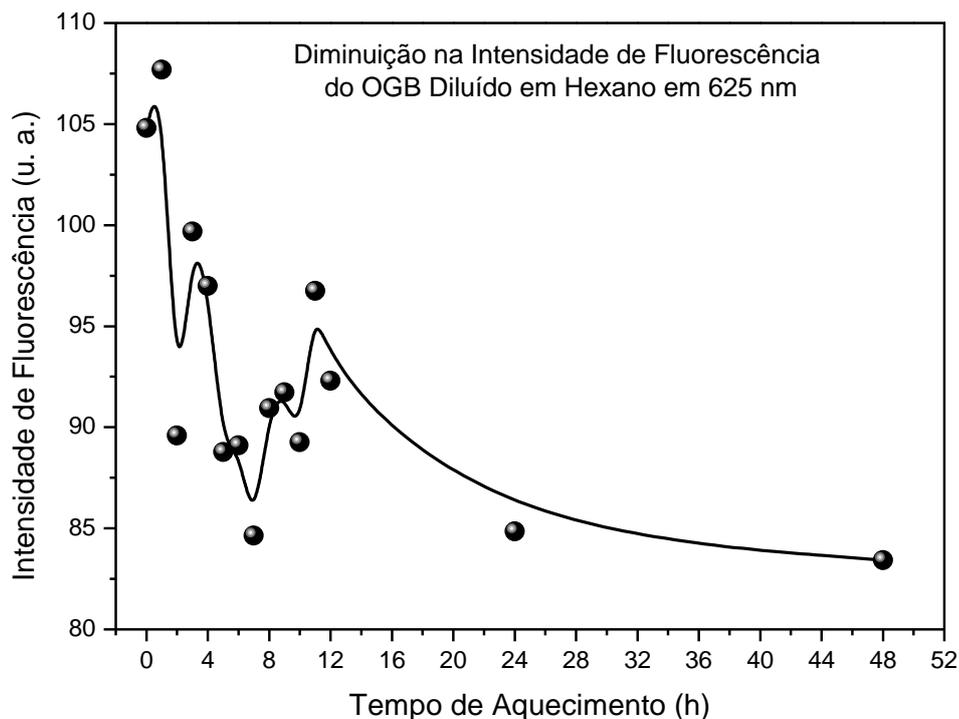


Figura 30. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (625 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de OGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência da Chl com o passar do tempo.

5.3.2 - Caracterização do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BGB - Diluído)

De forma análoga ao estudo realizado nas amostras termodegradadas e diluídas do OGB, realizamos medidas de EF nas amostras termodegradadas e diluídas do BGB. Para isso construímos mapas de excitação/emissão em 3D das 15 amostras e, assim como nos mapas do OGB, escolhemos quatro intervalos para acompanhar as mudanças apresentadas nas amostras durante a termodegradação.

A Figura 31 mostra os mapas de excitação/emissão em 3D associados às amostras de BGB. Logo, é possível observar alterações nas amostras de BGB na região compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 295 nm a 382 nm, emissão entre 255 nm a 305 nm e com pico máximo em torno de 318 nm quando excitado em 285 nm, associado aos tocoferóis⁴⁵ e na região de excitação compreendida entre 265 nm a 298 nm, emissão de 596 nm a 681 nm e com pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm, atribuído à clorofila.⁴⁸

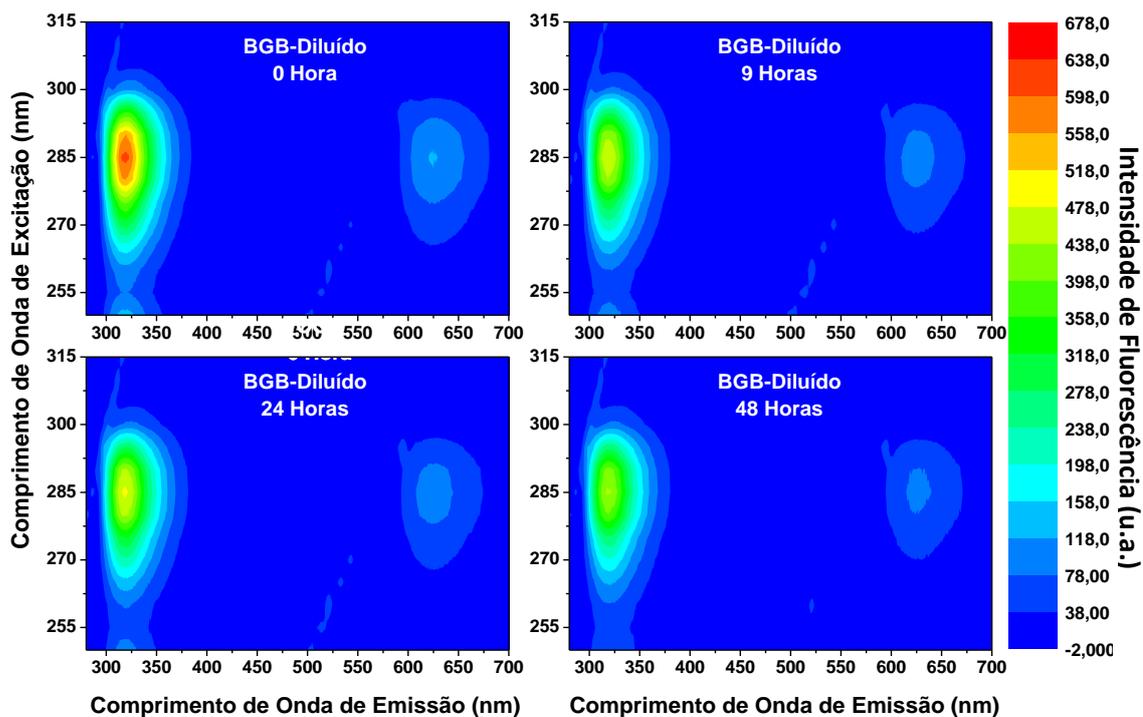


Figura 31. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de BGB diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

Analisando a região associada aos tocoferóis por meio dos espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB monitoramos bandas de emissão compreendidas entre 290 nm e 400 nm e pico máximo em torno de 318 nm quando excitado em 285 nm.

Desse modo, na Figura 32 tem-se uma diminuição na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Possivelmente essa supressão está associada à degradação dos tocoferóis presentes em óleos vegetais e também no biodiesel.⁴¹

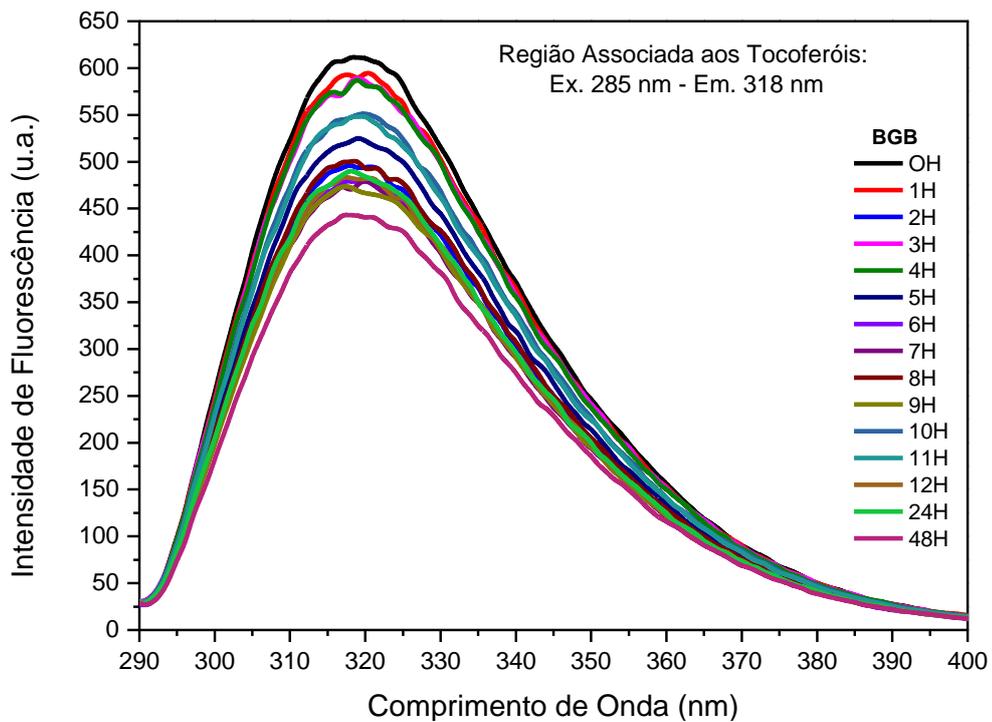


Figura 32. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do BGB associado aos tocoferóis compreendido entre 290 nm e 400 nm e pico máximo em torno de 318 nm quando excitado em 285 nm.

Monitorando a diminuição da fluorescência na região de 318 nm, na qual representa picos de maior intensidade, traçamos o gráfico apresentado na Figura 33 quando excitamos as amostras em 285 nm.

Então, tem-se uma supressão na intensidade de fluorescência na região associada aos tocoferóis a medida que aumenta o tempo de aquecimento. Evidenciando assim a degradação das amostras de BGB. Isso porque esses compostos ao se degradarem formam os chamados compostos de degradação, como cetonas, aldeídos, dienos, trienos e que não fluorescem, somente absorvem energia. Então suprimem a fluorescência dos tocoferóis, Chl e carotenoides presentes em óleos vegetais e biodieseis.⁴¹

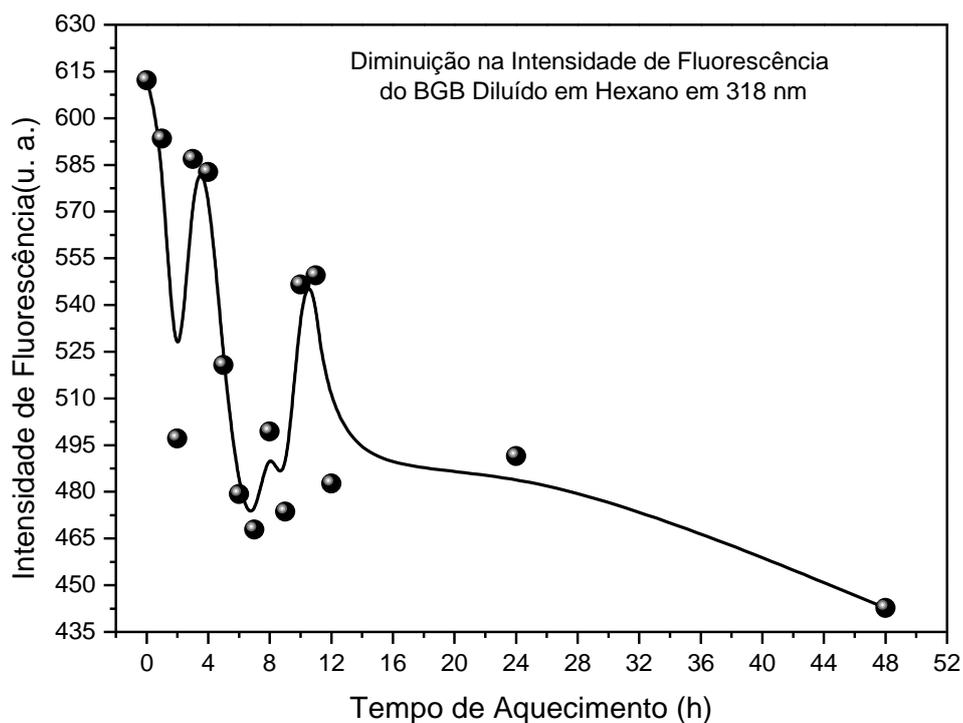


Figura 33. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (318 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de BGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência dos tocoferóis com o passar do tempo.

Agora fazendo a análise da segunda região que apresentou alteração durante a termodegradação, geramos espectros de fluorescência das amostras de BGB com bandas de emissão compreendidas entre 590 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm.

Desse modo, a Figura 34 mostra uma redução na fluorescência ao passo que aumenta o tempo de exposição das amostras de BGB a alta temperatura. Essa supressão aponta para a degradação da clorofila (Chl) presente nos óleos vegetais e que emitem nessa região.²⁰

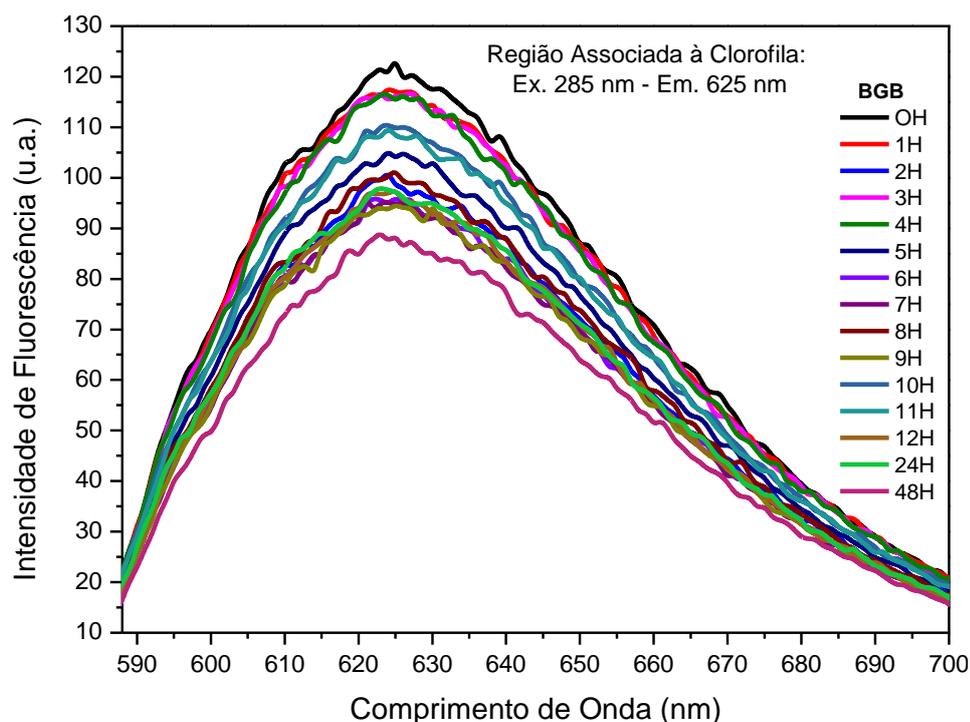


Figura 34. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do BGB associado aos tocoferóis compreendido entre 590 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 625 nm quando excitado em 285 nm.

Para monitorarmos a supressão da fluorescência nos picos de maior intensidade (625 nm) quando excitadas em 285 nm, traçamos o gráfico mostrado na Figura 35 e assim pudemos observar que a intensidade de fluorescência diminui enquanto o tempo de aquecimento aumenta. Isso evidencia que a Chl está se degradando durante o processo de termodegradação ao formar outros compostos que não fluorescem e consequentemente aponta para a degradação do BGB.

Ao compararmos os espectros de EF do OGB e do BGB diluídos em n-hexano (HPLC) apresentados até aqui é possível verificarmos uma semelhança entre eles. Isso porque o OGB foi extraído via prensa a frio e mesmo passando por processos de aquecimento, como a transesterificação, o BGB mantém uma quantidade significativa de compostos provenientes do OGB, daí a semelhança.

Por outro lado, a variação nos pontos dos gráficos que mostram a intensidade de fluorescência em função do tempo de aquecimento talvez possa ser explicada pelo fato das moléculas de OGB e BGB estarem bastante diluídas (0,059% m/m) e

consequentemente dispersas desfavorecendo processos de decaimento ao retornarem ao estado fundamental.

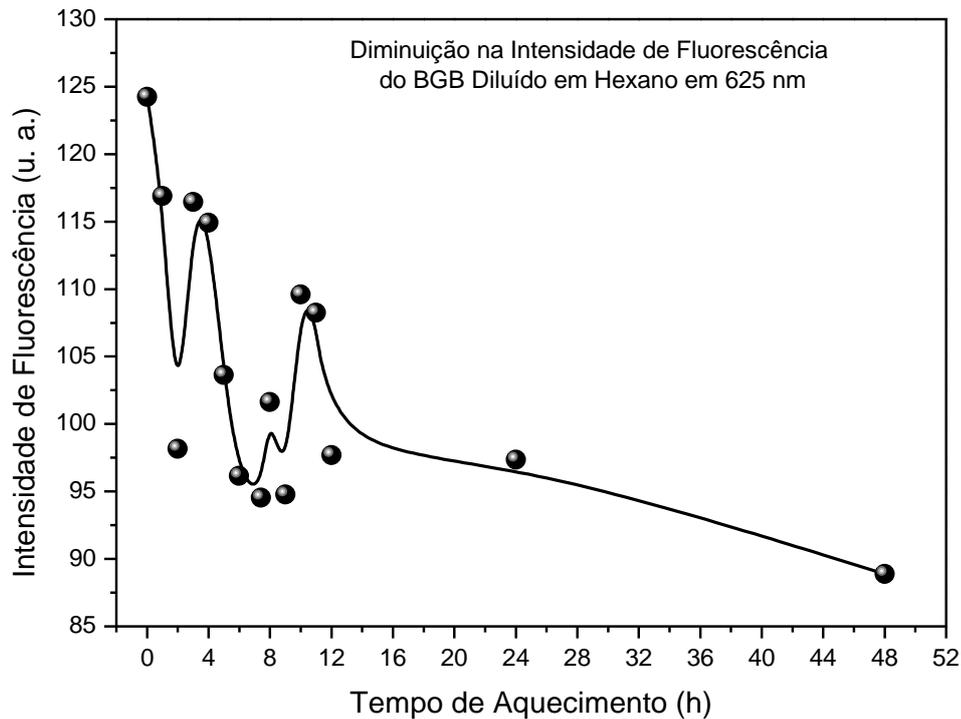


Figura 35. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (625 nm) quando excitado em 285 nm das amostras de BGB mostrando uma supressão na intensidade de fluorescência da Chl com o passar do tempo.

5.3.3 - Caracterização do Óleo do Pinhão-Manso (OPM - Diluído)

A EF realizada nas 15 amostras termodegradadas e diluídas do OPM mostrou, através de mapas de excitação/emissão em 3D, alteração somente em uma região. Isso pode estar relacionado ao fato de que durante a extração o óleo fica em contato com o solvente por cerca de 4 horas e meia a alta temperatura (cerca de 70°C). Consequentemente acarreta uma degradação de compostos naturais presentes em óleos vegetais como Chl, tocoferóis e carotenoides. Fator que se agrava no BPM, já que o OPM, degradado pela extração, necessita passar por uma neutralização e depois pela transesterificação para a síntese do biodiesel. Como ambos os processos necessitam de elevada temperatura, logo geram um produto bastante degradado como revelam os dados das amostras não-diluídas no estudo feito por EF, EFI e IA.

Diante desse quadro, a Figura 36 mostra os mapas de excitação/emissão em 3D associados às amostras de OPM. Os traços em diagonal que apresentam alta intensidade de fluorescência estão associados ao espalhamento de luz, ou seja, corresponde ao comprimento de onda de excitação das amostras, já que durante as análises os filtros do equipamento estavam abertos e os detectores receberam a própria luz de emissão.

Além disso, é possível observar alteração na região compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 250 nm a 310 nm, emissão entre 274 nm a 368 nm e com pico máximo em torno de 325 nm quando excitado em 260 nm, associado aos tetraenos conjugados que são compostos formados durante a termodegradação das amostras de OPM.¹⁶

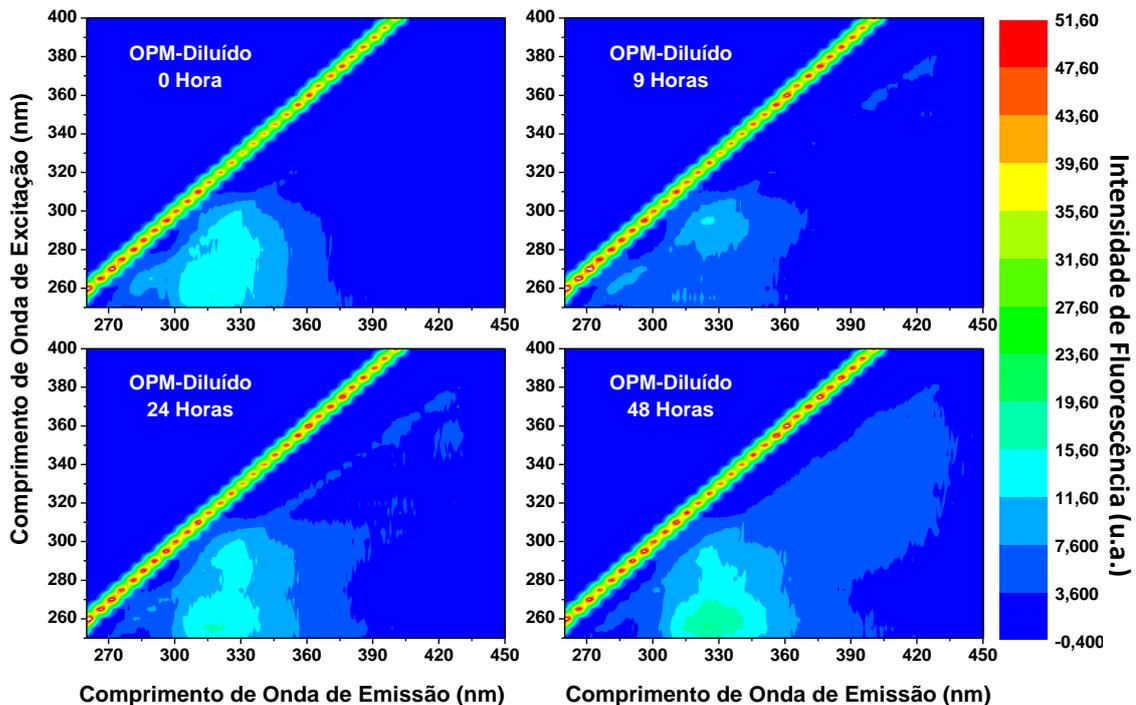


Figura 36. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de OPM diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

Em recente trabalho publicado, Magalhães e colaboradores¹⁶ mostram que os compostos gerados durante a degradação como cetonas, dienos, trienos não emitem radiação, somente absorvem. Assim, a fluorescência visível observada em amostras de biodiesel na região de 350-500 nm e pico máximo em torno de 410 nm foi atribuída pelos autores aos tetraenos conjugados, compostos com quatro insaturações e que são gerados durante o processo de degradação do éster metílico linolenato presente em

óleos vegetais e biodieíséis. A Figura 37 mostra a possível estrutura molecular desse composto proposta pelos autores.

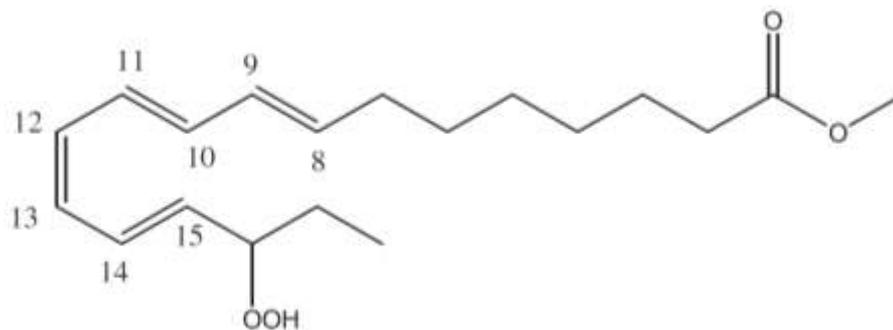


Figura 37. Possível estrutura molecular dos tetraenos conjugados gerados pela decomposição do éster metílico linolenato durante o processo de degradação.¹⁶

Analisando a região associada aos tetraenos conjugados geramos espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do OPM e monitoramos bandas de emissão compreendidas entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 325 nm quando excitado em 260 nm.

Assim sendo, na Figura 38 tem-se um aumento na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Possivelmente esse aumento deve-se ao aumento dos tetraenos conjugados à medida em os ésteres são degradados. Tal fato aponta para a degradação do OPM.^{16, 31, 32}

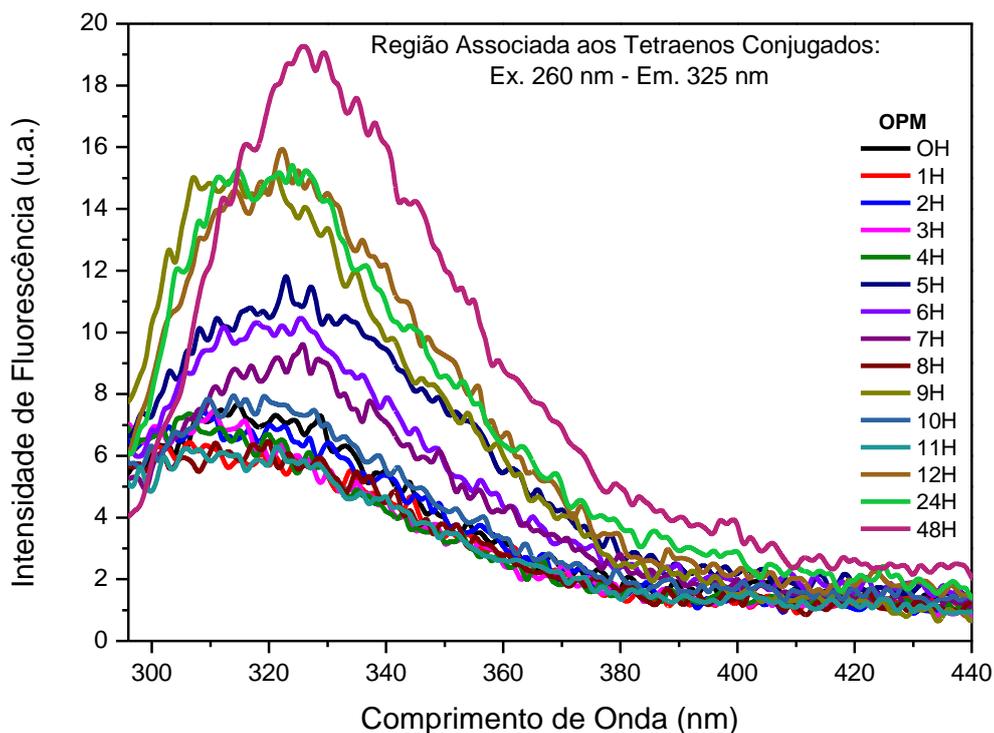


Figura 38. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do OPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 325 nm quando excitado em 260 nm.

A Figura 39 está associada ao gráfico traçado para monitorar o aumento na fluorescência na região de 325 nm que corresponde aos picos de maior intensidade quando excitamos as amostras em 260 nm.

Diante disso, tem-se um aumento na intensidade de fluorescência na região associada aos tetraenos conjugados a medida que aumenta o tempo de aquecimento. Evidenciando assim a degradação das amostras de OPM. Isso porque a geração desses compostos implica na degradação do éster metílico linolenato presente em óleos vegetais e biodieseis.^{16, 31}

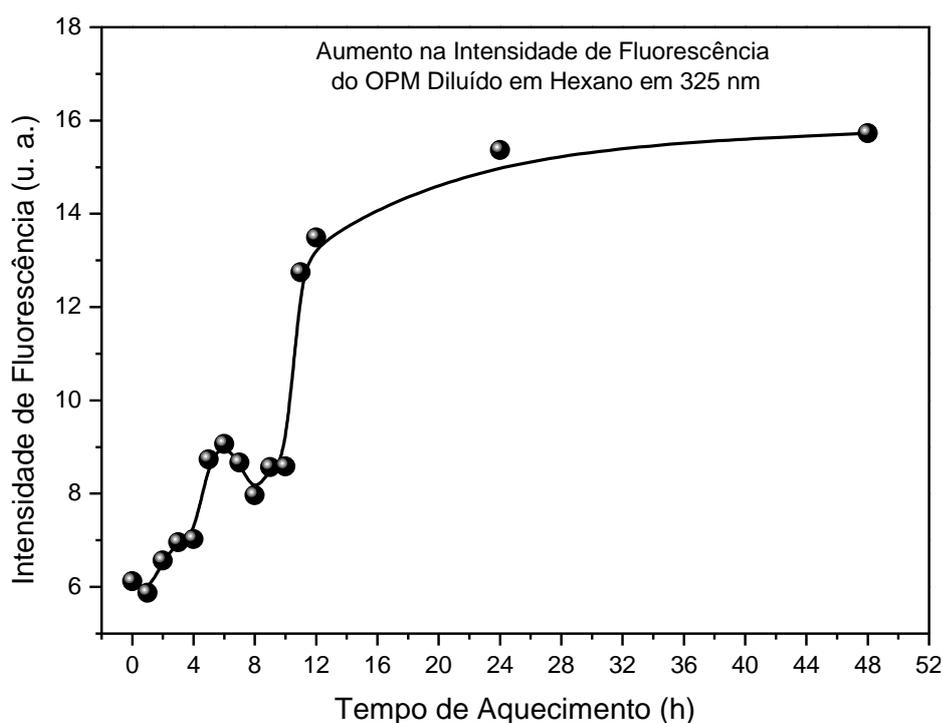


Figura 39. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (325 nm) quando excitado em 260 nm das amostras de OPM mostrando um aumento na intensidade de fluorescência dos tetraenos conjugados com o passar do tempo.

5.3.4 - Caracterização do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BPM - Diluído)

Analogamente aos mapas de excitação/emissão em 3D do OPM analisados, foram gerados os mapas de excitação/emissão em 3D do BPM. Ocorreu alteração somente em uma região conforme mostra a Figura 40, na região compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 278 nm a 350 nm, emissão entre 250 nm a 334

nm e com pico máximo em torno de 313 nm quando excitado em 265 nm, associado aos tetraenos conjugados, compostos formados durante a termodegradação das amostras de BPM.¹⁶ As intensas fluorescências na diagonal, assim como nos mapas do OPM, estão associadas ao comprimento de luz de excitação das amostras.

As amostras termodegradadas do BPM foram analisadas pelos espectros de fluorescência monitorados nas bandas de emissão compreendidas entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 313 nm quando excitado em 265 nm.

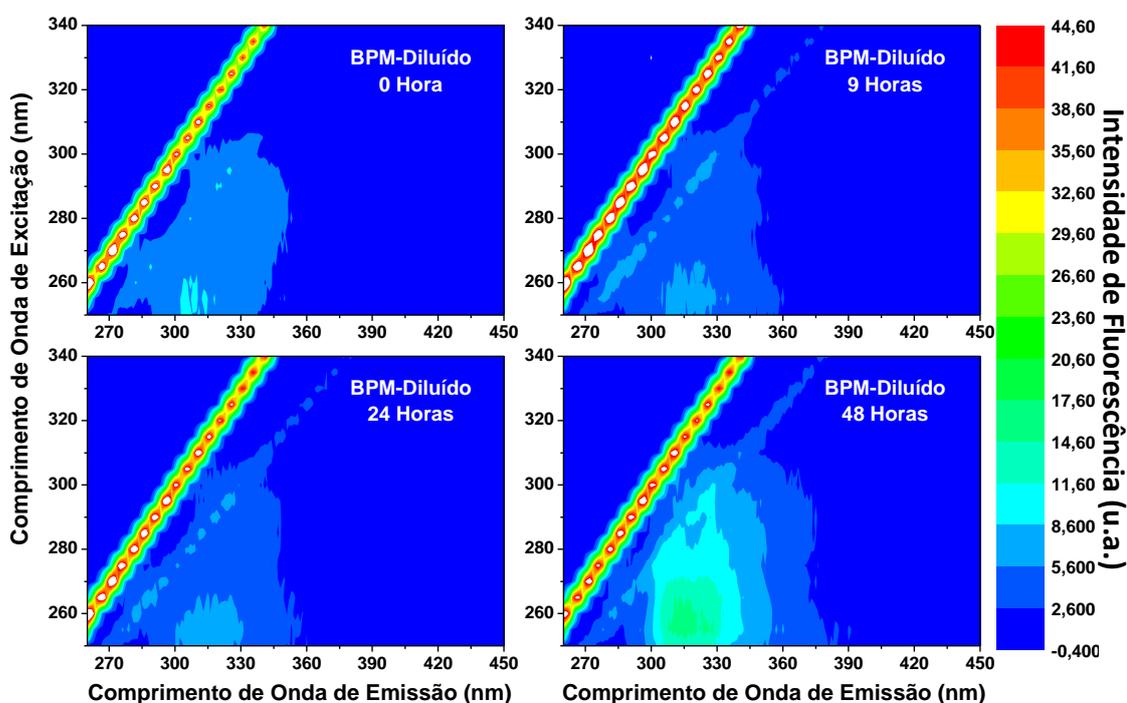


Figura 40. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de OPM diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

Neste sentido, a Figura 41 aponta para um aumento na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Assim como no OPM, possivelmente esse aumento deve-se à formação dos tetraenos conjugados à medida em os ésteres presentes no BPM são degradados. Indicando assim a degradação do BPM.^{16, 31}

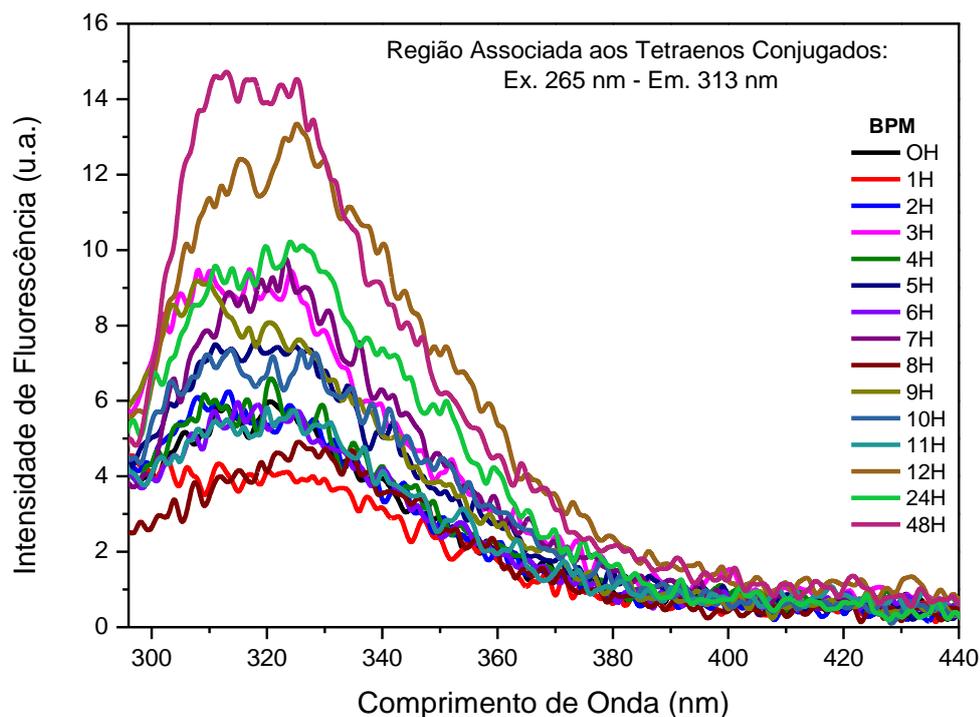


Figura 41. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas e diluídas em n-hexano do BPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 313 nm quando excitado em 265 nm.

Buscando analisar os picos de maior intensidade de fluorescência (313 nm) nas amostras de BPM traçamos o gráfico mostrado na Figura 42 e monitoramos o aumento na fluorescência na região de 313 nm quando excitamos as amostras em 265 nm.

Como resultado tem-se um aumento na intensidade de fluorescência na região associada aos tetraenos conjugados a medida que aumenta o tempo de aquecimento. Possivelmente ocorre uma degradação do éster metílico linolenato gerando um aumento na formação dos tetraenos e conseqüentemente a degradação das amostras de BPM.^{16, 31}

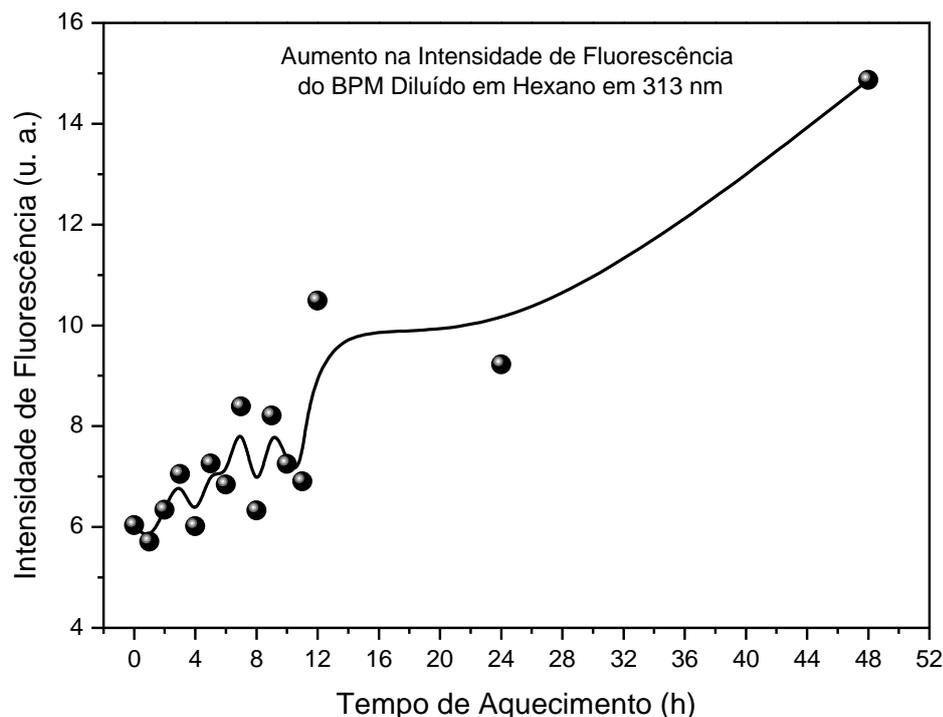


Figura 42. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (313 nm) quando excitado em 265 nm das amostras de BPM mostrando um aumento na intensidade de fluorescência dos tetraenos conjugados com o passar do tempo.

Quando comparamos os espectros de EF das amostras do OPM e do BPM termodegradados e diluídos em n-hexano (HPLC) apresentados até aqui é possível verificarmos uma variação nos espectros assim como nos pontos dos gráficos que mostram a intensidade de fluorescência em função do tempo de aquecimento. Talvez isso esteja relacionado ao fato das moléculas de OPM e BPM estarem bastante diluídas (0,059% m/m) e conseqüentemente dispersas desfavorecendo processos de decaimento mais regulares. Além disso, a extração do OPM via solvente degrada moléculas que potencializam a fluorescência e quando olhamos para o BPM isso se agrava ainda mais, dado o processo no qual este passa até estar purificado.

5.3.5 - Caracterização do Óleo do Gergelim Branco (OGB Não-Diluído)

Antes de prosseguirmos com a discussão das análises do OGB não-diluído em hexano faremos uma breve comparação entre os óleos de gergelim branco extraídos via prensa e via solvente. Assim sendo, de posse dos óleos pudemos ver que fisicamente eram diferentes. O OGB extraído via solvente possuía uma cor mais escura em relação ao OGB extraído via prensa, conforme mostra a Figura 43.

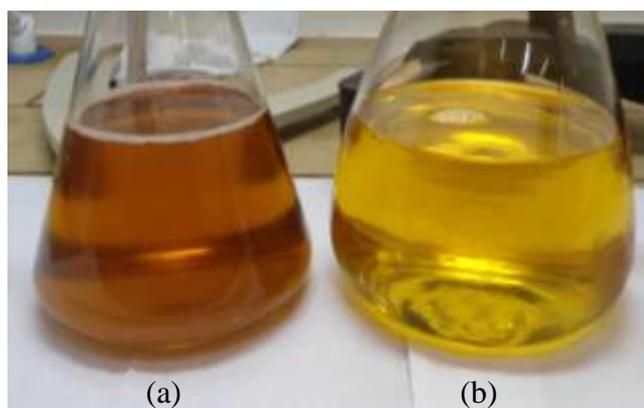


Figura 43. Comparação física entre os óleos de gergelim branco: (a) OGB via solvente e (b) OGB via prensa.

Dada a diferença física entre os óleos, realizamos medidas de EF para verificarmos se houve mudança em compostos fluorescentes já descritos pela literatura e que estão presentes em óleos vegetais como tocoferóis, carotenoides e clorofila.

A Figura 44 mostra mapas de contorno de excitação/emissão em 3D do OGB via prensa e via solvente: em (a) tem-se o mapa referente ao OGB extraído via prensa, já em (b) o mapa referente ao OGB extraído via solvente. Ambos estão com regiões máximas de excitação (250-550 nm) e emissão (260-800 nm). Analisando os mapas de contorno é possível percebermos que houve mudança na fluorescência em várias regiões. No entanto nos verificaremos a região pontilhada em destaque. Essa região já descrita pela literatura^{16, 31, 46} como sendo característica da clorofila (Chl) (650-700 nm), um pigmento natural presente em óleos vegetais.

Neste sentido, é perceptível que no OGB extraído via prensa (Figura 44a) esse composto fluoresce muito mais do que no OGB extraído via solvente (Figura 44b). Isso

sugere que durante o processo de extração do OGB via solvente a Chl possivelmente sofreu degradação e comprometeu a estabilidade oxidativa do óleo.

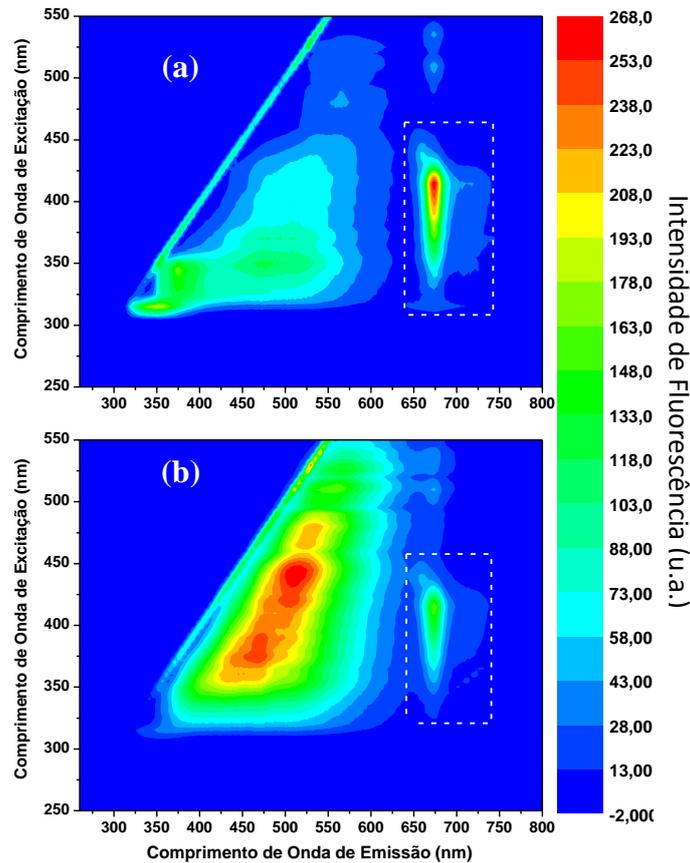


Figura 44. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D dos óleos de gergelim branco: (a) OGB via solvente e (b) OGB via prensa.

Buscando corroborar com essa proposição, geramos espectros de fluorescência (655-700 nm, pico máximo de 674 nm e excitação em 405 nm) a fim de estimar de quanto foi a supressão na intensidade de fluorescência da Chl no OGB extraído via solvente. Desse modo, conforme a Figura 45, no OGB via prensa era cerca de 198 u.a. e passou para cerca de 140 u.a., uma diminuição em torno de 30,3%.

Os resultados mostrados acima sugerem que a supressão na intensidade de fluorescência da Chl pode ser utilizada como um indicador da qualidade de óleos vegetais e biodieseis por meio da técnica óptica de EF.

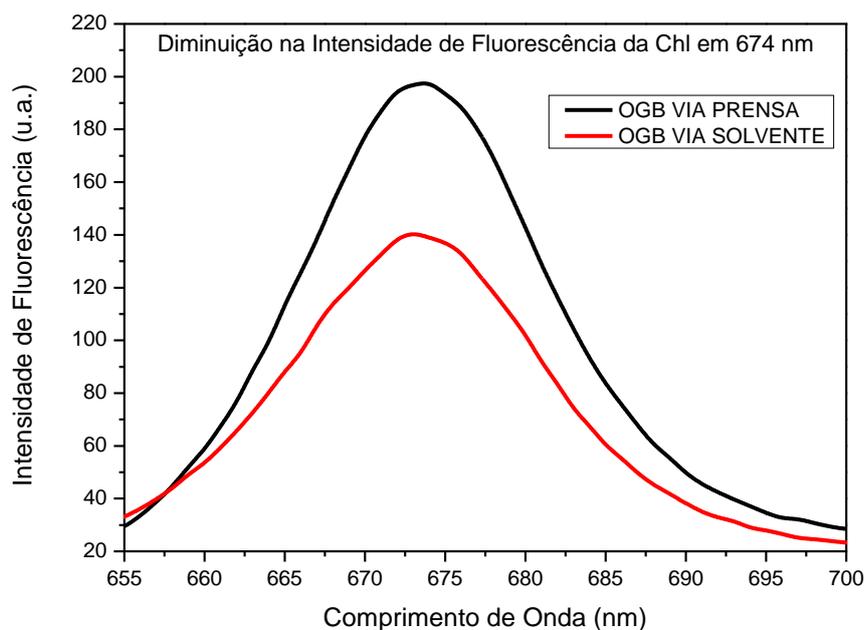


Figura 45. Espectros de fluorescência do OGB extraído via prensa e via solvente associados à Chl compreendidos entre 655 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 674 nm quando excitado em 405 nm.

Agora, dando sequencia na discussão das análises realizadas nas amostras termodegradadas do OGB não-diluído (15 no total), foram realizadas medidas de espectroscopia de fluorescência gerando mapas de contorno de excitação/emissão em 3D para identificarmos qual região sofria alteração. Neste sentido, dentre os quinze mapas de contorno de excitação/emissão em 3D, escolhemos quatro intervalos para monitoramento do OGB: 0 hora, 9 horas, 24 horas e 48 horas, conforme mostra a Figura 46. A linha que aparece na diagonal é espalhamento de luz referente aos comprimentos de onda nos quais as amostras estão sendo excitadas. Comparando os mapas em 3D, percebe-se uma supressão da fluorescência após 48 horas de termodegradação na região compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 305 nm a 325 nm, emissão entre 313 nm a 376 nm e com pico máximo em torno de 354 nm quando excitado em 315 nm, possivelmente associado aos tocoferóis.^{20, 45}

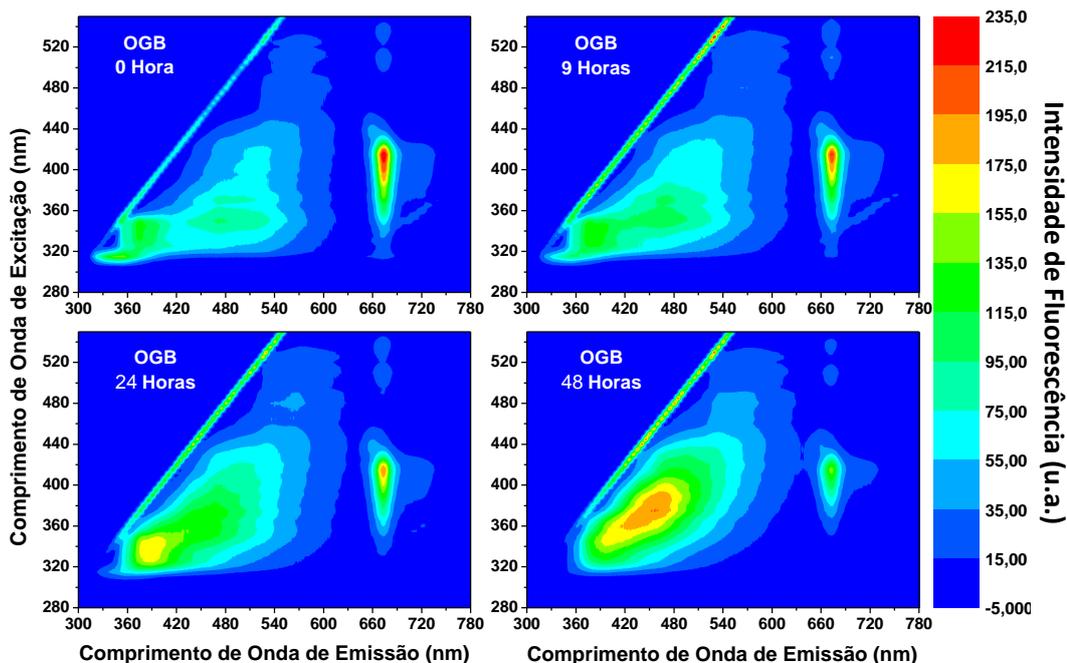


Figura 46. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de Óleo de Gergelim Branco (OGB) que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

A supressão de fluorescência também ocorre na região de excitação compreendida entre 312 nm a 456 nm, emissão de 645 nm a 737 nm e com pico máximo em torno de 674 nm quando excitado em 405 nm, atribuído à Chl.^{31, 45}

Já na região de excitação compreendida entre 310 nm a 535 nm e emissão de 347 nm a 637 nm com um pico máximo de 460 nm quando excitado em 380 nm, há um aumento da fluorescência. Possivelmente associado aos compostos formados durante o processo de termodegradação das amostras de OGB como os tetraenos conjugados que fluorescem na região em torno de 410 nm.^{16, 31}

Diante desse quadro, foi gerado o espectro de fluorescência para a região apontada pela literatura como sendo dos tocoferóis. Assim, a Figura 47 mostra bandas de emissão compreendidas entre 300 nm e 420 nm de amostras termodegradadas do OGB e pico máximo em torno de 354 nm quando excitado em 315 nm.

É possível observar uma diminuição na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Essa supressão pode estar associada à quebra das moléculas na degradação dos tocoferóis.^{20, 32, 37} Já o deslocamento da banda também pode ser um indicio da degradação desses compostos, pois tende a se deslocar para a região de emissão, em torno de 410 nm, associada aos tetraenos conjugados.¹⁶

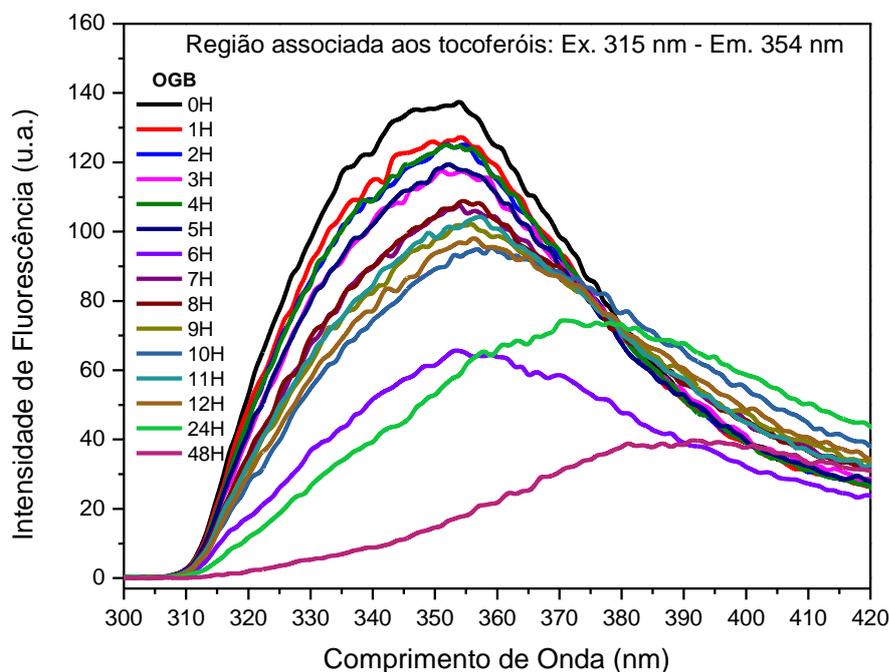


Figura 47. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do OGB associado aos tocoferóis compreendido entre 300 nm e 420 nm e pico máximo em torno de 354 nm quando excitado em 315 nm.

A fim de monitorar essa supressão da fluorescência dos tocoferóis nas amostras de OGB termodegradadas, foi gerado o gráfico (intensidade em função do tempo de degradação) a partir dos picos de maior intensidade (354 nm). A Figura 48 mostra um decréscimo na intensidade de fluorescência das amostras de OGB conforme o tempo passa, apontando assim a degradação dos tocoferóis presentes em sua composição.

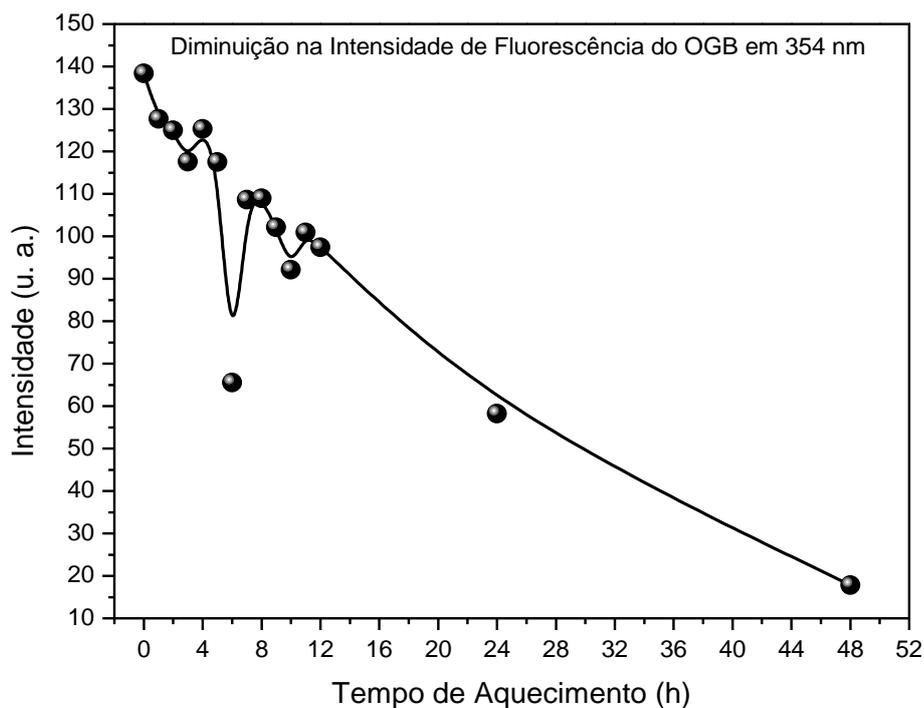


Figura 48. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (354 nm) quando excitado em 315 nm das amostras de OGB.

Já a Figura 49 mostra espectros de fluorescência compreendidos no intervalo de 650 nm a 700 nm e pico máximo em torno de 674 nm quando excitado em 405 nm, atribuído à clorofila (Chl), um antioxidante natural presente nos óleos vegetais e está suscetível a sofrer termodegradação ou termoxidação quando o óleo vegetal é exposto a altas temperaturas.^{35, 46}

Neste sentido, é possível observar uma supressão na fluorescência da Chl, fato que aponta para sua degradação conforme aumenta o tempo de aquecimento. Esse resultado é semelhante ao observado quando comparamos os mapas de excitação/emissão em 3D do OGB extraído via prensa com o OGB extraído via solvente (Figura 44, p. 55) e os espectros de fluorescência da Chl (Figura 45, p. 56).

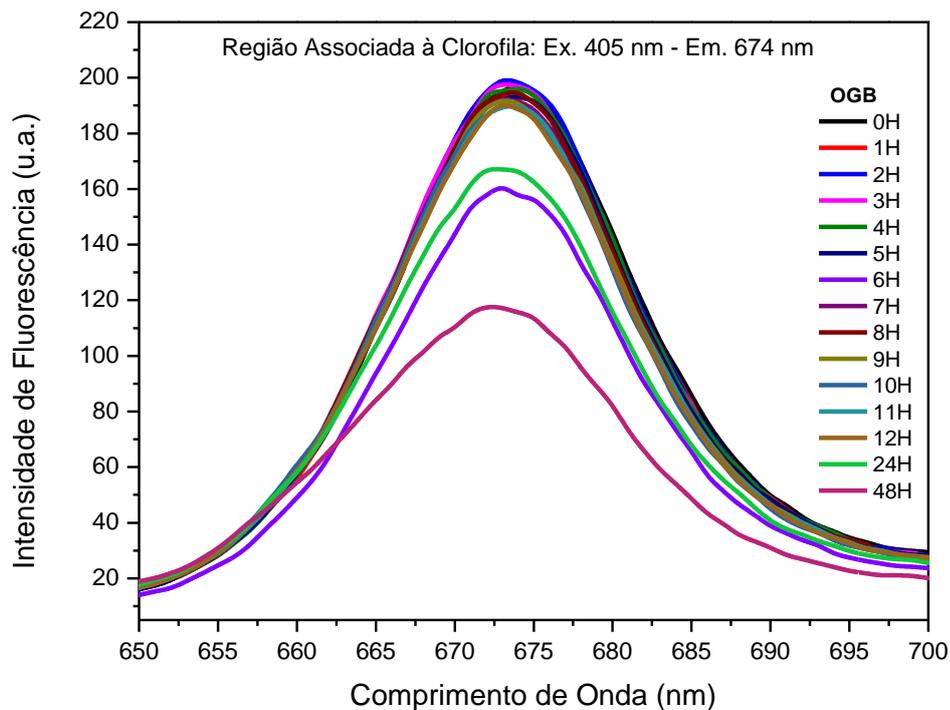


Figura 49. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do OGB associado à clorofila compreendido entre 650 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 674 nm quando excitado em 405 nm.

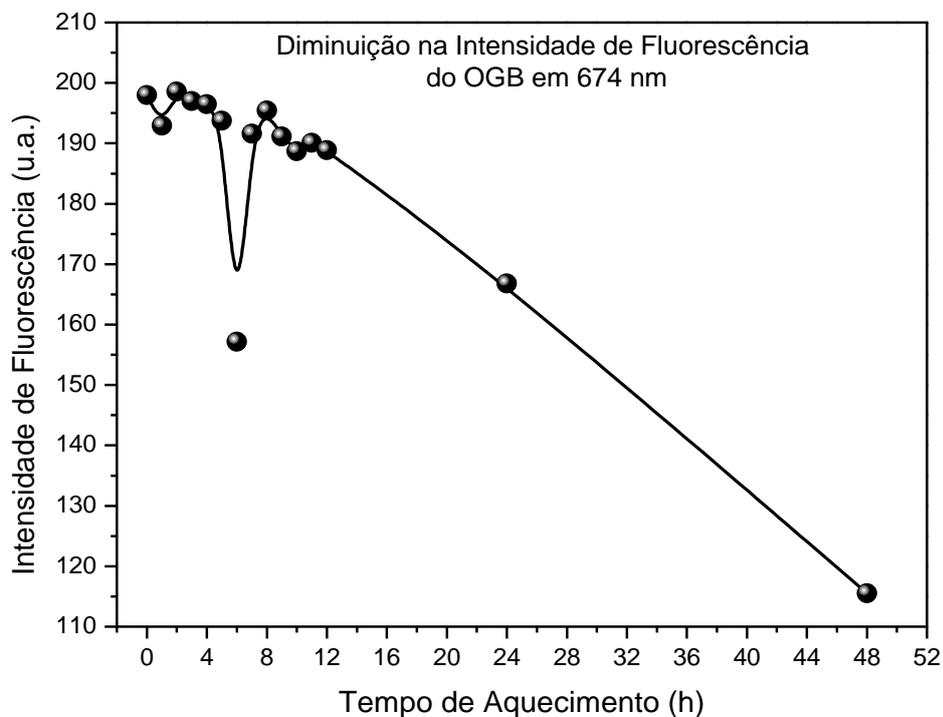


Figura 50. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (674 nm) das amostras de OGB excitadas em 405 nm.

A Figura 50, (intensidade de fluorescência em função do tempo de

aquecimento) monitora a degradação da Chl presente no OGB a partir dos picos de maior intensidade (674 nm) quando excitada em 405 nm. É possível observar uma diminuição na fluorescência das amostras de OGB conforme o tempo passa, tal fato sugere que a Chl está sofrendo uma degradação de acordo com o aumento do tempo de exposição à alta temperatura.

Quando comparamos o mapa de contorno de emissão/excitação em 3D (Figura 46, p.57) do OGB em 0 hora com 48 horas percebemos que há um aumento significativo na fluorescência. Por conseguinte, os espectros de fluorescência apresentados na Figura 51 mostra esse aumento por meio de bandas de emissão compreendidas entre 390 nm e 600 nm de amostras termodegradadas do OGB e pico máximo em torno de 360 nm quando excitado em 380 nm. É possível observar um aumento na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Isso pode estar associado à formação de compostos durante o processo de termodegradação como os tetraenos conjugados.^{16, 31} Assim, o deslocamento da banda de emissão para a região em torno de 410 nm é um indício da degradação do OGB, já que compostos de primeira e segunda degradação não emitem radiação na região do visível, só absorvem.¹⁶

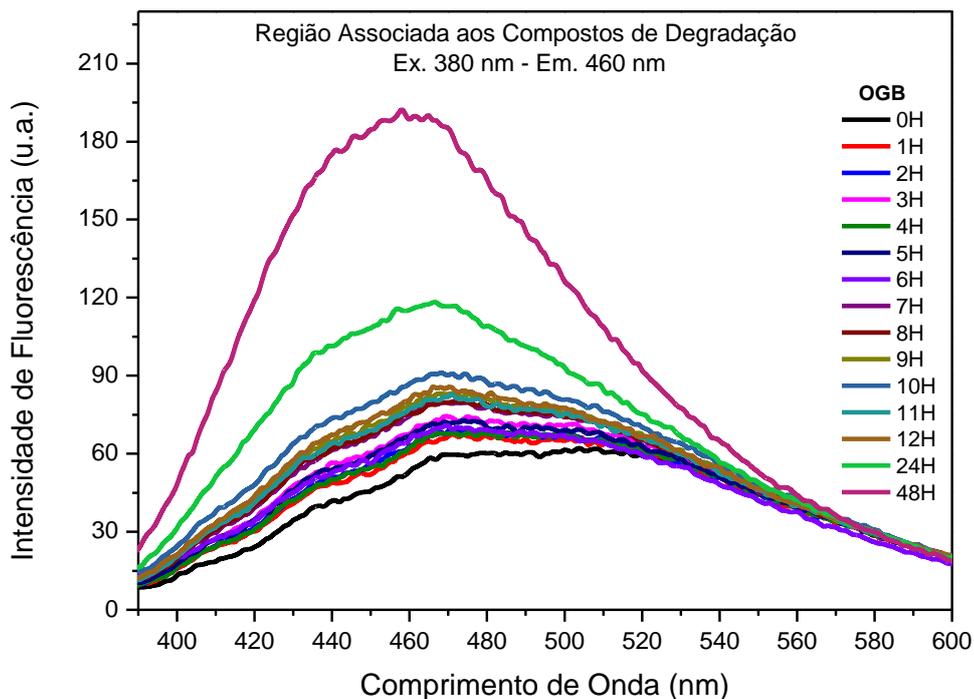


Figura 51. Espectro de fluorescência das amostras termodegradadas do OGB associado aos compostos de degradação compreendido entre 390 nm e 600 nm e pico máximo em torno de 460 nm quando excitado em 380 nm.

Associado a essa ideia, a Figura 52 mostra um gráfico (intensidade de fluorescência em função do tempo de Aquecimento) a partir dos picos de maior intensidade (460 nm) com excitação em 380 nm. Nota-se um aumento na intensidade de fluorescência de acordo com o aumento do tempo de degradação. Isso possivelmente deve-se ao aumento dos compostos degradados formados a partir dos constituintes contidos no OGB que sofreram uma transformação durante o processo de termodegradação acelerado.

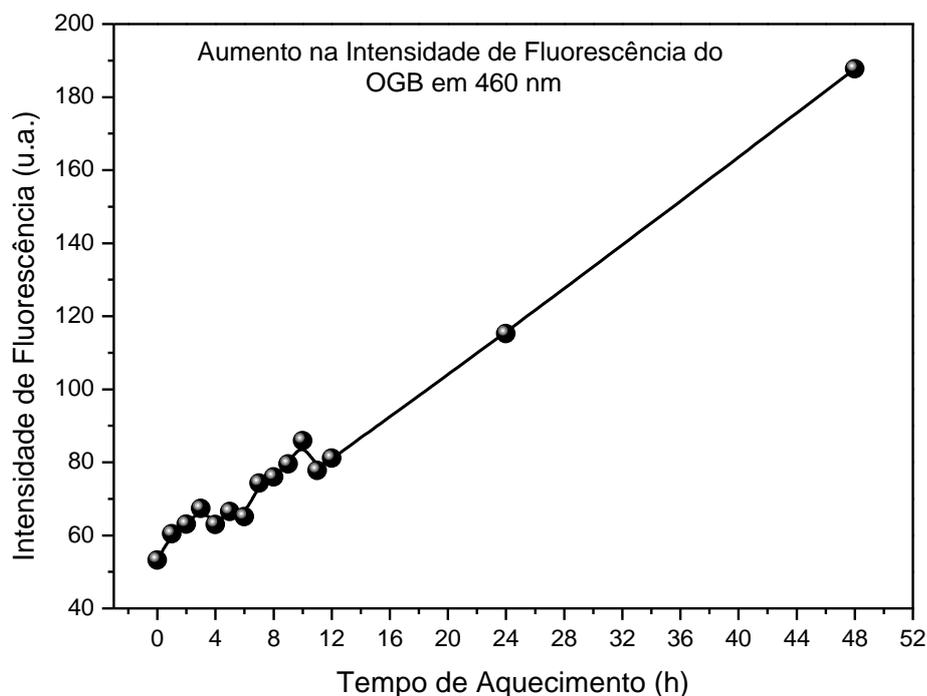


Figura 52. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (460 nm) das amostras de OGB excitadas em 380 nm.

Para as amostras de OGB não-diluído e termodegradadas analisadas até agora pudemos verificar que ocorreu um aumento na intensidade de fluorescência no pico máximo de 460 nm, quando excitado em 380 nm, associado aos tetraenos conjugados. Por sua vez pudemos verificar uma supressão na intensidade de fluorescência no pico máximo de 354 nm, quando excitado em 315 nm, associado aos tocoferóis.

Buscando entender essas flutuações nas intensidades de fluorescência geramos o gráfico apresentado na Figura 53, comprimento de onda de emissão em 354 nm em função do Comprimento de Onda de Emissão em 460 nm. O resultado aponta para uma supressão na intensidade de fluorescência das amostras de OGB.

Possivelmente, porque durante o processo de termodegradação acelerada, enquanto diminuem as moléculas dos tocoferóis, aumentam as moléculas dos compostos de degradação, como os tetraenos conjugados. Isso sugere que o OGB está degradando com o passar do tempo de exposição das amostras ao calor.

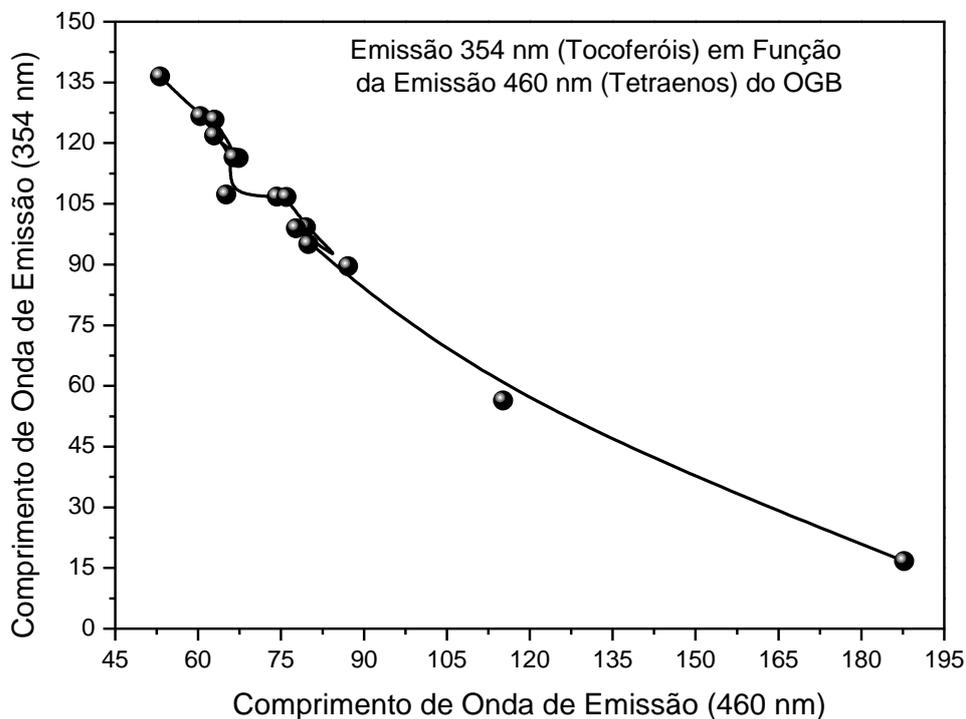


Figura 53. Flutuações nas intensidades de fluorescência (máximo em 354 nm associado aos tocoferóis em função do máximo em 460 nm associado aos tetraenos).

5.3.6 – Caracterização do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BGB – Não-Diluído)

De forma análoga às medidas de espectroscopia de fluorescência realizadas nas amostras de OGB não-diluídas, monitorou-se as amostras termodegradadas do BGB por através de mapas de contorno de excitação/emissão em 3D quatro intervalos: 0 hora, 9 horas, 24 horas e 48 horas.

A Figura 54 está associada aos mapas de excitação/emissão em 3D das amostras de BGB. Quando comparamos os mapas em 3D, é possível observar uma supressão da fluorescência após 48 horas de termodegradação na região compreendida

entre os comprimentos de onda de excitação de 305 nm a 331 nm, emissão entre 313 nm a 315 nm e com pico máximo em torno de 337 nm quando excitado em 315 nm, possivelmente associado aos tocoferóis.^{20, 46}

Também há supressão, chega a praticamente desaparecer no intervalo 48 horas, na região de excitação compreendida entre 370 nm a 420 nm, emissão de 659 nm a 682 nm e com pico máximo em torno de 671 nm quando excitado em 405 nm, atribuído à Chl.^{32, 37, 46}. A linha que aparece na diagonal é referente ao espalhamento de luz associado aos comprimentos de onda nos quais as amostras estão sendo excitadas

Por outro lado, ocorre um aumento da fluorescência na região de excitação compreendida entre 342 nm a 430 nm e emissão de 397 nm a 555 nm com um pico máximo de 450 nm quando excitado em 380 nm, associado aos compostos formados durante o processo de termodegradação acelerado, possivelmente os tetraenos conjugados.¹⁶

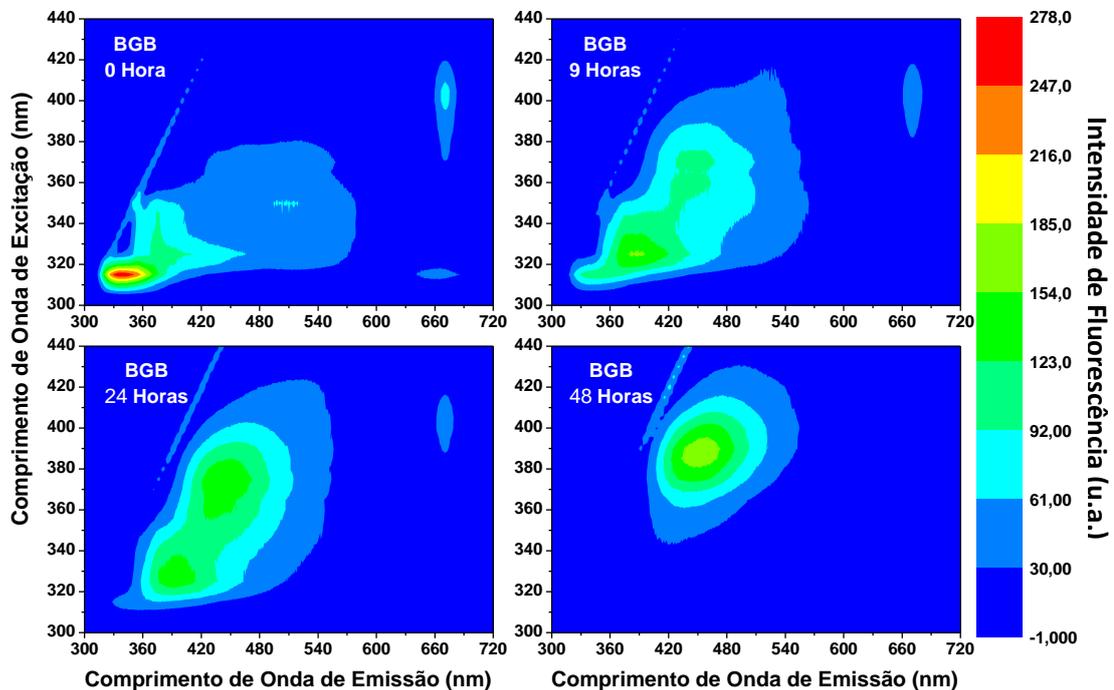


Figura 54. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de Biodiesel de Gergelim Branco (BGB) que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

Comparando os mapas de contorno de excitação/emissão em 3D do OGB (Figura 46, p.57) com os mapas de contorno de excitação/emissão em 3D do BGB

(Figura 54, p.64) percebe-se que no caso dos mapas do OGB existem muito mais regiões que fluorescem do que nos mapas associados ao BGB.

Possivelmente isso se deve a um número maior de moléculas emissoras no óleo como tocoferóis, carotenoides, Chl. Além desses compostos, o OGB por ser um óleo cru (não-refinado), possui fosfatídeos, proteínas, ligninas, dentre outros constituintes que associados aos efeitos de reabsorção, conversão interna, relaxação interna, filtro interno podem contribuir para esse evento.^{23, 33}

Já o BGB possui regiões que fluorescem menos. Possivelmente porque durante o processo de transesterificação e purificação grande parte dos constituintes do óleo são retirados e durante o processo de termodegradação acelerado as possíveis moléculas emissoras são quebradas gerando os compostos de degradação que, como já discutimos até aqui, não fluorescem, somente absorvem energia. Assim, com menos moléculas emissoras há uma tendência de ocorrer menos eventos e efeitos internos e externos nas transições eletrônicas resultando em menos regiões fluorescentes nos mapas de contorno.

Buscando entender a supressão na fluorescência da região atribuída aos tocoferóis pela literatura, foram gerados espectros de fluorescência, conforme mostra a Figura 55. Nela é possível observar bandas de emissão compreendidas entre 300 nm e 420 nm de amostras termodegradadas do BGB e pico máximo em torno de 337 nm quando excitado em 315 nm.

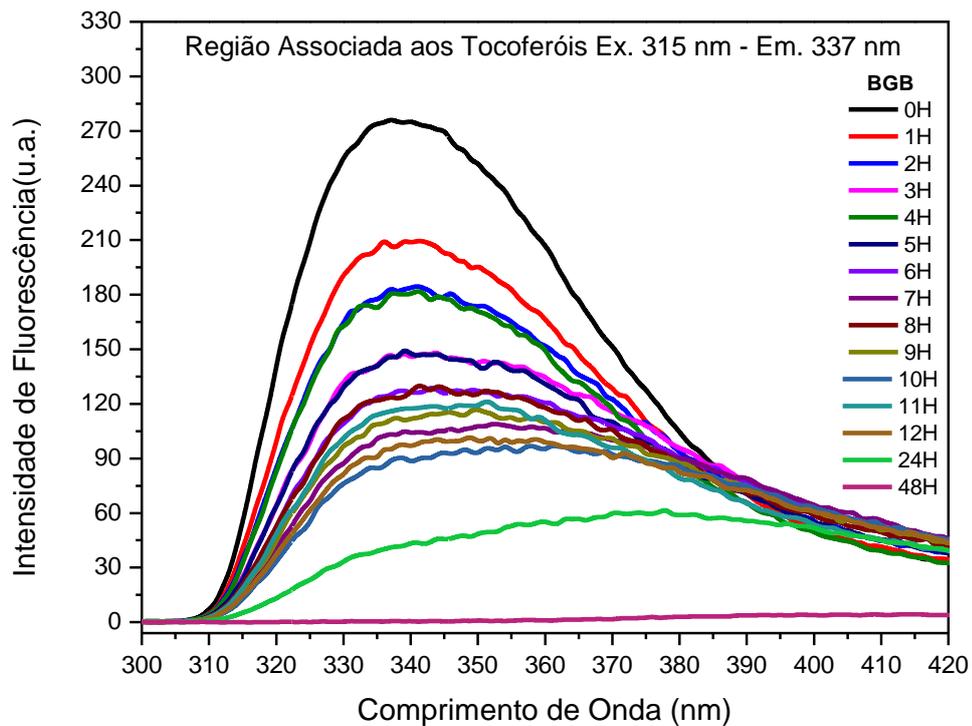


Figura 55. Espectro de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB associado aos tocoferóis compreendido entre 300 nm e 420 nm e pico máximo em torno de 337 nm quando excitado em 315 nm.

Nota-se uma diminuição na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Isso pode ser atribuído à degradação dos tocoferóis, um antioxidante natural presente em óleos vegetais e consequentemente, presente no biodiesel sintetizado a partir desses óleos.^{32, 35}

Já o deslocamento da banda de emissão para a região em torno de 410 nm pode ser um indício da quebra das moléculas na degradação dos tocoferóis e formação dos compostos degradados que fluorescem na região do visível, os tetraenos conjugados.^{16, 32}

Para monitorar a região associada aos tocoferóis, gerou-se o gráfico (intensidade de fluorescência em função do tempo de aquecimento) a partir dos picos de maior intensidade (337 nm) quando excitado em 315 nm.

Assim sendo, a Figura 56 mostra uma supressão na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de aquecimento. Isso pode ser atribuído aos tocoferóis que sofrem degradação durante esse processo podendo ser um indicador da estabilidade oxidativa do BGB.⁴⁶

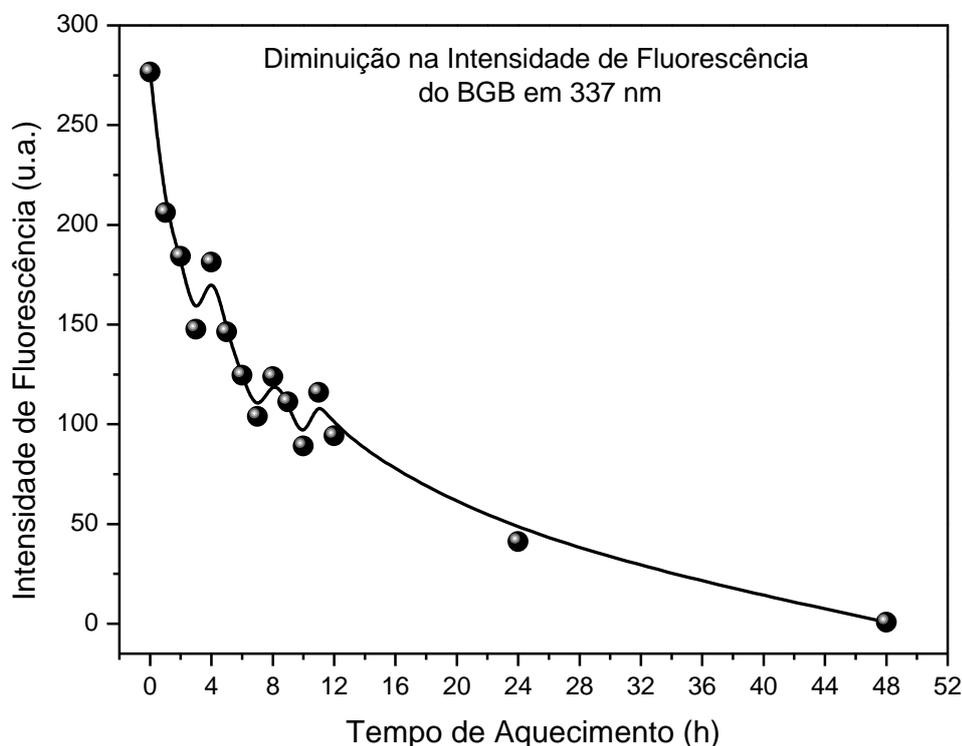


Figura 56. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (337 nm) das amostras de BGB quando excitado em 315 nm.

A Chl é um antioxidante natural presente nos óleos vegetais que não passaram por um processo de refino. Assim sendo, quando observamos as regiões dos mapas de contorno de excitação/emissão em 3D (Figura 54, p. 64) ela desaparece completamente após 48 horas de termodegradação.

Neste sentido, a Figura 57 mostra os espectros de fluorescência atribuídos à Chl compreendidos entre 650 nm e 700 nm de amostras termodegradadas do BGB e pico máximo em torno de 671 nm quando excitado em 671 nm.

Nota-se uma supressão na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Isso pode ser atribuído à degradação da Chl, um antioxidante natural presente em óleos vegetais e conseqüentemente, presente no biodiesel sintetizado a partir desses óleos.^{20, 32, 45}

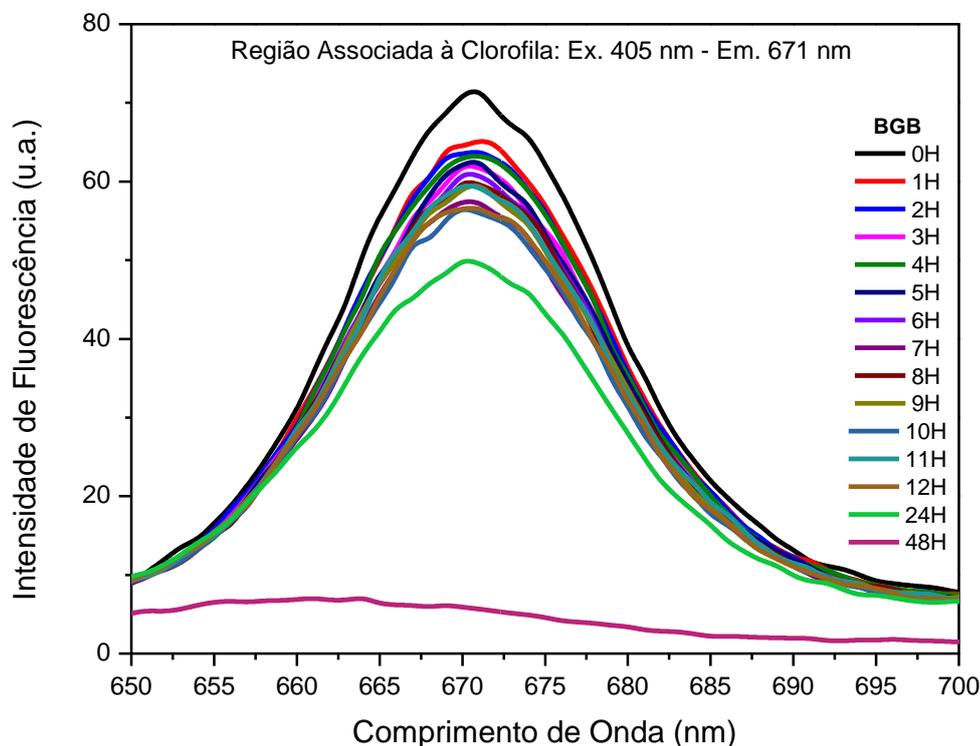


Figura 57. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB associado à clorofila (Chl) compreendido entre 650 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 671 nm quando excitado em 405 nm.

Monitorando a degradação da Chl no BGB em relação aos picos de maior intensidade, a Figura 58 mostra o gráfico Intensidade de Fluorescência em função do Tempo de Aquecimento. Os picos de maior intensidade (671 nm) quando excitado em 405 nm, diminuem ao passo que se aumenta o tempo de aquecimento.

Isso é um indício de que as moléculas de Chl presentes nas amostras de BGB estão susceptíveis à termodegradação ou termoxidação quando expostas a altas temperaturas.^{20, 35, 46} Desse modo a Chl pode ser um indicador da estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis.

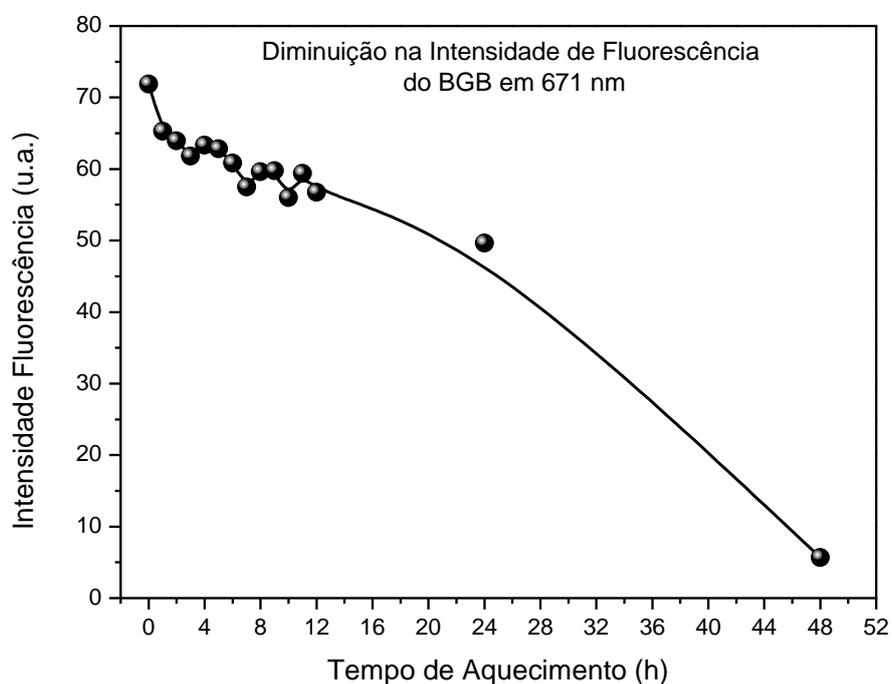


Figura 58. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (671 nm) das amostras de BGB quando excitado em 405 nm.

Comparando os intervalos 0 hora com 48 horas do BGB nos mapas de contorno de emissão/excitação em 3D (Figura 54, p.64) é perceptível que há um aumento na fluorescência considerável. Assim, a Figura 59 está associada aos espectros de fluorescência com bandas de emissão compreendidas entre 390 nm e 600 nm de amostras termodegradadas do BGB e pico máximo em torno de 450 nm quando excitado em 380 nm.

É possível observar um aumento na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Isso pode estar associado à formação dos compostos durante o processo de termodegradação como os tetraenos conjugados.^{16, 31,}

Também pode-se observar um deslocamento da banda de emissão para a região em torno de 410 nm. Tal fato aponta para a degradação do BGB, uma vez que a emissão nessa região é atribuída aos compostos de degradação tetraenos conjugados.¹⁶

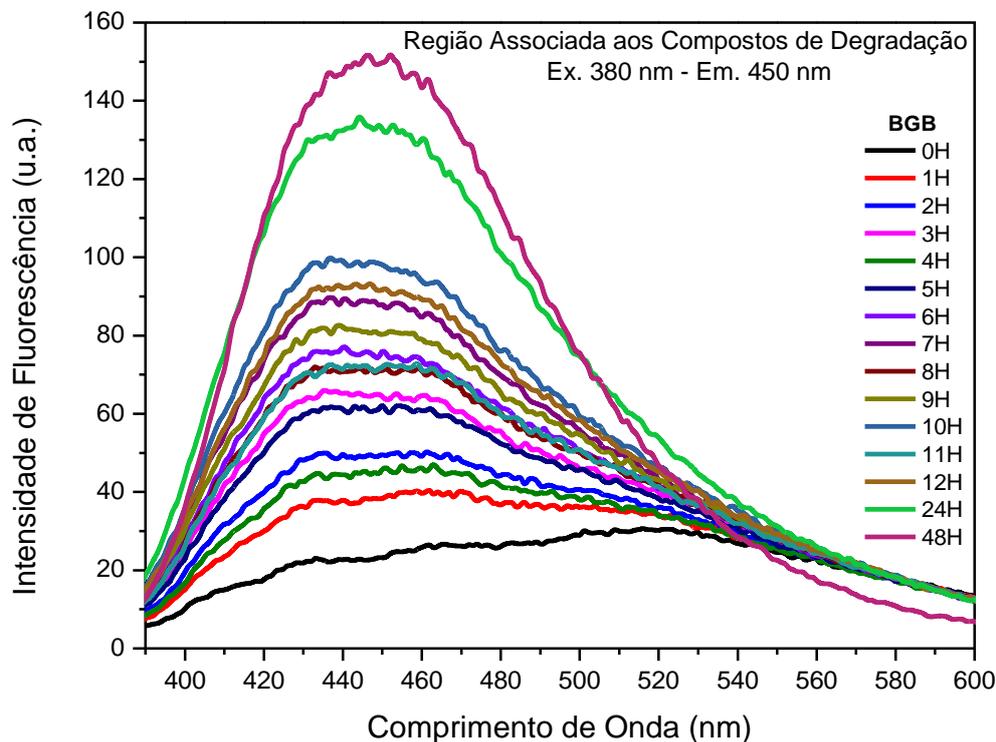


Figura 59. Espectro de fluorescência das amostras termodegradadas do BGB associado aos compostos de degradação compreendido entre 390 nm e 600 nm e pico máximo em torno de 450 nm quando excitado em 380 nm.

Para monitorar os picos de maior intensidade referentes aos compostos de degradação do BGB, foi gerado o gráfico Intensidade de Fluorescência em função do Tempo de Aquecimento. Desse modo, a Figura 60 mostra os picos de maior intensidade (450 nm) quando excitado em 380 nm.

Nota-se um aumento ao passo que se aumenta o tempo de aquecimento. Isso possivelmente deve-se à formação dos compostos degradados gerados a partir dos compostos contidos no BGB, como os ésteres metílicos linolenatos, que podem sofrer uma transformação durante o processo de termodegradação acelerado e originar os tetraenos conjugados.¹⁶

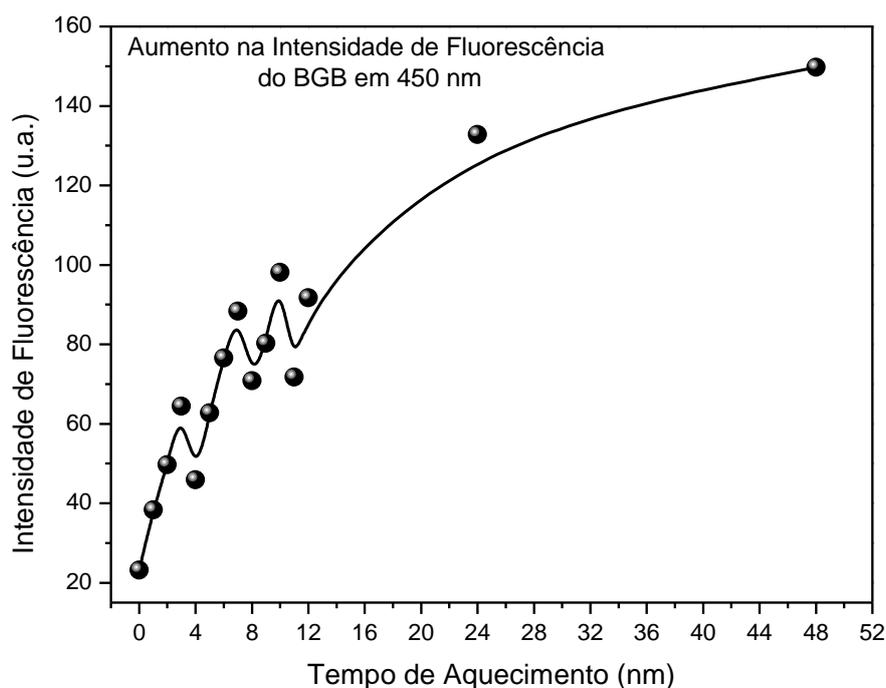


Figura 60. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (450 nm) das amostras de BGB quando excitado em 380 nm.

Assim como as flutuações de intensidade de fluorescência apresentadas nas amostras não-diluídas de OGB, as amostras não-diluídas de BGB também apresentaram flutuações nas intensidades de fluorescência.

Ocorreu um aumento na intensidade de fluorescência no pico máximo de 450 nm, quando excitado em 380 nm, associado aos tetraenos conjugados e uma supressão na intensidade de fluorescência no pico máximo de 337 nm, quando excitado em 315 nm, associado aos tocoferóis.

A exemplo do estudo feito no OGB e buscando entender essas flutuações nas intensidades de fluorescência geramos o gráfico apresentado na Figura 61, Comprimento de Onda de Emissão em 337 nm em função do Comprimento de Onda de Emissão em 450 nm. O resultado aponta para uma supressão na intensidade de fluorescência das amostras de BGB.

O resultado foi coerente com o encontrado no OGB, possivelmente, porque durante o processo de termodegradação acelerada, enquanto diminuem as moléculas dos tocoferóis, aumentam as moléculas dos compostos de degradação associados aos tetraenos conjugados. Esse indício indica que a estabilidade oxidativa do BGB foi alterada.

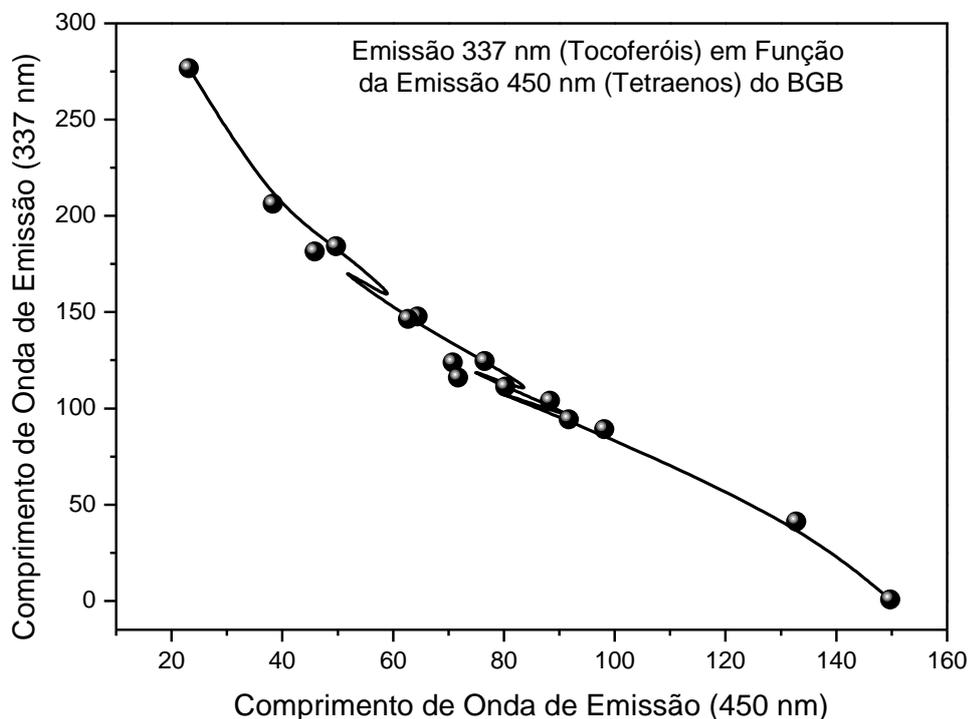


Figura 61. Flutuações nas intensidades de fluorescência (máximo em 354 nm associado aos tocoferóis em função do máximo em 460 nm associado aos tetraenos).

5.3.7 – Caracterização do Óleo do Pinhão-Manso (OPM – Não-Diluído)

Até agora já analisamos o OBG e o BGB não-diluídos. De forma análoga, os estudos se estenderão também ao OPM e BPM não-diluídos. Neste sentido, dos 15 mapas contorno de excitação/emissão em 3D das amostras do OPM termodegradadas gerados, quatro são mostrados na Figura 62, OGB: 0 hora, 9 horas, 24 horas e 48 horas.

A linha que aparece na diagonal é espalhamento de luz referente aos comprimentos de onda nos quais as amostras estão sendo excitadas. Comparando os mapas em 3D, percebe-se que há alteração somente em uma região do espectro após 48 horas de termodegradação.

Isso porque durante o processo de extração do OPM (via solvente) possíveis moléculas emissoras como tocoferóis, carotenoides e, principalmente a Chl, são degradadas. Isso nós mostramos quando comparamos o OGB extraído via prensa com o OGB extraído via solvente (Figuras 44, p.55 e 45, p. 56).

Dentro desse contexto, a região emissora nos mapas de contorno do OPM apresentados está compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 345 nm a 516 nm, emissão entre 383 nm a 593 nm e com pico máximo em torno de 498 nm quando excitado em 435 nm, possivelmente associado aos compostos de degradação térmica, como os tetraenos conjugados.¹⁶ A linha que aparece na diagonal é referente ao espalhamento de luz associado aos comprimentos de onda nos quais as amostras estão sendo excitadas.

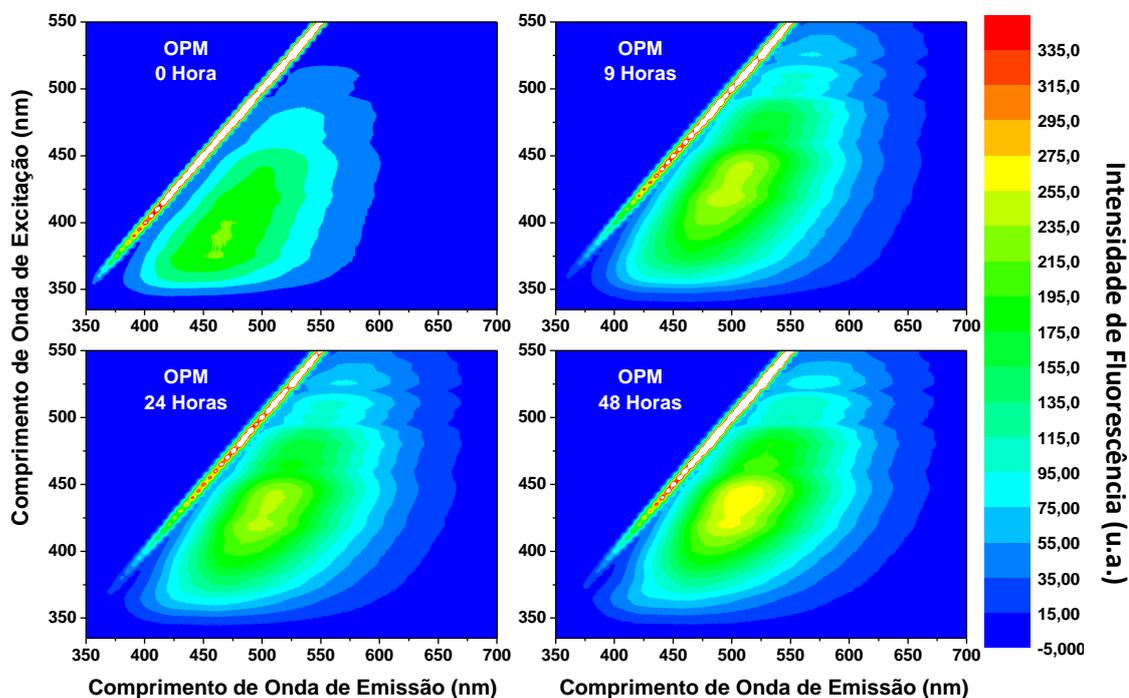


Figura 62. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de Óleo de Pinhão-Manso (OPM) que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

A Figura 63 está associada ao monitoramento da região de emissão atribuída pela literatura como sendo dos tetraenos conjugados. Então, mostra espectros de fluorescência das amostras termodegradadas do OPM e o monitoramento de bandas de emissão compreendidas entre 296 nm e 440 nm e pico máximo em torno de 325 nm quando excitado em 260 nm.

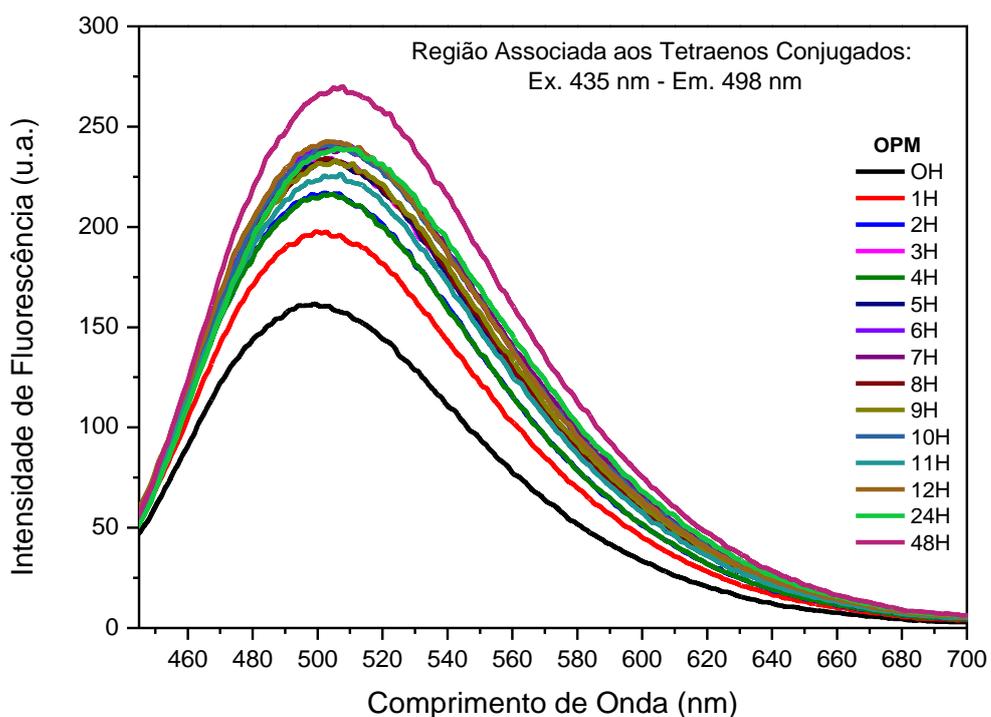


Figura 63. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas não-diluídas do OPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 445 nm e 700 nm e pico máximo em torno de 498 nm quando excitado em 435 nm.

Dessa forma, na Figura 64 tem-se um aumento na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Possivelmente esse aumento deve-se ao aumento dos tetraenos conjugados à medida em os ésteres metílicos linolenatos são degradados. Tal fato aponta para a degradação do OPM.¹⁶

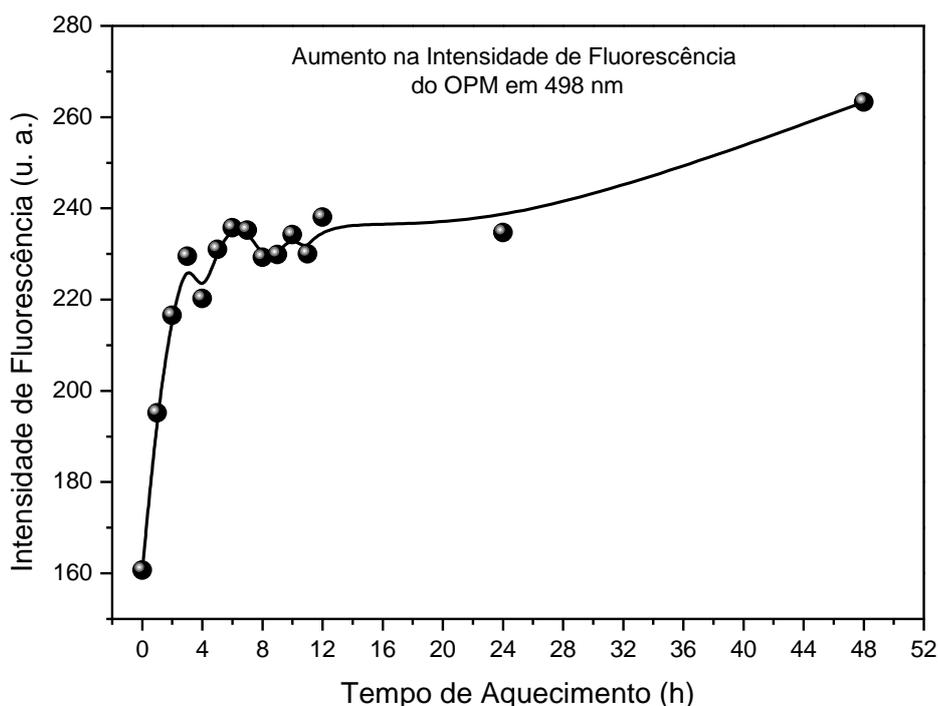


Figura 64. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (498 nm) das amostras de OPM quando excitado em 435 nm.

5.3.8 – Caracterização do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BPM – Não-Diluído)

Analogamente aos mapas de excitação/emissão em 3D do OPM analisados, foram gerados os mapas de excitação/emissão em 3D das amostras termodegradadas não-diluídas do BPM.

Conforme aponta a Figura 65, ocorreu alteração somente em uma região compreendida entre os comprimentos de onda de excitação de 313 nm a 445 nm, emissão entre 356 nm a 570 nm e com pico máximo em torno de 434 nm quando excitado em 365 nm, associado aos tetraenos conjugados.¹⁶ Assim como nos mapas de contorno apresentados anteriormente, a linha que aparece na diagonal é referente ao espalhamento de luz associado aos comprimentos de onda nos quais as amostras estão sendo excitadas.

Quando comparamos os mapas de contorno de excitação/emissão em 3D das amostras termodegradadas e não-diluídas do OPM (Figura 62, p.73) com os mapas do BPM é possível observar que o óleo possui uma região mais abrangente de emissão, apesar de no processo de extração já sofrer uma degradação.

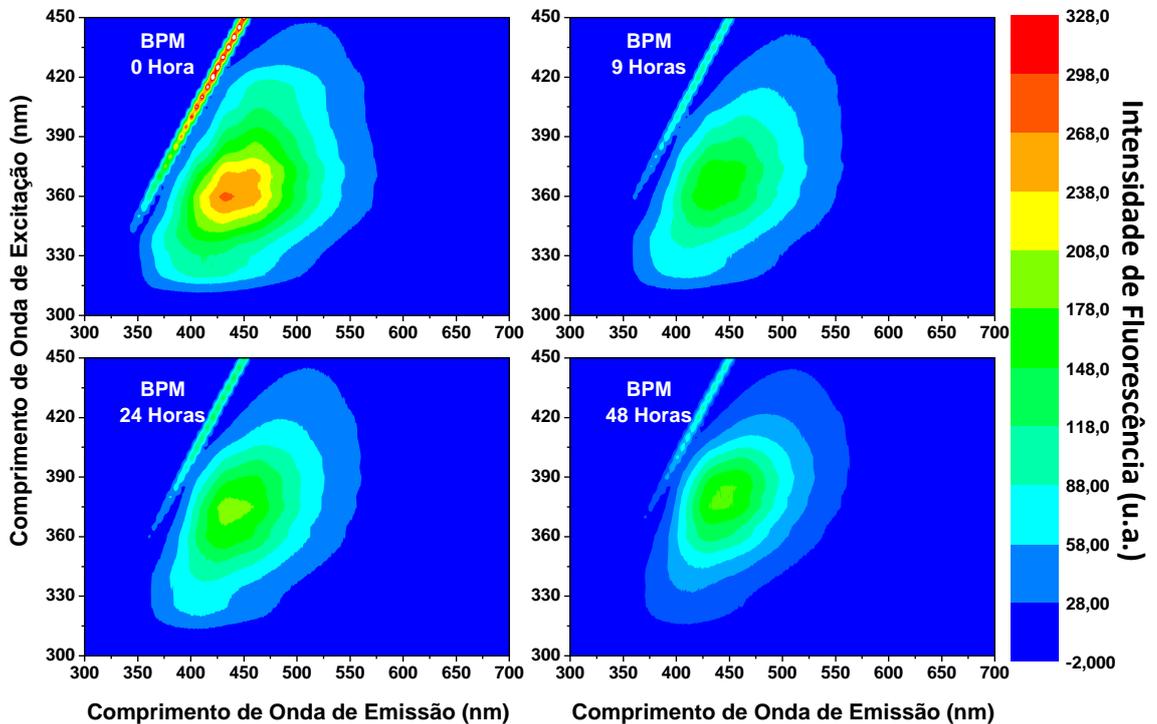


Figura 65. Mapas de contorno de excitação/emissão em 3D de quatro regiões das amostras de BPM diluídas em n-hexano que passaram pelo processo de termodegradação acelerado.

Por outro lado, os mapas de contorno do BPM apresentam uma região mais reduzida de emissão. Isso porque o grau de degradação do biodiesel frente ao óleo é bem maior, pois antes de passar pelo processo de transesterificação, ele necessita passar pelo processo de neutralização sofrendo aquecimento reduzindo a quantidade de possíveis moléculas fluorescentes.

Com o intuito de verificar a alteração na região associada aos tetraenos, obteve-se a Figura 66 que mostra espectros de fluorescência das amostras de BPM termodegradadas e não- diluídas monitoradas nas bandas de emissão compreendidas entre 370 nm e 660 nm e pico máximo em torno de 434 nm quando excitado em 365 nm.

Neste sentido, percebe-se uma diminuição na intensidade de fluorescência à medida que aumenta o tempo de degradação das amostras. Essa supressão na intensidade de fluorescência aponta para a degradação dos tetraenos conjugados que possivelmente passa a formar outros compostos que não fluorescem nessa região. Indicando assim a degradação do BPM.¹⁶

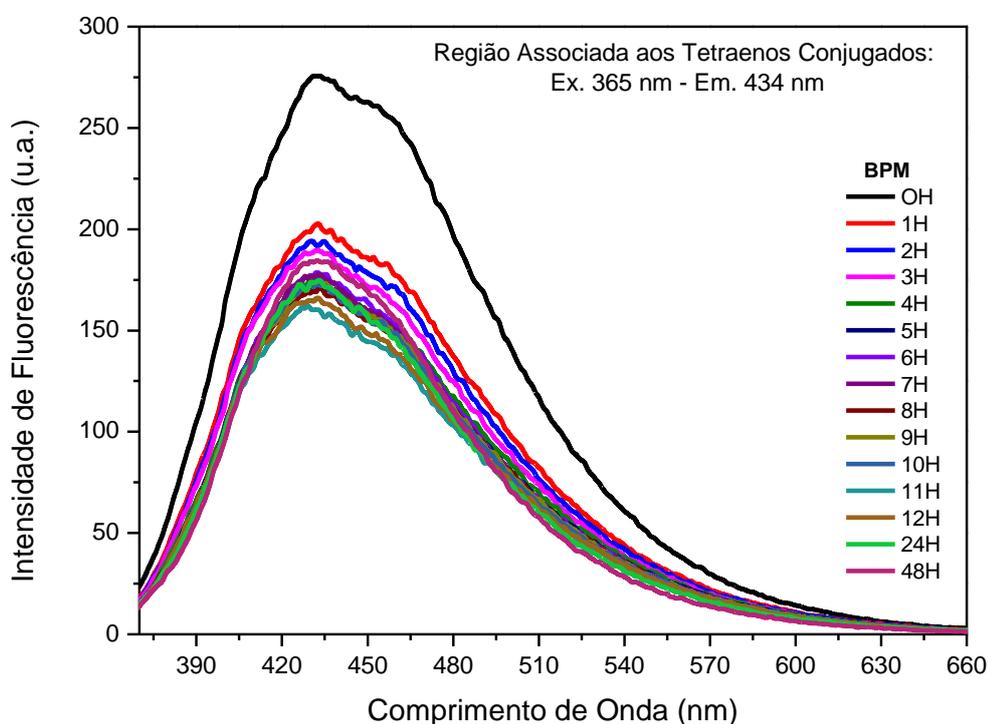


Figura 66. Espectros de fluorescência das amostras termodegradadas não-diluídas do BPM associado aos tetraenos conjugados compreendido entre 370 nm e 660 nm e pico máximo em torno de 434 nm quando excitado em 365 nm.

Analisando os picos de maior intensidade de fluorescência (434 nm) nas amostras de BPM traçamos o gráfico mostrado na Figura 67 e monitoramos a supressão na fluorescência na região de 434 nm quando excitamos as amostras em 365 nm.

Isso resulta em uma diminuição na intensidade de fluorescência na região associada aos tetraenos conjugados a medida que aumenta o tempo de aquecimento. Possivelmente porque os tetraenos conjugados estão se degradando e formando outros compostos. Tal fato indica uma alteração na estabilidade oxidativa do BPM.^{16, 31}

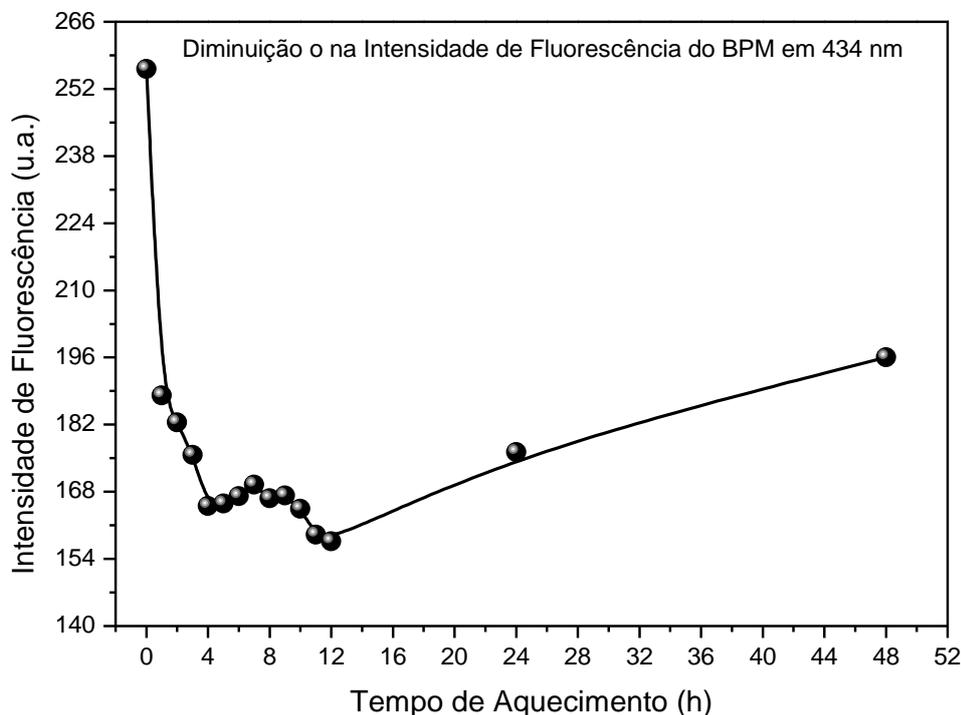


Figura 67. Intensidade x tempo de aquecimento no pico máximo de emissão (434 nm) das amostras de BPM quando excitado em 365 nm.

Observando os resultados apresentados até então em relação às amostras do OPM e do BPM termodegradadas e não-diluídas é possível verificarmos algumas variações nos espectros, bem como nos pontos dos gráficos que mostram a intensidade de fluorescência em função do tempo de aquecimento. Talvez isso esteja relacionado ao grau de degradação apresentado pelo OPM, devido sua extração.

Já o BPM apresenta-se ainda mais degradado, já que até estar purificado e pronto para o estudo, passou por processos de aquecimento e consequentemente importantes moléculas emissoras foram degradadas.

Assim como ocorreu nos resultados de absorção UV-Vis, quando comparamos os resultados de EF dos óleos e biodieséis das oleaginosas, constatamos que o OGB e o BGB apresentaram-se mais estáveis por não formar tetraenos conjugados e nem gerar produtos de segunda degradação tão evidente quanto o OPM e o BPM.

5.4 – ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA POR IMAGEM (EFI)

Utilizando-se a ideia da Patente de Invenção apresentada por Caires e colaboradores¹⁸, foram feitas imagens de fluorescência da Chl nas amostras de OGB e BGB.

Nas amostras de OPM e BPM as medidas não foram feitas porque, como já mostramos anteriormente, o processo de extração de um óleo vegetal via solvente degrada, dentre outros compostos, a Chl. Como o sistema apresentado na Patente de Invenção propõe monitorar o estado de degradação de óleos vegetais e biodiéseis por meio da imagem de fluorescência da Chl, logo torna-se inviável analisar as amostras porque não possuem mais Chl.

Neste contexto, a Figura 68 mostra a imagem de fluorescência (IF) da Chl presente nas amostras de OGB termodegradadas em nove intervalos distintos. É facilmente perceptível a supressão da intensidade de fluorescência da Chl com o passar do tempo de aquecimento indicando sua degradação, principalmente quando comparamos nas 12 primeiras horas.

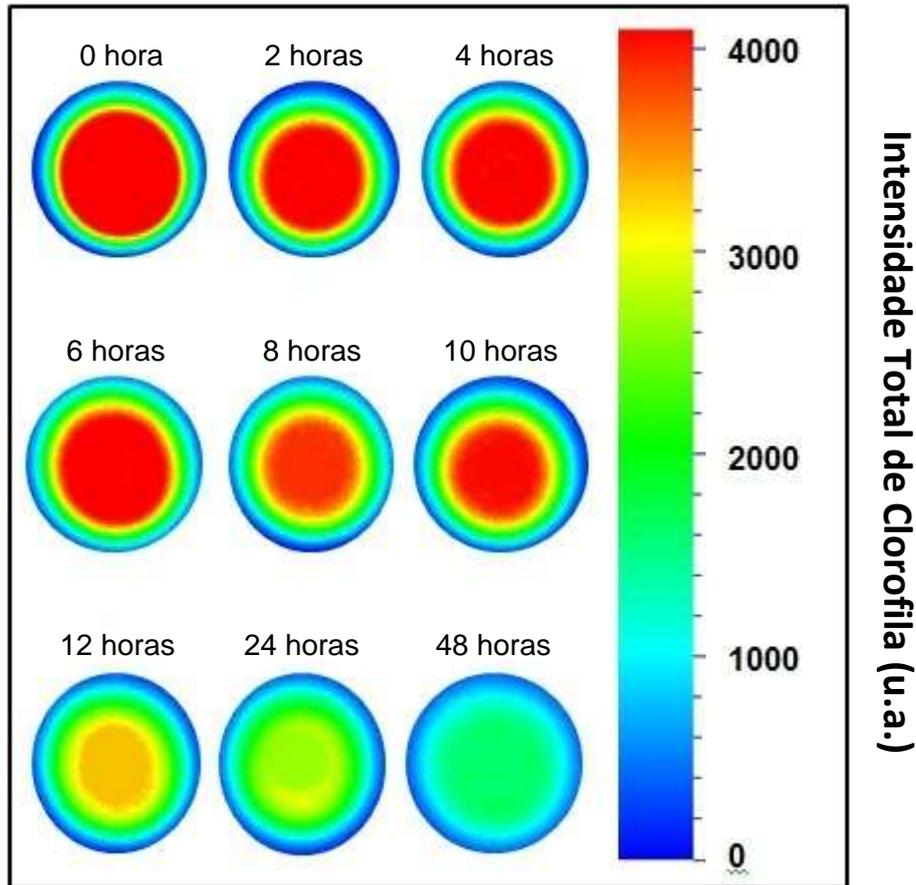


Figura 68. Imagem da fluorescência da Chl do OGB quando excitada com laser de 405 nm do sistema de EFP e gerada pelo sistema Closed FluorCam.

Já a Figura 69 mostra a imagem de fluorescência da Chl das amostras de BGB. Percebe-se uma menor intensidade da cor vermelha quando comparada com a imagem apresentada no OGB. Isso possivelmente ocorre porque o biodiesel passa pelo processo de transesterificação e então a Chl contida nele sofre uma degradação térmica nesse processo e passa a fluorescer menos. Observa-se que após 12 horas de estresse térmico a Chl praticamente deixa de existir no BGB enquanto que no OGB ela ainda está bastante presente.

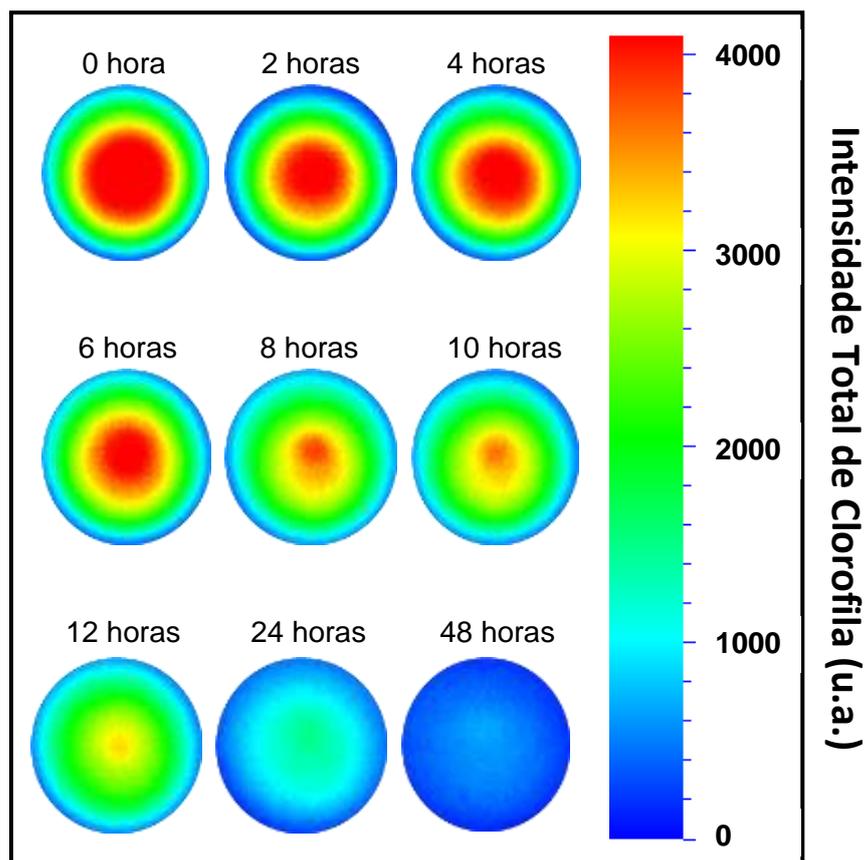


Figura 69. Imagem da fluorescência da Chl do BGB quando excitada com laser de 405 nm do sistema de EFP e gerada pelo sistema Closed FluorCam.

Buscando consolidar de EFI apresentada na Patente de Invenção como uma ferramenta capaz monitorar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis por meio da imagem de fluorescência da Chl e mostrar a supressão na fluorescência da Chl, nós geramos imagens de fluorescência de uma amostra de OGB extraído via prensa, uma amostra de OGB extraído via solvente e uma amostra de BGB. Ambos em 0 hora, ou seja sem passar pelo processo de degradação térmica e sob as mesmas condições e padrões de sensibilidade do equipamento.

A Figura 70 mostra o resultado das imagens de fluorescência associadas à Chl contida em cada amostra. Como podemos observar, é notória a supressão da Chl na amostra de OGB extraído via solvente (Figura 70b) quando comparada com a amostra de OGB extraído via prensa (Figura 70a), simplesmente desapareceu.

O resultado dessa primeira comparação corrobora com os resultados mostrados pela Espectroscopia de Fluorescência (EF) discutidos anteriormente neste trabalho (item 5.3.5, Figuras 42 ,43 e 44, p. 54-56). A supressão praticamente total na fluorescência da Chl está associada a degradação do OGB durante o processo de extração via solvente, como apontaram os resultados.

Agora comparando a amostra do OGB via prensa com o BGB, a supressão também ocorre, todavia de forma mais amena. Esta supressão está associada ao processo de transesterificação que degrada parcialmente a Chl. Esse resultado também corrobora com o que foi apresentado pela EF neste trabalho.

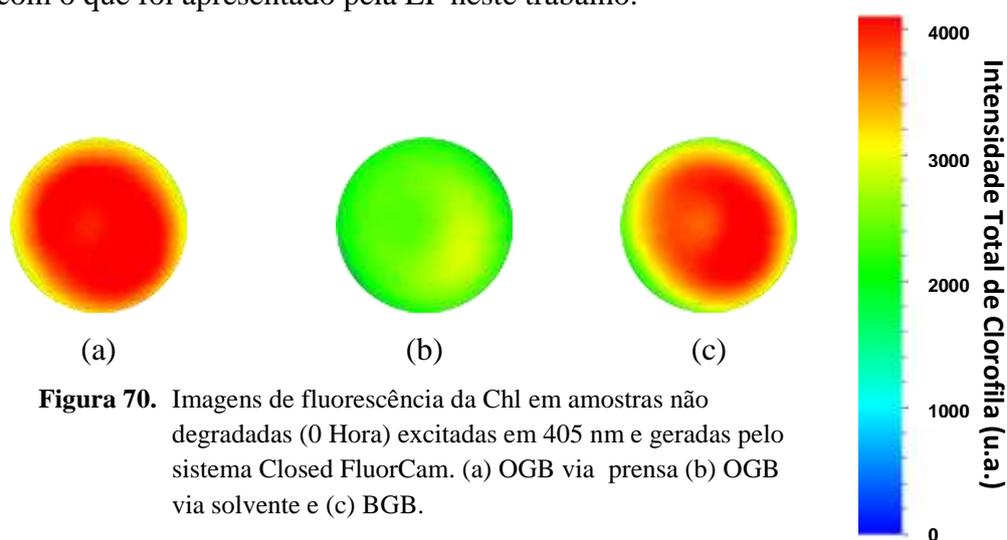


Figura 70. Imagens de fluorescência da Chl em amostras não degradadas (0 Hora) excitadas em 405 nm e geradas pelo sistema Closed FluorCam. (a) OGB via prensa (b) OGB via solvente e (c) BGB.

Diante desses resultados, a EFI apresenta-se como uma ferramenta óptica, sensível e capaz de monitorar a estabilidade térmica de óleos vegetais e biodieseis por meio da imagem de fluorescência da Chl de forma imediata.

5.5 - ÍNDICE DE ACIDEZ (IA)

5.5.1 – Determinação do IA do Óleo do Gergelim Branco (OGB)

O IA é um parâmetro usado para monitorar a estabilidade oxidativa de óleos e biodieseis e o seu aumento pode quantificar o quanto a amostra está degradando.^{31, 37} Assim sendo, utilizando-se o método oficial AOAC 940.28 determinou-se o IA das amostras de OGB e BGB termodegradadas.

A Figura 71 mostra o IA determinado das amostras de OGB extraído via prensa com suas respectivas barras de erro. Em 0 hora apresentou um IA de 0,48 mg KOH.g⁻¹ estando dentro das normas técnicas que exige um IA abaixo de 1% para óleos vegetais não refinados para a síntese de biodiesel. Ainda, nas primeiras 9 horas apresentou um aumento gradativo e mesmo depois de 48 horas com um IA de cerca de 0,80 mg KOH.g⁻¹, ainda permanece dentro das normas exigidas pela ANP.

Isso possivelmente devido ao sesamol, antioxidante natural presente no OGB e que lhe confere alta resistência à estabilidade oxidativa quando comparado com outros óleos vegetais. Por outro lado, o aumento no IA das amostras indica que o OGB sofreu degradação e alteração na sua estabilidade oxidativa, logo gerou um comprometimento na qualidade do OGB.^{11, 32, 37}

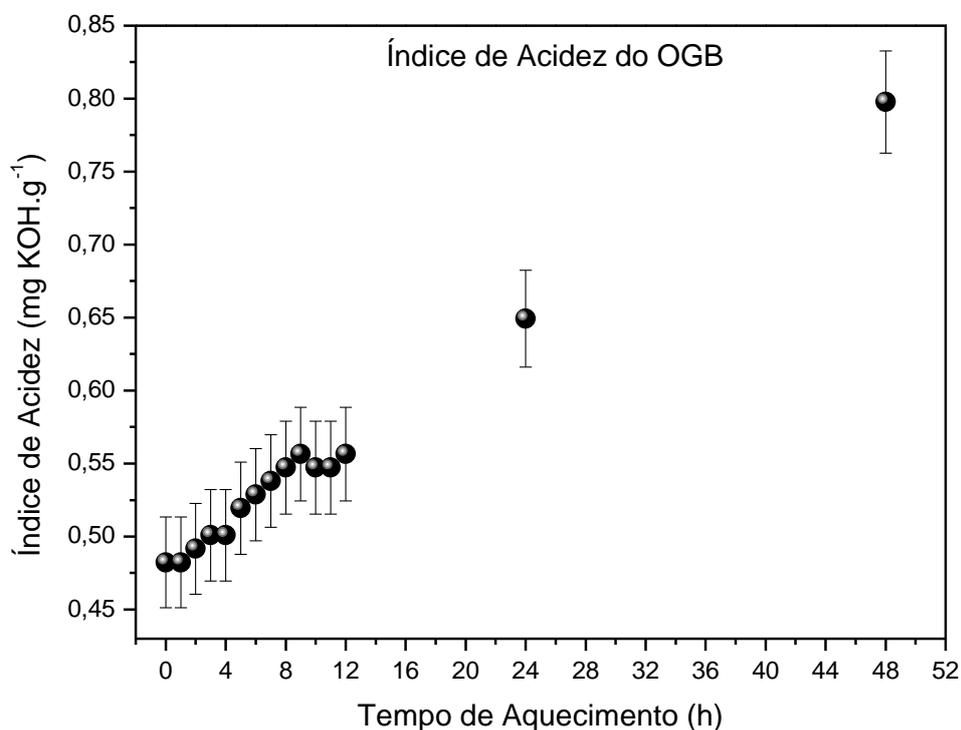


Figura 71. IA das amostras de OGB termodegradadas.

Estimamos percentualmente o aumento do IA no OGB, nas primeiras horas foi em torno de 5% e ao final do processo foi para cerca de 31% quando aumentou o tempo de termodegradação das amostras.

Nos tópicos anteriores fizemos uma discussão a respeito das mudanças físico-químicas sofridas pelo OGB extraído via solvente quando comparado com o OGB extraído via prensa através de técnicas espectroscópicas.

Dentro deste contexto, determinamos o IA do OGB extraído pelas duas metodologias para que pudéssemos fazer uma comparação entre os métodos. O resultado está expresso na Tabela 3.

Logo, comparando o IA do OGB via prensa com o IA do OGB via solvente, observamos que o óleo via prensa apresentou um IA em torno de 0,48 mg KOH.g⁻¹, enquanto que o óleo via solvente apresentou um IA em torno 0,83 mg KOH.g⁻¹. Um aumento em torno de 72,92% em relação ao OGB extraído via prensa.

Ainda assim manteve-se dentro das normas da ANVISA para óleos não-refinados (óleos crus) na qual regulamenta que o IA máximo para óleos nessa categoria seja de 4,0 mg KOH.g⁻¹.⁴⁹

Tabela 3 – Comparação IA do OGB via prensa com o OGB via solvente

IA OGB prensa (mg KOH.g ⁻¹)	IA OGB solvente (mg KOH.g ⁻¹)	Aumento IA (%)
0,48	0,83	72,92

Este resultado indica que durante o processo de extração de um óleo vegetal via solvente ocorre um aumento no IA e conseqüentemente, há uma degradação de seus compostos comprometendo sua estabilidade oxidativa.^{31,32}

A confirmação da degradação térmica de um óleo vegetal pela extração via solvente por meio desta metodologia clássica de análise química corrobora os resultados apresentados pelas metodologias espectroscópicas utilizadas neste trabalho para estudar e caracterizar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis. Isto porque o aumento no índice de acidez está relacionado com a formação de produtos de degradação.

5.5.2 – Determinação do IA do Biodiesel do Óleo do Gergelim Branco (BGB)

Na Figura 72 tem-se o IA das amostras de BGB termodegradadas. De maneira geral, apresenta maior estabilidade e menor IA quando comparado com o OGB. Talvez isso ocorra porque durante o processo de transesterificação possivelmente algumas substâncias que contribuem para o aumento do IA como fosfatídeos, enzimas, proteínas, são eliminadas quando o BGB é purificado. Em 48 horas de estresse térmico o BGB apresentou um IA de cerca de $0,18 \text{ mg KOH.g}^{-1}$, valor que ainda está dentro das normas exigidas pela ANP para o biodiesel que é de, no máximo, $0,50 \text{ mg KOH.g}^{-1}$.^{3, 32}

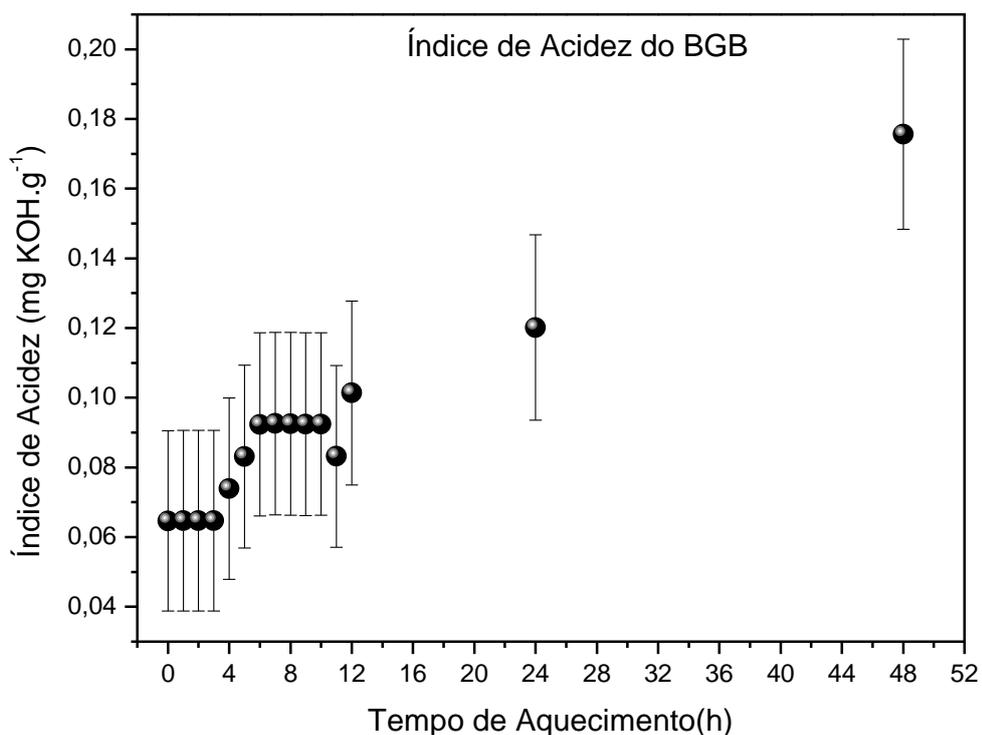


Figura 72. IA das amostras de BGB termodegradadas.

De maneira análoga às amostras de OGB, estimamos o percentual de aumento no IA das amostras de BGB. Nas primeiras 12 horas foi em torno de 3% e ao final do processo foi para cerca de 11% quando aumentou o tempo de termodegradação das amostras.

5.5.3 – Determinação do IA do Óleo do Pinhão-Manso (OPM)

O IA das amostras termodegradadas do OPM extraído via solvente e neutralizado são apresentadas na Figura 73. Em 0 hora apresentou um IA de 1,59 mg KOH.g⁻¹ estando acima das normas técnicas que exige um IA abaixo de 1% para óleos vegetais não refinados para a síntese de biodiesel.

Nas primeiras 10 horas apresentou um aumento gradativo e depois de 48 horas apresentou um alto IA, em torno de 2,0 mg KOH.g⁻¹, portanto fora das normas exigidas pela ANP.

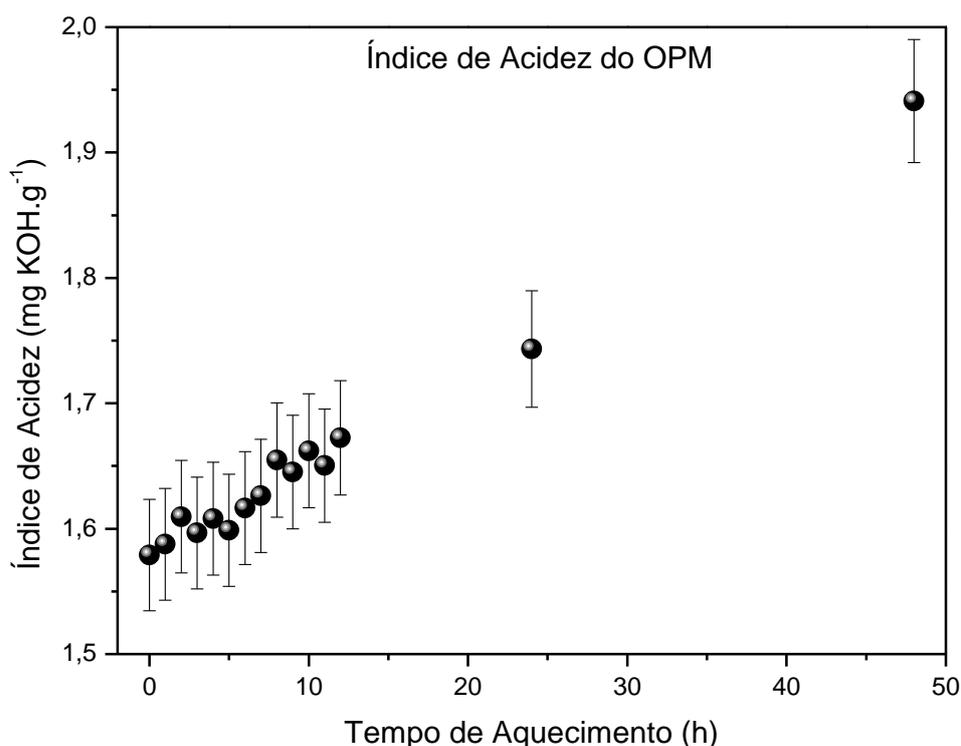


Figura 73. IA das amostras de OPM termodegradadas.

O alto IA apresentado pelo OPM possivelmente está relacionado com o método de extração via solvente, já que um óleo vegetal extraído por esse método sofre degradação térmica e aumenta seu IA, conforme mostraram os resultados da Tabela 3, p.84 associados ao OGB.

Um outro fator intrínseco ao OPM extraído via prensa que o torna altamente ácido, é o fato de possuir em sua composição cerca de 15% de ácidos graxos livres.

Durante a extração via solvente há uma redução desse valor, portanto ainda assim o torna inviável e fora das normas da ANP para a síntese de biodiesel.²⁹

Neste sentido, a síntese do BPM apresentada neste trabalho seguiu a metodologia apresentada por Berchmans e Hirata (2007)²⁹ que primeiramente neutralizou a alta quantidade de ácidos graxos do OPM para depois sintetizar o BPM. Buscando verificar se a técnica diminuiu o IA do OPM para menos de 1%, conforme exigência da ANP, determinamos o IA do OPM antes e depois da neutralização.

O resultado é apresentado na Tabela 4. Antes da neutralização o valor do IA do OPM foi cerca de 1,59 mg KOH.g⁻¹, enquanto que depois da neutralização apresentou um IA em torno 0,23 mg KOH.g⁻¹. Uma redução em torno de 85,53% indicando que a metodologia apresentada pelos autores foi eficiente reduzindo o IA do OPM e deixando-o dentro das normas técnicas.

Tabela 4 – IA do OPM antes e depois da neutralização

IA antes (mg KOH.g ⁻¹)	IA depois(mg KOH.g ⁻¹)	Redução IA (%)
1,59	0,23	85,53

Estimamos o percentual de aumento no IA das amostras do OPM. Nas primeiras horas foi em torno de 11% e ao final do processo foi para cerca de 48% quando aumentou o tempo de termodegradação das amostras.

5.5.4 – Determinação do IA do Biodiesel do Óleo do Pinhão-Manso (BPM)

Para as amostras termodegradadas do BPM o IA é apresentado na Figura 74. O IA em 0 hora foi de aproximadamente 0,10 mg KOH.g⁻¹ estando dentro das normas técnicas que exige um IA no máximo de 0,50 mg KOH.g⁻¹. No final do processo apresentou um IA em torno de 0,18 mg KOH.g⁻¹, ainda dentro das normas da ANP.

O IA do BPM é bem menor e apresenta uma maior estabilidade quando comparado ao IA do OPM. Isso pode ser explicado pelo fato de que para a síntese do biodiesel, o OPM necessita passar pelo processo de neutralização que visa exatamente reduzir o alto IA que o OPM possui.

De forma análoga às amostras de OPM, estimamos o percentual de aumento no IA das amostras de BPM. Nas primeiras 9 horas foi praticamente constante e ao final do

processo foi para cerca de 8% quando aumentou o tempo de termodegradação das amostras.

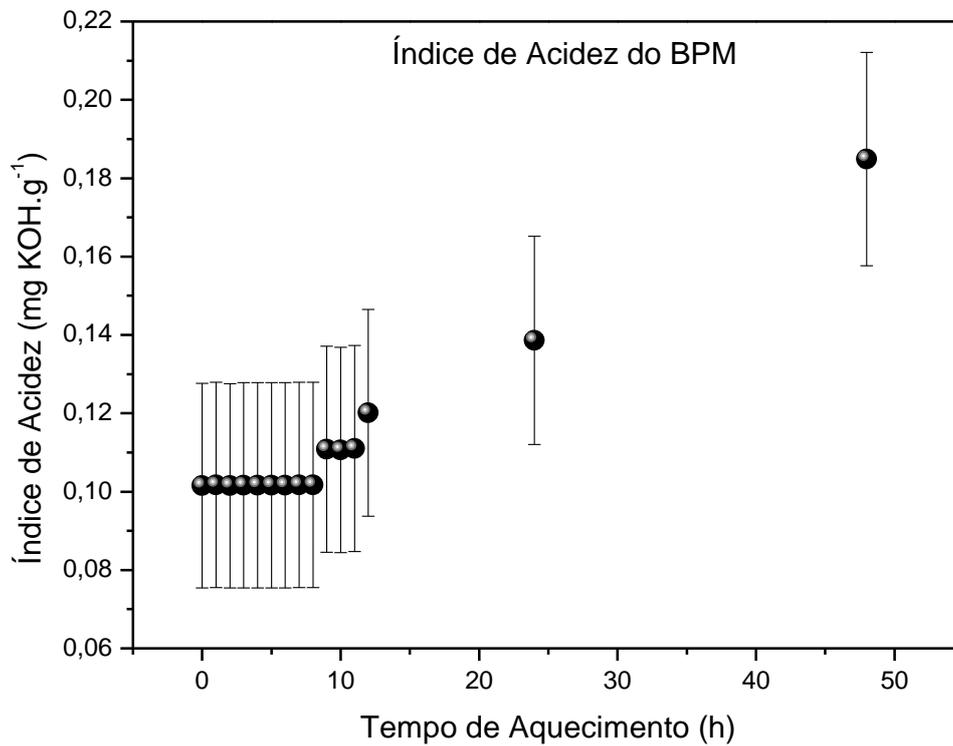


Figura 74. IA das amostras de BPM termodegradadas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO

As técnicas ópticas de espectroscopia de fluorescência utilizadas na caracterização das amostras de OBG, BGB, OPM e BPM mostram-se eficientes, pois possibilitam monitorar as mudanças sofridas na estabilidade oxidativa dos analitos.

Os resultados mostram a sensibilidade e eficácia das técnicas ópticas de FT-IR, UV/Vis, e espectroscopia de fluorescência como ferramentas de monitoramento e avaliação do OGB, BGB, OPM e BPM termodegradados, pois puderam identificar mudanças ocorridas nas amostras submetidas ao estresse térmico e indicar que as amostras estão se degradando à medida que aumenta o tempo de exposição ao calor.

Já a espectroscopia de fluorescência por imagem, apresentada como uma invenção no monitoramento de óleos vegetais e biodieseis por ser uma técnica inovadora, mostra-se eficaz ao monitorar a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e do biodiesel de forma imediata, utilizando pouca quantidade de amostra e por meio da técnica óptica baseada na obtenção de imagem de fluorescência emitida pela Chl.

A análise química realizada através do método clássico de determinação do IA por titulação (AOAC 940.28) mostra que as amostras tornam-se mais ácidas à medida que aumenta o tempo de exposição ao calor. Isso corrobora com os resultados espectroscópicos que apontam para a degradação das amostras de óleos e biodieseis.

Em suma, as técnicas ópticas apresentadas neste trabalho são ferramentas importantes no monitoramento, caracterização e controle da estabilidade oxidativa do óleo vegetal e do biodiesel dada sua alta eficiência, sensibilidade, seletividade e rapidez na apresentação dos resultados. Neste sentido, podem ser utilizadas pelas agências normativas porque são capazes de atender às necessidades e exigências na qualificação e quantificação dos parâmetros necessários para a produção e o comércio de óleos vegetais e biodieseis.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

-
- ¹ Brasil. SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Cartilha Biodiesel. 2007, 64 p. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/agroenergia/acesse/biblioteca/cartilhabiodiesel>. Acesso em 02/08/2013.
 - ² Brasil. PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Inclusão Social e Desenvolvimento Territorial. Cartilha, 2011, 48 p. Disponível em: <http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/nsmail.pdf>. Acesso em: 02/08/2013.
 - ³ Brasil. ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biodiesel. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=60468&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1378132796532>. Acesso em: 02/08/2013.
 - ⁴ MELO, M. A R. Monitoramento da Estabilidade Oxidativa no Armazenamento de Biodiesel Metílico de Soja/Mamona e Blendas em Recipientes de Vidro. 2009. Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
 - ⁵ DANTAS, M. B. Blendas de Biodiesel: Propriedade de Fluxo, Estabilidade Térmica e Oxidativa e Monitoramento Durante Armazenamento. 2010. Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
 - ⁶ CANDEIA, R. A., *et. al.* Thermal and Rheological Behavior of Diesel and Methanol Biodiesel Blends. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 87, no. 3, 653-656, 2007.
 - ⁷ CANDEIA, R. A. Biodiesel de Soja: Síntese, Degradação e Misturas Binárias. 2008. Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
 - ⁸ TAROZO, Rafael. Processo Fotoquímico na degradação de Combustível Fóssil e Biodiesel. 2005. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Química dos recursos Naturais, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
 - ⁹ SCHERER, Marisa Daniele. Caracterização Óptica do Diesel, Biodiesel, Óleo e Suas Misturas: Desenvolvimento de uma Metodologia Alternativa Para a Quantificação do Teor de Biodiesel na Mistura Diesel/Biodiesel. 2011. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
 - ¹⁰ MARTÍNEZ, Marcela L., *et. al.* Effect of Natural And Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Walnut Oil Under Different Storage Conditions . *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 51, 44-50, 2013.

-
- ¹¹ KNOTHE, G. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. JAOCS, Vol. 83, no. 10, 823-833, 2006.
- ¹² KNOTHE, G., *et al.* Manual de Biodiesel. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 340 p., 2006.
- ¹³ SCHERER, M. D., *et al.* Determination of the Biodiesel Content in Diesel/Biodiesel Blends: A Method Based on Fluorescence Spectroscopy. Journal of Fluorescence, Vol. 21, 1177-1182, 2011.
- ¹⁴ CAIRES, A.R.L., LIMA, V.S., OLIVEIRA, S.L. Quantification of Biodiesel Content in Diesel/Biodiesel Blendas by Fluorescence Spectroscopy: Evaluation of The dependence on Biodiesel Feedstock. Renewable Energy. Vol. 46, 137-140, 2012.
- ¹⁵ CHIMENEZ, T.A., *et al.* Fluorescence as an Analytical Tool For Assessing The Conversion of Oil Into Biodiesel. Journal of Fluorescence, Vol. 22, 1177-1182, 2012.
- ¹⁶ MAGALHÃES, K. F., *et al.* Endogenous Fluorescence of Biodiesel and Products Thereof: Investigation of the Molecules Responsible for this Effect. Fuel, Vol. 119, 120-128, 2014.
- ¹⁷ CAIRES, A.R.L., *et al.* The Role of Viscosity in the Fluorescence Behavior of the Diesel/ Biodiesel Blends. Renewable Energy. Vol. 63, 388-391, 2014.
- ¹⁸ CAIRES, A. R. L., *et al.* Patente de Invenção: Processo Para Analisar Degradação do Biodiesel e Óleo Vegetal. INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual Nº BR 1020140138960, 2014, Brasil.
- ¹⁹ SERQUEIRA, D. S. Avaliação da Estabilidade Oxidativa de Misturas Binárias de Biodieseis Metílicos Obtidos a Partir de Óleos de Soja, Algodão, Canola, Girassol, Milho e Residual. 2014. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia.
- ²⁰ MAGALHÃES, Keurison Figueredo. Investigação dos Fluoróforos Presentes no Biodiesel Produzido a Partir de Diferentes Óleos Vegetais. 2012. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- ²¹ EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB). Cultivo do Gergelim. Disponível em: <http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Gergelim/Cultivo do Gergelim/index.html>. Acesso em 06/11/2013. Hora: 10:45.
- ²² FONSECA, Flávia Aparecida. Avaliação da Qualidade e Estudo Cinético de óleo de Gergelim sob Estresse Termoxidativo por Espectroscopia de UV e RMN de H¹ e C¹³. 2011. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

-
- ²³ GUNSTONE, Frank D. Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses. 1 ed. UK: Blackwell Publishing, 3370 p., 2002.
- ²⁴ RANGKADILOK, Nuchanart, *et al.* Variation of Sesamin, Sesamolin and Tocopherols in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Seeds and Oil Products in Thailand. Food Chemistry. Vol. 122, 724-730, 2010.
- ²⁵ LANFER-MARQUEZ, U.M. O Papel da Clorofila na Alimentação Humana: Uma Revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 39, n. 3, p. 227 - 242, 2003.
- ²⁶ DRUMOND, Marcos Antonio, *et al.* Pinhão-manso – *Jatropha curcas* L. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. 15 p., 2008.
- ²⁷ ACHTEN, W. M. J, *et al.* *Jatropha* Bio-diesel Production and Use. Biomass and Bioenergy. Vol. 32, 1063-1084, 2008.
- ²⁸ FONSECA, Flávia Aparecida. Avaliação da Estabilidade Oxidativa do Biodiesel de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) e Suas Misturas ao Diesel. 2010. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.
- ²⁹ BERCHMANS, Hanny Johanes, HIRATA, Shizuko. Biodiesel Production From Crude *Jatropha curcas* L. Seed Oil With a High Content of Free Fatty Acids . Bioresouce Technology. Vol. 99, 1716-1721, 2007.
- ³⁰ BERCHMANS, Hanny Johanes, HIRATA, Shizuko. Chemical Changes of Thermoxidized Virgin Olive Oil Determined by Excitation. Food Research International. Vol. 45, 103-108, 2012.
- ³¹ YAAKOB, Zahira, *et al.* A Review on the Oxidation Stability of Biodiesel. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 35, 136-153, 2014.
- ³² PULLEN, James, SAEED, Khizer. An Overview of Biodiesel Oxidation Stability. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 16, 5924-15950, 2012.
- ³³ HOLLER, F. James, *et al.* Princípios de Análise Instrumental. Porto Alegre: Bookman, 6ª ed., p. 1055. 2009.
- ³⁴ LAKOWICZ, Joseph R.. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Springer, 3ª ed., p.63-65, 2006.
- ³⁵ TENA, N. et al. Chemical Changes of Thermoxidized Virgin Olive Oil Determined by Excitation–Emission Fluorescence Spectroscopy (EEFS). Food Research International, Vol. 45, 103-108, 2012.
- ³⁶ TOMAZZONI, *et al.* Identification of Vegetable Oil or Biodiesel Added to Diesel Using Fluorescence Spectroscopy and Principal Component Analysis. J Am Oil Chem Soc, Vol. 91, 215-227, 2014.

-
- ³⁷ GORBE, Elisa; CALATAYUD, Angeles. Applications of Chlorophyll Fluorescence Technique in Horticultural Research: A Review. *Scientia Horticulturae*, Vol. 138, 24-35, 2012.
- ³⁸ CALATAYUD, Angeles, *et al.* Use of Chlorophyll Fluorescence Imaging as Diagnostic Technique to Predict Compatibility in Melon Graft. *Scientia Horticulturae*, Vol. 149, 13-18, 2013.
- ³⁹ OLIVEIRA, I. P. Estudo da Degradação Térmica de Misturas dos Óleos da Macaúba (*Acrocomia aculeata*) por Espectroscopia Molecular. 2013. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- ⁴⁰ ROHMAN, A., MAN, Y. B. Che. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Analysis of Extra Virgin Olive Oil Adulterated With Palm Oil. *Analytical Methods*, Vol. 43, 886–892, 2010.
- ⁴¹ DANTAS, M. B. *et al.* Evaluation of the Oxidative Stability of Corn Biodiesel. *Fuel*, Vol. 90, 773-778, 2011.
- ⁴² KONSOUOLA, Zoe, KYRIAKIDES, Maria Liakopoulou- . Effect of Endogenous Antioxidants of Sesame Seeds and Sesame Oil to the Thermal Stability of Edible Vegetable Oils . *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 43, 1379-1386, 2010.
- ⁴³ KASHANIAN, Soheila, *et al.* DNA Interaction Studies of Sesamol (3,4-Methylenedioxyphenol) Food Additive. *Mol Biol Rep*, Vol. 40, 1173–1179, 2013.
- ⁴⁴ SALEEM, T. S. Mohamed, *et al.* *In-vitro* Antioxidant Activity of Sesamin Isolated From Sesame Oil. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, Vol. 4, 120–125, 2013.
- ⁴⁵ LIU, Zhigang. *et al.* The Interaction of Sesamol With DNA and Cytotoxicity, Apoptosis, and Localization in HepG2 Cells. *Food Chemistry*, Vol. 141, 289–296, 2013.
- ⁴⁶ SUN, Weihong, XIAO, Ronghui. Determination of Sesamol in Sesame Oil by Anion Exchange Solid Phase Extraction Coupled With HPLC. *Analytical Methods*, Vol. 6, 6432–6436, 2014.
- ⁴⁷ 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*, Vol. 53, 9361–9368, 2005.
- ⁴⁸ TENA, N. *et al.* Chemical Changes of Thermoxidized Virgin Olive Oil Determined by Excitation–Emission Fluorescence Spectroscopy (EEFS). *Food Research International*, Vol. 45, 103-108, 2012.
- ⁴⁹ ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Para Óleos Vegetais, Gorduras e Creme Vegetal. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC_n_270.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 04/08/2013. Hora: 10:30.