

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD

Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia – FACET

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA

Wilson Espindola Passos

**Desenvolvimento de metodologia analítica para
a quantificação de água em etanol: utilização da
Rodamina B como sensor óptico**

Tese de Doutorado

Dourados/MS

Fevereiro/2019

Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD

Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia – FACET

Wilson Espindola Passos

**Desenvolvimento de metodologia analítica para
a quantificação de água em etanol: utilização da
Rodamina B como sensor óptico**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação
Ciências e Tecnologia Ambiental
da Universidade Federal da Grande
Dourados para obtenção do título
de Doutor em Ciência e
Tecnologia Ambiental

Orientador:

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Dourados/MS

Fevereiro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P289d	<p>Passos, Wilson Espindola. Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de água em etanol : utilização da Rodamina B como sensor óptico. / Wilson Espindola Passos. – Dourados, MS : UFGD, 2019.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Quantificação de água em etanol combustível. 2. Rodamina B. 3. Espectroscopia molecular. I. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese de doutorado intitulada: **"Desenvolvimento de metodologia analítica para a quantificação de água em etanol: utilização da Rodamina B como sensor óptico"**, de autoria de **Wilson Espíndola Passos**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

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

Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
Membro Examinador (UFGD)

Prof.ª Dr.ª Rozanna Marques Muzzi
Membro Examinador (UFGD)

Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira
Membro examinador (UFMS)

Prof. Dr. Cícero Rafael Cena da Silva
Membro Examinador (UFMS)

Dourados/MS, 22 de fevereiro de 2019.

Dedicatória

Aos meus pais, Nilson
Lima Passo e Sônia Ferreira
Espindola Passos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à atenção e dedicação do Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires, pela orientação deste trabalho.

Aos professores Magno A.G.Trindade e Bruno S. Marangoni pelo apoio e discussões e análise de dados no trabalho. Também aos membros da banca de qualificação Professor Samuel L. Oliveira e Professor Diego Alves pelas discussões correções e sugestões.

Ao Grupo de Ótica Aplicada da UFGD e ao Grupo de Ótica e Fotônica da UFMS. Pelo suporte para o desenvolvimento da pesquisa, professores e alunos. Ao Professor Hebert Juliano Vieira pelo apoio às medidas de absorção UV-VIS em Dourados-MS

Aos meus amigos e colegas que sempre ajudaram e apoiaram durante este período, Flávio S. Michels, Willian Falco, Alessandra Ramos, Cícera Maria, Juliete Lima, Daniele Pedruzzi, Caroline Fróes.

Aos meus colegas de trabalho da UNIGRAN, em especial ao Luiz M. Carvalho, Giselle S. Souza, Sheyla Cadore, Wgner Klein, Wolmer Sitadini, Andréia Iguma Rubens Di Dio, e todos os professores da engenharia civil e mecânica, pelo apoio incentivo neste período.

A todos meus alunos, que sempre perguntam, mandam mensagens positivas e de incentivo aos estudos.

A equipe de Jiu-Jitsu Soul Fighters que fazem parte da minha rotina diária, são uma família sempre apoiando.

A toda minha família, Meus pais e irmãos que sempre incentivaram aos estudos e a carreira acadêmica.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Epígrafe

Gostaria de viver para estudar e não de estudar para viver.

(Francis Bacon)

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular do etanol [8]	23
Figura 2: Estrutura molecular água [38]	27
Figura 3: Interação entre as moléculas da água e etanol [38]	28
Figura 4: Estrutura molecular da Rodamina B [63]	30
Figura 5:A radiação de potencia incidente P_0 pode ser absorvida pelo analito, resultando em um feixe transmitido de menor potencia radiante P . Para que a absorção ocorra a energia do feixe incidente deve corresponder a uma das diferenças de energia [66].	32
Figura 6:: Radiação com Intensidade inicial P_0 é atenuada por uma solução que contem c mols por litro de solução absorvente em um caminho óptico de b (centímetros) e P é a intensidade da radiação transmitida [65].	35
Figura 7:Esquemas de instrumentos para fotômetros ou espectrofotômetro de UV-Vis. (a) É mostrado um instrumento de feixe único, a radiação passa pelo filtro, ou monocromador, para a célula de referência, ou das amostras, antes de chegar ao fotodetector. (b) É mostrado um instrumento de feixe duplo com feixes separados no espaço, neste caso, a radiação proveniente do filtro ou do monocromador é dividida em dois feixes que passam simultaneamente pelas células de referência e da amostra antes de alcançar dois fotodetectores. (c) Mostra o instrumento de feixe duplo, com feixes separados no tempo, o feixe é enviado alternadamente através das células de referência e da amostra antes de alcançar o fotodetector. Os feixes estão separados por milisegundos enquanto passam alternadamente pelas duas células [63].....	39
Figura 8:Estados eletrônicos do spin das moléculas. (a) é mostrado o estado eletrônico fundamental, onde os spins estão sempre emparelhados. Em (b) e (c) são mostrados os estados eletrônicos excitados, quando emparelhados no estado excitado a molécula está no e excitado a molécula está no estado singleto. Se os spins tornam se desemparelhados a molécula está no estado tripleto [63].....	42
Figura 9: Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente [67].	43

Figura 10: Compostos heterocíclicos simples, piridina, furano, tiofeno e pirrol [63].	46
Figura 11: Anéis benzênicos: quinolina, isoquinolina e indol [71]	47
Figura 12: (a) Espectros de fluorescência tridimensional (b) Gráfico de contorno de fluorescência [66]	53
Figura 13: Componentes de um fluorímetro ou espectrofluorímetro. A fonte de radiação é dividida em dois feixes. O feixe da amostra passa através do seletor de comprimento de onda de excitação em direção da amostra. A fluorescência emitida é isolada pelo seletor de comprimento de onda de emissão antes de atingir o transdutor. O feixe de referência é atenuado antes de atingir o transdutor. Os componentes eletrônicos e o sistema computacional calculam a razão da intensidade de fluorescência para a intensidade do feixe de referencia, que cancela o efeito das flutuações da intensidade da fonte [66].	54
Figura 14: Diagrama esquemático de um fluorímetro de contagem de fóton único [67]	61
Figura 15: Interações de pontes e hidrogênio entre os diferentes grupos funcionais das rodaminas e solventes próticos [85]	64
Figura 16: Estruturas ressonantes dos cromóforos das rodaminas [92]	65
Figura 17: Espectro de absorção UV-vis das misturas água/etanol	73
Figura 18: Intensidade de absorbância em 550 m, em função do teor de água nas blendas água/etanol	73
Figura 19: Reta ajustada entre os valores de absorbância em 550 nm e as blendas água/etanol entre A0 e A10.	74
Figura 20: Deslocamento dos picos de maior intensidade de absorção em função das blendas água/etanol.	75
Figura 21: Reta ajustada, relação entre o deslocamento de banda de absorção e o teor de água presente nas amostras.	76
Figura 22: Mapas de contorno de fluorescência das misturas água/etanol.	77

Figura 23: Espectro de fluorescência das misturas água/etanol, quando excitado em 550 nm.	78
Figura 24: Deslocamento dos picos de maior intensidade de fluorescência em função das blendas água/etanol	79
Figura 25: Reta ajustada, relação entre o deslocamento de banda de absorção e o teor de água presente nas amostras.....	80
Figura 26: Intensidade de fluorescência em função das blendas água/etanol, com comprimento de onda de excitação de 550 nm e emissão de 578 nm.	81
Figura 27: Correlação entre os valores de intensidade de fluorescência e as blendas água/etanol no intervalo de A0 até A10.	81
Figura 28: Deslocamento das bandas de emissão e absorção, das amostras A0, A50 e A100.....	83
Figura 29: Razão entre as intensidades de fluorescência pelas intensidades de absorção das misturas água/etanol, para absorção comprimento de onda de 550nm, para a fluorescência o comprimento de onda de excitação foi de 550 nm e de emissão de 578.	84
Figura 30: Correlação linear entre as razões de fluorescência por absorção, considerando uma variação de 0 a 10% do teor de água presente nas amostras, juntamente com a reta ajustada.....	85
Figura 31: Decaimento dos tempos de vida das misturas água/etanol na presença de rodamina B, com excitação em 370 nm e emissão acima de 400nm.....	86
Figura 32: Tempo de vida médio de fluorescência em função das blendas água/etanol.....	87
Figura 33: Reta ajustada entre os valores de tempo de vida de fluorescência e as blendas água/etanol entre A0 e A15.	87
Figura 34: Retas ajustadas para variação das intensidades ópticas obtidas em função das misturas água/etanol (a) usando absorção UV-Vis. (b) usando a espectroscopia de fluorescência. (c) Usando o tempo de vida de fluorescência.	90
Figura 35: Retas ajustadas entre o comprimentos de onda de maior intensidade em função das misturas água/etanol. (a) comprimento de onda de absorção em função das	

misturas água/etanol (b) Comprimento de onda de emissão em função das misturas água/etanol..... 92

Figura 36: Valor previsto da mistura água/etanol % (g/g). (a) Absorção de UV-VIS (absorbância a 550 nm). (b) intensidade de fluorescência a 576 nm (excitação a 550 nm). (c) tempo de vida médio de emissão de fluorescência superior a 400 nm e excitação 370 nm..... 95

Figura 37: Valor previsto da mistura água/etanol % (g/g). (a) Comprimento de onda de absorção de maior intensidade. (b) Comprimento de onda de emissão de maior intensidade..... 96

Lista de Tabelas

Tabela 1: Efeito da substituição na fluorescência no benzeno [63].....	47
Tabela 2: Parâmetros analíticos	91
Tabela 3: Parâmetros analíticos das curvas de calibração entre comprimento de onda de máxima intensidade e as misturas água/etanol	93
Tabela 4: Resultados obtidos pelo teste de recuperação de amostra usando a absorção UV-Vis	98
Tabela 5: Resultados obtidos pelo teste de recuperação de amostra usando a espectroscopia de fluorescência.....	98
Tabela 6: Resultados obtidos pelo teste de recuperação de amostra usando o tempo de vida de fluorescência	99

Lista de abreviaturas

Pro-álcool	Programa Nacional do Álcool
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UV-Vis	Espectro ultravioleta e visível
HPLC	High performance liquid chromatography
A_x	Mistura água, etanol e rodamina com $x\%$ de água
Água/etanol	Misturas de água etanol e rodamina
R^2	Coefficiente de correlação linear
RdB	Rodamina B
I_A	Intensidade de absorção UV-Vis em função das blendas
I_F	Intensidade de fluorescência em função das blendas
τ	Intensidade do tempo de vida em função das blendas
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
α	Coefficiente angular
β	Coefficiente linear
σ	Desvio padrão
k	Índice Kappa
$(WE)_{pred}$	Valor previsto pelo método “leave-one-out”

I_{opt}	Valor retornado da técnica optica usada, no método “leave-one-out”
λ	Comprimento de onda
$\Delta\lambda$	Deslocamento de banda (diferença entre os comprimentos de onda)

Resumo

Entre os biocombustíveis existentes, o bioetanol tem ganhado destaque por ser usado diretamente nos motores automotivos, apresentando vantagens ambientais e econômicas em relação aos combustíveis de origens fósseis. Todavia, para um bom funcionamento e conservação dos motores é necessário garantir um rigoroso controle de qualidade, exigindo que o etanol combustível atenda algumas especificações técnicas, como por exemplo, não possuir um teor elevado de água em sua composição final. Conseqüentemente, para estabelecer o cumprimento da legislação se faz necessário à existência de técnicas analíticas para monitorar e avaliar a qualidade do combustível. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a potencialidade das técnicas espectroscópicas de absorção molecular, fluorescência no estado estacionário e fluorescência resolvida no tempo no processo de quantificação do teor de água em amostras de etanol. Para tal, foi usado a Rodamina B como uma sonda cromófora e/ou fluorófora para a avaliação das amostras de água/etanol. Para a realização das análises, preparou-se blendas água/etanol possuindo diferentes percentuais de água no etanol na presença da sonda cromófora/fluorófora e foram coletados os espectros de absorção UV-Vis, fluorescência e tempo de vida de emissão. Os resultados demonstraram que os valores de absorbância, intensidade de fluorescência e tempo de vida de fluorescência são linearmente dependentes da porcentagem de água nas blendas no intervalo entre 0 a 10%. Os resultados também revelaram que as três técnicas apresentam limites de detecção com valores $\leq 1,4\%$ (%*massa*) de água nas amostras. Portanto, o presente estudo revela que as técnicas espectroscópicas empregadas podem ser aplicadas como técnicas analíticas para a caracterização e quantificação de água em etanol, apontando a possibilidade do desenvolvimento de dispositivos ópticos simples, compactos e que permitam avaliações *in loco* do combustível.

Palavras chave: Quantificação de água em etanol combustível; Rodamina B; Espectroscopia molecular.

Abstract

Among the existing biofuels, bioethanol has gained prominence because it can be used directly in automobile engines, providing economic and environmental advantages when compared to fuels from fossil sources. For a smooth operation and maintenance of the engines, however, a rigorous quality control must be ensured, requiring that the bioethanol meets certain technical specifications, such as not having a high water content in its final composition. To comply with Brazilian legislation, therefore, analytical techniques must exist to monitor and evaluate the quality of the fuel. Based on that, the present study aimed to evaluate the potential of ultraviolet and visible absorption, steady state fluorescence, and time-resolved fluorescence techniques to determine the water content in ethanol samples. In this context, Rhodamine B was tested as a chromophore and/or fluorophore sensor for evaluating the water/ethanol samples. To perform the analyses, water/ethanol blends were prepared with different percentages of water in ethanol in the presence of the chromophore/fluorophore sensor, and then collecting the UV-Vis absorption, fluorescence and emission lifetime spectra. The results showed that the absorbance, fluorescence and fluorescence lifetime values are linearly dependent on the percentage of water in the blends in the range between 0 to 10%. The results also revealed that the three techniques presented limits of detection values $\leq 1,4$ % (%*mass*) of water in the samples. In summary, the present study reveals that the optical techniques have great potential for characterizing and quantifying the water content in ethanol, indicating the possibility of the development of simple, and compact optical devices that allow the *in loco* evaluation of the fuel.

Keywords: Water quantification, bioethanol; Rhodamine B; Molecular spectroscopy

Sumário

Dedicatoria	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas	ix
Resumo.....	xi
Abstract	xii
1. Introdução	19
2 Objetivos	22
2.1 Objetivos específicos	22
3 Revisão de literatura.....	23
3.1 Etanol	23
3.2 Água	27
3.3 Mistura Etanol-Água.....	28
3.4 Rodamina B.....	29
3.5 Espectroscopia molecular.....	31
3.5.1 Absorção Uv-Vis.....	31
3.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular	40
3.5.3 Tempo de vida de fluorescência.....	55
3.6 Interação Etanol- Água-Rodamina.....	62
3.7 Curva analítica	65
3.9 Validação Cruzada	68
4 Materiais e métodos	70

4.1 Materiais utilizados	70
4.2 Preparo das amostras.....	70
4.3 Medidas de fluorescência	71
4.4 Medidas de absorção UV-vis	71
4.5 Medidas tempo de vida de fluorescência	71
5 Resultados e discussão	72
5.1 Absorção UV-Vis.....	72
5.2 Espectroscopia de fluorescência	76
5.3 Tempo de vida de fluorescência.....	85
5.4 Curvas analíticas	88
5.5 Determinação de água em amostras de etanol contaminadas	97
Conclusões	100
Referências.....	101

1. Introdução

No início do século XX, ocorreram às primeiras ações de introdução do etanol na matriz energética brasileira, no ano de 1925 surgiu à primeira experiência brasileira com etanol combustível, o governo de Getúlio Vargas oficializa uma ação de incentivo para produção de etanol e cria o Instituto do Açúcar e do Alcool – IAA e, pela Lei nº 737 em 1933. Em 1975 com a crise mundial do petróleo o governo brasileiro lançou o Programa Nacional do Alcool (Proálcool), cujo objetivo maior era a redução da dependência nacional em relação ao petróleo importado. Naquele momento, o Brasil importava, aproximadamente, 80% do petróleo consumido, o que correspondia a cerca de 50% da balança comercial. Antes mesmo de ter um apelo ambiental os biocombustíveis tinha objetivo de influenciar na cadeia econômica do país [1].

A definição de etanol combustível atualmente é dada pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), por meio da resolução número 19 de 15 de abril de 2015, sendo: “Biocombustível proveniente do processo fermentativo de biomassa renovável, destinado ao uso em motores à combustão interna, e possui como principal componente o etanol, o qual é especificado sob as formas de Etanol Anidro Combustível e Etanol Hidratado Combustível” [2].

O etanol hidratado é utilizado diretamente nos motores dos veículos sem misturas, já o etanol anidro compõe uma mistura com gasolina. Em 2013 o teor de etanol anidro permitido na gasolina era de 25% (v/v), porém o artigo 9º parágrafo 1º (Art. 9º§ 1º) da lei nº 13.033 de 24 de setembro de 2014, considera elevar o referido percentual até o limite de 27,5% (v/v). No Brasil a principal fonte de matéria prima para produção de ambos é a cana-de-açúcar [3-4].

O consumo de etanol hidratado sofreu uma redução de 6,5% dos anos de 2016 para 2017, tal redução motivada em grande parte pela perda de competitividade em relação à gasolina. Já o etanol anidro acompanhou o aumento o desempenho verificado na gasolina 2,6% para o mesmo período citado. O etanol total (soma de etanol anidro e etanol hidratado) teve queda de 2,4% em 2017 frente a 2016, com uma quantidade de 26,201 bilhões de litros para 25,562 bilhões de litros [5].

O etanol é miscível em água, pois é um composto orgânico que apresenta uma parte hidrofílica e outra parte hidrofóbica. Devido ao fato do etanol possuir uma alta miscibilidade em água, o etanol pode ser facilmente adulterado com a adição de altos

teores de água, causando grandes prejuízos ao consumidor. No etanol anidro é feito uso de corantes que ajudam na identificação da contaminação de água, porém o etanol hidratado não, e forma uma mistura homogênea com a água aumentando a facilidade de adulteração [6]. A adulteração do etanol combustível no Brasil tem sido maior do que a adulteração da gasolina. De acordo com boletins de qualidade emitidos pela ANP, este índice de não conformidade ficou ao redor de 7,0%, enquanto que, para a gasolina, o mesmo índice ficou em 2,9% e, para o diesel, em 1,7%. Essa adulteração consome milhões de reais/ano dos cofres públicos.

A ANP utiliza a titulação volumétrica (NBR 15531) e coulométrica de Karl Fischer (NBR 15888), para determinar o teor de água presente no etanol combustível. A resolução número 19 de 15 de abril de 2015 da ANP define para o etanol hidratado a concentração máxima de água permitida é de 7,5% (m/m). A quantidade em porcentagem de etanol presente no líquido deve ser em torno de 94,6 % (v/v). Para o Etanol Anidro o limite máximo da concentração de água é de 0,7% (m/m), com teor de etanol por volta de 98,0 % (v/v) [2].

As técnicas padrões baseiam-se na titulação de uma amostra de etanol diluída em metanol na presença do reagente de Karl Fischer, este reagente é composto de iodo, dióxido de enxofre, piridina éter monometílico de etilenoglicol. O ponto de viragem da titulação é percebido com a mudança colorimétrica da solução provocada pelo iodo [7]. Na técnica coulométrica uma corrente elétrica libera uma determinada quantidade estequiométrica de iodo, que está contido no reagente Karl Fischer, que é correspondente direta do teor de água presente na amostra [7].

As más execuções dessas técnicas podem provocar alterações nos resultados do teor de água presente no etanol combustível, é sempre recomendada à automação de tais técnicas com o intuito de minimizar os erros sistemáticos. Além disso, por meio desses métodos é difícil fazer um monitoramento em tempo real, pois requer extração, tratamento químico do material [8].

Há algumas metodologias alternativas para determinar a quantificação de água no etanol, principalmente fazendo uso da espectroscopia de infravermelho, espectroscopia Ramam [9; 10]. Existem também outras técnicas que fazem uso da radiação de infravermelho como ultrassônicas, voltametria cíclica e um sensor de fibra óptica que utiliza ressonância de plasma de superfície, tais metodologias alternativas têm ganhado importância. [10-13].

Metodologias envolvendo nanopartículas, como por exemplo, analisar a taxa de mudança de cor e características espectrais de misturas água/etanol na presença de nanopartículas de prata [14]. A espectroscopia de impedância juntamente com a espectroscopia de absorção na região UV [15] são citadas como metodologias alternativas na determinação de água em etanol. Procedimentos envolvendo efeitos fototérmico, também estão sendo explorados com o mesmo intuito [16; 17].

Existem discussões da aplicabilidade de uma linguagem eletrônica baseada em medições de capacitância, essa linguagem consiste em uma série de eletrodos que são interligados e revestem o taque de armazenamento do etanol, para determinar o teor de água em etanol [18]. Tais metodologias alternativas têm ganhado importância

Dentro dessa perspectiva, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias alternativas para quantificar água em amostras de etanol combustível. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de metodologias ópticas para quantificar o teor de água na mistura água/etanol por meio do uso da Rodamina B (RdB) como uma sonda cromófora e/ou fluorófora. Para tal, o comportamento da RdB, como sensor óptico, na mistura água/etanol foi monitorado a partir das técnicas espectroscópicas de fluorescência e absorção UV-Vis.

2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de metodologias alternativas para detecção e quantificação de água em amostras de etanol usando a rodamina B como sensor óptico.

2.1 Objetivos específicos

Preparar amostras constituídas de misturas água/etanol e rodamina B.

Obter os espectros de absorção e emissão das misturas água etanol na presença da rodamina B.

Medir e analisar o tempo de vida de fluorescência das misturas água/etanol e rodamina B.

Determinar as correlações entre as intensidades de sinais ópticos, absorção UV-Vis, fluorescência e tempo de vida de fluorescência em função do teor de água presente nas amostras.

Determinar as curvas analíticas, juntamente com os limites de quantificação e detecção.

3 Revisão de literatura

3.1 Etanol

O etanol ou álcool etílico é uma substância orgânica formada por dois carbonos saturados e um grupamento hidroxila, sua forma molecular é C_2H_5OH , possui ponto de fusão em $-114\text{ }^\circ\text{C}$ e de ebulição em $78\text{ }^\circ\text{C}$. Esse composto orgânico possui varias utilidades desde perfumaria a combustível de veículos [18].

Na estrutura molecular do etanol mostrada na Figura 1, a cadeia carbônica está associada à parte alquílica, sendo formada por carbono e hidrogênio não apresentando polaridade, não há uma diferença significativa na eletronegatividade [19]. A hidroxila por conter oxigênio e que é eletronegativo tende a receber elétrons e formar um ânion, o hidrogênio age como um doador de elétrons, pois possui uma menor eletronegatividade.

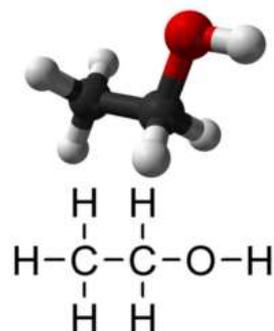


Figura 1: Estrutura molecular do etanol [8]

Nas interações entre as moléculas do etanol temos ligações de hidrogênio provenientes das hidroxilas, que é o tipo de interação intermolecular mais forte. Já as cadeias carbônicas estão mais fracamente ligadas com iterações chamadas de forças de Van der Waals [20-22]. Nas moléculas de etanol as ligações de hidrogênio são responsáveis por um ponto de ebulição em torno de $78\text{ }^\circ\text{C}$, sendo uma temperatura maior do que no metanol que é por volta de $64\text{ }^\circ\text{C}$.

A cadeia carbônica por não possuir polos eletrônicos não é capaz de interagir com moléculas polares, como por exemplo, a água. Já a hidroxila possui um dipolo definido, que possibilita a interação com substâncias polares por meio de ligações ou pontes de

hidrogênio, Assim o etanol tem uma capacidade de se ligar tanto a moléculas polares como a apolares [2; 20].

O etanol produzido de cana-de-açúcar surgiu, no Brasil, basicamente por duas razões: a necessidade de amenizar as sucessivas crises do setor açucareiro e a tentativa de reduzir a dependência do petróleo importado. Nesse sentido, no início do século XX, ocorreram as primeiras ações de introdução do etanol na matriz energética brasileira. Apesar dos aumentos sucessivos do preço internacional do petróleo, o etanol não era economicamente competitivo, exigindo subsídios para sua penetração no mercado nacional. Esses incentivos duraram, basicamente, até o fim do regime militar, em 1984. Durante a segunda metade da década de 80, iniciou-se novo período, sem subsídios, quando o Governo tentou diminuir seu papel no setor. Em 1990, durante o governo Collor, extinguiu-se o IAA e os subsídios à produção de açúcar foram retirados. O Brasil passou a ser um grande exportador de açúcar [23].

No início do século XXI, o Brasil possuía um setor sucroalcooleiro muito forte e competitivo. Isso foi possível graças a constante esforço de garantir o mercado interno do etanol e de ganhar novos mercados de açúcar. Todavia, foi a partir de 2003, com os veículos flex-fuel, que o setor ganhou novo impulso. Com significativa contribuição do etanol, o Brasil logrou alcançar – embora talvez provisoriamente – autonomia quanto a combustíveis líquidos.

Além do mais, devido, por um lado, à impressionante redução de custos de produção do etanol (cerca de 70%) e, por outro, ao aumento do preço internacional do petróleo, tornou-se este biocombustível altamente competitivo em relação à gasolina, tanto no mercado interno, quanto no externo. Bastaria esse cenário para que se tornasse incontornável a expansão da produção do etanol. Aliás, são esses dois fatores, redução dos custos de produção e aumento dos preços internacionais do petróleo, que, por si sós, mobilizaram os inúmeros novos empreendimentos verificados nesses dois últimos anos [24].

O álcool produzido pelo setor sucroalcooleiro do Brasil pode ser classificado em três categorias: o álcool etílico anidro carburante, o etanol hidratado é utilizado diretamente nos carros movidos a álcool ou flex fuel, e o álcool neutro que é utilizado na fabricação de bebidas, cosméticos, produtos químicos e farmacêuticos. O bagaço de cana é utilizado como combustível nas caldeiras das usinas para geração de vapor e para cogeração; bagaço excedente é eventualmente vendido para outras indústrias, também

para ser usado como combustível. Os xaropes são utilizados na indústria de refrigerantes e farmacêuticas; a torta de filtro e a vinhaça são sub-produtos utilizados como fertilizante. O melaço é usado na fabricação de cachaça, rum, levedura e ração. São muitas as utilizações dos subprodutos da produção de açúcar e álcool, porém a viabilidade econômica de alguns ainda é questionada [23-25].

As técnicas de produção de etanol, na antiguidade apenas restrita à fermentação natural ou espontânea de alguns produtos vegetais havendo uma expansão com o domínio da destilação. No Brasil a principal matéria prima para obtenção de etanol é a cana de açúcar, que pode se cultivada durante todos os meses do ano devido à diversidade do solo e do clima [26].

Existe também o etanol de segunda geração obtido por processo de fermentação pelo qual microorganismos (fermentos) convertem açúcar ou amido em etanol. Parte considerável de um vegetal, entretanto, não é nem açúcar, nem amido, mas fibras, que não podem ser digeridas pelos fermentos tradicionais. Para a cana, 2/3 de sua massa é fibra biomassa não fermentável, e muitas plantas quase não detêm açúcar ou amido. Ou seja, dois terços da biomassa, no caso da cana, não são aproveitados para a conversão para etanol [27].

Nestas últimas duas ou três décadas, tentou se desenvolver uma série de tecnologias denominadas “hidrólise”, que permitam converter a fibra (materiais lignocelulósicos) em etanol. Essas tecnologias permitiriam aumentar, em princípio, a produção de etanol de cana, com a mesma área plantada, em 200%, devido ao aproveitamento do bagaço e da palha. Também, em princípio, seria possível aproveitar qualquer cultura ou rejeito vegetal [28-30].

Os EUA possuíam projetos que pretendiam substituir 30% de seu consumo de gasolina por etanol derivado da hidrólise de refugo vegetal e florestal, que, atualmente, são dispostos como lixo. Estas novas tecnologias, entretanto, muito provavelmente não estarão disponíveis para uso comercial antes de dez anos. E, embora possam vir a aumentar a competitividade de outras culturas, certamente não serão suficientes para alcançar o rendimento da cana, que também se beneficiará dessas inovações. Apesar do ceticismo do atual presidente americano ante as evidências empíricas e os estudos contundentes sobre o tema, é inegável a mudança profunda no comportamento mundial, e a busca pelo uso consciente de energia limpa e renovável retrata um movimento sem volta [29-30].

A marca da indústria de cana-de-açúcar é a de superação de ciclos econômicos de altas e baixas. Ao mesmo tempo, os desafios tecnológicos estiveram sempre presentes na história da cadeia produtiva sucroenergética. O pacto histórico assinado por 197 países na 21ª Conferência das Partes (COP-21) da Convenção-Quadro da Organização das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC, na sigla em inglês) estabeleceu um novo marco no enorme desafio de manter o aumento da temperatura global abaixo de 2 °C e combater os efeitos nefastos do aquecimento global [23; 28; 31].

O caso brasileiro ainda é considerado um exemplo de sucesso: as suas fontes renováveis respondem por expressivos 39% da matriz energética nacional. Já os produtos de cana-de-açúcar destacam-se ao representarem cerca de 16% da matriz ou 40% de toda a energia renovável ofertada internamente. Estas cifras são obtidas com a utilização de apenas 0,6% do território nacional para o cultivo da lavoura canavieira destinada ao uso energético [24-25].

Ao contrário de várias nações, o País tem uma posição privilegiada, com a possibilidade de expansão do etanol sem desmatamento, competição na produção de alimentos e desafios estruturais intransponíveis. O etanol produzido no Brasil é uma alternativa econômica viável, com técnica dominada e, mais importante, pronta e disponível para o combate ao aquecimento global de forma imediata [29-32].

O chamado Acordo de Paris, resultado da (COP-21), formalizou um novo pacto internacional em busca de uma resposta global à ameaça das mudanças climáticas. As metas brasileiras apresentadas foram consideradas bastante ambiciosas, prevendo, por exemplo, a participação de 18% de biocombustíveis e 23% de energias renováveis (sem considerar a hidrelétrica) na sua matriz energética até 2030, resultando em um novo perfil de matriz energética nacional, ainda mais sustentável. Estima-se que o Brasil precisará produzir 50 bilhões de litros de etanol combustível em 2030. Atualmente, este volume é de 28 bilhões de litros. Isso demandará a instalação de 75 novas usinas e investimentos na ordem de US\$ 40 bilhões [24; 33].

3.2 Água

Á água é a substância composta mais abundante no planeta Terra, além de ser o elemento fundamental da vida. Por ser encontrada tanto no estado líquido, gasoso ou sólido; na atmosfera, sobre ou sob a superfície terrestre, nos oceanos, mares, rios e lagos [34].

A importância química da água está no seu alto poder de dissolução de gases, corantes, colóides, sais, etc. Este poder químico faz com que a água seja denominada solvente universal. A água é uma substância composta resultante da combinação de dois átomos de hidrogênio e um de oxigênio (H₂O) [34-35].

A água, em seu estado natural mais comum, é um líquido transparente, assumindo a cor azul esverdeada em lugares profundos. Possui uma densidade máxima de 1 g/cm³ a 4 °C e seu calor específico é de 1 cal/°C. No estado sólido, sua densidade diminui até 0,92 g/cm³, mas são conhecidos gelos formados sob pressão que são mais pesados que a água líquida. Suas temperaturas de fusão e ebulição à pressão de uma atmosfera são de 0 e 100 °C, respectivamente, muito superiores às temperaturas de fusão e ebulição de outros compostos parecidos com a água [34-36].

A estrutura da molécula de água possibilita que sejam realizadas diversas interações intermoleculares caracterizadas como ligações de hidrogênio. Esse tipo de interação ocorre tanto na região polar do oxigênio como na do hidrogênio, resultando em um efeito de atração eletrostática mútua entre as moléculas. Portanto, as moléculas de água estão cerca de 15% mais próximas do que se o líquido realizasse apenas interações de Van der Waals, como ocorre nas moléculas de álcool. A capacidade da água em dissolver melhor substâncias polares do que apolares, ocorre até que seja atingido o ponto de saturação da solução formada [37].

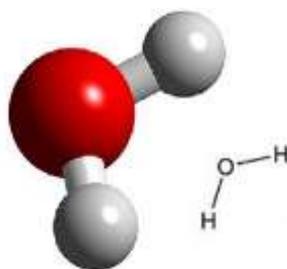


Figura 2: Estrutura molecular água [38]

A água no estado líquido apresenta considerável força de coesão entre as moléculas, resultando em propriedades físicas como ponto de fusão e ebulição, tensão superficial e calor específico diferentes de outros líquidos simples. As características presentes na água são comuns em líquidos iônicos, metálicos ou que são formados por moléculas grandes. Como a molécula de água não tem caráter iônico, não é formada por interação de metais, tampouco é uma molécula grande, essas propriedades são atribuídas às interações intermoleculares (ligações de hidrogênio) que ocorrem entre as moléculas [35-38].

3.3 Mistura Etanol-Água

Muitos compostos não iônicos também são solúveis em água, como por exemplo, o etanol. Esta molécula contém uma ligação polar O-H tal como a água, que permite à molécula fazer ligações intermoleculares [35; 42].

Ligações de hidrogênio são responsáveis pela total miscibilidade do etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) em água [35; 43]. Ao misturar essas duas substâncias, são estabelecidas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e etanol, permitindo a dissolução completa de um líquido no outro, conforme ilustrado na Figura 3:



Figura 3: Interação entre as moléculas da água e etanol [38]

As ligações de hidrogênio entre as moléculas de etanol e água, além de formar os aglomerados de moléculas, proporcionam as soluções propriedades azeotrópicas [35; 38]. Um azeótropo é uma mistura que não pode ter seus componentes separados

completamente por processos como a destilação, pois o vapor formado quando se atinge o ponto de ebulição tem a mesma composição da fase líquida [40-41].

3.4 Rodamina B

A família de compostos orgânicos fluronas é genericamente chamada de rodamina, cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{31}N_2O_3Cl$ são altamente utilizados como, corantes traçadores para determinação de vazão e direção de fluxos de água, aplicações de biotecnologia, manufaturas de cartuchos para impressora jato de tinta, em coloração de pedras preciosas, na produção de produtos têxteis. Assim se mostra com uma vasta gama de aplicabilidade a nível laboratorial e também industrial [42].

Há na literatura também, aplicações ópticas da rodamina: como sonda fluorescente para determinação de Cu^{2+} em membranas celulares, detecção de CO_2 dentro de amostras biológicas, determinação por fluorescência de tiofenóis tóxicos em água no meio ambiente e em células vivas, identificação e determinação de Fe^{3+} em células vivas principalmente em peixes [43-48].

Na agricultura, há trabalhos que mencionam o uso da rodamina como corante marcador para análise de infiltração e transportes de fluidos. Para estudar e avaliar bicos de pulverização de agrotóxicos em na cultura de algodão [49]. É usada também como traçador fluorescente em dispersão superficial de contaminantes e rios e lagoas [50]. Usada para detecção à jusante do vírus da doença infecciosa na avicultura (bursal disease) [51].

As rodaminas também possuem uma vasta aplicação na área da saúde, por exemplo, como sonda luminescente altamente eficiente para monitoramento de ATP em mitocôndrias [52]. Também como uma sonda fluorescente para estudar a imagem de cálcio em neurônios corticais in vivo [53], para a detecção de HOCl em lisossomos [54]. Usada como um fotossensibilizador para terapia fotodinâmica de células cancerígenas [55]. Aplicação em fármaco anticancerígeno, modificando complexos intermoleculares com rodamina B para estudar estabilidade de pH como também citotoxicidade, tais procedimentos feitos com técnicas espectroscópicas [56].

A Rodamina-B é amplamente utilizada com corante em espectroscopia molecular, das suas propriedades óticas mais relevantes tem se o comprimento de onda da radiação

emitida bem definido e alto rendimento quântico. Ela faz parte da classe de corantes chamada de xatenos, possuindo uma estrutura rígida, apresenta alta estabilidade sob vários pH, têm considerável resistência à fotodegradação e também a degradação oxidativa [57].

As Rodaminas são corantes eficientes para laser, chegando até a 50% de eficiência na conversão de energia. São consideradas as famílias mais importantes de materiais para lasers de corante, dentro do espectro eletromagnético elas cobrem grande parte do espectro visível de 540 a 690 nm [57-59].

Os álcoois são os solventes mais utilizados para as rodaminas, assim como água que também é usada como solvente para este corante. Em concentrações nas ordens de 10^{-4} a 10^{-7} , as Rodaminas- B e 6G apresentam dimerização em solução aquosa, isto praticamente não ocorre quando usado solventes álcoois [38-40].

A Figura 4 mostra a estrutura molecular da Rodamina-B, esse composto possui massa molar 479,02 g/mol, A solubilidade em água é ~15 g/L, já em etanol possui uma solubilidade de 70 ~g/L.

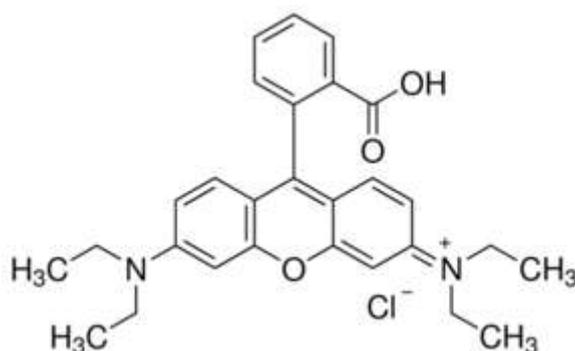


Figura 4: Estrutura molecular da Rodamina B [63]

Uma desvantagem do corante Rodamina-B está na toxicidade, mesmo sendo amplamente usada é confirmada como agente cancerígeno e teratogênico, principalmente para gestantes e crianças. Causa irritação a pele, olhos e também trato respiratório. Deste modo, as metodologias e procedimentos que faz uso deste devem possuir uma acuidade para evitar acidentes [60-61].

3.5 Espectroscopia molecular

A espectroscopia é um termo geral empregado para designar o estudo das interações da radiação eletromagnética com a matéria. Tais interações fornecem informações sobre a matéria. Os espectros de bandas de absorção ou emissão, por exemplo, possuem características únicas para cada molécula. Diversos elementos químicos ao longo da história foram descobertos via técnicas espectroscópicas.

Além de identificação de elementos químicos, as várias técnicas de espectroscopia molecular são amplamente usadas para quantificação de um determinado analito em uma amostra. A situação mais comum é a construção curvas de calibração entre a variação da intensidade do sinal ótico e a concentração do analito, a seguir serão descrita três técnicas espectroscópicas usadas neste trabalho.

3.5.1 Absorção Uv-Vis

A radiação eletromagnética na região espectral do ultravioleta e visível de modo geral pode ser absorvida por moléculas ocorrendo uma transferência de energia necessária para que haja transições nos níveis eletrônicos moleculares. Esse processo está entre os mais importantes no estudo e entendimento da matéria [63].

A absorção dessa radiação gera uma excitação dos elétrons, ou seja, elevando- os de um nível de mais baixa energia para outro nível de maior energia, este que último que é comumente chamado de estado excitado, a Figura 5 esquematiza o processo de interação da radiação com a matéria, assim como os níveis de energia. Estas transições só são possíveis quando a energia fornecida pela radiação (fóton) é exatamente igual à diferença de energia entre os estados eletrônicos da molécula. Esses níveis energéticos são chamados como um todo de orbitais moleculares [62-63].

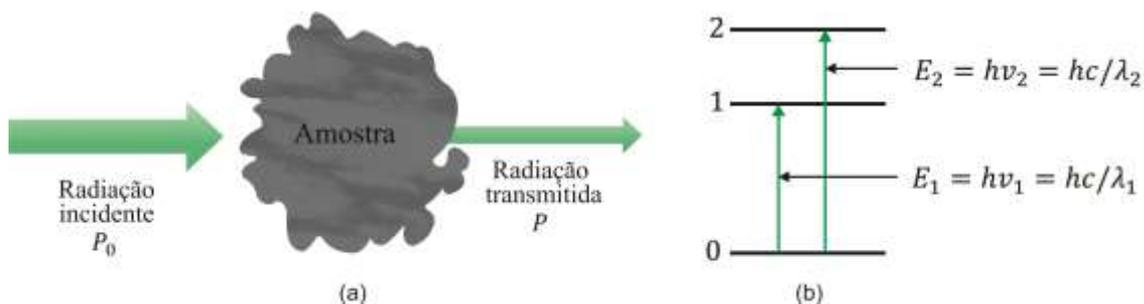


Figura 5: A radiação de potencia incidente P_0 pode ser absorvida pelo analito, resultando em um feixe transmitido de menor potencia radiante P . Para que a absorção ocorra a energia do feixe incidente deve corresponder a uma das diferenças de energia [66].

A absorção de radiação UV-Vis por uma espécie molecular M pode ser considerado um processo dividido em duas etapas, a primeira envolve a excitação eletrônica, como mostra a equação,



Onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, λ é o comprimento de onda e ν é a frequência da radiação. O produto da absorção do fóton $h\nu$ pela espécie M é uma espécie eletronicamente excitada representada por M^* , o tempo de vida da espécie excitada é curto (10^{-8} a 10^{-9} s). Cada um dos processos de relaxação pode levar à desexcitação de M^* , o tipo mais comum envolve conversão da energia de excitação em calor, sendo que,



A relaxação pode ocorrer também via um processo fotoquímico como decomposição de M^* para formação de novas espécies, alternativamente a relaxação pode envolver processos de emissão por fluorescência ou fosforescência. Vale ressaltar que o tempo de vida de M^* é tão pequeno que sua concentração em qualquer instante é desprezível. Além disso, a quantidade de energia térmica liberada pela relaxação é também é muito pequena, dessa maneira, medidas de absorção criam uma perturbação mínima do sistema em estudo, com exceção quando ocorre decomposição fotoquímica.

A absorção da radiação ultravioleta ou visível é geralmente, o resultado da excitação de elétrons de ligação. Assim os comprimentos de onda de bandas de

absorção estão relacionados com os tipos de ligação das moléculas em análise. Por esse fato a espectroscopia de absorção UV-Vis é uma técnica válida para identificação de grupos funcionais em uma molécula. Além da identificação, são importantes também, as aplicações da técnica para determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes [63-64].

Todos os compostos orgânicos são capazes de absorver radiação eletromagnética, pois contêm elétrons de valência que podem ser excitados para níveis de energia superiores. As energias de excitação associadas a elétrons que formam a maior parte das ligações simples são suficientemente altas para que absorção ocorra na região denominada de ultravioleta de vácuo ($\lambda < 185 \text{ nm}$), onde os componentes da atmosfera também absorvem fortemente a radiação. Essas transições envolvem a excitação de elétrons não ligantes n para orbitais σ^* [39].

Devido às dificuldades experimentais associadas com a região do ultravioleta de vácuo, muitas das investigações espectroscópicas de compostos orgânicos envolvem comprimentos de ondas maiores que 185 nm. As aplicações da espectroscopia de absorção UV-Vis baseiam-se nas transições de elétrons n ou π para o estado excitado π^* , sendo que as energias necessárias para esses processos levam as bandas de absorção para a região ultravioleta-visível (200 a 700 nm) [39].

Tanto as transições $n \rightarrow \pi^*$ quanto $\pi \rightarrow \pi^*$ exigem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π . As moléculas que possuem esses grupos funcionais e que são capazes de absorver radiação ultravioleta-visível são chamadas de cromóforas. O espectro eletrônico de moléculas cromóforas geralmente é complexo por que a sobreposição das transições vibracionais às transições eletrônicas leva a uma combinação de linhas sobrepostas [62].

Essa complexidade no espectro dificulta e impossibilita análises teóricas detalhadas, contudo as conclusões qualitativas ou semiquantitativas relativas aos tipos de transições eletrônicas responsáveis por um dado espectro de absorção podem ser determinadas a partir de considerações sobre orbitais.

Os espectros de absorção UV-Vis geralmente são medidos pelo uso de soluções diluídas do analito. Para compostos voláteis, os espectros de fase gasosa são geralmente mais úteis que os espectros de fase líquida ou da solução, os espectros de fase gasosa

são obtidos deixando duas ou três gotas do líquido puro evaporar e entrar em equilíbrio com atmosfera em uma célula fechada [65].

A escolha de um determinado solvente para um estudo, deve se considerar não apenas sua transparência, mas também seus possíveis efeitos no sistema absorventes. De modo geral solventes como água, álcoois, ésteres e cetonas tendem a suprimir as estruturas espectrais finas resultantes de efeitos vibracionais. Além disso, as posições do máximo de absorbância podem ser afetadas pela natureza do solvente. Como regra o mesmo solvente deve ser usado quando os espectros de absorção são comparados para efeito de identificação [64-65].

Um estudo espectroscópico registra qual alteração molecular ocorre, em um estado quântico para outro, ou seja, uma transição espectroscópica provém resultado da absorção da radiação. A interação dos fótons com as moléculas que absorvem radiação provoca uma atenuação da intensidade do feixe. Há absorção quando, a intensidade da radiação emergente é menor que a intensidade da radiação incidente. É definida a grandeza de absorvência que é inversamente proporcional à transmitância, ela é uma medida da quantidade de radiação que foi absorvida pelas moléculas que compõe o analítico [62].

As medidas de absorção molecular são baseadas nessa transmitância T ou na absorbância A de soluções contidas em células transparentes com caminho óptico b (geralmente em cm), o que ocorre com frequência é a concentração de um analito que absorve a radiação está relacionada linearmente com a absorbância, tal relação é chamada de Lei de Beer [62-63]. Define se a transmitância:

$$T = \frac{P_{Solução}}{P_{solvente}} \approx \frac{P}{P_0} \quad (3)$$

$$A = \text{Log} \left(\frac{P_{Solução}}{P_{solvente}} \right) \approx \text{Log} \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

Onde P e P_0 representa a intensidade da radiação após sua passagem através de uma célula contendo soluções de solvente e analito, respectivamente.

A Figura 6 mostra um bloco de matéria absorvente (sólido, líquido ou gás) e um feixe paralelo de radiação monocromática com intensidade P_0 que incide perpendicularmente a superfície do bloco, após percorrer a espessura b do material que contém n átomos, íons ou moléculas absorventes a intensidade da radiação é atenuada para P devido à absorção. Considerando uma seção transversal de com área s e uma espessura infinitesimal dx , onde nesta seção há dn partículas absorventes. Pode se imaginar uma superfície associada a cada partícula na qual ocorrerá captura de fótons, ou seja, se um fóton alcança uma dessas áreas imediatamente ocorrerá sua absorção. Se a área total projetada dessas superfícies de captura dentro desta seção é denominada por ds , logo a razão ds/s , em uma média estatística, representa a probabilidade de captura de fótons dentro de cada seção.

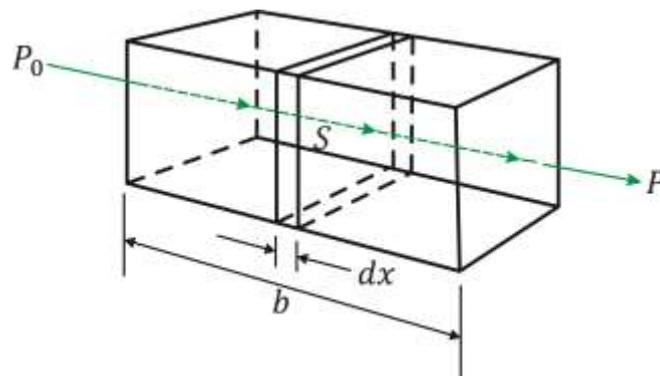


Figura 6:: Radiação com Intensidade inicial P_0 é atenuada por uma solução que contém c mols por litro de solução absorvente em um caminho óptico de b (centímetros) e P é a intensidade da radiação transmitida [65].

A intensidade do feixe que atinge a seção é P_x , é proporcional ao número de fótons por unidade de área, e dP_x , representa a intensidade absorvida dentro de uma seção. A fração absorvida é então, $-dP_x/P_x$, e esta razão também é igual à probabilidade média de captura de fótons, o sinal negativo indica que a intensidade radiante diminui à medida que o feixe passa pela região absorvente, assim,

$$-\frac{dP_x}{P_x} = \frac{ds}{s} \quad (4)$$

Como ds é uma soma das áreas de captura para partículas dentro dessa secção ela deve ser proporcional ao número de partículas, ou seja, $ds = a dn$, onde dn é o número de partículas e a é uma constante de proporcionalidade, que pode ser interpretada como secção transversal de captura, assim tem se a integração no intervalo de 0 a n dada por,

$$-\int_{P_0}^P \frac{dP_x}{P_x} = \int_0^n \frac{a dn}{s} \quad (5)$$

Resolvendo as integrais obtém se,

$$-\ln\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{a n}{s} \quad (6)$$

Convertendo o logaritmo para a base 10 e invertendo a fração tem se,

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{a n}{2,303 s} \quad (7)$$

O n é o numero total de partículas dentro do bloco mostrado na Figura 6, a área da secção transversal s pode ser expressa como a razão do volume V (cm^3) do bloco para seu comprimento b (cm). De maneira que $s = V/b$, fazendo a substituição obtém se,

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{a nb}{2,303 V} \quad (8)$$

Observa se que, n/V é o número de partículas por centímetros cúbicos, ou seja, é a concentração c , convertendo a concentração em mol por litro,

$$c = \frac{n}{V} = \left(\frac{n}{6,02 \times 10^{23}} \text{ mol}\right) \times \left(\frac{1000 \text{ cm}^3 / L}{V \text{ cm}^3}\right) = \frac{1000n}{6,02 \times 10^{23} V} \left(\frac{\text{mol}}{L}\right) \quad (9)$$

Combinando as equações anteriores fica,

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \frac{6,02 \times 10^{23} abc}{2,303 \times 10^3} \quad (10)$$

Usando as constantes como um único termo ε , resulta na representação da lei de Beer, onde, A é a absorvância, ε é a absorvidade molecular ou coeficiente de extinção molar:

$$\log\left(\frac{P}{P_0}\right) = \varepsilon bc = A \quad (11)$$

Há poucas exceções encontradas que fogem da regra geral a qual estabelece que a absorvância esta relacionada linearmente com o caminho óptico, entretanto podem ocorrer desvios da proporcionalidade direta entre a absorvância medida e a concentração quando o caminho óptico é constante. Alguns desvios são chamados de desvios reais, estes representam as limitações reais da lei de Beer, outros resultam da maneira a qual as medidas foram feitas chamados de desvios instrumentais, ou são resultado de mudanças químicas que ocorrem com as variações de concentração, denominados de desvios químicos [63-64].

Desvios da lei de Beer, também podem ocorrer porque a absorvidade depende do índice de refração do meio. Assim se as variações de concentração alteram significativamente o índice de refração de uma solução, desvios da lei de Beer são observados, mas existem algumas correções e métodos que podem ser aplicados dependendo da situação e condições adequadas [62].

De modo geral pode se considerar quatro tipos de instrumentos espectroscópicos, usado na para análises de absorção UV-Vis, de feixe único; de feixe duplo; de feixe duplo espacial; de feixe duplo temporal, todos esses tipos de aparatos experimentais possuem características similares no aspecto da fonte excitadora, porém a forma a qual determina a intensidade da radiação absorvida que difere [63].

O instrumento de feixe único para medidas de absorção é mostrado na Figura 7(a), ele consiste de uma lâmpada de tungstênio ou deutério, um filtro e um monocromador

para seleção do comprimento de onda. Normalmente esses instrumentos requer um estabilizador de voltagem para evitar erros resultantes das mudanças de intensidade do feixe durante o tempo necessário para ajustar à medida de 100%T e determinar a %T para o analito. Os instrumentos variam enormemente em complexidade e características de desempenho.

Os espectrofotômetros baseados em feixe duplo, mostrados na Figura 7(b), esse instrumento de feixe duplo espacial no qual dois feixes são formados no espaço por um espelho em formato V, chamado de divisor de feixe. Um feixe passa através da solução e chega ao fotodetector, o segundo feixe atravessa simultaneamente a amostra em direção a um segundo detector, com características semelhantes ao primeiro. Os dois sinais de saída são amplificados e sua razão é determinada eletronicamente e mostrado no dispositivo de leitura.

A Figura 7(c) ilustra um segundo instrumento de feixe duplo, os feixes são separados no tempo por um disco com setores espelhados que direciona o feixe que vem do monocromador, primeiramente através da célula de referência e depois através da célula da amostra. Os pulsos de radiação são recombinados por outro espelho, que transmite um pulso e reflete o outro para o transdutor, o disco com setores espelhados é acionado por um motor é formado por segmentos em formato de fatias metade as quais são espelhadas e metade são transparentes. A configuração de feixe duplo temporal é geralmente preferida devido a dificuldade de igualar os dois detectores necessários na configuração de feixe duplo espacial [63].

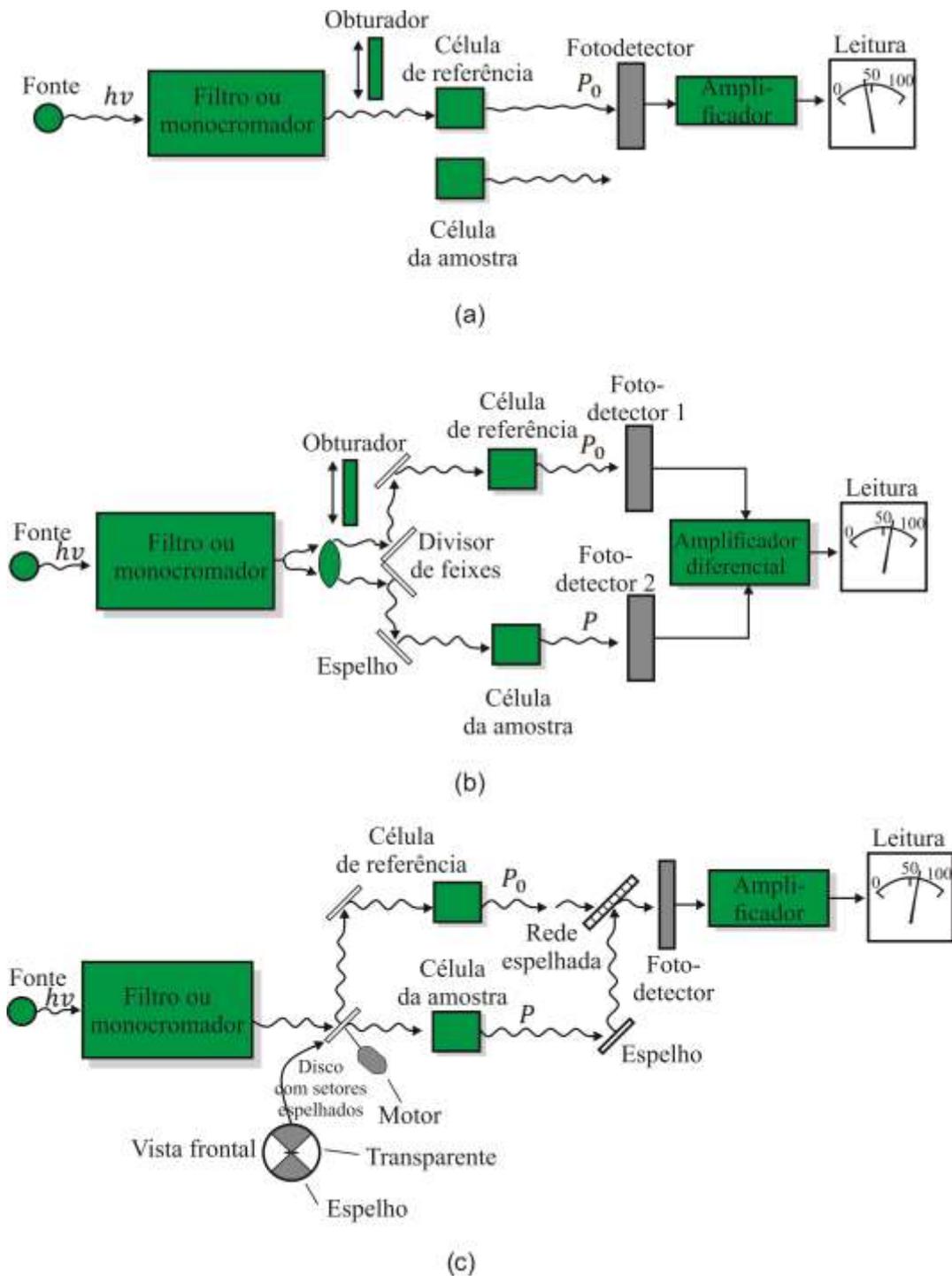


Figura 7: Esquemas de instrumentos para fotômetros ou espectrofotômetro de UV-Vis. (a) É mostrado um instrumento de feixe único, a radiação passa pelo filtro, ou monocromador, para a célula de referência, ou das amostras, antes de chegar ao fotodetector. (b) É mostrado um instrumento de feixe duplo com feixes separados no espaço, neste caso, a radiação proveniente do filtro ou do monocromador é dividida em dois feixes que passam simultaneamente pelas células de referência e da amostra antes de alcançar dois fotodetectores. (c) Mostra o instrumento de feixe duplo, com feixes separados no tempo, o feixe é enviado alternadamente através das células de referência e da amostra antes de alcançar o fotodetector. Os feixes estão separados por milissegundos enquanto passam alternadamente pelas duas células [63].

Os espectrofotômetros de feixe único de varredura computadorizados, operam nas regiões do ultravioleta e do visível, com esses instrumentos, a varredura do comprimento de onda é inicialmente efetuada com a solução de referência na trajetória do feixe. A saída resultante de um transdutor é digitalizada e armazenada na memória de um computador acoplado no sistema, as amostras são então varridas e as absorvâncias calculadas com auxílio de dados da solução de referência armazenados. Em seguida o espectro completo é mostrado poucos segundos depois. Neste trabalho faz uso da espectroscopia molecular de absorção para caracterizar e quantificar o teor de água em misturas de água e etanol na presença da rodamina B.

3.5.2 Espectroscopia de fluorescência molecular

A fotoluminescência é proveniente do decaimento radiativo dos estados moleculares excitados, proveniente da absorção de fótons. Esse fenômeno é classificado de duas maneiras, a primeira denominada fluorescência e a segunda fosforescência a seguir serão feitas explicações sobre a diferença entre os dois fenômenos [66].

A fluorescência difere da fosforescência, pois as transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolvem mudança no spin eletrônico. Assim os estados excitados envolvidos na fluorescência possuem um tempo de vida curto, sendo de aproximadamente $< 10^{-5}s$. Em contra partida, uma mudança no spin eletrônico acompanha a emissão por fosforescência e o tempo de vida dos estados excitados é mais longo, frequentemente na ordem de segundos ou até minutos. Os processos de fotoluminescência ocorrem em comprimentos de onda maiores que os da radiação de excitação [66-67].

Existe também um terceiro tipo de luminescência, chamada de quimiluminescência, ela é baseada na emissão de radiação por uma espécie excitada formada durante uma reação química. Em alguns casos, a espécie excitada é o produto de uma reação entre o analito e um reagente, o resultado é um espectro de emissão característico do produto da reação. O número de métodos fluorimétricos é maior que o número de aplicações dos procedimentos de fosforescência e quimiluminescência [67].

A fluorescência molecular é causada pela irradiação de moléculas em solução ou em fase gasosa, a absorção da radiação promove as moléculas para qualquer um dos níveis vibracionais associados aos estados eletrônicos excitados. No entanto o tempo de vida desses estados vibracionais excitados é sempre na ordem de 10^{-15} que é muito menor que o tempo de vida dos estados eletrônicos excitados. Por tanto em média a relaxação vibracional ocorre antes da relaxação eletrônica. Em consequência a energia da radiação emitida é menor que aquela absorvida por uma quantidade igual à energia de excitação vibracional [63-66].

Assim, a radiação emitida apresenta uma frequência mais baixa, ou um comprimento de onda maior, do que a radiação que excitou a fluorescência. Esse deslocamento do comprimento de onda para frequências menores é denominado de deslocamento de Stokes. A fosforescência ocorre quando uma molécula excitada relaxa a um estado eletrônico excitado metaestável, chamado de estado tripleto, apresentando assim um tempo de vida maior, diferenciando da fluorescência [68].

O princípio de exclusão de Pauli estabelece que, em um átomo dois elétrons quaisquer não podem ter o mesmo valor dos quatro números quânticos. Essa restrição exige que não mais do que dois elétrons possam ocupar um orbital, além disso, os dois devem ter estados de spin opostos, ou seja, os spins estão emparelhados. Devido ao emparelhamento do spin, muitas moléculas não apresentam um campo magnético resultante, elas são denominadas diamagnéticas. Em contra ponto, os radicais livres, que contêm elétrons desemparelhados, têm um momento magnético, são chamados de paramagnéticos [68].

Um estado eletrônico molecular no qual todos os spins eletrônicos estão emparelhados é definido de estado singleto, neste caso, não ocorre nenhum desdobramento dos níveis de energia eletrônicos quando a molécula é exposta a um campo magnético. O estado fundamental para um radical livre é um estado duplete, por que há duas possíveis orientações para o elétron ímpar em um campo magnético, e cada uma fornece energias ligeiramente diferentes ao sistema [68-69].

O estado tripleto é formado quando um dos pares de elétrons de uma molécula é excitado a um nível de energia mais alto. No estado excitado singleto o spin do elétron promovido ainda está emparelhado com o elétron do estado fundamental. No estado tripleto os spins dos dois elétrons tornam se desemparelhados, ou seja, são paralelos. A

Figura 8 mostra os estados onde as setas representam a direção do spin. As propriedades de uma molécula no estado excitado tripleto diferem significativamente daquelas excitadas no estado singleto. O tempo de vida médio de um estado excitado tripleto pode variar de 10^{-4} até vários segundos, enquanto para um estado excitado singleto o tempo de vida médio é de aproximadamente 10^{-8} s [67].

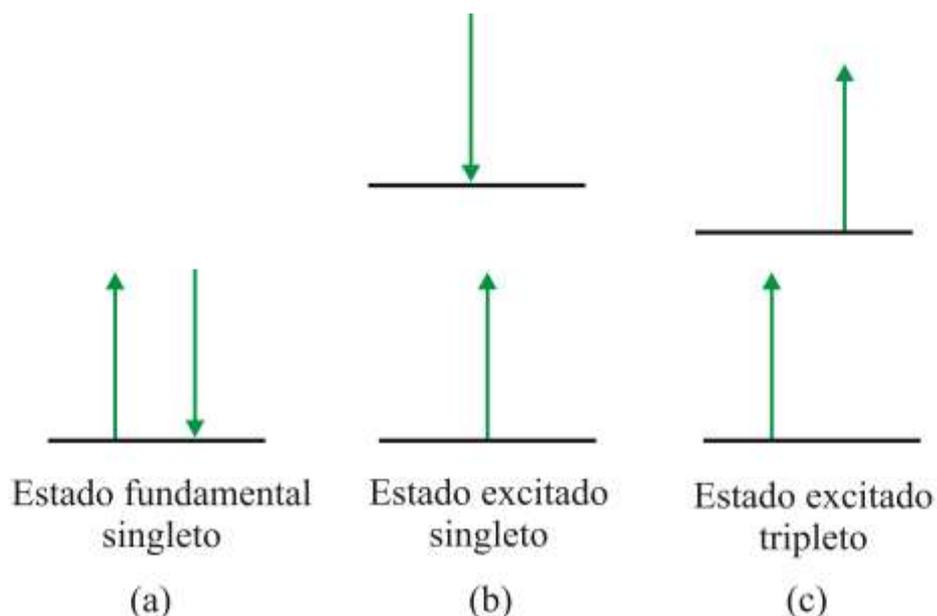


Figura 8: Estados eletrônicos do spin das moléculas. (a) é mostrado o estado eletrônico fundamental, onde os spins estão sempre emparelhados. Em (b) e (c) são mostrados os estados eletrônicos excitados, quando emparelhados no estado excitado a molécula está no e excitado a molécula está no estado singleto. Se os spins tornam se desemparelhados a molécula está no estado tripleto [63].

O diagrama de níveis de energia é chamado de diagrama de Jablonski, ilustrado na Figura 9, a linha horizontal mais espessa na parte inferior do diagrama representa o nível de energia do estado fundamental da molécula, que é o estado singleto representado por S_0 . As linhas da parte superior são os níveis de energia dos estados fundamentais vibracionais de três estados eletrônicos excitados. As duas linhas a esquerda representa o primeiro S_1 eo segundo S_2 estado eletrônico singleto. A linha à direita T_1 representa a energia do primeiro estado eletrônico tripleto [69].

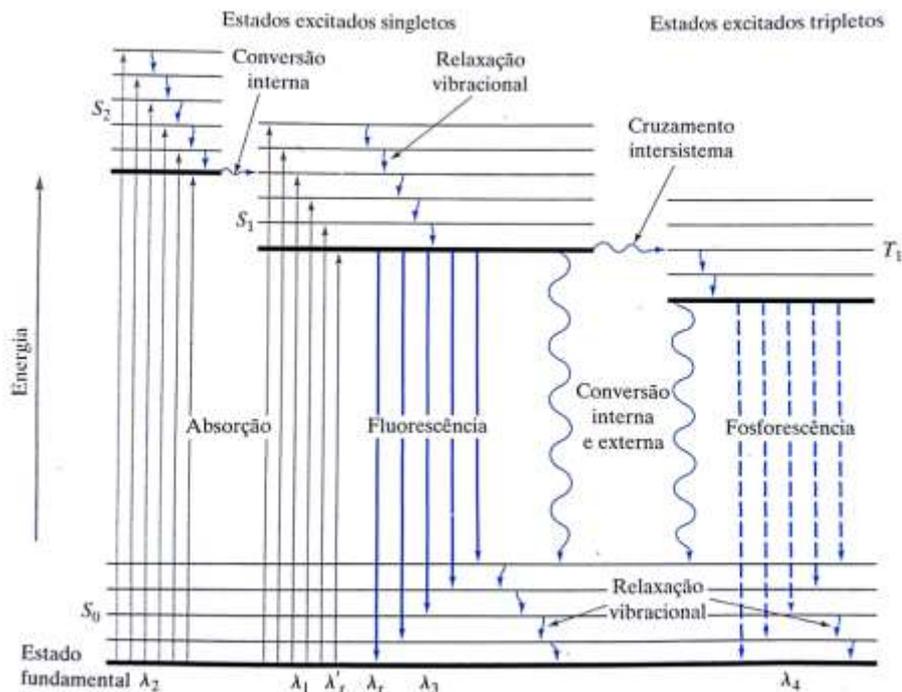


Figura 9: Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente [67].

Os numerosos níveis de energia vibracional estão associados a cada um dos quatro eletrônicos, conforme as linhas horizontais mais estreitas, as transições de absorção podem ocorrer do estado eletrônico fundamental S_0 para vários níveis vibracionais dos estados eletrônicos excitados singletos S_1 e S_2 . É possível notar que a excitação direta para o estado tripleto não é mostrada, uma vez que essa transição envolve uma mudança na multiplicidade e há uma probabilidade muito pequena de sua ocorrência, chama-se de transição proibida [68].

As moléculas excitadas para os estados eletrônicos S_1 e S_2 perdem rapidamente qualquer excesso de energia vibracional e relaxam para o nível vibracional fundamental daquele estado eletrônico, tal processo não-radiante é denominado de relaxação vibracional. As colisões entre as moléculas das espécies excitadas e aquelas do solvente leva a uma rápida transferência de energia com um leve aumento da temperatura do solvente. Uma consequência direta do relaxamento vibracional é o deslocamento de Stokes [68-69].

A conversão interna ilustrada na Figura 9 descreve processos intermoleculares pelos quais uma molécula passa para um estado eletrônico de energia mais baixa sem emissão da radiação. É uma transição entre dois estados de mesma multiplicidade

(singleto-singleto ou tripleto-tripletto), é particularmente eficiente quando dois níveis eletrônicos de energia estão suficientemente próximos para que ocorra superposição nos níveis de energia vibracionais. A conversão interna através dos níveis de energia vibracionais superpostos é geralmente mais provável que a perda de energia por fluorescência, a partir de um estado excitado mais alto.

A desativação de um estado eletrônico excitado pode envolver interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente e outros solutos, tal processo é denominado de conversão externa. A evidência para a conversão externa inclui um forte efeito exercido pelo solvente na intensidade de fluorescência da maioria das espécies. Além disso, as condições que tendem a reduzir o número de colisões entre as partículas (baixa temperatura e alta viscosidade) que levam a um aumento de fluorescência.

O cruzamento intersistema é um processo no qual há uma conversão interna entre estados eletrônicos de diferentes multiplicidades, o processo mais comum é do estado singleto para um estado tripleto, como mostrado na Figura 9. Assim como a conversão interna, a probabilidade de ocorrer o cruzamento intersistema aumenta se os níveis vibracionais dos dois estados se superpõem. A transição singleto-tripletto mostrada na Figura 9 o nível vibracional singleto mais baixo superpõem aos níveis vibracionais tripletos superiores em uma mudança no estado do spin. O cruzamento intersistema é mais comum em moléculas que contém átomos pesados, como por exemplo, o iodo ou bromo [63-67].

Além dos processos de desativação dos estados excitados, deve se avaliar as variáveis que afetam os processos de fluorescência e fosforescência. A estrutura molecular assim como o ambiente químico influencia a ocorrência ou não da luminescência de uma substância, esses fatores determinam a intensidade da emissão quando a luminescência ocorre. É possível definir uma eficiência dessa luminescência.

O rendimento quântico, ou a eficiência quântica, para a fluorescência ou fosforescência, é dado pela razão do número de moléculas que luminescem em relação ao número total de moléculas excitadas [67]. Assim,

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_d} \quad (12)$$

onde os k_x são as velocidades relativas para o processo pelo qual o estado foi excitado singleto mais baixo é desativado. Esses processos são fluorescência k_f , cruzamento intersistema k_i , a conversão externa k_{ec} , a conversão interna k_{ic} , pré-dissociação k_{pd} e a dissociação k_d .

É importante notar que a fluorescência dificilmente é resultado da absorção de radiação ultravioleta de comprimentos de onda menores que 250 nm, pois essa radiação é suficientemente energética para causar desativação dos estados excitados pela pré-dissociação ou dissociação. A maioria das moléculas orgânicas tem pelo menos algumas ligações que podem ser rompidas por energias dessa magnitude. Como consequência, a fluorescência decorrente das transições $\sigma^* \rightarrow \sigma$ raramente observada. Ao contrário, esse tipo de emissão é restrito aos processos menos energéticos $\pi^* \rightarrow \pi$ e $\pi^* \rightarrow n$ [68-70].

Uma molécula eletronicamente excitada normalmente retorna a seu estado excitado mais baixo por uma série de relaxações vibracionais rápidas e conversões internas que não produzem emissão de radiação. Assim a fluorescência origina se geralmente de uma transição do estado vibracional mais baixo do primeiro estado eletrônico excitado para um dos níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental. Dessa maneira, para a maior parte dos compostos fluorescente, a radiação é produzida por uma transição $\pi^* \rightarrow n$ ou $\pi^* \rightarrow \pi$, dependendo de qual das duas é menos energética [68-70].

A maior eficiência quântica referente aos estados π e π^* pode ser associada de duas maneiras, a primeira a absorvidade molar de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ geralmente é 100 a 1000 vezes maior que para um processo $n \rightarrow \pi^*$, e essa quantidade representa uma maior probabilidade de transição. Assim o tempo de vida inerente associado aos estados π, π^* é menor (10^{-7} a 10^{-9}) s, comparado com (10^{-5} a 10^{-7})s para os estados n, π^* . Na fosforescência em geral, o processo ocorre a partir do estado excitado n, π^* , que tende a serem menor assim, menos suscetíveis á desativação que um estado tripleto π e π^* do que para os estados n, π^* , porque a diferença de energia entre os estado singleto e tripleto é maior e o acoplamento spin-órbita é menos provável [68-71].

A fluorescência sofre também influência da estrutura da molécula, a fluorescência de maior intensidade é encontrada em compostos contendo grupos aromáticos funcionais com transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Os compostos contendo estruturas alifáticas e carbonilas alicíclicas ou estruturas de ligação duplas altamente conjugadas também podem

apresentar fluorescência, mas em menor intensidade que nos sistemas aromáticos. A maioria dos hidrocarbonetos aromáticos não-substituídos florescem em solução e a eficiência quântica geralmente aumenta com o número de anéis e seu grau de condensação [66]. Os compostos heterocíclicos simples, ilustrado na Figura 10 não apresentam fluorescência.

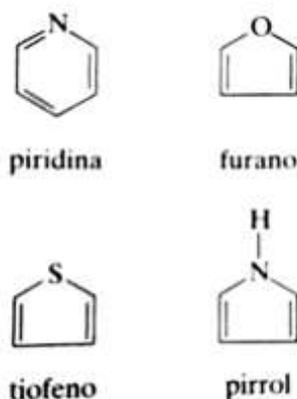


Figura 10: Compostos heterocíclicos simples, piridina, furano, tiofeno e pirrol [63].

Toda via estruturas com anéis condensados geralmente fluorescem. Acredita-se que em compostos heterocíclicos nitrogenados a transição eletrônica de energia mais baixa envolva sistema $n \rightarrow \pi^*$, que é rapidamente convertida em estado tripleto e evita fluorescência. A condensação dos anéis benzênicos a núcleos heterocíclicos, porém resulta em um aumento da absorvidade molar da banda de absorção, assim o tempo de vida de um estado excitado é mais curto para tais estruturas [71].

É observada fluorescência para composto como, mostra quinolina, isoquinolina e indol, mostrados na Figura 11. A substituição no anel benzênico causa deslocamentos nos comprimentos de onda dos máximos de absorção e mudanças correspondentes nos picos de emissão de fluorescência. A substituição também pode afetar a eficiência quântica.

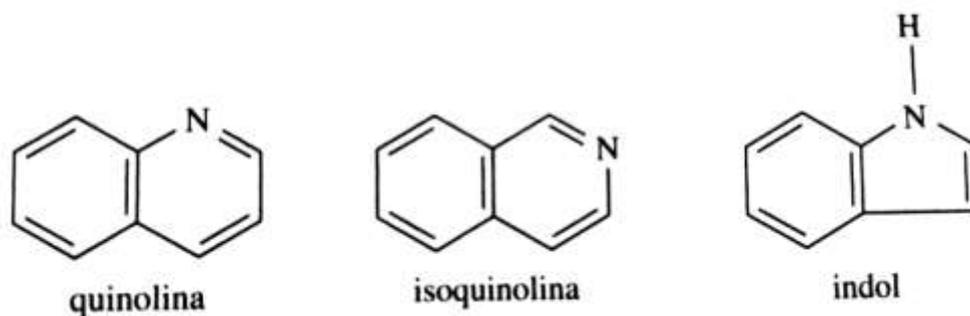


Figura 11: Anéis benzênicos: quinolina, isoquinolina e indol [71]

O efeito da substituição por halogênicos é notável, o decréscimo de fluorescência é observado ao aumentar a massa molar do halogênio como ilustrado pela Tabela -1 é um exemplo do efeito de átomo pesado, que aumenta a probabilidade de cruzamento intersistema para o estado tripleto. Estima-se que a pré-dissociação desempenha papel importante no iodobenzeno e também em derivados nitrogenados, uma vez que esses compostos possuem ligação de fácil ruptura, que podem absorver a energia de excitação em seguida à conversão interna.

Tabela 1: Efeito da substituição na fluorescência no benzeno [63].

Composto	Fórmula	Comprimento de onda Da fluorescência, <i>m</i>	Intensidade relativa da fluorescência
Benzeno	C_6H_6	270 – 310	10
Tolueno	$C_6H_5CH_3$	270 – 320	17
Propilbenzeno	$C_6H_5C_3H_7$	270 – 320	17
Fluorobenzeno	C_6H_5F	270 – 320	10
Clorobenzeno	C_6H_5Cl	275 – 345	7
Bromobenzeno	C_6H_5Br	290 – 380	5
Iodobenzeno	C_6H_5I	—	0
Fenol	C_6H_5OH	285 – 365	18
Íon fenolato	$C_6H_5O^-$	310 – 400	10
Anisol	$C_6H_5OCH_3$	285 – 345	20
Anilina	$C_6H_5NH_2$	310 – 405	20
Íon anilínio	$C_6H_5NH_3^+$	—	0
Ácido benzóico	C_6H_5COOH	310 – 390	3
Benzonitrila	C_6H_5CN	280 – 360	20
Nitrobenzeno	$C_6H_5NO_2$	—	0

A substituição de um grupo carboxílico ou carbonílico em um anel aromático geralmente inibe a fluorescência. Nesses compostos, a energia de transição $n \rightarrow \pi^*$ é menor que a energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Assim tem-se que o rendimento de fluorescência nos sistemas $n \rightarrow \pi^*$ é geralmente mais baixo.

A fluorescência também é favorecida em moléculas com estruturas rígidas, o efeito da rigidez também já mencionando para explicar o aumento na fluorescência de alguns agentes quelantes orgânicos, que são cátions metálicos se ligam a substâncias que possuem dois ou mais grupos doadores de pares de elétrons (grupos contendo pares isolados de elétrons), de tal maneira que se forma uma ou mais estruturas em anel. Quando complexados com íons metálicos. A falta de rigidez em uma molécula pode causar o aumento da velocidade de conversão interna consequentemente um aumento na facilidade de desativação não radioativa. Uma parte da molécula não rígida pode sofrer vibrações de baixa frequência em relação a outras partes, tais movimentos indubitavelmente podem gerar uma perda de energia [67-70].

A temperatura é uma variável que pode influenciar na fluorescência, a eficiência quântica da fluorescência na maioria das vezes diminui com o aumento da temperatura, porque aumenta a frequência de colisões, em temperaturas mais elevadas tem-se uma maior probabilidade da desativação por conversão externa. Um decréscimo na viscosidade do solvente também aumenta a facilidade de conversão externa [63-66].

Outro aspecto que deve ser mencionado a respeito da fluorescência é que para um composto aromático com anéis substituído ácidos ou básicos o pH altera as intensidades da fluorescência. Tanto o comprimento de onda quanto a intensidade de emissão serão possivelmente diferentes para formas protonadas e desprotonadas. Tais mudanças na emissão de compostos desse tipo resultam da diferença no número de espécies de ressonância que estão associadas às formas ácidas e básicas das moléculas. Uma aplicação deste efeito é usada para detecção do ponto final em titulação ácido-base [67].

Existem ainda efeitos da concentração do analito na intensidade de fluorescência, a potência de emissão de fluorescência (F) é proporcional à potência radiante do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema, assim:

$$F = \phi_F K''(P_0 - P) = K'(P_0 - P) \quad (13)$$

Onde P_0 é a potência do feixe incidente na solução, P é sua potência após atravessar uma distância b do meio, ϕ_F é a eficiência quântica do processo de fluorescência e K'' é convertido em uma nova constante. Para relacionar F com a concentração c das espécies fluorescentes, temos a lei de Beer na forma:

$$\frac{P}{P_0} = 10^{-\varepsilon bc} \quad (14)$$

Onde ε é a absortividade molar das moléculas fluorescentes e εbc é a absorbância A . Fazendo as manipulações algébricas obtém se:

$$F = K'P_0(1 - 10^{\varepsilon bc}) \quad (15)$$

O termo da exponencial pode ser expandindo usando uma série Maclaurin de modo que,

$$F = K'P_0 \left[2,303\varepsilon bc - \left(\frac{(2,303\varepsilon bc)^2}{2!} \right) + \left(\frac{(2,303\varepsilon bc)^3}{3!} \right) + \dots \right] \quad (16)$$

Considerando que $2,303 \varepsilon bc = A < 0,005$, todos os termos entre parênteses são pequenos quando comparados com o primeiro termo, assim o erro relativo máximo causado por desprezar todos os termos, exceto o primeiro é (0,13%) [65]. De maneira que é possível escrever,

$$F = 2,303K'\varepsilon bcP_0 \quad (17)$$

ou, com P_0 constante,

$$F = Kc = 2,303K'P_0 = 2,303\phi_F K'' \epsilon bc P_0 \quad (18)$$

Com isso, o gráfico da intensidade de fluorescência radiante de uma solução em função da concentração das espécies emitidas deve ser linear para baixas concentrações. Quando c torna se suficientemente grande de forma que a absorbância é maior que 0,005, os termos de ordens superiores da equação (18) tornam se relevantes e a linearidade é perdida. F é determinada por extrapolação da reta do gráfico, essa absorção excessiva é denominada como absorção primária [65-66].

Outro fator responsável pelos desvios negativos da linearidade em altas concentrações é a absorção secundária, esta ocorre quando o comprimento de onda da emissão superpõe uma banda de absorção. A fluorescência sofre uma diminuição á medida que a emissão atravessa a solução é reabsorvida por outras moléculas na solução. A absorção secundária pode ser uma absorção pelo próprio analito ou por outras espécies em solução. Esses efeitos da absorção são nomeados de “efeitos de filtro interno” [67].

Além dos efeitos da concentração em relação à intensidade de fluorescência, pode mencionar também os efeitos da supressão. Tal termo refere se à energia não radiativa transferida das espécies excitadas para outras moléculas. A supressão dinâmica necessita do contato entre as espécies excitadas e o agente supressor (Q). A supressão ocorre tão rapidamente quanto as espécies que sofrem colisão podem difundir juntas, a velocidade depende da temperatura e da viscosidade [67-68].

A concentração do supressor deve ser suficientemente alta para que haja probabilidade de colisão entre as espécies excitadas e o supressor durante o tempo de vida do estado excitado. Para a conversão externa controlada pela supressão dinâmica com um único supressor, tem se que a constante de velocidade de conversão externa é na forma:

$$k_{ec} = k_q[Q] \quad (19)$$

Onde k_q é constante de velocidade para supressão e $[Q]$ é a concentração do supressor. Na ausência de supressão ($k_{ec} = 0$) e quando a pré-dissociação e a dissociação estão ausentes ($k_{pd} = k_d = 0$), a eficiência quântica pode ser escrita como,

$$\phi_F^0 = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ic}} \quad (20)$$

Quando considera se a supressão tem se:

$$\phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ic} + k_q[Q]} \quad (21)$$

Assim, realizando a razão entre as duas relações da eficiência quântica obtêm se a constante a equação de Ster-Vomer,

$$\frac{\phi_F^0}{\phi_F} = 1 + k_q[Q] \quad (22)$$

Onde K_q é a constante de supressão de Stern-Volmer, sendo definida por $K_q = k_q/(k_f + k_i + k_{ic})$. Manipulando a equação chega se,

$$\frac{1}{\phi_F} = \frac{1}{\phi_F^0} + \frac{K_q[Q]}{\phi_F^0} \quad (23)$$

A representação gráfica de $(1/\phi_F)$ em função de $[Q]$ deverá ser uma reta com inclinação proporcional de (K_q/ϕ_F^0) e um intercepto em $(1/\phi_F^0)$. A constante de Stern-

Volmer pode ser obtida a partir da razão do coeficiente angular pelo coeficiente linear. A supressão dinâmica reduz tanto a eficiência quântica de fluorescência como o tempo de vida de fluorescência. Como a emissão de fluorescência é diretamente proporcional à eficiência quântica, pode se escrever a equação de Stern-Volmer [67] em termos sinais medidos,

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q[Q] \quad (24)$$

Onde F_0 e F são os sinais de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente. De modo que a constante de Stern-Volmer é a inclinação do gráfico de (F_0/F) por $[Q]$. Na supressão estática, o supressor e o fluoróforo no estado fundamental formam um complexo chamado de complexo escuro, neste caso o decréscimo na intensidade de fluorescência também pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer. Porém K_q será uma constante de formação do complexo fluoróforo, vale ressaltar que a supressão estática não afeta o tempo de vida de fluorescência [69].

Os espectros de emissão de um determinado composto podem ser representados graficamente de algumas maneiras, pode se fixar um comprimento de onda de excitação enquanto é feito o registro da intensidade de emissão em função do comprimento de onda [72]. Outra maneira de representa o espectro é tridimensionalmente ou também com um gráfico de contorno A Figura 12 ilustra ambos os casos. Ambos mostram o sinal de fluorescência em função dos comprimentos de onda de excitação e dos comprimentos de onda de emissão, simultaneamente. É comum chamar esses dados de matriz de excitação-emissão.

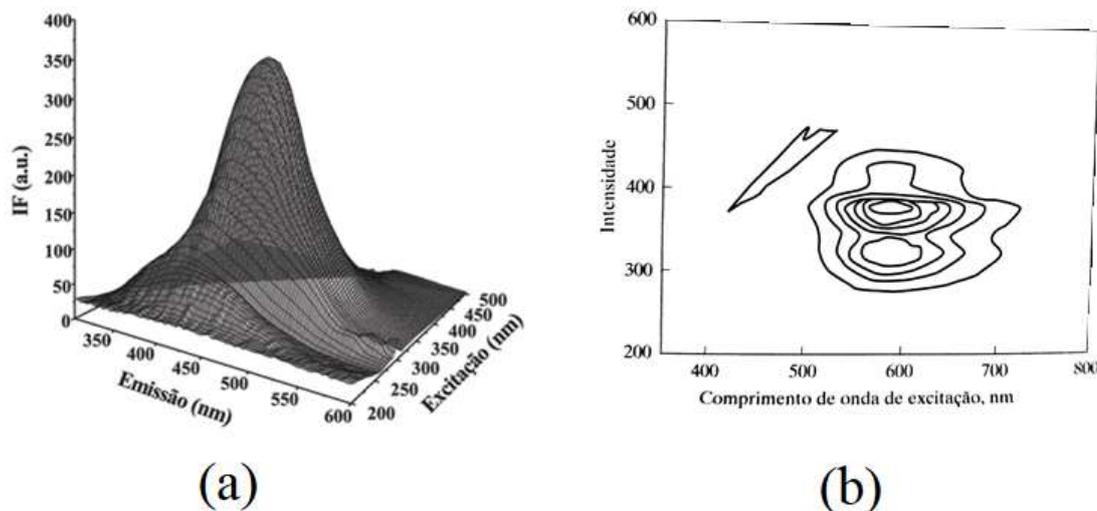


Figura 12: (a) Espectros de fluorescência tridimensional (b) Gráfico de contorno de fluorescência [66]

Há ainda alguns aparatos experimentais que permitem varrer simultaneamente os comprimentos de onda de excitação e de emissão com uma pequena diferença entre eles, o espectro gerado por esse procedimento é denominado de espectro síncrono. Um sinal de fluorescência é obtido apenas em comprimentos de onda onde a excitação e a emissão ocorrem para uma diferença de comprimento de onda selecionada [65-66].

Os componentes dos instrumentos de medidas para fluorescência são similares aos fotômetros e espectrofotômetros ultravioleta-visível. A Figura 13 ilustra uma configuração típica para os componentes de fluorímetros e espectrofluorímetros, basicamente quase todos os aparatos experimentais de fluorescência usam óptica de feixe duplo. O feixe superior da amostra passa inicialmente através do seletor de excitação de comprimento de onda (filtro ou monocromador), o qual transmite a radiação que excita a fluorescência, mas exclui ou limita a radiação do comprimento de onda de emissão fluorescente. A fluorescência é emitida em todas as direções, mas é convenientemente observada em ângulos retos ao feixe de excitação, isso minimiza as contribuições do espalhamento e da radiação intensa da fonte. A radiação emitida passa através de um seletor de emissão de comprimento de onda de comprimento de onda (filtro ou monocromador) que isola a emissão da fluorescência, a radiação isolada atinge então um fototransdutor, onde é convertido em um sinal elétrico para a medida [66-70].

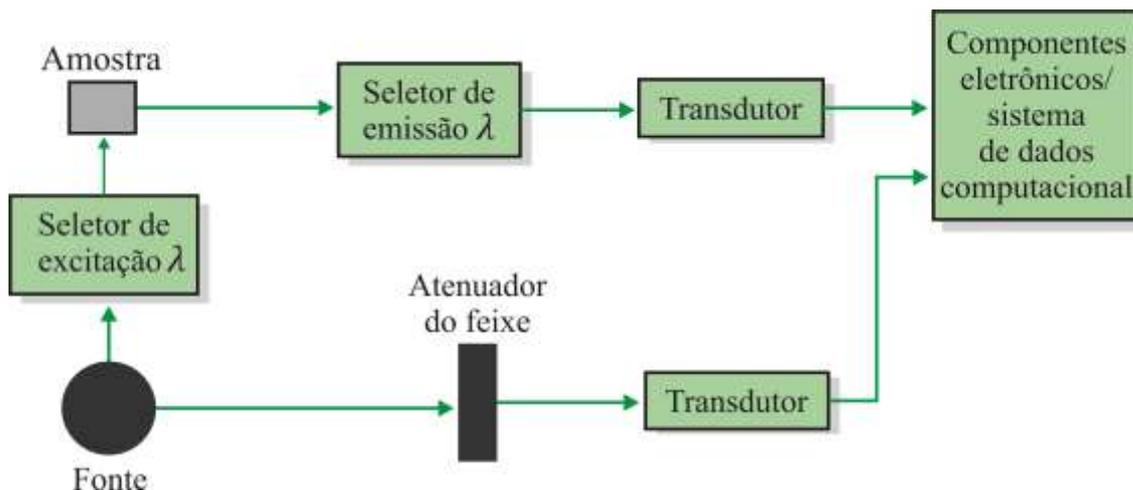


Figura 13: Componentes de um fluorímetro ou espectrofluorímetro. A fonte de radiação é dividida em dois feixes. O feixe da amostra passa através do seletor de comprimento de onda de excitação em direção da amostra. A fluorescência emitida é isolada pelo seletor de comprimento de onda de emissão antes de atingir o transdutor. O feixe de referência é atenuado antes de atingir o transdutor. Os componentes eletrônicos e o sistema computacional calculam a razão da intensidade de fluorescência para a intensidade do feixe de referência, que cancela o efeito das flutuações da intensidade da fonte [66].

O feixe de referência menor passa através de um atenuador que reduz sua potência para um valor próximo daquele da radiação de fluorescência, a redução da potência é usualmente de um fator de 100 ou maior, o feixe atenuado atinge, então, um segundo transdutor e é convertido para um sinal elétrico. Os componentes eletrônicos em um sistema de dados computacional processam os sinais para calcular a razão da intensidade de emissão de fluorescência para a intensidade da fonte de excitação e produz um espectro resultante ou os dados para um único comprimento de onda.

A sofisticação, as características de desempenho e custos dos fluorímetros e dos espectrofluorímetros diferem enormemente, da mesma forma que os instrumentos correspondentes para as medidas de absorção. Quando são empregados apenas filtros, o instrumento é chamado de fluorímetro, os espectrofluorímetros verdadeiros empregam dois monocromadores para isolar o comprimento de onda. Alguns instrumentos são híbridos, fazem uso de filtro para selecionar o comprimento de onda de excitação e um monocromador para escolher o comprimento de onda de emissão [72].

Uma das características mais interessantes dos métodos luminescentes é a sua inerente sensibilidade, com os limites de detecção, que são até três ordens de magnitude melhores que os encontrados pela espectroscopia de absorção. Outra vantagem dos métodos fotoluminescentes é a sua grande faixa linear de concentração, que também é significativamente maior que do que os métodos de absorção. Porém, como os estados

excitados são suscetíveis à desativação pelas colisões e outros processos, muitas moléculas não apresentam fluorescência ou fosforescência [68-70]. Neste trabalho fez-se uso da técnica de fluorescência molecular para caracterizar e quantificar o teor de água em amostras de etanol fez-se uso da rodamina B, um corante que é conhecido pela sua alta eficiência de fluorescência.

3.5.3 Tempo de vida de fluorescência

A medida de fluorescência no estado estacionário é feita com uma iluminação e observações constantes, a amostra é exposta a radiação com um feixe contínuo de luz e a intensidade de emissão é então registrada. A medida de fluorescência resolvida no tempo é realizada para determinar as intensidades e tempo de decaimento de fluorescência, a amostra é exposta em um pulso de luz, onde a largura do pulso é menor do que o tempo característico de decaimento da amostra. A intensidade deste decaimento é detectada, onde é possível retirar os valores de tempo numa escala de nanossegundos [67].

É possível estabelecer uma relação entre as medidas de estado estacionário e as medidas de fluorescência resolvidas no tempo, a observação do estado estacionário é tida como uma média do fenômeno resolvido no tempo sobre a intensidade de decaimento da amostra. Muitos fluoróforos dispõem de tempo de vida na ordem de subnanossegundos, devido às curtas escalas de tempo de fluorescência, medidas de emissão de fluorescência resolvida no tempo requer uma sofisticação na ótica e na eletrônica dos equipamentos. No entanto, apesar das dificuldades experimentais, a técnica de fluorescência resolvida no tempo vem sendo cada vez mais usada em análises laboratoriais [72].

As medidas de tempo de vida de fluorescência podem dar informações sobre os processos de desativação colisional, sobre a taxa de transferência de energia e sobre as reações em estado excitado. Tais medidas podem ser usadas analiticamente para fornecer seletividade adicional na análise de misturas contendo fluoróforos [69]. Dada uma solução diluída de espécies fluorescentes com concentração $[A]$ (geralmente em molL^{-1}), um pulso de luz $t = 0$ leva certo número de moléculas, A , ao estado excitado

de singlete S_1 através da absorção de fótons. Essas moléculas excitadas então retornam ao estado S_0 , através dos processos radiativos, não radiativos e cruzamento intersistema. A taxa de despopulação do estado excitado pode ser descrita pela equação diferencial,

$$-\frac{d[{}^1A^*]}{dt} = (k_r^s + k_{nr}^s)[{}^1A^*] \quad (25)$$

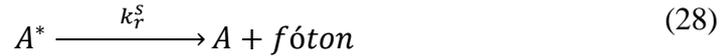
Onde k_r representa taxa de emissão radiativa e k_{nr} dos processos não radiativos, integrando a expressão é possível obter a evolução no tempo da concentração de moléculas no estado excitado, $[{}^1A^*]$, de modo que fica:

$$[{}^1A^*] = [{}^1A^*]_0 e^{-(t/\tau_s)} \quad (26)$$

Onde $[{}^1A^*]_0$ é a concentração de moléculas no estado excitado no tempo $t = 0$ e τ_s é o tempo de vida do estado S_1 , definido por,

$$\tau_s = \frac{1}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (27)$$

A intensidade de fluorescência é definida como a quantidade de fotos emitida por unidade de tempo por volume, assim,



A intensidade de fluorescência f no tempo t após a excitação da amostra por um pulso de luz no tempo igual a 0 é proporcional, em cada tempo, à concentração instantânea de moléculas no estado excitado, o fator de proporcionalidade é dado pela taxa radiativa k_r^s , de maneira que,

$$f(t) = k_r^s [{}^1A^*] = k_r^s [{}^1A^*]_0 e^{-(t/\tau_s)} \quad (29)$$

Onde $f(t)$ é a resposta do sistema, o qual diminui de acordo com uma função exponencial.

O tempo de decaimento de fluorescência τ_s é a propriedade de extrema relevância de uma molécula fluorescente, pois define a janela temporal em que podemos observar o fenômeno dinâmico do sistema. Após a excitação, uma fração de moléculas do sistema pode alcançar o estado excitado tripleto, de onde o retornarão ao estado fundamental via processo radiativo, emissão de fótons, e processos não radiativos [67-69]. A concentração de moléculas no estado tripleto decai exponencialmente com um tempo característico τ_T , definido por,

$$\tau_T = \frac{1}{k_r^T + k_{nr}^T} \quad (30)$$

O rendimento quântico de fluorescência ϕ_F é a fração de moléculas no estado excitado que retornam ao estado fundamental S_0 como emissão de fótons, então,

$$\phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \tau_s \quad (31)$$

Usando a definição de rendimento quântico, razão do número de fótons emitidos pelo número de fotos absorvidos, tem se,

$$\frac{f(t)}{[{}^1A^*]_0} = k_r^S e^{(-t/\tau_s)} \quad (32)$$

A integração desta expressão fornece o decaimento (matematicamente de zero a infinito) o rendimento quântico, assim,

$$\frac{1}{[{}^1A^*]_0} \int_0^{\infty} f(t) dt = k_r^S \tau_s = \phi_F \quad (33)$$

Na fluorescência estacionária os espectros de emissão e excitação são registrados usando os espectrofluorímetros, a fonte de luz é uma lâmpada emitindo um fluxo de fótons constante. Sendo N_0 número de fótons incidentes durante um intervalo de tempo por unidade de volume da amostra com a concentração do fluoróforo $[A]$, tem se que, αN_0 representa a quantidade de fótons absorvidos por unidade de volume e o processo de excitação em quesito é dado por ${}^1A + h\nu \xrightarrow{k_a} {}^1A^*$, onde $k_a \approx 10^{15} s^{-1}$.

Sob fonte de excitação contínua, a concentração $[^1A^*]$ permanece constante, logo, o sistema está no estado estacionário, à taxa temporal de mudança de $[^1A^*]$ é dado por,

$$\frac{d[^1A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r^s + k_{nr}^s)[^1A^*] \quad (34)$$

Onde $k_a \alpha N_0$ representa o número de fótons absorvidos por unidade de volume por unidade de tempo, é possível escrever a expressão em função da intensidade de luz incidente I_0 , a concentração fica,

$$[^1A^*] = \frac{\alpha I_0}{k_r^s + k_{nr}^s} \quad (35)$$

A quantidade de fotos fluorescentes emitidos por unidade tempo e por unidade de volume, de maneira que a intensidade de fluorescência no estado estacionário é,

$$f = k_r^s [^1A^*] = \alpha I_0 \frac{k_{nr}^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = \alpha I_0 \phi_F \quad (36)$$

Essa expressão representa a intensidade de fluorescência no estado estacionário por fóton absorvido.

Há dois métodos utilizados para medir o tempo de vida de fluorescência de um dado fluoróforo, o método pulsado e o harmônico ou de modulação de frequência, neste trabalho foi usado o pulsado, será feita uma explanação sobre este método. Suponha uma amostra contendo um fluoróforo é excitada com um pulso de luz infinitamente curta resultando em uma população inicial N_0 de fluoróforos no primeiro estado excitado singleto [70; 73]. A população decai de acordo com a equação,

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr})N(t) \quad (37)$$

Onde $N(t)$ é o número de moléculas excitadas no tempo t , k_r é taxa de radiativa de decaimento (fluorescência ou fosforescência) e k_{nr} é a taxa de decaimento não radiativa. A emissão é um evento aleatório e cada fluoróforo tem a mesma probabilidade de emitir num dado período de tempo, integrando a expressão obtêm se o decaimento exponencial da população excitada assim,

$$N = N_0 e^{(-t/\tau)} \quad (38)$$

Como a intensidade radiativa I é proporcional a $N(t)$ a expressão torna se,

$$I = \alpha e^{(-t/\tau)} \quad (39)$$

Para um decaimento de fluorescência multiexponencial com n componentes, $I(t)$ é representado por:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{(-t/\tau_i)} \quad (40)$$

A intensidade fracionária da componente i , ou contribuição fracionária da componente i para a intensidade estacionária, é,

$$f_i = \frac{\int_0^{\infty} I_i(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \quad (41)$$

Com $\sum_0^n f_i = 1$.

Nestes casos de decaimento de fluorescência mutiexponenciais, o tempo de vida médio pode ser determinado como,

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} = \sum_{i=1}^n f_i \tau_i \quad (42)$$

Nesta configuração, cada tempo de decaimento é ponderado pela intensidade fracionária, esta média é denominada de tempo de decaimento com a média nas intensidades. Outra possibilidade é fazer uso das amplitudes, ou seja,

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} = \sum_{i=1}^n a_i \tau_i \quad (43)$$

Onde a_i são as amplitudes fracionárias, $a_i = \frac{\alpha_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i}$, esta média é chamada de tempo de vida de fluorescência com média nas amplitudes.

A definição usada depende do fenômeno estudado em questão, por exemplo, o tempo de decaimento com média nas intensidades deve ser usado para calcular uma constante colisional média, enquanto, em procedimentos de transferência de energia ressonante, o tempo de decaimento com média nas amplitudes deve ser usado em cálculos de eficiência de transferência de energia [69].

O arranjo experimental para medidas de fluorescência resolvida no tempo usado no presente trabalho é baseado no método de contagem de fóton único correlacionado no tempo (TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting). O princípio deste método baseia-se no fato de que a probabilidade de detectar um fóton único no tempo t depois de um pulso de excitação é proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo. Após a sincronização e gravação de fótons únicos, depois de um grande número de pulsos de excitação, a curva de decaimento de intensidade de fluorescência é reconstruída, a Figura 14 ilustra um diagrama esquemático de fluorímetro de contagem de fóton único.

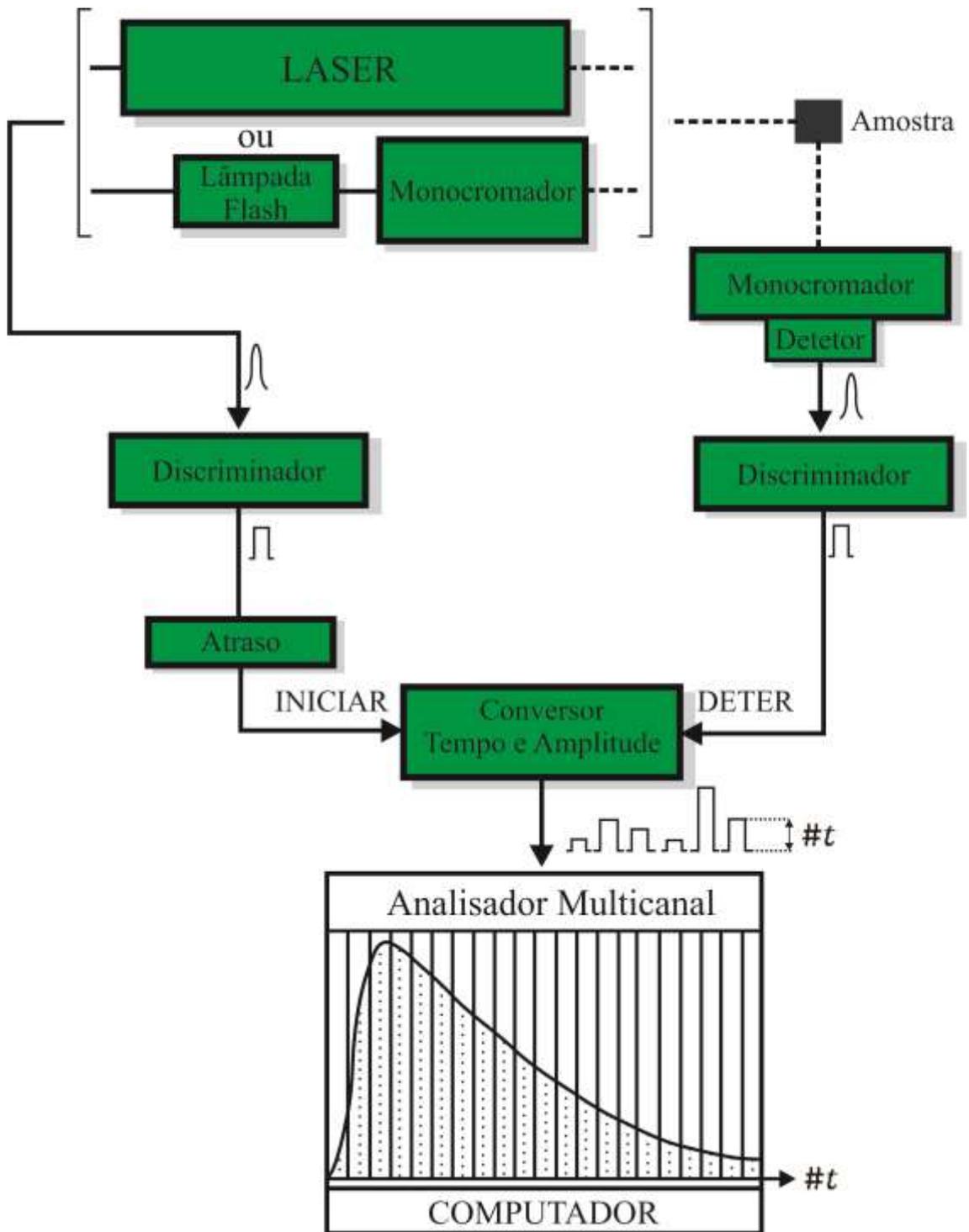


Figura 14: Diagrama esquemático de um fluorímetro de contagem de fóton único [67]

A fonte de excitação pode ser uma lâmpada de flash ou laser, um pulso elétrico associado com um pulso ótico é gerado e encaminhado através de um discriminador para a entrada INICIAR do conversor tempo-amplitude, por outro lado a amostra é excitada pelo pulso ótico e emite fluorescência. Os sistemas óticos são ajustados de

modo que o fotomultiplicador detecte não mais de um fóton por cada pulso de excitação, o pulso elétrico correspondente é encaminhado através de um discriminador, para a entrada DETER do conversor tempo-amplitude. Este que gera um pulso de saída cuja amplitude é diretamente proporcional ao intervalo de tempo entre os pulsos INICIAR e DETER, o intervalo de tempo é convertido a um valor digital por meio de um conversor analógico-digital, o analisador multicanal aumenta de um conteúdo do canal de memória correspondendo ao valor digital do pulso detectado. Depois de um grande número de eventos excitação-deteção, forma-se o histograma dos fótons detectados, que representa a curva de decaimento de fluorescência, logo quanto maior o número de eventos melhor a precisão da curva de decaimento [73].

Muitas vezes as fontes luminosas disponíveis fornecem pulsos de diferentes intervalos de duração, como consequência o decaimento de fluorescência observado deve ser corrigido pela largura do pulso da lâmpada, este procedimento é chamado de deconvolução espectral [67-70]. Quando a deconvolução é necessária, o perfil temporal da lâmpada do pulso de excitação é gravado sob as mesmas condições por substituição da amostra por uma solução dispersante, essa dificuldade causada pela largura do pulso pode ser minimizada pelo uso de lasers com pulsos de curta duração. Neste trabalho foi utilizada técnica de fluorescência pulsada, para determinar o tempo de vida de fluorescência das amostras, que são misturas de água/etanol em várias concentrações na presença da rodamina B.

3.6 Interação Etanol- Água-Rodamina

As propriedades ópticas de um fluoróforo sofrem influência do tipo de solvente em que este está diluído, fluorescência, o tempo de vida de fluorescência, a absorção UV-Vis [74], podem apresentar diferentes valores de intensidades, como também deslocamentos de bandas. Há trabalhos que discutem o comportamento da rodamina B diluída no etanol, na água e nas misturas água/etanol. Dois tipos de efeitos geralmente são mencionados e classificados como dinâmicos e estáticos [75].

Os efeitos dinâmicos são consequência de colisões entre as moléculas de solvente e, é importante nos processos de relaxação do estado excitado que envolve movimento

de torção foto-induzido ao redor das ligações químicas das moléculas do corante, a viscosidade do solvente também pode estar associada a esses efeitos dinâmicos de colisão [75-78].

Os efeitos estáticos são subdivididos em interações de curto alcance e interações universais, a magnitude da influência do solvente como meio dipolar depende da constante dielétrica e do índice de refração, e se mostra no aumento das interações universais. Ambas as interações afetam a forma e a separação das energias potenciais, e, portanto, modificam a altura das barreiras de potencial [78-79].

Na literatura há trabalhos confirmando a presença de dímeros em soluções aquosas de rodamina, inclusive em concentrações bem diluídas na ordem de 10^{-4} M a 10^{-7} M, mostrando que a constante de dissociação (dimerização) é praticamente invariável, isto indica que para estas concentrações as soluções são binárias, compostas de monômeros e dímeros [44]. As interações específicas de soluto-solvente correspondem às interações particulares da estequiometria entre as moléculas do soluto e do solvente, tais interações incluem ligações tipo pontes de hidrogênio e também podem incluir a formação de complexos. Elas podem afetar a constante de decaimento da rodamina B, devido aos grupos de dietilamina, pois favorecem os processos de conversão interna [80-81].

Existem trabalhos que buscam esclarecer as interações das rodaminas com diversos solventes, e explicar as propriedades fotofísicas derivadas dessas interações, em experiências usando a rodamina em misturas água/etanol [82-83]. É possível fazer implicações sobre alguns efeitos observados. A banda de absorção das rodaminas do tipo dietilamina (rodamina B) sofre deslocamento para altas energias, de modo que a quantidade de água diminui é verificado deslocamento para o azul. Em misturas onde o teor de água é maior, identifica-se um deslocamento de banda de absorção para o vermelho.

As diferentes interações entre a rodamina e o solvente [82,84] são ilustradas nas Figuras 15 e 16, a análise então pode ser feita:

Interação A: O solvente pode sofrer interação com o grupo hidroxila e com o par solitário do grupo amina com uma ligação tipo H, evitando a participação do par solitário do grupo amina no sistema π do xanteno e favorecendo a ressonância das estruturas *b*, *c* e *d*. o que favorece o deslocamento de banda para o vermelho.

Interação B: As estruturas ressonantes *a* e *a'* podem ser estabilizadas por uma interação eletrostática entre a carga positiva do grupo amina da rodamina e o par solitário do grupo hidroxila do solvente (etanol/água), o que causa consequentemente um deslocamento para o vermelho.

Interação C: O grupo carboxila pode sofrer solvatação, o que inibi a interação eletrostática molecular entre a carga positiva do xanteno e o grupo COOR, isto causa um deslocamento no espectro para comprimentos de onda maior, ou seja, baixas energias.

Interação D: A interação entre o par solitário do grupo hidroxila do solvente com o átomo de hidrogênio do grupo monometilamina da rodamina por uma ligação tipo H altera a densidade eletrônica do grupo amina, o que permite uma deslocalização do par solitário do grupo amina através do anel xanteno, favorecendo um deslocamento espectral para o vermelho.

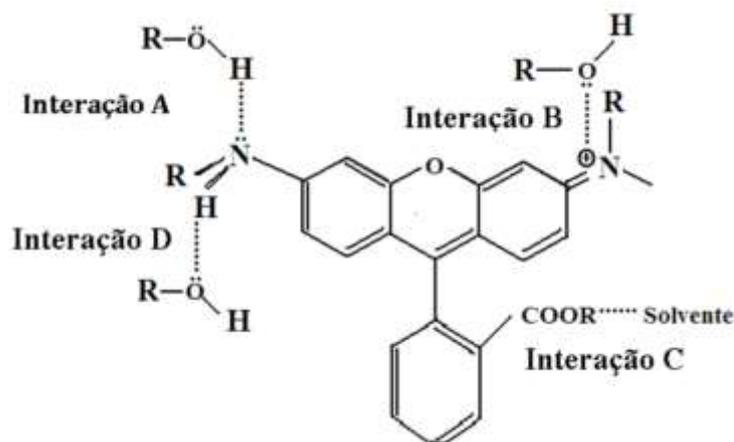


Figura 15: Interações de pontes e hidrogênio entre os diferentes grupos funcionais das rodaminas e solventes próticos [85]

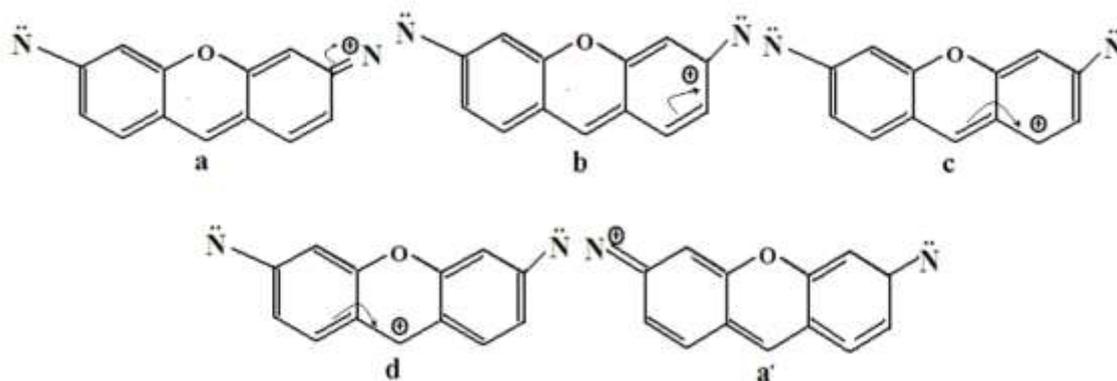


Figura 16: Estruturas ressonantes dos cromóforos das rodaminas [92]

As interações descritas entre a molécula de rodamina e o solvente (água/etanol) indicam as possíveis causas dos deslocamentos dos espectros observados, porém é complicado fornecer uma explicação com completeza de como todas as interações influem no espectro, uma vez que as interações não ocorrem isoladamente, mas de maneira conjunta e inter-relacionadas [82]. A partir dessas discussões pode se dizer que as moléculas de álcool têm maior afinidade para interagir (dissolver) com o grupo amina, no entanto que as moléculas de água são rejeitadas por este grupo devido a forças hidrofóbicas.

3.7 Curva analítica

O procedimento de validação de métodos deve incluir todas as etapas necessárias para demonstrar que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. Uma questão de suma importância no delineamento das etapas a comporem o procedimento de validação de um método analítico está justamente no estabelecimento dessas etapas [84].

A validação de um método desenvolvido, ou mesmo, a validação de modificações de ajuste de métodos já publicados, mesmo os oficiais, envolve uma etapa crítica que é o julgamento do nível de validação necessário conforme o objetivo a que se destina o método analítico. As agências reguladoras sugerem diferentes classificações para os níveis de validação de um método, todas diferenciadas conforme a proposta a que se destina o mesmo [84-85].

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado, a curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. O termo calibração é mais pertinente para instrumentos de medição e padrões o termo curva analítica para expressar a relação sinal (resposta) em função da concentração do analito. É recomendada que no mínimo cinco níveis de concentração (incluindo a amostra zero) sejam empregados na construção da curva analítica [62].

Como critérios de avaliação os resultados devam ser analisados por métodos estatísticos como, por exemplo, regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e que deva ser usado o modelo mais simples que adequadamente descreve a relação concentração-resposta. O uso de outros modelos mais complexos deve ser justificado [84-86].

Dentre os principais parâmetros de uma curva analítica têm-se: a especificidade do método, linearidade, exatidão, precisão, faixa, limite de detecção, limite de quantificação e robustez [86].

-Especificidade é a capacidade do método analítico em distinguir o analito de todo o resto que possa estar presente na amostra.

- Linearidade é a medida de o quanto uma curva analítica segue uma linha reta, mostrando que a resposta é proporcional à quantidade de analito, essa medida é comumente feita pelo valor do quadrado do coeficiente de correlação.

-Exatidão é definida como a proximidade do valor verdadeiro, as maneiras de verificar a exatidão podem incluir: analisar um material de referência-padrão em uma matriz similar àquela da amostra desconhecida; comparar resultados provenientes de dois ou mais métodos analíticos diferentes; analisar um branco que foi propositalmente contaminado por uma quantidade conhecida do analito.

-Precisão é a reprodutibilidade de um resultado, normalmente expressa por meio de um desvio padrão, existem vários tipos de precisão: precisão do instrumento de medida; Precisão intrínseca do ensaio; precisão intermediária, também chamada de robustez é a variação observada quando um ensaio é feito por pessoas diferentes, em instrumentos diferentes, em dias diferentes; precisão interlaboratorial também chamada de reprodutibilidade é a medida mais geral da reprodutibilidade quando alíquotas da mesma amostra são analisadas por pessoas diferentes, em laboratórios diferentes.

-Faixa é o intervalo de concentrações no qual a linearidade, exatidão e precisão atendem às especificações para o método analítico.

- Limite de detecção é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, ou seja, o limite de detecção é a mais baixa concentração de analito que pode ser detectado de forma confiável e distinto de zero, mas não necessariamente quantificado na concentração em que um valor medido for maior que a incerteza associada a ele [93-95]. O valor do limite de detecção LD pode ser expresso por,

$$LD = \frac{3\sigma}{\alpha} \quad (44)$$

Onde σ é o desvio padrão das n medidas do branco e α é o coeficiente angular da reta ajustada.

- Limite de quantificação é definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a mais baixa concentração de analito que pode ser determinada quantitativamente com um nível aceitável de precisão. O limite de quantificação LQ pode ser expresso por,

$$LQ = \frac{10\sigma}{\alpha} \quad (45)$$

Onde σ é o desvio padrão das n medidas do branco e α é o coeficiente angular da reta ajustada.

O menor limite de detecção, dado pela equação (44), onde σ é o desvio padrão de uma amostra de baixa concentração e α o coeficiente angular da curva analítica, o desvio padrão é uma medida do ruído (variação aleatória) em um branco ou sinal pequeno. Quando o sinal é 3 vezes maior que o ruído ele é prontamente detectável, mas ainda é pequeno para uma medida exata. Um sinal dez vezes maior que o ruído é definido como o limite inferior de quantificação, assim sendo a menor quantidade que pode ser medida com exatidão razoável.

Além das formas mencionadas anteriormente, existem outras maneiras de estipular os valores de LD e LQ , na literatura existem trabalhos [87-90] que utilizam

outros parâmetros da curva analítica para determinar os valores de LD e LQ, as justificativas para tais mudanças na forma de calcular os valores de LD e LQ são particulares de cada autor.

3.9 Validação Cruzada

A validação de um método é um processo de determinar o grau de confiabilidade do modelo construído em relação aos dados apresentados, A validação cruzada pode ser empregada como metodologia de teste para os métodos propostos em determinar quantidades de água presente em amostras de etanol, usando os procedimentos espectroscópicos [101-102].

No método de validação cruzada k -folds, o conjunto de dados original é dividido em k subconjuntos, destes k subconjuntos, um subconjunto é retido para ser utilizado na validação do modelo e os $k - 1$ subconjuntos sejam utilizados novamente. O processo de validação cruzada é então repetido k vezes, de modo que cada um dos k subconjuntos seja utilizado exatamente uma vez como dado de teste para validação do modelo [91-93].

O resultado final desse processo é o desempenho médio do classificador no k testes. O objetivo de repetir os testes múltiplas vezes é aumentar a confiabilidade da estimativa da precisão do classificador. A variância entre as precisões dos testes possui uma relação inversa com k .

O método de validação cruzada Leave-One-Out possui a mesma definição do método k -folds, a única diferença está no número de subconjuntos k , o método Leave-One-Out define o número de subconjuntos igual ao número de exemplos pertencentes ao conjunto de inicial. A partir deste método é possível obter os seguintes parâmetros: índice de Kappa, Acurácia, Precisão, Recal e F-Score [93-96].

O coeficiente Kappa é uma medida estatística de aceitação entre avaliadores, entre os dados reais e os dados deduzidos, este coeficiente mede a concordância entre dois avaliadores, em que cada um classifica os N itens em C categorias mutualmente exclusivas. A expressão para o índice Kappa (k) é,

$$k = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)} \quad (46)$$

Onde $\text{Pr}(a)$ é a observação relativa de aceitação entre os avaliadores e $\text{Pr}(e)$ é hipoteticamente a probabilidade de acerto, caso a concordância entre os classificadores seja completa, então $k = 1$, caso não haja concordância entre os preditores, então $k \leq 0$.

A acurácia é a proporção dos itens verdadeiros (positivos e negativos) sobre toda população, sendo,

$$\text{Acurácia} = \frac{\text{verdadeiros positivos} + \text{verdadeiros negativos}}{\text{verdadeiros} + \text{falsos}} \quad (47)$$

A precisão é a proporção entre itens classificados corretamente e todos os itens pertencentes à classe,

$$\text{precisão} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos positivos}} \quad (48)$$

O Recall mede a proporção dos itens classificados corretamente dentre todas as informações verdadeiras, assim,

$$\text{Recall} = \frac{\text{verdadeiros positivos}}{\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}} \quad (49)$$

O F-Score é a medida harmônica entre a precisão e o Recall, ou seja,

$$F - \text{Score} = 2 \times \frac{\text{precisão} \times \text{Recall}}{\text{precisão} + \text{Recall}} \quad (50)$$

O método de validação cruzada Leave-One-Out foi aplicado nas curvas analíticas resultante entre os sinais (reposta óptica) e a concentração de água em amostras de etanol, com o intuito de verificar a confiabilidade das metodologias empregadas.

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais utilizados

Os materiais utilizados para os procedimentos experimentais foram: Álcool etílico UV- HPLC - espectroscópico 1000 ml (Vetec); água deionizada; Rodamina B (RdB) padrão HPLC (Sigma-Aldrich).

4.2 Preparo das amostras

Foram preparadas blendas água/etanol, com massa total igual a 50g, variando as concentrações de água de 1% em 1 % entre A0 e A15, de 10% em 10% entre A20 e A50, e por fim a amostra A100. É importante destaca-se que na nomenclatura em questão a amostra Ax representa que existe x% de água na blenda água/etanol. Inicialmente, uma solução padrão RdB diluída em etanol na concentração de 0,156 mg/g (massa de RdB/massa de etanol) foi preparada. Em seguida 1g dessa solução padrão (etanol e rodamina B) foi adicionada em todas as blendas Ax, obtendo uma concentração final de RdB de $(5,2 \times 10^{-6})$ mol/Kg (mols-RdB/massa da blenda água-etanol). Para preparo da amostra A100 foi preparada uma solução padrão (água e rodamina B). Todas as amostras foram preparadas em triplicatas.

4.3 Medidas de fluorescência

As medidas de fluorescência molecular foram mensuradas em um Espectrofluorímetro Cary Eclipse da marca Varian®, disponível no LOF (Laboratório de Óptica e Fotônica) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da UFGD Dourados. Fez uso de uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Para obtenção dos mapas de contorno de fluorescência as amostras foram excitadas de 200nm a 600nm, as fendas de excitação e emissão foram de 5 nm e a sensibilidade do detector de 650 V.

4.4 Medidas de absorção UV-vis

As análises de absorção molecular foram realizadas em um Espectrômetro de Absorção UV-Visível Cary 50 da marca Varian®, disponível no LECA (Laboratório de Espectrometria e Cromatografia Aplicada) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da UFGD Dourados. Utilizou se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Para obtenção dos espectros de absorção as amostras foram excitadas de 200 nm a 800 nm.

4.5 Medidas tempo de vida de fluorescência

As medidas de tempo de vida de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrômetro de tempo de vida de fluorescência FluoTime 100 (PicoQuant®) sendo utilizado para excitação um Driver Laser de Diodo Pulsado de Picosegundo PDL800-B (PicoQuant®) com frequência de 40 MHz, o qual é utilizado para excitar LEDs de comprimentos de onda específicos. Para análises dos decaimentos e cálculo dos tempos de vida foi utilizado o software FluoFit (PicoQuant®). A excitação usada foi em 370 nm e emissão acima de 400 nm.

5 Resultados e discussão

5.1 Absorção UV-Vis

Foram feitas medidas de absorção UV-Vis com o intuito de analisar variações nos espectros da RdB em função das blendas de água/etanol. Os espectros de absorção UV-Vis das blendas etanol/água são ilustrados na Figura 17. O resultado mostra a existência de uma alteração na intensidade de absorção e um deslocamento do máximo de absorção, que é em 550 nm, em função do teor de água nas blendas. A Figura 18 mostra a variação de intensidade de absorção em função dos teores de água nas amostras.

É observada uma linearidade da absorbância em função da concentração de água/etanol na região entre A0 e A10, tal região a concentração de massa de água presente no etanol varia de 0 a 10%. O coeficiente de correlação é $R^2 = 0,9993$. A Figura 19 expõe a reta ajustada para os valores de absorção em função do teor de água nas amostras no intervalo de A0 a A10, cuja equação é igual $I_A(Ax) = (0,5173 \pm 0,0003) + (0,0056 \pm 0,0004)Ax$.

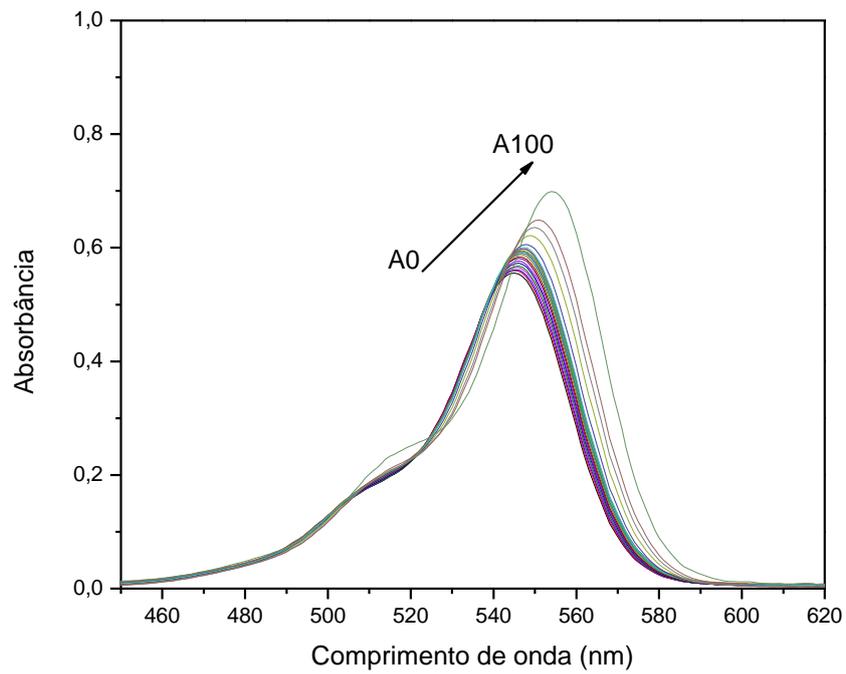


Figura 17: Espectro de absorção UV-vis das misturas água/etanol

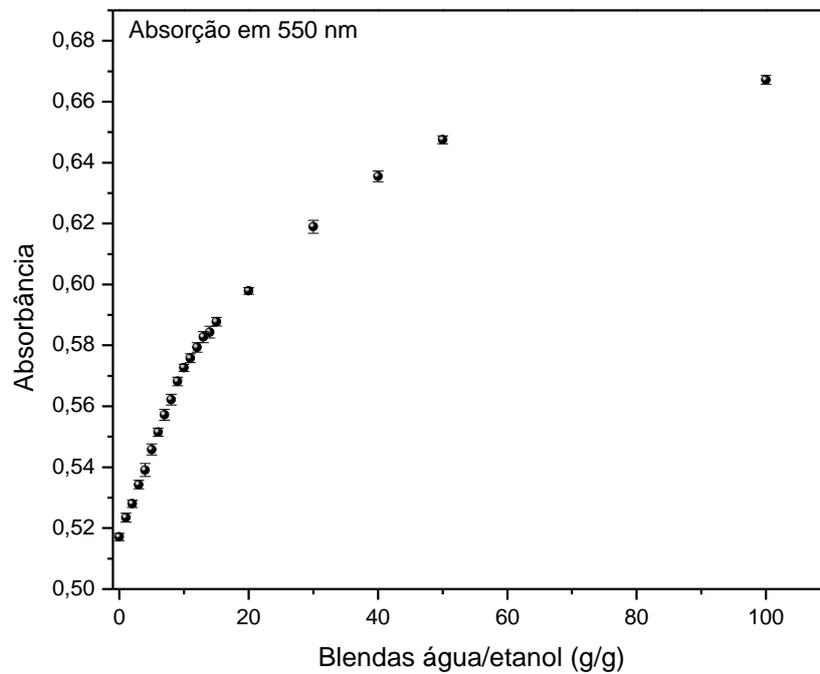


Figura 18: Intensidade de absorbância em 550 m, em função do teor de água nas blendas água/etanol.

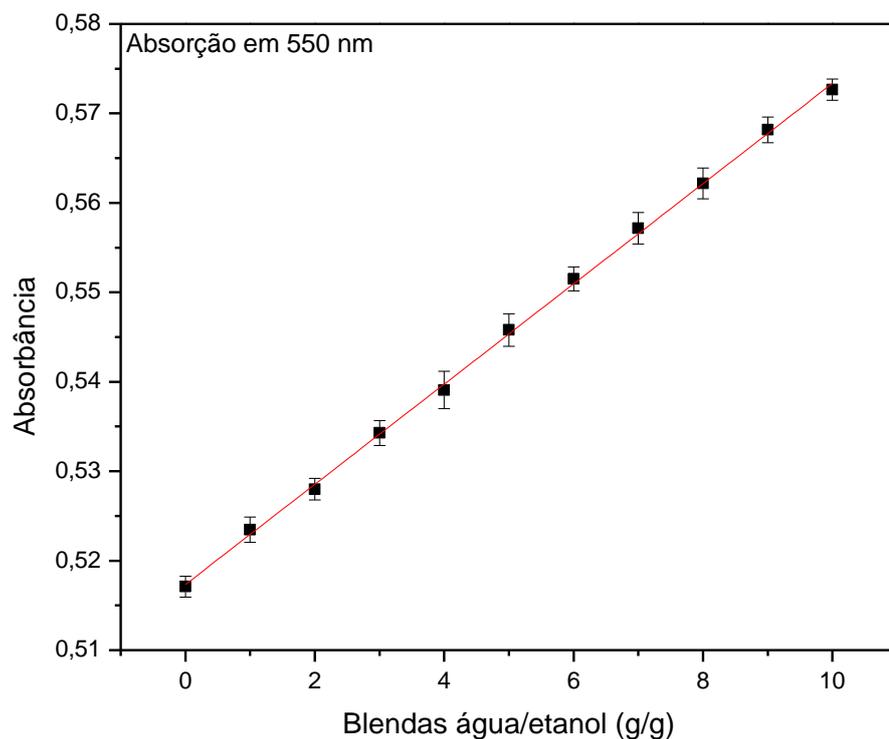


Figura 19: Reto ajustada entre os valores de absorbância em 550 nm e as blendas água/etanol entre A0 e A10.

Em termos do deslocamento do máximo de absorção, a amostra A0 (100% etanol) apresenta um máximo de absorção em torno de 544 nm, enquanto a amostra A100 (100% água) apresenta máxima absorção em 554 nm, resultando num deslocamento de 10 nm para o vermelho do espectro eletromagnético (red shift), a Figura 20 mostra a variação do comprimento de onda dos valores máximos de absorção em função das blendas água/etanol.

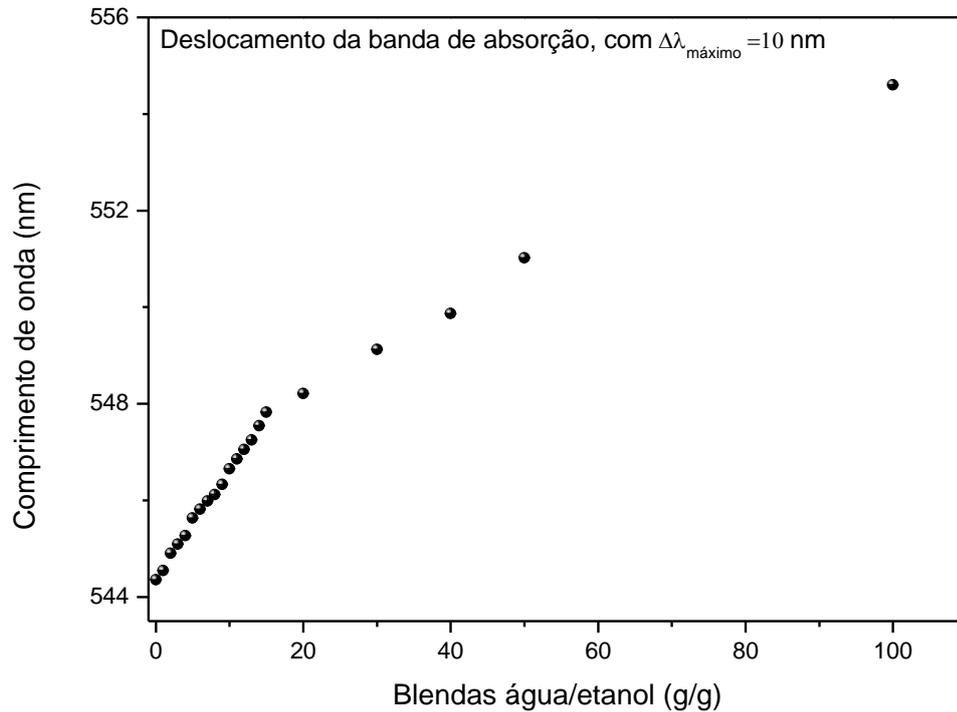


Figura 20: Deslocamento dos picos de maior intensidade de absorção em função das blendas água/etanol.

É possível verificar uma relação de linearidade entre os valores de comprimento de ondas de absorção máximo de cada amostra em função do teor de água nas blendas água/etanol. A Figura 21 mostra o gráfico da correlação, o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9914$ e a equação da reta ajustada é $\lambda_{\text{Absorção máx}}(Ax) = (0,2242 \pm 0,0288)Ax + (544,3961 \pm 0,0032)$.

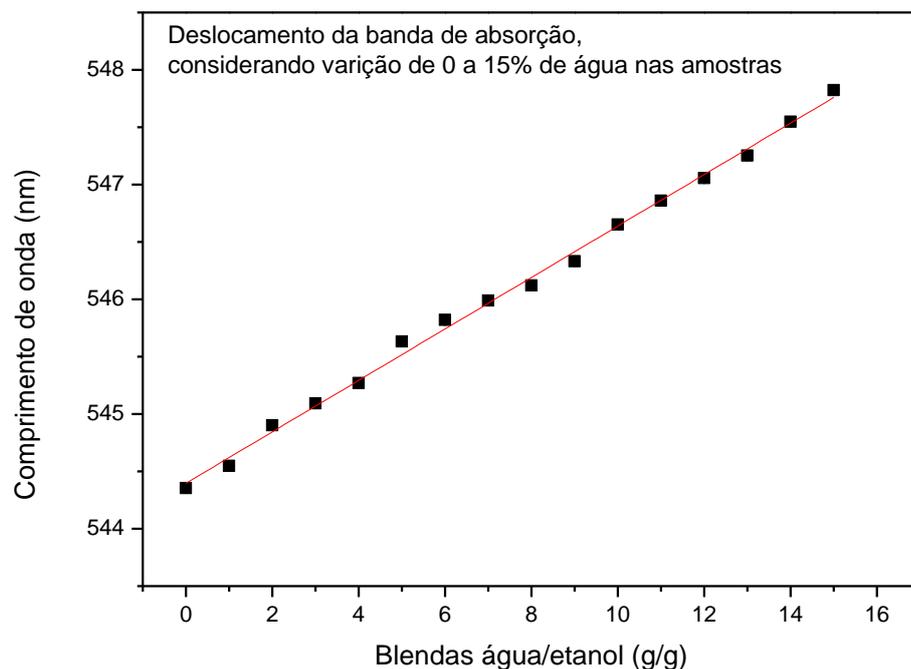


Figura 21: Reta ajustada, relação entre o deslocamento de banda de absorção e o teor de água presente nas amostras.

Esses deslocamentos constatados nos espectros de absorção em função da quantidade de água presente nas blendas estão associados aos efeitos de interação solvente (misturas água/etanol) e soluto (RdB). A cada amostra A_x a Rdb se encontra em um solvente diferente, ou seja, em um solvente que contém uma quantidade diferente de água o que acarreta o deslocamento da banda de absorção para o vermelho [87-88].

5.2 Espectroscopia de fluorescência

Foram feitas medidas de fluorescência em mapas de contorno, mapas 3D, com o intuito de averiguar todos os comprimentos de onda de emissão possíveis das amostras preparadas, esses mapas forneceram informações importantes para a identificação e caracterização da presença de água nas amostras, as intensidades de fluorescência

sofreram alterações para taxa de variação de água nas misturas, o comportamento das emissões do marcador RdB foi caracterizado por essas medidas de fluorescência 3D.

Os mapas de fluorescência 3D apresentado na Figura 22 fornecem os comprimentos de onda de excitação e emissão das misturas etanol/água, a emissão observada é puramente da rodamina B presente nas amostras, e é possível perceber que há uma diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de água nas blendas.

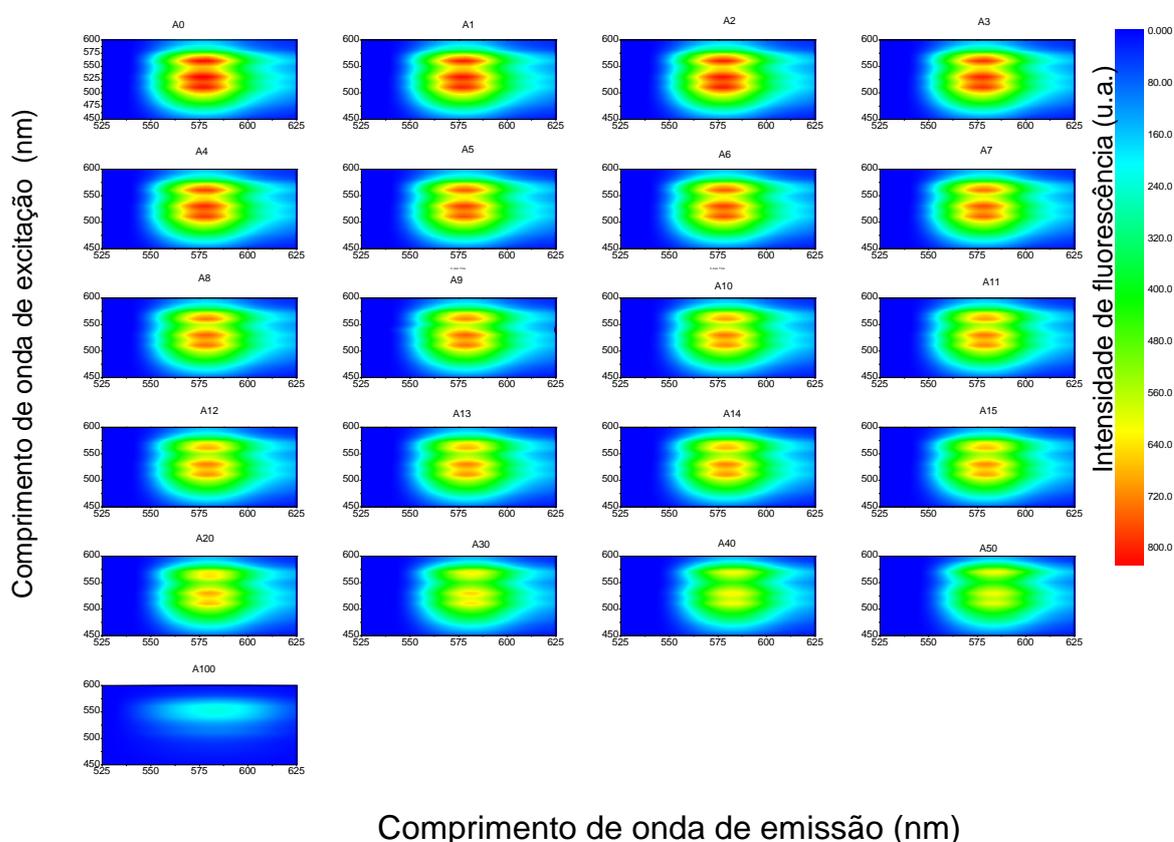


Figura 22: Mapas de contorno de fluorescência das misturas água/etanol.

A partir das medidas de fluorescência 3D, foi identificado qual comprimento de onda de excitação, apresentava uma maior intensidade de fluorescência do analito, foi analisada a amostra A0, quando excitada com radiação de comprimento de onda igual a 530 nm apresentou maior intensidade de fluorescência em 576 nm. já amostra A100

excitada com radiação de comprimento de onda de 550 nm apresentou máxima intensidade de fluorescência em 586 nm.

A Figura 23 mostra os espectros de fluorescência quando as amostras são excitadas em 550 nm. É possível observar um deslocamento nas bandas de emissão para o vermelho do espectro eletromagnético à medida que se aumentou a concentração de água nas blendas. Assim é possível estabelecer relações entre o deslocamento de banda de emissão e o teor de água nas misturas. Também pode ser correlacionar a intensidade de fluorescência com o incremento de água, traçando curvas de dispersão para análise de correlações.

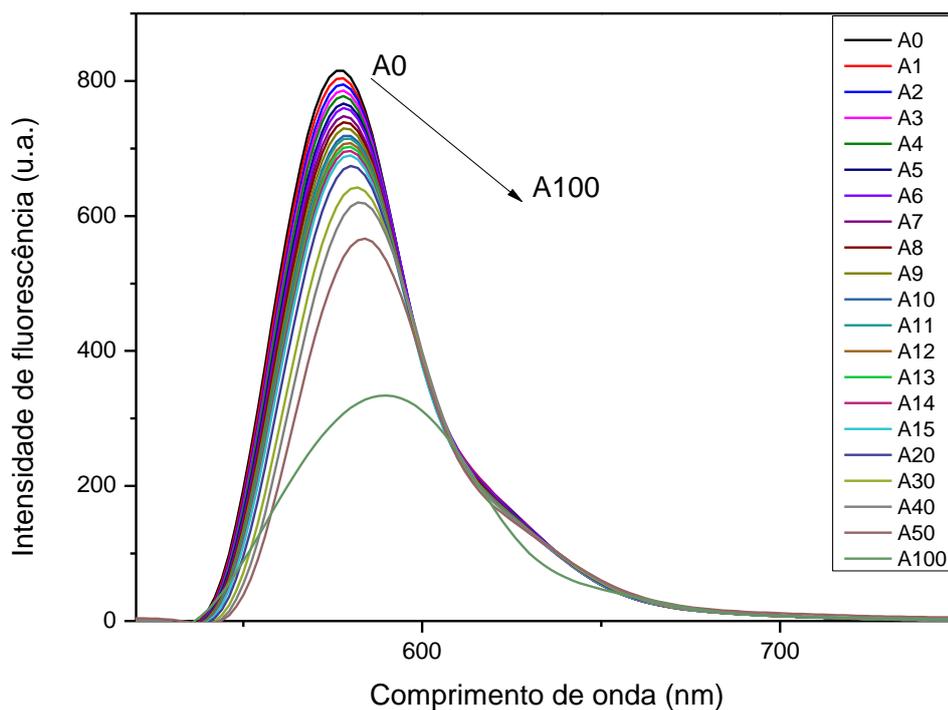


Figura 23: Espectro de fluorescência das misturas água/etanol, quando excitado em 550 nm.

A amostra A0 apresentou um máximo de emissão em 576 nm enquanto a amostra A100 teve uma máxima emissão em 586 nm, com comprimento de onda de excitação

de 550 nm. Dessa forma, analogamente ao obtido para os espectros de absorção, um deslocamento para o vermelho de 10 nm no máximo de emissão foi induzido ao mudar o meio no qual a RdB estava diluída (do etanol para água) a Figura 24 mostra o deslocamento das bandas de fluorescência em função do teor de água nas blendas água/etanol.

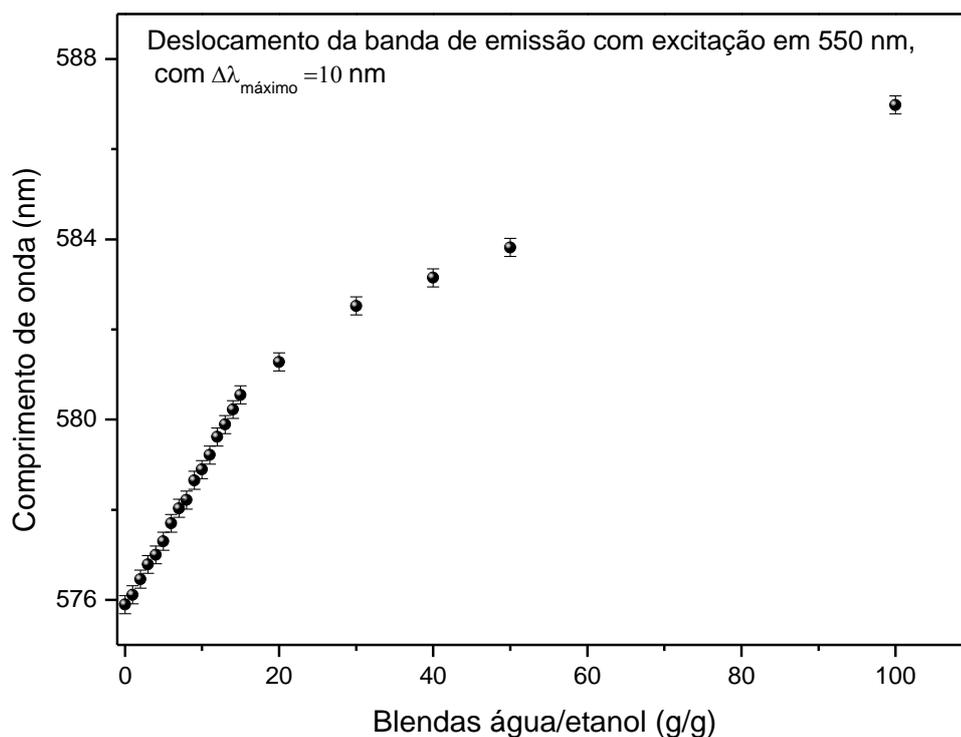


Figura 24: Deslocamento dos picos de maior intensidade de fluorescência em função das blendas água/etanol

A correlação entre o deslocamento de banda de emissão entre as amostras A0 e A15 e o teor a concentração de água é linear, a Figura 25 mostra a reta ajustada cuja equação é $\lambda_{\text{Emissão}_{\text{máx}}}(Ax) = (0,3132 \pm 0,0291)Ax + (575,8085 \pm 0,2559)$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9987$.

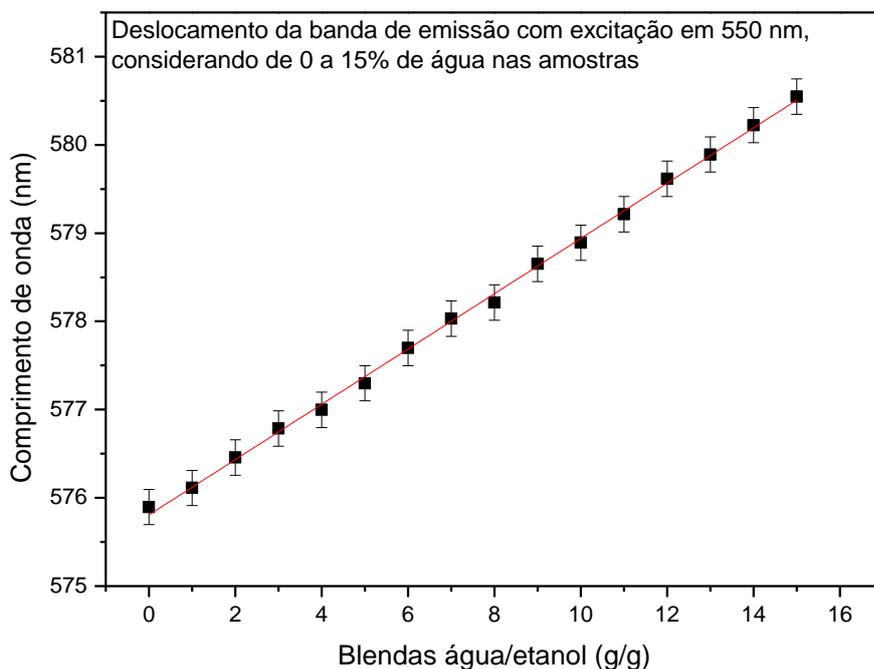


Figura 25: Reta ajustada, relação entre o deslocamento de banda de absorção e o teor de água presente nas amostras.

Foi verificada que a amostra com maior teor de água possui uma menor intensidade de fluorescência, a Figura 26 ilustra a relação entre a intensidade do sinal de fluorescência em função da concentração de água nas amostras, para comprimento de onda de excitação de 550 nm e emissão em 578nm. É possível constatar que nas concentrações de 0 a 10% de água, ou seja, de A0 a A10, existe uma correlação linear entre a intensidade de emissão e o percentual de água presente na amostra. A Figura 27 mostra a reta ajustada para este intervalo, o coeficiente de correlação é $R^2 = 0,9997$. A equação da reta é dada por, $I_F(Ax) = (-9,4586 \pm 0,0913)Ax + (814,5640 \pm 0,5575)$.

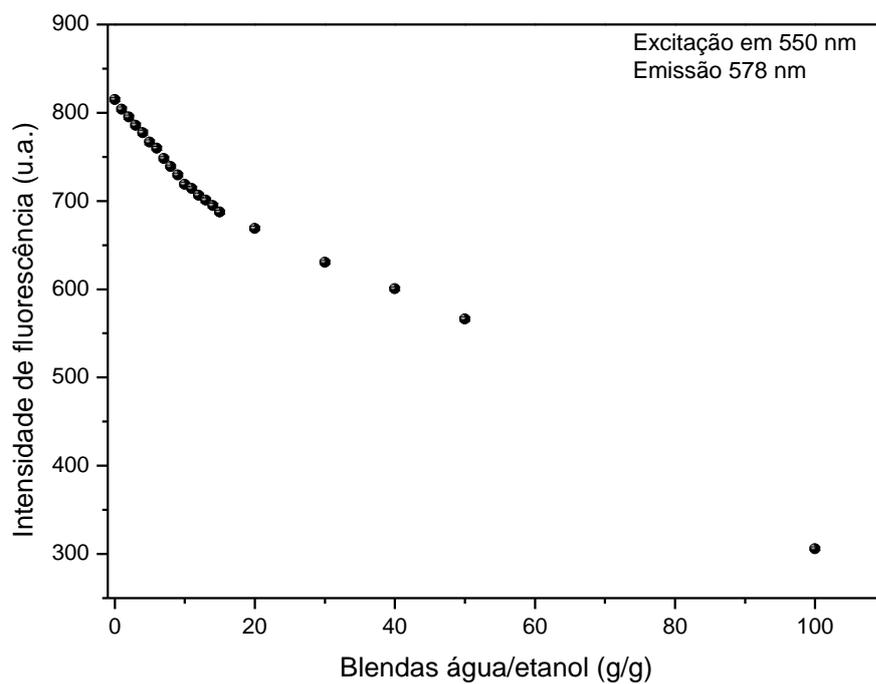


Figura 26: Intensidade de fluorescência em função das blendas água/etanol, com comprimento de onda de excitação de 550 nm e emissão de 578 nm.

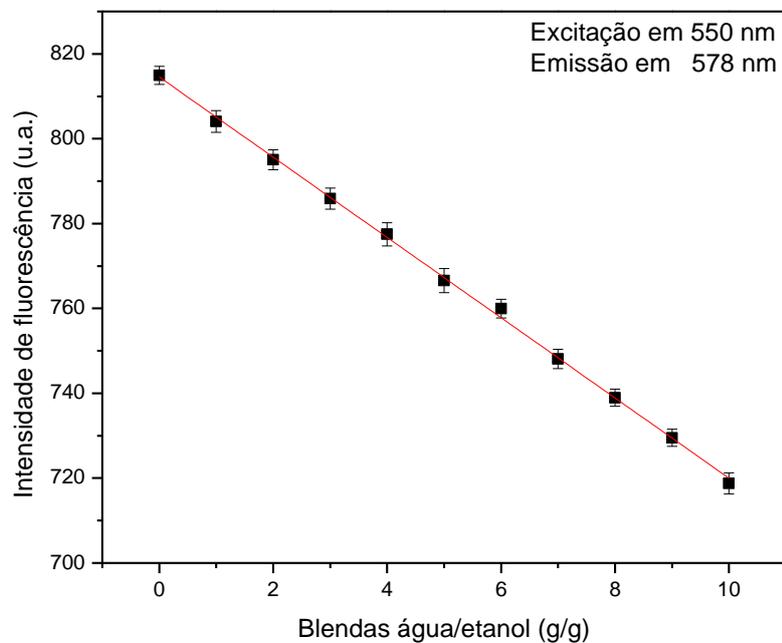


Figura 27: Correlação entre os valores de intensidade de fluorescência e as blendas água/etanol no intervalo de A0 até A10.

É possível que o deslocamento nas bandas de emissão e variações nas intensidades do sinal de fluorescência estejam associados às interações da rodamina com o solvente. Existem trabalhos na literatura que apresentam o efeito e alterações que os diferentes solventes podem causar nas propriedades químicas e físicas do corante rodamina. [54-56] Em soluções aquosas de rodamina é verificada formação de agregados como dímeros, trímeros e até mesmo de ordens maiores, mesmo em concentrações bem diluídas, entre 10^{-4} M a 10^{-7} M, [89-90].

A formação de dímero para estas concentrações é devido a interações hidrofóbicas. A eficiência de emissão é prejudicada pela formação destes agregados não fluorescentes na solução. Já para soluções em etanol ela se dissolve completamente em monômeros, sendo verificada a formação de agregados somente em altas concentrações, ou seja, valores acima de 10^{-3} M [88-90].

Neste trabalho, cada amostra possui uma concentração de $5,2 \mu (mol/Kg)$ de rodamina B, porém foi feita uma variação do teor de água nas misturas. A variação da concentração de água influenciou diretamente na intensidade de fluorescência das blendas. A Figura 25 mostra a diminuição da intensidade de fluorescência em função da concentração de água. Acredita-se que com o aumento de água nas amostras houve a formação de agregados não fluorescentes, como discutido anteriormente, ocasionando a diminuição da fluorescência nas amostras.

Verificou-se também o deslocamento de Stokes, ou seja, a diferença entre o espectro de excitação e o espectro de emissão das amostras com concentrações 0, 50 e 100% de água, A Figura 28 ilustra o espectro de absorção UV-Vis das amostras A0, A50 e A100, juntamente com o espectro de emissão, esse espectro de fluorescência foi obtido com uma fonte de radiação excitante de 550 nm, os deslocamentos de Stokes são respectivamente, $\Delta\lambda_{A0} = 26,7711$ nm, $\Delta\lambda_{A50} = 33,2288$ nm, $\Delta\lambda_{A100} = 37,0012$ nm.

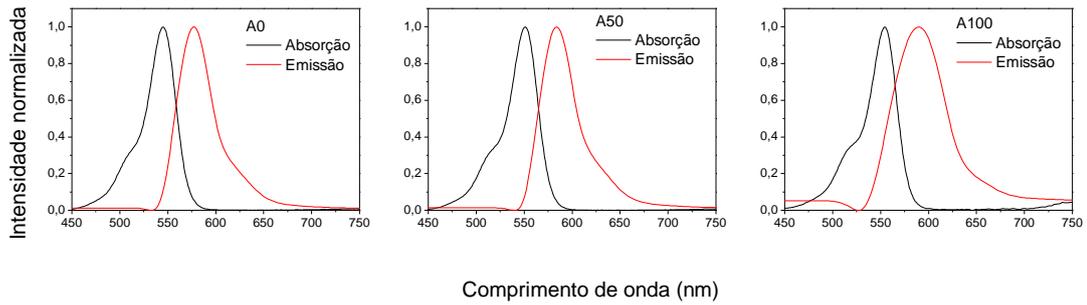


Figura 28: Deslocamento das bandas de emissão e absorção, das amostras A0, A50 e A100.

Como intuito de determinar relações dos sinais óticos com a concentração de água nas amostras, foi detectada uma relação linear entre a razão de intensidade de fluorescência pela absorbância nas amostras cuja concentração de água varia de 0 a 10%. A Figura 29 mostra o gráfico desta razão em função das misturas água etanol. Os valores de absorção considerados são para o comprimento de onda de 550 nm, os valores de intensidade de fluorescência são para comprimento de onda de excitação de 550 nm e emissão de 578 nm.

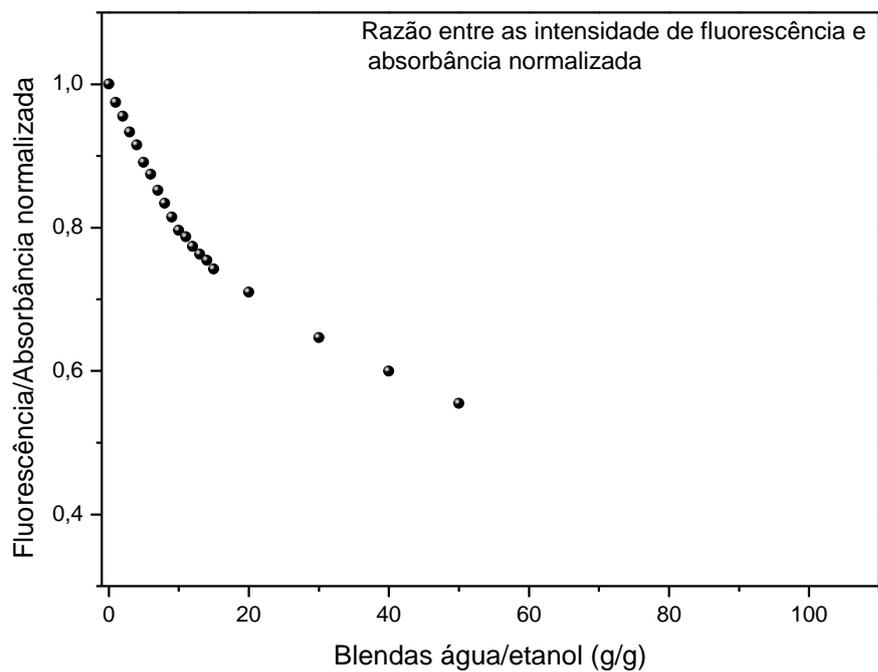


Figura 29: Razão entre as intensidades de fluorescência pelas intensidades de absorção das misturas água/etanol, para absorção comprimento de onda de 550nm, para a fluorescência o comprimento de onda de excitação foi de 550 nm e de emissão de 578.

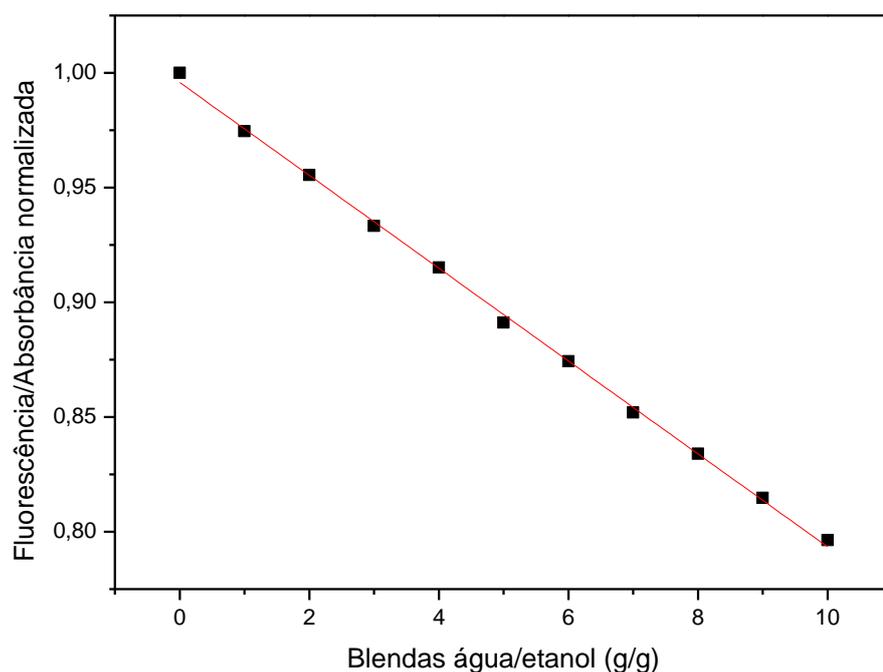


Figura 30: Correlação linear entre as razões de fluorescência por absorção, considerando uma variação de 0 a 10% do teor de água presente nas amostras, juntamente com a reta ajustada.

A Figura 30 expõe a relação linear entre as razões de fluorescência por absorção em função das misturas água/etanol nas concentrações de 0 a 10%. A reta ajustada possui a equação, $I_F/I_A (Ax) = (-0,0202 \pm 0,0023)Ax + (0,9958 \pm 0,0013)$. O coeficiente de correlação linear é $R^2 = 0,9988$. As correlações lineares são interessantes como curvas analíticas, ou seja, para elaboração de métodos e procedimento para quantificação e identificação de resíduos de água em etanol.

5.3 Tempo de vida de fluorescência

Foi analisando também o tempo de vida de fluorescência das misturas água/etanol com a presença de rodamina B, a Figura 31 mostra os decaimentos das amostras consideradas, nota-se uma diferença significativa entre as amostras A0 e A100. Os

valores de tempo de vida diminuem com o incremento do teor de água nas misturas água/etanol.

Segundo Lopez Arbeloa, as interações do soluto- solvente, ou seja, rodamina B e água/etanol são interações particulares de estequiometria entre as moléculas que depende da natureza do soluto e do solvente. Foi discutido anteriormente que há interações tipo ponte de hidrogênio e também pode existir a formação de complexos, como dímeros devido ao aumento da concentração de água nas amostras. Tais interações podem afetar a constante de decaimento radiativo [86-88].

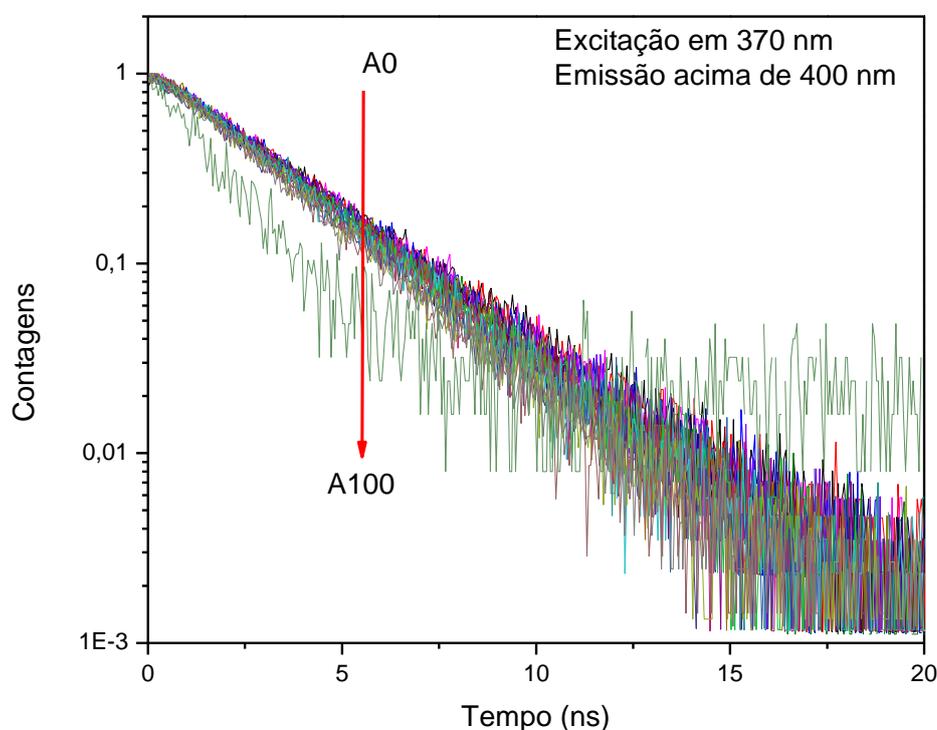


Figura 31: Decaimento dos tempos de vida das misturas água/etanol na presença de rodamina B, com excitação em 370 nm e emissão acima de 400nm.

A variação dos valores de tempo de vida médio da RdB diluídas nas misturas água/etanol em função da concentração de água nas amostras está exposta na Figura 31. Têm um intervalo (A0–A15) linear, a Figura 33 ilustra a reta ajustada para esse intervalado, a equação desta é $\tau(Ax) = (-0,0207 \pm 0,0003)Ax + (3,1182 \pm 0,0036)$ o coeficiente de correlação é $R^2 = 0,9948$.

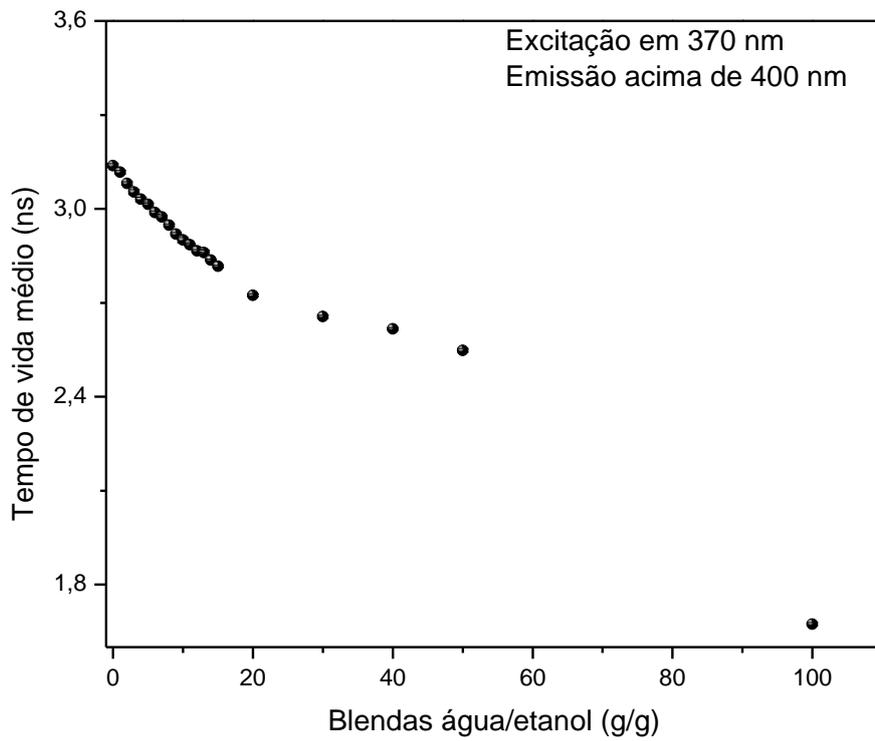


Figura 32: Tempo de vida médio de fluorescência em função das blendas água/etanol.

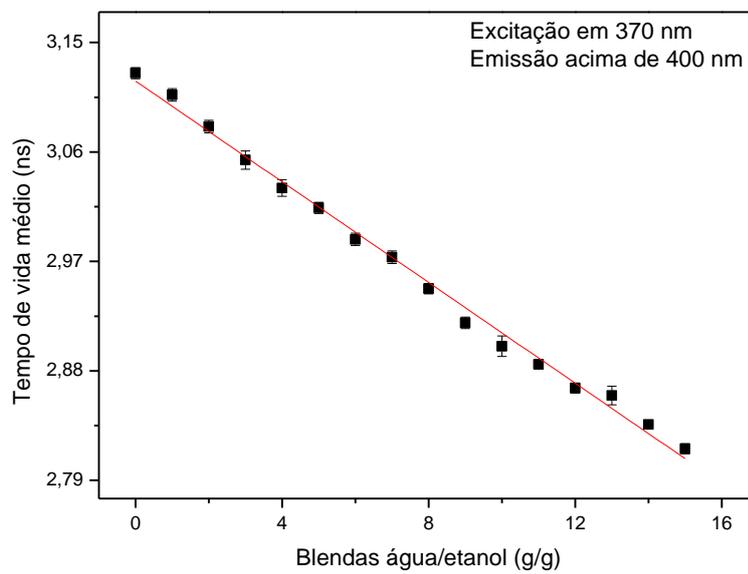
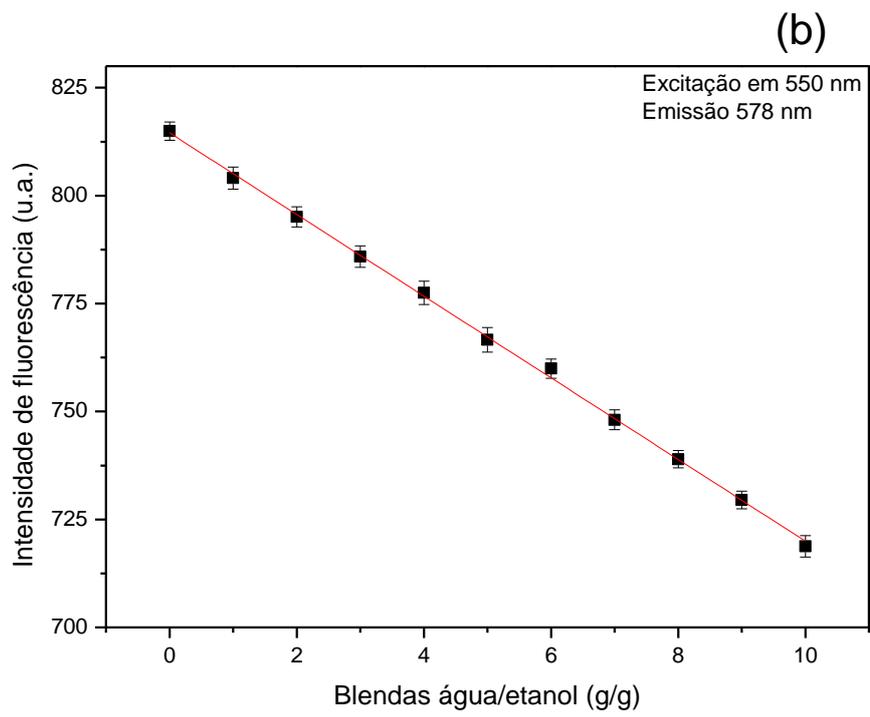
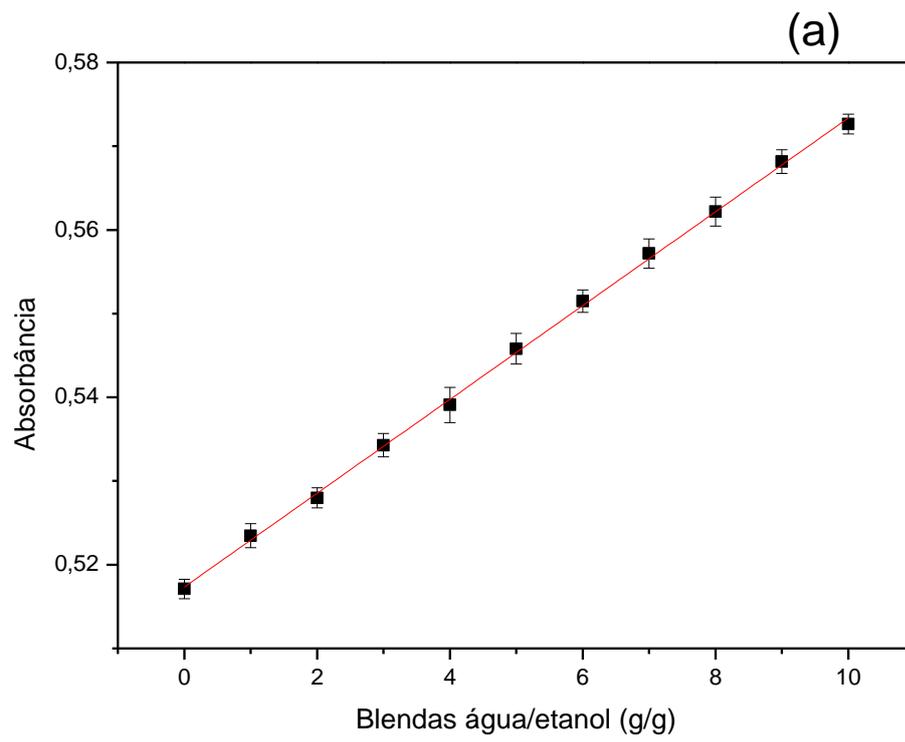


Figura 33: Reto ajustada entre os valores de tempo de vida de fluorescência e as blendas água/etanol entre A0 e A15.

Há uma diminuição na intensidade fluorescência com o aumento da concentração das amostras, esse efeito se repete na correlação entre o valor médio de tempo de vida e as misturas água etanol, como a concentração do corante RdB é igual para todas as amostras, atribui se esses efeitos de diminuição ao tempo de vida de fluorescência ao teor de água presente na amostra analisada. Assim é possível utilizar essa correlação como um mecanismo de caracterização e quantificação de resíduos de água em misturas água etanol.

5.4 Curvas analíticas

As três técnicas apresentadas mostram se com potencialidade para caracterização e quantificação de teores de água em etanol na presença usando a RdB como uma sonda (marcador, corante), foram analisadas amostras com variação do teor de 0 a 10% de água, com o intuito de averiguar os parâmetros analíticos para cada uma das técnicas espectroscópicas. A Figura 34 mostra as retas ajustadas, para as intensidades dos sinais ópticos para o intervalo de A0 a A10.



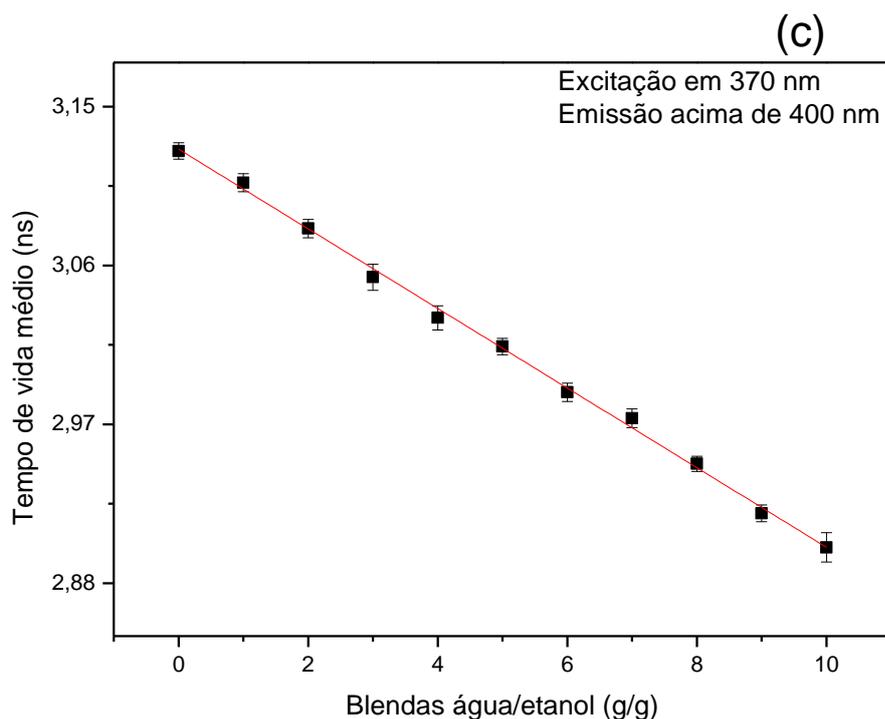


Figura 34: Retas ajustadas para variação das intensidades ópticas obtidas em função das misturas água/etanol (a) usando absorção UV-Vis. (b) usando a espectroscopia de fluorescência. (c) Usando o tempo de vida de fluorescência.

As equações das retas ajustadas para Absorção UV-Vis, fluorescência e tempo de vida de fluorescência são respectivamente,

$$I_A (Ax) = (0,0056 \pm 0,0004)Ax + (0,5173 \pm 0,0003). \quad (51)$$

$$I_F (Ax) = (-9,4586 \pm 0,0913)Ax + (814,5640 \pm 0,5575). \quad (52)$$

$$\tau (Ax) = (-0,0225 \pm 0,0003)Ax + (3,1258 \pm 0,0018). \quad (53)$$

Os parâmetros analíticos são ilustrados na Tabela 2, onde σ_β erro padrão do coeficiente linear da reta ajustada, e α é o valor do coeficiente angular curva analítica.

Os limites de detecção e quantificação são determinados respectivamente, $LD = \frac{3\sigma_\beta}{\alpha}$ e $LQ = \frac{10\sigma_\beta}{\alpha}$ [97]. Sendo R^2 é o coeficiente de correlação linear.

Tabela 2: Parâmetros analíticos

Parâmetros	UV-Vis (I_A)	Fluorescência (I_F)	Tempo de vida (τ)
α	0,0056	9,4587	0,0236
σ_β	0,0003	0,5574	0,0032
R^2	0,9993	0,9991	0,9989
LD %(g/g)	0,1481	0,1768	0,4118
LQ %(g/g)	0,4937	0,5893	1,3728

Além das curvas analíticas obtidas das intensidades de absorção, emissão e tempo de vida de fluorescência, foi feito também as curvas analíticas que relacionam os comprimentos de onda de maior intensidade tanto de absorção quanto de emissão em função da concentração água/etanol, a Figura 28 mostra que há um deslocamento no pico de maior intensidade na absorção e de emissão com a variação do teor de água presente nas misturas. A figura 35 ilustra as restas ajustada para esses efeitos de variação do comprimento de onda (absorção e emissão) e a Tabela 3 contém os parâmetros analíticos das curvas.

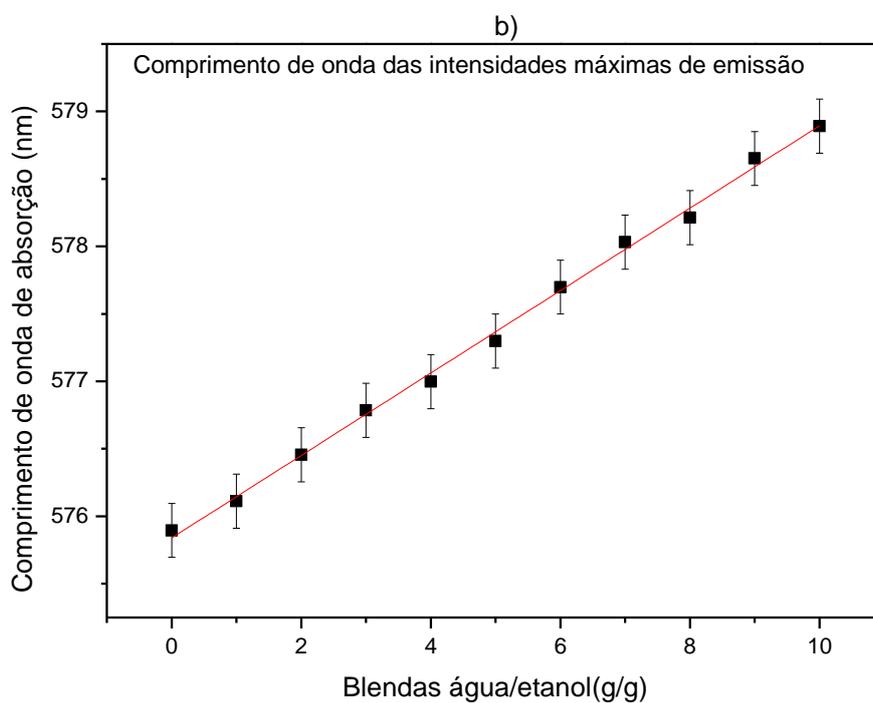
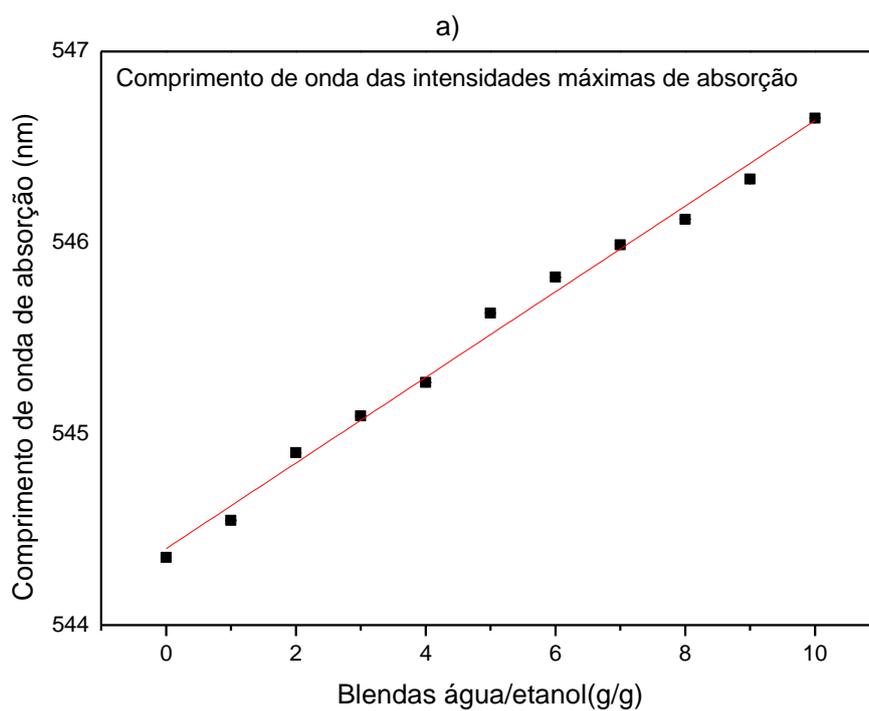


Figura 35: Retas ajustadas entre o comprimentos de onda de maior intensidade em função das misturas água/etanol. (a) comprimento de onda de absorção em função das misturas água/etanol (b) Comprimento de onda de emissão em função das misturas água/etanol.

Tabela 3: Parâmetros analíticos das curvas de calibração entre comprimento de onda de máxima intensidade e as misturas água/etanol

Parâmetros	UV-Vis	Fluorescência
α	0,2239	0,3054
σ_{β}	0,038	0,0304
R^2	0,9914	0,9971
LD %(<i>g/g</i>)	0,5091	0,2982
LQ %(<i>g/g</i>)	1,6973	0,9954

A partir das curvas de calibração das Figuras 34 e 35, foi aplicado um procedimento de quantificação para predizer a relação da concentração de água na mistura água/etanol. Foi utilizada a validação cruzada “leave-one-out”. A análise consistiu em retirar uma amostra do conjunto de calibração e utilizá-la para testar o modelo de quantificação. Neste caso, uma correlação linear entre a intensidade da técnica óptica (absorbância, intensidade de fluorescência ou tempo de vida da fluorescência) e o valor de referência da mistura é obtida para as amostras "n-1" restantes, usando a equação,

$$I_{opt} = \alpha WE + \beta \quad (54)$$

Onde α e β são os coeficientes angulares e lineares do ajuste linear, “WE” é o valor da razão para a mistura de água/etanol e I_{opt} é o valor retornado da técnica óptica usada. O próximo passo foi isolar o “WE” da equação (54) e usar o valor I_{opt} da amostra retirada para prever a relação água/etanol nessa amostra, de acordo com a equação,

$$(WE)_{pred} = \frac{I_{opt} - \beta}{\alpha} \quad (55)$$

onde $(WE)_{pred}$ é o valor previsto para a mistura retirada pela calibração das amostras “n-1”. O valor de $(WE)_{pred}$ é então comparado ao valor de referência da mistura e um erro percentual absoluto é obtido, de acordo com a equação,

$$E_{pred} = \left| \frac{(WE)_{pred} - WE}{WE} \right| \times 100 \quad (56)$$

Este processo é repetido para todas as amostras com WE acima do LQ . A amostra com o maior valor de WE (amostra A10) também foi excluída do teste de quantificação porque está fora da faixa da curva de calibração com as amostras "n-1". Para avaliar as técnicas, calculou-se o valor médio de E_{pred} para todas as amostras testadas, retornando o erro médio de quantificação da técnica. Neste experimento, o erro médio foi de 1,4% (absorção), 1,5% (intensidade de fluorescência) e 4,4% (tempo de vida de fluorescência). Os gráficos de quantificação relacionando os valores previstos e de referência são apresentados na Figura 36 e 37.

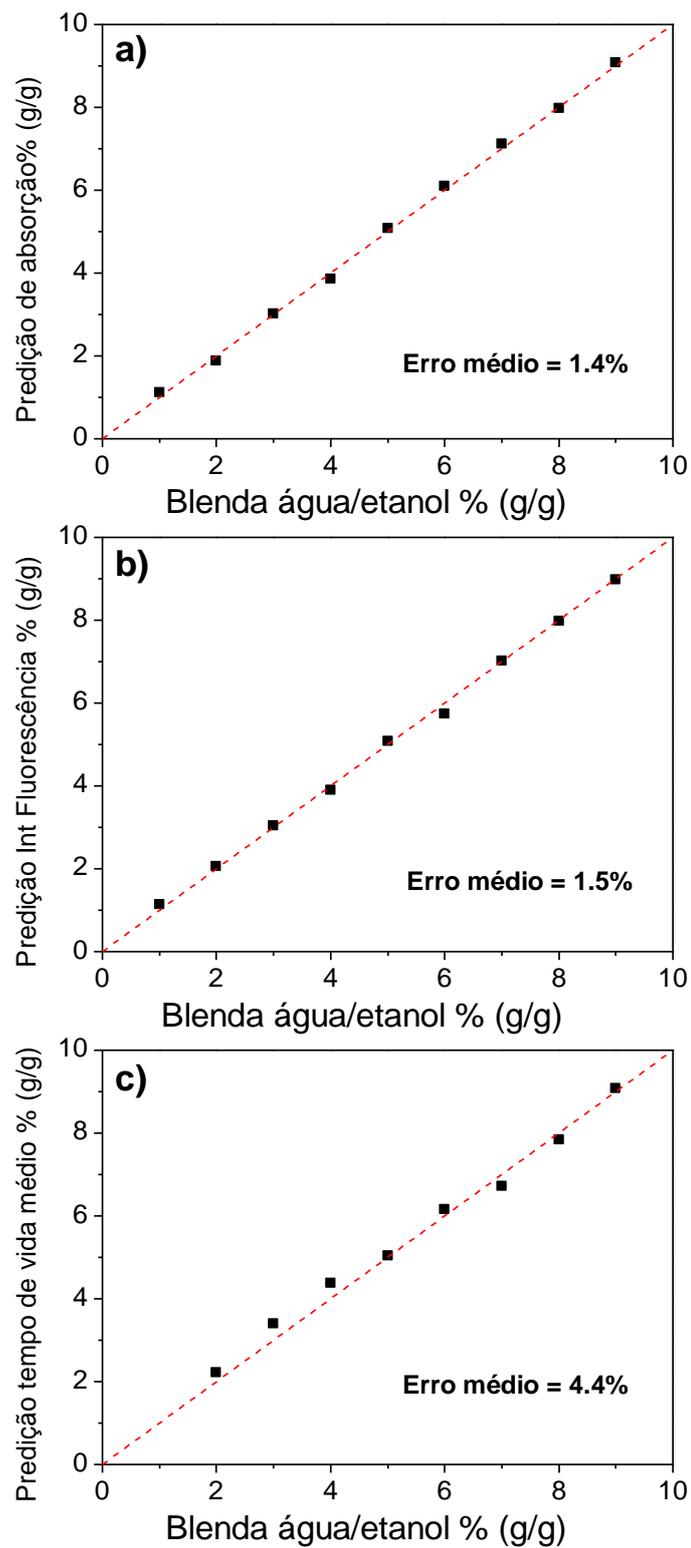


Figura 36: Valor previsto da mistura água/etanol % (g/g). (a) Absorção de UV-VIS (absorbância a 550 nm). (b) intensidade de fluorescência a 576 nm (excitação a 550 nm). (c) tempo de vida médio de emissão de fluorescência superior a 400 nm e excitação 370 nm.

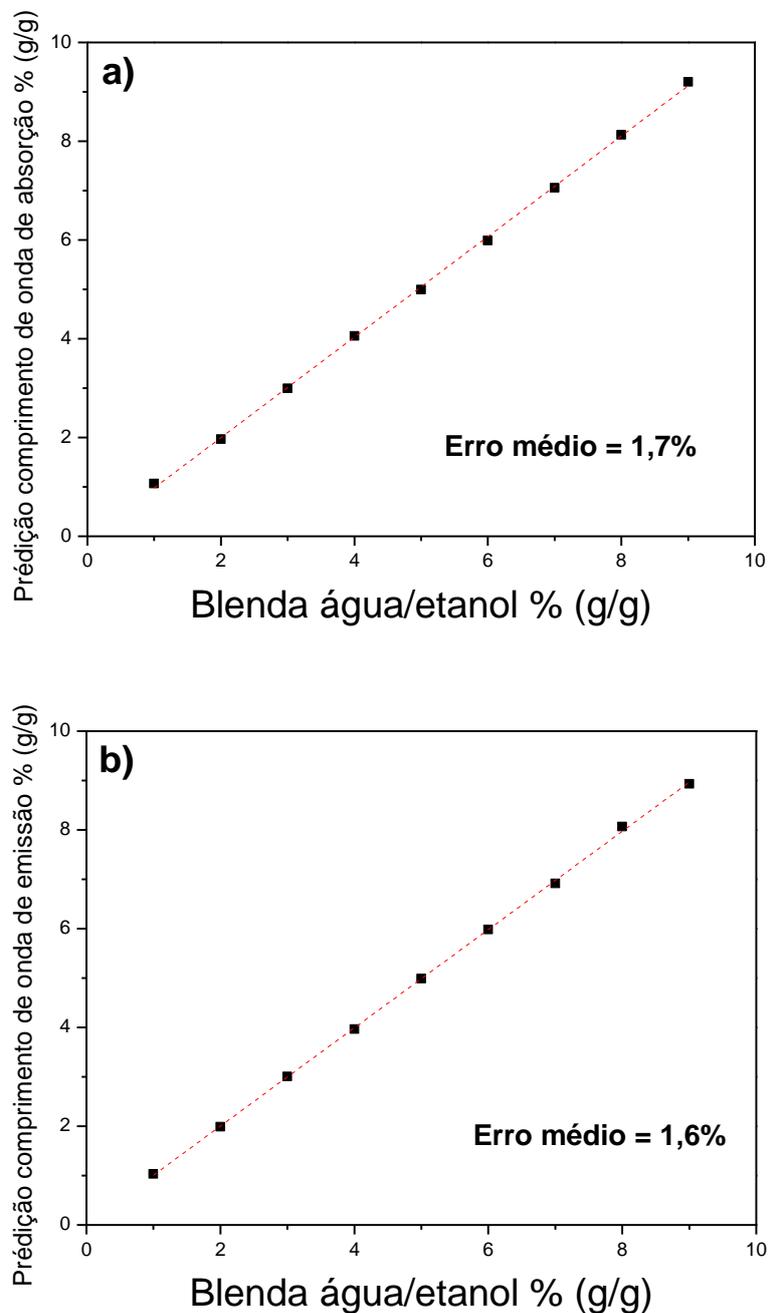


Figura 37: Valor previsto da mistura água/etanol % (g/g). (a) Comprimento de onda de absorção de maior intensidade. (b) Comprimento de onda de emissão de maior intensidade.

Os baixos erros médios de quantificação da água nas misturas relação água/etanol obtidos pelas técnicas ópticas propostas destacam o grande potencial deste protocolo para aplicações. Os parâmetros das curvas analíticas das técnicas de absorção UV-Vis, fluorescência e tempo de vida, fornecem valores de limites de quantificação de água em

etanol que satisfatórios para a aplicação em etanol combustível, a concentração máxima de água permitida é de 7,4% (% massa). Todas as técnicas mencionadas detectam valores de concentração de água menores que a metade do valor máximo requerido.

As vantagens das técnicas espectroscópicas são a possibilidade de dispositivos óticos que permitam um monitoramento contínuo em um posto de abastecimento, o preparo de a amostra ser um procedimento rápido, o resultado ser imediato, a quantidade de solvente envolvida para analisar uma amostra de etanol combustível é baixa. A espectroscopia de fluorescência pode ser usada para o monitoramento on-line e in situ, pois pode fornecer análises precisas, rápidas e de baixo custo usando dispositivos portáteis.

5.5 Determinação de água em amostras de etanol contaminadas

Após a obtenção das curvas analíticas para, absorção UV-Vis, fluorescência e tempo de vida, foi usado o método de recuperação aparente para amostras de etanol contaminada com água na presença da rodamina B. Preparou se três amostras de etanol contaminadas com água nas seguintes proporções (2,5; 5,5; 8,5)% água/etanol. Cada amostra foi preparada em triplicata e, em seguida foram realizadas as medidas das técnicas espectroscópicas. Os resultados do teste de recuperação são ilustrados nas Tabelas 3,4 e 5 apresentam os dados de recuperação das amostras.

Tabela 4: Resultados obtidos pelo teste de recuperação de amostra usando a absorção UV-Vis

Técnica	Concentração preparada (g/g)%	Valor encontrado (g/g)%	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
	2,5	2,54 ± 0,06	101,6	1,6
Absorção UV-Vis	5,5	5,49 ± 0,08	99,8	0,2
	8,5	8,51 ± 0,01	100,1	0,1

Tabela 5: Resultados obtidos pelo teste de recuperação de amostra usando a espectroscopia de fluorescência

Técnica	Concentração preparada (g/g)%	Valor encontrado (g/g)%	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
	2,5	2,54 ± 0,05	101,6	1,6
Fluorescência	5,5	5,48 ± 0,01	99,6	0,4
	8,5	8,49 ± 0,01	99,9	0,1

Tabela 6: Resultados obtidos pelo teste de recuperação de amostra usando o tempo de vida de fluorescência

Técnica	Concentração preparada (g/g)%	Valor encontrado (g/g)%	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
	2,5	2,46 ± 0,04	98,4	1,6
Tempo de vida	5,5	5,51 ± 0,05	100,2	0,2
	8,5	8,49 ± 0,01	99,9	0,1

É possível observar que a recuperação tem um valor mais próximo do real para amostras com concentrações maiores de água. Assim como o erro relativo é maior para as amostras onde o teor de água é menor. Esses efeitos são verificados para as três técnicas espectroscópicas em questão. É verificada a eficácia das técnicas para quantificação de água em misturas de água/etanol.

Conclusões

Através espectroscopia molecular de absorção UV-Vis juntamente com a fluorescência e tempo de vida de fluorescência, foi possível caracterizar as misturas de água/etanol na presença da rodamina B. Foi observado deslocamento das bandas de emissão e absorção e também variação nos decaimento radiativo das amostras, tais efeitos ocasionados pela variação do teor de água nas misturas.

Foi detectado também que há uma relação linear entre o teor de água presente nas amostras e os sinais ópticos de absorção, fluorescência e tempo de vida de fluorescência. Especificamente nas concentrações entre 0 e 10%. Foram determinados os limites de quantificação e de detecção, juntamente com as curvas analíticas para cada técnica óptica específica. A espectroscopia de absorção UV-Vis apresentou o menor limite de quantificação dentre as três técnicas usadas no trabalho.

A análise utilizada de validação cruzada “leave-one-out” indicou que a técnica de tempo de vida de fluorescência tem um maior erro médio, enquanto que a espectroscopia de absorção UV-Vis indica um menor erro médio, Essa análise fornece uma predição sobre a confiabilidade das curvas analíticas. A partir do método de adição e recuperação de amostra foi possível verificar a eficiência da metodologia proposta no trabalho, as amostras testadas em três níveis, baixa, média e alta concentração de água nas misturas permitiu determinar o erro relativo da quantidade de água presente na amostra de etanol.

Os resultados apresentados mostram a potencialidade das técnicas espectroscópicas para quantificação de contaminação de água em amostras de etanol. O intervalo de percentual de massa de água analisado, de 0 a 10%, está dentro dos valores normativos estabelecidos pela ANP. As técnicas que foram utilizadas neste trabalho podem ser empregadas como ferramentas de auxílio para identificar e quantificar resíduos de água em etanol combustível.

Referências

- [1]. EPE. Empresa de Pesquisa Energética. Balanço energético nacional-2015. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2015.pdf>. Acesso em: março de 2018.
- [2] ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. Resolução ANP nº 19 de 09 de Abril de 2015. Disponível: <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2015/abril/ranp%2019%20-%202015.xml> Acesso em: março de 2018.
- [3] ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. Resolução ANP nº 30 de 29 de junho de 2015. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2015/junho/ranp%2030%20-%202015.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2015/junho/ranp%2030%20-%202015.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)>. Acesso em: março de 2018.
- [4] JURÍDICOS., B.-P. D. R.-C. C.-S. P. A. Lei nº 13,033 de 24 de setembro de 2014. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm#art4>. Acesso em: março de 2018.
- [5] ANP- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. Consumo de combustíveis no Brasil subiu 0,4% na comparação entre 2017 e 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/noticias/4334-consumo-de-combustiveis-no-brasil-subiu-0-4-na-comparacao-entre-2017-e-2016>>. Acesso em: março 2018.
- [6] CORADIN, F. K. et al. Etched fiber bragg gratings sensors for water-ethanol mixtures: a comparative study. *Journal of Microwaves, Optoelectronics and Electromagnetic Applications*, v. 9, issue 2, p. 131-143, 2010.
- [7] BRUTTEL, P.; SCHLINK, R. *Water Determination by Karl Fischer Titration*. Herisau, Switzerland: Metrohm, 2003. passim.
- [8] CHAGAS, I. P. Desenvolvimento de um fotômetro portátil NIR para determinação do teor de água no álcool combustível e do teor de etanol na gasolina. 2006. 151 f (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- [9] SILVA, A. C. et al. Detection of adulteration in hydrated ethyl alcohol fuel using infrared spectroscopy and supervised pattern recognition methods. *Talanta*, v. 93, p. 129-134, 2012.
- [10] MENDES, L. S. et al. Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries. *Analytica Chimica Acta*, v. 493, issue 2, p. 219-231, 2003.

- [11] NOMEN, R.; SEMPERE, J.; AVILES, K. Detection and characterisation of water alcohol hydrates by on-line FTIR using multivariate data analysis. *Chemical Engineering Science*, v. 56, issue 23, p. 6577-6588, 2011.
- [12] SRIVASTAVA, S. K.; VERMA, R.; GUPTA, B. D. Surface plasmon resonance based fiber optic sensor for the detection of low water content in ethanol. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 153, issue 1, p. 194-198, 2011.
- [13] PEREIRA, P. F. et al. Simultaneous determination of ethanol and methanol in fuel ethanol using cyclic voltammetry. *Fuel*, v. 103, p. 725-729, 2013.
- [14] WIJAYA, Y. N.; KIM, J.; HUR, S. H.; PARK, S. H.; KIM, M. H. Metal nanocrystal-based sensing platform for the quantification of water in water-ethanol mixtures. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 263, p. 59–68, 15 june 2018.
- [15] MIDDELBURG, L. M.; DE GRAAF, G.; BOSSCHE, A.; BASTEMEIJER, J.; GHADERI, M.; WOLFFENBUTTEL, F. S.; WOLFFENBUTTEL, R. F. Multi-domain spectroscopy for composition measurement of water-containing bio-ethanol fuel. *Fuel Processing Technology*, v. 167, p. 127–135, 1 dec. 2017.
- [16] OMIDO, C. R.; OLIVEIRA, S. L.; SHIRAIISHI, R. S.; MAGALHÃES, K. F.; FERREIRA, V. S.; DE CARVALHO, A. A.; PAULA, M. H. Quantification of water in ethanol using a photothermal transparent transducer. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 178, p. 581–585 1 mar. 2013.
- [17] SOUZA, A. C.; ARISTONE, F.; CAPITANIO, R. A.; DE PAULA, M. H. Quantification of water content in water–ethanol solutions using photothermal transparent transducer method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 226, p. 495–499, 2016.
- [18] DE QUEIROZ, D. P.; FLORENTINO, A. O.; BRUNO, J. C.; DA SILVA, J. H. D.; RIUL, A.; GIACOMETTI, J. A. The use of an e-tongue for discriminating ethanol/water mixtures and determination of their water content. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 230, p. 566–570, 2016.
- [18] GUPTA, R. B.; DEMIRBAS, A. *Gasoline, Diesel, and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants*. Cambridge University Press, 2010. Passim.
- [19] WAKISAKA, A.; MATSUURA, K.; URANAGA, M.; SEKIMOTO, T.; TAKAHASHI, M. Azeotropy of alcohol-water mixtures from the viewpoint of cluster-level structures. *Journal of Molecular Liquids*, v. 160, issue 2, p. 103-108, 1 may 2011.
- [20] WAKISAKA, A.; MATSUURA, K. Microheterogeneity of ethanol-water binary mixtures observed at the cluster level. *Journal of Molecular Liquids*, v. 129, issue 1-2, p. 25-32, 2006.
- [21] SPELLMAN, F. R. *The Science of Water: Concepts and Applications*, Second Edition. Taylor & Francis, 2000. passim.

- [22] SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. Organic Chemistry. USA: John Wiley & Sons, 2009. passim.
- [23] ÚNICA- União da indústria de cana de açúcar. Desenvolvimento sustentável. Caderno Agronalyis, maio 2017.
- [24] LEITE, R.C; CORTEZ, L. A.B.C. O etanol combustível no Brasil. Bicombustíveis no Brasil: realidade e perspectivas, p. 61-75. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol3_000g7gq2cz702wx5ok0wtedt3xdrmfk.pdf>. Acesso em: agosto de 2018.
- [25] SHIKIDA, Pery Francisco Assis; PEROSA, Bruno Benzaquen. Álcool combustível no Brasil e path dependence. Rev. Econ. Sociol. Rural, Brasília, v. 50, n. 2, p. 243-262, june 2012.
- [26] CRUZ, M. G; GUERREIRO, E; RAIHER. A. P. A evolução da produção de etanol no Brasil, no período 1974 a 2009. Documentos técnicos-científicos, v. 43, n. 04, p. 141-159, out./dez. 2012. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/projwebren/Exec/artigoRenPDF.aspx?cd_artigo_ren=1342. Acesso em: dezembro de 2018.
- [27] ZEB, H.; CHOI, J.; KIM, Y.; KIM, J. A new role of supercritical ethanol in macroalgae liquefaction (*Saccharina japonica*): Understanding ethanol participation, yield, and energy efficiency. Energy, v. 118, p. 116–126, 1 jan. 2017. doi:10.1016/j.energy.2016.12.016
- [28] TOBIN, P.; SCHMIDT, N. M.; TOSUN, J.; BURNS, C. Mapping states' Paris climate pledges: Analysing targets and groups at COP 21. Global Environmental Change, v. 48, p. 11–21, 2018.
- [29] DE SOUZA, N. R. D.; FRACAROLLI, J. A.; JUNQUEIRA, T. L.; CHAGAS, M. F.; CARDOSO, T. F.; WATANABE, M. D. B.; CAVALETT, O.; VENZKE FILHO, S. P.; DALE, B. E.; BONOMI, A.; CORTEZ, L. A. B. Sugarcane ethanol and beef cattle integration in Brazil. Biomass and Bioenergy, v. 120, p. 448-457, 2019.
- [30] SAKTHIVEL, P., SUBRAMANIAN, K. A.; MATHAI, R. Comparative studies on combustion, performance and emission characteristics of a two-wheeler with gasoline and 30% ethanol-gasoline blend using chassis dynamometer. Applied Thermal Engineering, v. 146, p. 726-737, 2018.
- [31] CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D. B.; BONOMI, A. Environmental impacts of technology learning curve for cellulosic ethanol in Brazil. Industrial Crops and Products, v. 106, p. 31–39, 1 nov. 2017.
- [32] GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; PADILHA, C. E. A.; DOS SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. Journal of Environmental Management, v. 234, p. 44–51, 15 mar. 2019.

- [33] PAINTER, J.; KRISTIANSEN, S.; SCHÄFER, M. S. How “Digital-born” media cover climate change in comparison to legacy media: A case study of the COP 21 summit in Paris. *Global Environmental Change*, v. 48, p. 1–10, jan. 2018. doi:10.1016/j.gloenvcha.2017.11.003
- [34] BRACKO, S.; SPAN, J. Anionic dye-cationic surfactant interactions in water-ethanol mixed solvent. *Dyes and Pigments*, v. 50, issue 1, p. 77-84, july 2001.
- [35] BRANCO, S. M. *Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária*. 2. ed. São Paulo: CETESB, 1987.
- [36] ROCHA, W. R. Interações Intermoleculares. *Cadernos Temáticas de Química Nova na Escola*, n. 4, p. 31-36, maio 2001.
- [37] KUOVACKII, J. R. R.; LEME, R. C. B. Os usos da água no Brasil: uma proposta de educação ambiental como subsídio ao consumo racional dos recursos hídricos. Paraná: *Cadernos PDE*, 2009. v. 1.
- [38] FERNANDES, C. V. Avaliação do método de adição de padrão aliado a uma câmara fototérmica para a quantificação de água em etanol. 2016. (Dissertação de mestrado). Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.
- [39] HERMAN, B; FROHLICH, V.E.C; LAKOWICZ, J.R; MURPHY, D.B.; SPRING, K.R.; DAVIDSON, M. W. D. *Fluorescence microscopy– Basic Concepts in Fluorescence. Molecular Expressions - Optical Microscopy Primer*, 2015.
- [40] ATKINS, P. W.; JONES, L. *Chemical Principles: The Quest for Insight*. USA: W.H. Freeman, 2010. passim.
- [41] CASTELLAN, G. W. *Fundamentos de fisico-química*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1986. passim.
- [42] CUIPING, B.; XIANFENG, X.; WENQI, G.; DEXIN, F.; ZHONGXUE, G.; NIAN, X. Removal of Rhodamine B by ozone-based advanced oxidation process. *Desalination*, v. 278, issue 1-3, p. 84-90, 1 sept. 2011.
- [43] JIN, X.; WANG, S.; YIN, W.; XU, T.; JIANG, Y.; LIAO, Q.; XIA, X.; LIU, J. A highly sensitive and selective fluorescence chemosensor for Fe³⁺ based on rhodamine and its application in vivo imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v.247, p. 461-468, 2017.
- [44] WU, J.; YE, Z.; WU, F.; WANG, H.; ZENG, L.; BAO, G.-M. A rhodamine-based fluorescent probe for colorimetric and fluorescence lighting-up determination of toxic thiophenols in environmental water and living cells. *Talanta*, v. 181. p. 239-247, 1 may 2018.
- [45] LIU, K.; GUO, P.; LIU, L.; SHI, X. Fluorescence enhancement of a novel pyrazine coupled rhodamine derivative for the paramagnetic CO₂⁺ detection. *Sensors and Actuators. B Chemical*, v.250, p. 667-672, apr. 2017.

- [46] TANTIPANJAPORN, A.; PRABPAI, S.; SUKSEN, K.; KONGSAEREE, P. A thiourea-appended rhodamine chemodosimeter for mercury (II) and its bioimaging application. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 192, p.101-107, 5 mar. 2018.
- [47] HUANG, K.; JIAO, X.; LIU, C.; WANG, Q.; QIU, X.; HE, S.; ZHAO, L.; ZENG, X. Synthesis of a novel π -extended hybrid rhodamine dye with far-red fluorescence emission and its application in bioimaging. *Dyes and Pigments*, v.145, p.561-569, oct. 2017.
- [48] BARZAN, M.; HAJIESMAEILBAIGI, F. Investigation the concentration effect on the absorption and fluorescence properties of Rhodamine 6G dye. *Optik*, v.159, p.157-161, apr. 2018.
- [49] SCRAMIM, S.; CHAIM, A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L.; PAVAN, L. A.; ALVARENGA, N. Avaliação de bicos de pulverização de agrotóxicos na cultura de algodão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 12, p. 43-50, jan./dez. 2002.
- [50] FONTOURA, J. A. S.; NIENCHESKI, L. F. H. Metodologia para traçador fluorescente “rodamina B” no estudo da dispersão superficial adaptada para aplicação no estuário da lagoa dos Patos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 8, n. 3, p. 105-116, jul./set. 2003.
- [51] SABZEHPARVAR, F., CHERATI, T. R., MOHSENIFAR, A., SHOJAEI, T. R., & TABATABAEI, M. Immobilization of gold nanoparticles with rhodamine to enhance the fluorescence resonance energy transfer between quantum dots and rhodamine, new method for downstream sensing of infectious bursal disease virus. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 212, p. 173-179, 2018.
- [52] LIU, Y.; LEE, D.; WU, D.; SWAMY, K. M. K.; YOON, J. A new kind of rhodamine-based fluorescence turn-on probe for monitoring ATP in mitochondria. *Sensors and Actuators B Chemical*, v. 265, p. 429–434, 15 July 2018.
- [53] OHTANI, S.; FUJITA, S.; HASEGAWA, K.; TSUDA, H.; TONOIGI, M.; KOBAYASHI, M. Relationship between the fluorescence intensity of rhodamine-labeled orexin A and the calcium responses in cortical neurons: An in vivo two-photon calcium imaging study. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 138, issue 1, p. 76-82, sept. 2018.
- [54] SHEN, S.L.; HUANG, X.-Q.; JIANG, H.-L.; LIN, X.-H.; CAO, X.-Q. A rhodamine B-based probe for the detection of HOCl in lysosomes. *Analytica Chimica Acta*, v. 1046, p. 185-191, 2018.
- [55] DAVIES, K. S.; LINDER, M. K.; KRYMAN, M. W.; DETTY, M. R. Extended rhodamine photosensitizers for photodynamic therapy of cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 24, issue 17, p. 3908–3917, 1 sept. 2016.

- [56] MA, W.; GE, X.; GUO, L.; ZHANG, S.; LI, J.; HE, X.; LIU, Z. Bichromophoric anticancer drug: Targeting lysosome with rhodamine modified cyclometalated Iridium (III) complexes. *Dyes and Pigments*, v. 162, p. 385-393, mar. 2018.
- [57] CUIPING, B.; WENQI, G.; DEXIN, F.; MO, Z.; SHAOHUA, C.; ZHONGXUE, G.; YANSHUI, Z. Natural graphite tailings as heterogeneous Fenton catalyst for the decolorization of Rhodamine B. *Chemical Engineering Journal*, v. 197, p. 306-313, 15 July 2012.
- [58] ARELOA, F.L.; OJEDA, P. R.; ARBELOA, I.L. Fluorescence self-quenching of the molecular forms of Rhodamine B in aqueous and ethanolic solutions. *Journal of Luminescence*, v. 44, issues 1-2, p. 105-112, sept./oct. 1989.
- [59] DOMINGUEZ, K.C.T. Emissão laser em meio espalhadores com ganho: estudos experimentais em soluções etanoicas e aquosas. 2009. (tese doutorado). Física, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PE.
- [60] ARELOA, F. L.; MARTINEZ, V.M; PEIETRO; J.B; ARBELOA I. L. Adsorption of rhodamine 3B dye on saponite colloidal particles in aqueous suspensions. *Langmuir*, v.18, no. 7, p. 2656-2664, 2002.
- [61] DOVICH, N.J.; MARTIN, J.C.; JETT, J.H.; TRKULA, M.; KELLER, R.A.; Laser-induced fluorescence of flowing samples as an approach to single-molecule detection in liquids. *Anal. Chem.*, v. 56, issue 3., p. 348 – 354, mar. 1984.
- [62] MENDHAM J., DENNEY R.C., BARNES J.D., THOMAS M.J.K. *Vogel – Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro – RJ: LTC Editora, 2002.
- [63] HOLLER, F. *Princípios de análise instrumental*/ F. James Holler, Douglas A. Skoog R. Crouch; Tradução Celio Pasquini. [et al]. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- [64] PAVIA, D.L; LAMPMAN, G.M; KRIZ, S. *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*. Mexico: Thomson Learning, 2001. 680 p.
- [65] KHAJEHZADEH, M.; SADEGHI, N. Molecular structure, the effect of solvent on UV–vis and NMR, FT–IR and FT–Raman spectra, NBO, frontier molecular orbital analysis of Mitomycin anticancer drug. *Journal of Molecular Liquids*, v. 256, p. 238–246, 15 Apr. 2018.
- [66] VALEUR, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
- [67] LAKOWICZ, J.R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 1: Techniques*. Edition Book, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2002. v. 1.
- [68] EISBERG, R.; RESNICK, R. *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1994. 928 p.
- [69] LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer: USA, 2006. 960 p.

- [70] SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Spectrometric Identification of Organic Compounds. USA: John Wiley & Sons, 2005. 550 p.
- [71] HOLLAS, J.M. Modern Spectroscopy. USA: John Wiley & Sons, 2004. 483 p.
- [72] DIAS, J.T. Espectroscopia Molecular: Fundamentos, Métodos e Aplicações Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. 162 p.
- [73] TECHNICAL MANUAL, flu-time 100. Compact Fluorescence Lifetime Spectrometer. Disponível em <<https://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-spectrometers/fluotime-100-compact-fluorescence-lifetime-spectrometer>>. Acesso em 22 de dezembro de 2018.
- [74] MAGDE, D; ROJAS, G. E; SEYBOLD, P. Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthenes Dyes. Photochemistry and Photobiology, v. 70, issue 5, p. 737-744. 1999;
- [75] ARBELOA, T. L. Características fotofísicas de colorantes de laser em disolución. 1993. Ph.D. Thesis. Universidad Del País Vasco.
- [76] ARBELOA, T. L.; ESTÉVEZ, M. J. T.; ARBELOA, F. L.; AGUIRRESA, I. U.; ARBELOA, I. L. Luminescence properties of rhodamines in water/ethanol mixtures, Journal of Luminescence, v. 48-49, p. 400-404, jan./feb. 1991.
- [77] ROTHENBERGER, G.; NEGUS, D. K.; HOCHSTRASSER, R. M. Solvent influence on photoisomerization dynamics. Journal of Chemical Physics, v. 79, issue 11, 1 dec. 1983.
- [78] VELSKO, S. P.; FLEMING, G. R. Photochemical Isomerization in Solution. Photophysics of Diphenyl Butadiene. Journal of Chemical Physics, v. 76, issue 7, 1 apr. 1982;
- [79] GROTE, R. F.; HYNES, J. T. The stable states picture of chemical reactions. II. Rate constants for condensed and gas phase reaction models. Journal of Chemical Physics, v. 73, issue 6, 15 sept. 1980.
- [80] ARBELOA F. L.; AGUIRRESACONA I. U.; ARBELOA, I. L. Influence of the molecular structure and the nature of the solvent on the absorption and fluorescence characteristics of rhodamines. Chemical Physics, v. 130, issue 1-3, p. 371-378, 1989.
- [81] ARBELOA, F. L.; ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. Solvent effect on photophysics of the molecular forms of rhodamine B. Solvation models and spectroscopic parameters. Chemical Physics Letters, v. 128, issue 5-6 p. 474-479, aug. 1986.

- [82] ARBELOA F. L.; ARBELOA, T. L.; ESTEVEZ, M. J. T.; ARBELOA, I. L. Photophysics of rhodamine: molecular structure and solvent effects. *Journal Physical Chemistry*, v. 95, issue, p. 2203-2208, mar. 1991.
- [83] ARBELOA, F. L.; ARBELOA, T. L.; LAJE, E. G.; ARBELOA, I. L.; DE SCHRYVER, F. C. Photophysical Properties of Rhodamines with Monoethylamino Groups R19 and R6G in Water/Ethanol Mixtures. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 56, issue 2-3, p. 313-321, 15 feb. 1991.
- [84] ARBELOA, F. L.; ARBELOA, T. L.; ARBELOA, I. L. Photophysics of amino-aromatic laser dyes. *Trends Photochem. Photobiol*, v. 3, issue 1, p. 145-155, 1994.
- [85] ARBELOA, F.L.; ARBELOA, T. L.; ARBELOA, I. L. Photophysical properties of laser dyes: correlations with the lasing characteristics. *Handbook of advanced electronic and photonic materials and devices*, edited by H.S Nalwa, v. 7: Liquid crystals, displays and lasaer materials (Academic Press, San Diego, 2001), p.209-245.
- [84] PIMENTEL, M. F; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química nova*, v. 19. p.268-277, 1996.
- [85] Skoog, DA; West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. ed. São Paulo: Thompson (Cengage), 2006.
- [86] HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- [87] NOMURA, C. S.; DA SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 104–113, 2008.
- [88] SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.
- [89] JURADO, J. M.; ALCÁZAR, A.; MUÑIZ-VALENCIA, R.; CEBALLOS-MAGAÑA, S. G.; RAPOSO, F. Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach. *Talanta*, v. 172, p. 221–229, 1 sept. 2017.
- [90] SHAO, J.; GUO, J.; WANG, L.; YING, C.; ZHOU, Z. Self-calibration methodology by normalized intensity for wavelength modulation spectroscopy measurement. *Optics Communications*, v. 336, p. 67–72, 1. feb. 2015.
- [91] VAROQUAUX, G.; RAAMANA, P. R.; ENGEMANN, D. A.; HOYOS-IDROBO, A.; SCHWARTZ, Y.; & THIRION, B. Assessing and tuning brain decoders: Cross-validation, caveats, and guidelines. *NeuroImage*, v. 145, p. 166–179, 15 jan. 2017.

- [92] WONG, T.-T. Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation. *Pattern Recognition*, v. 48, issue 9, p. 2839–2846, sept. 2015.
- [93] MENEGATTI, C. R.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G. S.; DA SILVA, O. A.; FILHO, H. J. I.; VILLAS BOAS, P. R.; MILORI, D. M. B. P. (2017). Semiquantitative analysis of mercury in landfill leachates using double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Optics*, v. 56, issue 13, p. 3730-3735, 1 may 2017.
- [94] CONCEIÇÃO, J. N.; MARANGONI, B. S.; MICHELS, F. S.; OLIVEIRA, I. P.; PASSOS, W. E.; TRINDADE, M. A. G.; CAIRES, A. R. L. Evaluation of molecular spectroscopy for predicting oxidative degradation of biodiesel and vegetable oil: Correlation analysis between acid value and UV–Vis absorbance and fluorescence. *Fuel Processing Technology*, v. 183, p. 1–7, jan. 2019.
- [95] KNIGHT, J.; TAYLOR, G. W.; KHADEMI, A. Voxel-Wise Logistic Regression and Leave-One-Source-Out Cross Validation for white matter hyperintensity segmentation. *Magnetic Resonance Imaging*, v. 54, p. 119-136, dec. 2018.
- [96] CAWLEY, G. C.; TALBOT, N. L. C. Efficient leave-one-out cross-validation of kernel fisher discriminant classifiers. *Pattern Recognition*, v. 36, issue 11, p. 2585–2592, nov. 2003.
- [97] FRANCO, M. A.; ARAÚJO, D. A. G.; OLIVEIRA, L. H., Trindade, M. A. G.; TAKEUCHI, R. M., & Santos, A. L. An amperometric FIA system with carrier recycling: an environmentally friendly approach for atenolol determination in pharmaceutical formulations. *Analytical Methods*, v. 48, p.8420–8426, 2016.