Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia – FACET Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA

Tese de Doutorado

Estudos sobre a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e biodiesel de girassol: monitoramento em tempo real via fluorescência e influência de nanopartículas de ouro

Flávio Santana Michels

Dourados/MS Abril/2018 Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia – FACET Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA

Flávio Santana Michels

# Estudos sobre a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e biodiesel de girassol: monitoramento em tempo real via fluorescência e influência de nanopartículas de ouro

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 Abril/2018

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M623e Michels, Flávio Santana

Estudos sobre a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e biodiesel de girassol: monitoramento em tempo real via fluorescência e influência de nanopartículas de ouro / Flávio Santana Michels -- Dourados: UFGD, 2018. 122f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Anderson Rodrigues Lima Caires

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados. Inclui bibliografia

1. Estabilidade oxidativa. 2. Monitoramento em tempo real. 3. Espectroscopia de fluorescência. 4. Nanopartículas de ouro. 5. Metal-enhanced fluorescence. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução 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: **"Estudos sobre a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e biodiesel de girassol: monitoramento em tempo real via fluorescência e influência de nanopartículas de ouro**", de autoria de Flávio Santana Michels, 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. Cauê Alves Martins Membro Examinador (UFGD)

Inon

Prof. Dr. Keurison Figueredo Magalhães Membro Examinador (UFMS)

Prof. Dr. Bruno Spolon Marangoni Membro examinador (UFMS)

Prof. Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos Membro Examinador (UFMS)

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

Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 16 de março de 2018.

#### Agradecimentos

Gostaria de agradecer à atenção e dedicação do Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.

Ao Prof. Dr. Evaristo A. Falcão pelo empréstimo do forno de alumínio maciço e do micro controlador de temperatura, utilizados nas análises de fluorescência em tempo real e *in situ*.

Ao Grupo de Espectroscopia e Bioinformática Aplicados a Biodiversidade e a Saúde através da Profa. Dr. Rita C. A. Guimarães pelo suporte necessário nas análises de cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos por ceder laboratório, equipamento e material para o processo de deposição das nanopartículas.

Ao Prof. Dr. Valter Aragão pelas medidas de ICP-OES de grande importância no trabalho.

À Giovanna Machado junto ao Laboratório de Microscopia e Microanálise no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, em Recife, pelas medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Grupo de Ótica Aplicada pelo suporte para o desenvolvimento da pesquisa em Dourados-MS.

Ao Prof. Dr. Magno A.G. Trindade pelo suporte às medidas de Rancimat® em Dourados-MS.

Ao Prof. Dr. Hebert Juliano Vieira pelo apoio às medidas de absorção UV-VIS em Dourados-MS.

Aos amigos e colegas de pesquisa que sempre ajudando nas mais diversas ocasiões Wilson Espindola Passos, Herbert Lee, Manoel Garcia, Tiago Tavares dos Santos, Neimar Vitor, Willian Falco, Alessandra Ramos, Cícera Maria, Juliete Lima, Eliene Santos, Guilherme Brum Laranjeira, Cristiane Rivarola, Deluana Martins, Genilson Silva, Nicele Pimentel, Simone Bittencourt, entre outros...

Aos amigos e colegas de trabalho Paulo Renato Espindola e Álvaro Junior.

Aos membros da banca de qualificação Heberton Wender Luiz dos Santos, Bruno Spolon Marangoni e Keurison Figueiredo Magalhães pelas discussões, correções e sugestões apresentadas.

### Lista de Figuras

| Figura 1: Esquema geral para reação de transesterificação contendo principais componentes do óleo vegetal e biodiesel   |
|---|
| Figura 2: Alguns antioxidantes naturais frequentemente encontrados em óleos vegetais e respectivos biodieseis   |
| Figura 3: Esquema ilustrativo das principais partes constituintes de um equipamento Rancimat <sup>®</sup> 12  |
| Figura 4: Curvas distintas de condutividade, a) utilizando método das tangentes para determinação do período de indução, e b) determinado fazendo uso da segunda derivada13 |
| Figura 5: Esquema geral para oxidação de ácidos graxos contendo etapas de Iniciação,<br>Propagação e Término, formação de peróxidos e hidroperóxidos14                      |
| Figura 6: Esquema lateral de câmara de deposição por <i>sputtering</i> 17   |
| Figura 7: Esquema da interação de NPs metálicas com a componente do campo elétrico da luz   |
| Figura 8: Espectro eletromagnético, em destaque a faixa visível ao olho humano, contendo ainda detalhes das frequências e comprimentos de onda22                            |
| Figura 9: Primeiros dois níveis eletrônicos de menor energia de uma molécula genérica juntamente com seus respectivos desdoramentos em níveis vibracionais e rotacionais    |
| Figura 10: Orbitais moleculares ligante e antiligande formados em uma ligação quimica de dois átomos iguais   |
| Figura 11: Representação energética dos orbitais ligante e antiligante para ligações do tipo 1s-<br>1s e $2p_x$ - $2p_x$  |
| Figura 12: Representação energética dos orbitais ligante e antiligante para ligações do tipo $2p_y - 2p_z$  |
| Figura-13: Orbitais moleculares em escala crescente de energia e possíveis transições eletrônicas   |
| Figura 14: Diagrama de Jablonski ilustrando possíveis transições entre os níveis eletrônicos e vibracionais   |
| Figura 15: Esquema para os diferentes modos de medida do tempo de vida de fluorescência, pulsada e por modulação de fase  |
| Figura 16: Perfis de decaimento de intensidade de fluorescência pulsada32   |
| Figura 17: Mudança na coloração de solução contendo Au NPs de diferentes tamanhos diluídas em citrato de sódio  |

Figura 20: Esquema explicativo da variação de temperatura submetida às amostras em forma de rampas de temperatura, aquecimento e resfriamento......40

Figura 35: Intensidade de fluorescência do óleo de girassol em 510 nm normalizada em função do tempo de degradação, obtida excitando em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>......61

Figura 39: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do óleo de girassol em 510 nm para 6% da amostra interagindo com o feixe de excitação utilizando dois valores para a intensidade do feixe ( $\Box$ )19,1 mW.cm<sup>-2</sup> e ( $\bullet$ ) 0,6 mW.cm<sup>-2</sup>......65

Figura 40: Índice de acidez, em a), e razão entre as absorbâncias 232 e 270 nm, em b), do óleo de girassol para diferentes volumes de interação entre a fonte de excitação e a amostra (6, 12,

Figura 46: Concentração de Au encontrada nas amostras de óleo vegetal e biodiesel de girassol para diferentes tempos de deposição.....70

### Lista de Tabelas

| Tabela-1: Distribuição em gramas de $\alpha$ , $\beta+\gamma$ e $\delta$ tocoferóis e tocoferóis totais em alguns óleo vegetais, para cada 100 g de óleo [44] | )s<br>.7 |
|---|----------|
| Tabela-2: Características de qualidade de óleos vegetais refinados [48]   | .8       |
| Tabela-3: Características de Identidade dos óleos vegetais refinados [48]   | .9       |
| Tabela-4: Especificações do Biodiesel [38]1   | 0        |
| Tabela-5: Programa de aquecimento utilizado para digerir4   | 15       |
| Tabela-6: Perfil de ésteres metílicos do óleo de girassol4  | 17       |
| Tabela-7: Concentração de Au encontrada nas amostras de óleo vegetal e biodiesel juntament<br>com precisão para diferentes tempos de deposição6               | te<br>59 |

### Lista de abreviaturas

| NPs             | Nanopartículas  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------|---|--|--|--|--|--|--|--|
| ABNT            | Associação Brasileira de Normas Técnicas                    |  |  |  |  |  |  |  |
| ANP             | Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |  |  |  |  |  |  |  |
| ANVISA          | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                    |  |  |  |  |  |  |  |
| ASTM            | American Society for Testing and Materials                  |  |  |  |  |  |  |  |
| AuNPs           | Nanopartículas de ouro                                      |  |  |  |  |  |  |  |
| BF <sub>3</sub> | Trifluoreto de boro   |  |  |  |  |  |  |  |
| BHA             | 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol                          |  |  |  |  |  |  |  |
| CETENE          | Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste              |  |  |  |  |  |  |  |
| CID             | Charge Injection Device                                     |  |  |  |  |  |  |  |
|                 | (Dispositivo de injeção de carga)                           |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>G</b> 10     |   |  |  |  |  |  |  |  |
| CIS             | Cruzamento intersistema                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| CI              | Conversão Interna   |  |  |  |  |  |  |  |
| CH <sub>3</sub> | Grupo Metila  |  |  |  |  |  |  |  |
| СНО             | Carbonila   |  |  |  |  |  |  |  |
| $CO_2$          | Dióxido de carbono  |  |  |  |  |  |  |  |
| CO              | Monóxido de carbono   |  |  |  |  |  |  |  |
| DNA             | Ácido Desoxirribonucleico                                   |  |  |  |  |  |  |  |
| EF              | Espectroscopia de Fluorescência                             |  |  |  |  |  |  |  |
| EN              | European Norm   |  |  |  |  |  |  |  |
|                 | (Norma Europeia)  |  |  |  |  |  |  |  |
| FAME            | Eatty Acid Mothy Ester                                      |  |  |  |  |  |  |  |
| TAN             | (Fotor motilize de écide grave)                             |  |  |  |  |  |  |  |
|                 | (Ester methico de acido graxo)                              |  |  |  |  |  |  |  |
| НОМО            | Highest Occupied Molecular Orbital                          |  |  |  |  |  |  |  |
|                 | (Orbital molecular ocupado de maior energia)                |  |  |  |  |  |  |  |
| HPLC            | High performance liquid chromatography                      |  |  |  |  |  |  |  |
| -               | (Cromatografia líquida de alta performace)                  |  |  |  |  |  |  |  |
|                 |   |  |  |  |  |  |  |  |

| ICP/OES                         | Inductively Coupled Plama Optical Emission Spectrometry                |  |  |  |  |  |  |
|---------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
|                                 | (Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente=e) |  |  |  |  |  |  |
|                                 |  |  |  |  |  |  |  |
| ISSO                            | International Organisation for Standardisation                         |  |  |  |  |  |  |
| КОН                             | Hidróxido de potássio  |  |  |  |  |  |  |
| LAMM                            | Laboratório de Microscopia e Microanálise                              |  |  |  |  |  |  |
| LED                             | Light Emitting Diode   |  |  |  |  |  |  |
|                                 | (Diodo emissor de luz)   |  |  |  |  |  |  |
|                                 |  |  |  |  |  |  |  |
| LUMO                            | Lowest Unoccupied Molecular Orbital                                    |  |  |  |  |  |  |
|                                 | (Orbital molecular não ocupado de menor energia)                       |  |  |  |  |  |  |
| MEE                             |  |  |  |  |  |  |  |
| MEF                             | Metal-Ennancea Fluorescence  |  |  |  |  |  |  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sulfato de sódio   |  |  |  |  |  |  |
| OH                              | Hidroxila  |  |  |  |  |  |  |
| OIS                             | Oil Stability Index  |  |  |  |  |  |  |
|                                 | (Índice de estabilidade do óleo)                                       |  |  |  |  |  |  |
|                                 |  |  |  |  |  |  |  |
| PA                              | Para análise   |  |  |  |  |  |  |
| PI                              | Período de Indução   |  |  |  |  |  |  |
| PTFE                            | Politetrafluoretileno - Teflon   |  |  |  |  |  |  |
| SO <sub>X</sub>                 | Óxido de enxofre   |  |  |  |  |  |  |
| TEM                             | Transmission Eletrônic Micorscopy                                      |  |  |  |  |  |  |
|                                 | (Microscopia eletrônica de transmissão)                                |  |  |  |  |  |  |
| TBHQ                            | Terc-butil-hidroquinona  |  |  |  |  |  |  |

#### Resumo

Durante a execução do presente trabalho foram realizados dois estudos relacionados à estabilidade oxidativa de óleo vegetal e biodiesel de girassol. Realizou-se um estudo referente à possibilidade de utilizar a espectroscopia de fluorescência como ferramenta para monitorar em tempo real a degradação do óleo vegetal e biodiesel, revelando à relevância de se ajustar a intensidade do laser de excitação durante o monitoramento em tempo real. Os resultados mostraram que, dependendo da intensidade do laser, o próprio feixe de excitação pode degradar as amostras de óleo vegetal e biodiesel, falseando assim análises. Após vários testes, alterando a intensidade da luz de excitação e o volume de amostra em contato com o laser de excitação, foi determinado um setup experimental que permitiu realizar o monitoramento em tempo real e *in situ, via* fluorescência molecular, a real degradação do óleo vegetal e biodiesel de girassol. Analisou-se também a influência da presença de nanopartículas de ouro na estabilidade oxidativa do óleo vegetal e do biodiesel de girassol. As nanopartículas de ouro foram depositadas via *sputtering* e diferentes concentrações foram obtidas ao variar-se o tempo de deposição. A concentração de ouro nas amostras foi determinada por ICP-OES e a distribuição de tamanho foi obtida por meio de análises das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os resultados mostraram que a concentração de nanopartículas aumentou com o tempo de deposição. O tamanho das nanopartículas se manteve constante no biodiesel, e maior para tempos menores de deposição no óleo. A influência das nanopartículas na estabilidade oxidativa do óleo e biodiesel foi determinado a partir do período de indução obtido pelo método Rancimat<sup>®</sup> segundo norma EN14112. O período de indução apresentou uma redução exponencial em função do aumento da concentração de nanopartículas. Adicionalmente, as propriedades óticas das amostras de óleo e biodiesel na presença de nanopartículas de ouro foram analisadas. Os resultados mostraram um aumento da absorbância na região da banda de ressonância plasmônica, e também na região de 318 nm. As medidas de fluorescência mostraram ainda que as nanopartículas de ouro induziram um aumento da intensidade de emissão de fluorescência (Metal-Enhanced Fluorescence, em inglês) do óleo e biodiesel, mostrando que a presença das nanopartículas também alteram drasticamente as propriedades óticas do óleo e biodiesel.

**Palavras chave:** Estabilidade oxidativa; Monitoramento em tempo real; Espectroscopia de fluorescência; Nanopartículas de ouro; *Metal-Enhanced Fluorescence*.

#### Abstract

During the realization of the present work two studies were carried out related to the oxidative stability of vegetable oil and sunflower biodiesel. A study was carried out regarding the possibility of using fluorescence spectroscopy as a tool to monitoring the degradation of vegetable oil and biodiesel in real time, revealing the relevance of adjusting the excitation laser intensity during on-line monitoring (in real time). The results showed that the excitation beam itself can degrade the samples of vegetable oil and biodiesel depending on the intensity of the laser, thus distorting analyzes. After several tests, altering the intensity of the excitation light and the volume of sample in contact with the excitation laser, it was determined an experimental setup that allowed the online and in situ monitoring, by molecular fluorescence, the real degradation of vegetable oil and sunflower biodiesel. In another study, the influence of the presence of gold nanoparticles on the oxidative stability of vegetable oil and sunflower biodiesel was analyzed. The gold nanoparticles were deposited by sputtering and different concentrations were obtained by varying the deposition time. The concentration of gold in the samples was determined by ICP-OES and the size distribution was obtained by Transmission Electron Microscopy images. The results showed that the concentration of nanoparticles increased with time of deposition. The size of the nanoparticles remained constant in biodiesel, and were greater for shorter deposition times on oil. The influence of the nanoparticles on the oxidative stability of the oil and biodiesel was determined from the induction period obtained by the Rancimat® method according to EN14112. The induction period presented an exponential reduction as a function of the increase of the nanoparticle concentration. Additionally, the optical properties of the oil and biodiesel samples in the presence of gold nanoparticles were analyzed. The results showed an increase in absorbance in the region of the plasmon resonance band, and also in the 318 nm region. Fluorescence measurements also showed that the gold nanoparticles induced an increase in the fluorescence emission intensity (Metal Enhanced Fluorescence) of the oil and biodiesel too, showing that the presence of the nanoparticles also drastically alter the optical properties of the oil and biodiesel.

**Keywords:** Oxidative stability; Real-time monitoring; Fluorescence spectroscopy; Gold nanoparticles; Metal-Enhanced Fluorescence

### Sumário

| 1.     | Introdução  | 1  |
|--------|---|----|
| 2.     | Revisão de Literatura   | 3  |
| 2.1.   | Óleo vegetal e biodiesel  | 3  |
| 2.2.   | Composição e reação de transesterificação                       | 4  |
| 2.3.   | Estabilidade oxidativa  | 8  |
| 2.4.   | Método Rancimat <sup>®</sup>                                    | 12 |
| 2.5.   | Oxidação de óleos vegetais e biodieseis                         | 13 |
| 3.     | Nanopartículas  | 15 |
| 3.1.   | Processos de síntese  | 15 |
| 3.2.   | Deposição Física de Vapor por Sputtering                        | 16 |
| 3.3.   | Deposição por Sputtering em líquidos                            | 17 |
| 3.4.   | Nanopartículas e óleo vegetal                                   | 18 |
| 3.5.   | Nanopartículas e biodiesel                                      | 19 |
| 3.6.   | Ressonância Plasmônica  | 21 |
| 4.     | Espectroscopia Molecular  | 21 |
| 4.1.   | Estados eletrônicos moleculares                                 | 24 |
| 4.2.   | Absorção UV-Vis   | 27 |
| 4.2.1. | Lei de Lambert-Beer   | 28 |
| 4.3.   | Fluorescência molecular   | 29 |
| 4.3.1. | Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo              | 30 |
| 4.3.2. | Monitoramento em tempo real via espectroscopia de fluorescência | 33 |
| 4.3.3. | Metal Enhanced Fluorescence                                     | 34 |
| 5.     | Objetivos   | 37 |
| 5.1.   | Objetivos gerais  | 37 |
| 5.2.   | Objetivos específicos   | 37 |
| 6.     | Materiais e métodos   | 38 |
| 6.1.   | Produção do biodiesel   | 38 |
| 6.2.   | Cromatografia gasosa  | 38 |
| 6.3.   | Estabilidade oxidativa (Rancimat <sup>®</sup> )                 | 39 |
| 6.4.   | Monitoramento em tempo real da degradação térmica por EF        | 39 |
| 6.4.1. | Monitoramento em tempo real da Degradação Térmica               | 39 |
| 6.4.2. | Estudo da influência da intensidade                             | 41 |

| 6.4.3. | Estudo da influência do volume                                  | 41  |
|--------|---|-----|
| 6.5.   | Índice de Acidez  | 42  |
| 6.6.   | Absorção UV-Vís   | 43  |
| 6.7.   | Mapa de contorno de fluorescência                               | 43  |
| 6.8.   | Tempo de vida de fluorescência                                  | 43  |
| 6.9.   | Deposição das nanopartículas de ouro                            | 43  |
| 6.10.  | Quantificação de ouro nas amostras por ICP-OES                  | 45  |
| 6.11.  | Microscopia Eletrônica de Transmissão                           | 45  |
| 7.     | Resultados e discussões   | 47  |
| 7.1.   | Composição de ésteres metílicos                                 | 47  |
| 7.2.   | Período de Indução  | 47  |
| 7.3.   | Monitoramento em tempo real                                     | 48  |
| 7.3.1. | Biodiesel   | 48  |
| 7.3.2. | Óleo vegetal  | 59  |
| 7.4.   | Nanopartículas de ouro  |     |
| 7.4.1. | Caracterização e determinação da concentração de nanopartículas |     |
| 7.4.2. | Influência das Au NPs na estabilidade exidativa                 | 79  |
| 7.4.3. | Caracterização ótica  | 82  |
| 8.     | Conclusões  | 88  |
| Refer  | ências  | 90  |
| Publie | cações  |     |
| ANEX   | KO I  | 102 |
| ANEX   | KO II   | 103 |
| ANEX   | KO III  |     |
| ANEX   | KO IV   |     |
| ANEX   | (O V  | 106 |

# 1. Introdução

O estudo da estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis tem aumentado devido à mudanças nos contextos econômicos e tecnológicos num âmbito global. Óleos vegetais vêm sendo largamente empregados nas indústrias alimentícias, cosméticas e de fármacos [1-3]. O biodiesel por sua vez está relacionado ao apelo de fontes alternativas de energia frente à instabilidade do mercado, à futura escassez de combustíveis fósseis e à maior emissão de poluentes dos derivados de petróleo [4-7]. Para o uso e aplicações, tanto do óleo quanto do biodiesel, é de suma importância que o produto mantenha suas propriedades físico-químicas para que cumpra suas especificações desejadas. A oxidação do óleo e do biodiesel modifica suas características e propriedades, comprometendo a utilização destes produtos. Neste sentido diversas investigações vêm sendo realizadas a respeito de fatores que afetem a qualidade do produto durante o tempo de estocagem e transporte [8-9].

Um dos fatores mais importante para avaliar a qualidade do óleo e do biodiesel é determinar à susceptibilidade à oxidação, pois está diretamente ligada ao tempo de prateleira e estocagem. A oxidação do óleo e do biodiesel consiste na quebra das moléculas devido à perca de elétrons para o meio, fatores externos como luz, temperatura e umidade influenciam na oxidação. Desta forma, monitorar e avaliar a estabilidade oxidativa é fundamental. Atualmente a técnica oficial para analisar a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e biodiesel é o método Rancimat<sup>®</sup>, que consiste em acelerar a degradação das amostras termicamente e medir a geração de produtos voláteis durante a degradação [10]. No entanto, técnicas alternativas vêm sendo propostas buscando simplicidade nos procedimentos e redução de custos [11].

Frente a esta problemática, a espectroscopia de fluorescência mostra grande potencial para confecção de aparatos simples e compactos possibilitando análises em tempo real e *in situ*, e consequentemente, permitindo obtenção de informações precisas em tempo real dos processos oxidativos [12-14]. Todavia, os compostos fluorescentes presentes nos óleos e biodieseis geralmente apresentam absorção na região do ultravioleta e a incidência da luz com este comprimento de onda durante as análises em tempo real pode desencadear processos oxidativos [15]. Desta forma, almejando avaliar a aplicabilidade da espectroscopia de fluorescência no monitoramento em tempo real da estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis, faz-se necessária uma investigação detalhada da influência da intensidade da radiação luminosa da luz de excitação e do volume da amostra a ser monitorada durante as análises de fluorescência em tempo real.

Outra questão importante associada à estabilidade de óleos e biodieseis é a aceleração da oxidação quando na presença de alguns contaminantes. Estudos mostraram que a presença de metais em óleos vegetais e biodieseis aceleram os processos oxidativos [16]. Todavia, os efeitos induzidos por nanopartículas (NPs) na estabilidade oxidativa de óleos e biodiesel ainda não foram investigados.

As NPs apresentam propriedades de adsorver moléculas específicas em sua superfície tornando-se assim poderosas ferramentas na entrega inteligente de fármacos e outras substâncias como cosméticos. Neste sentido, os óleos vegetais desempenham importante papel devido à sua biocompatibilidade e à estabilidade que proporciona às NPs [17]. Em biodieseis, NPs e nanoestruturas veem sendo propostas na área de catálise [18-19], biocatálise enzimática [20-22] e diretamente como catalisadores com NPS de ouro [23-24] para reação de transesterificação. Além de aplicações na redução da emissão de poluentes em misturas com diesel [6, 25-27]. Uma das rotas mais eficazes de se obter NPs de maneira controlada é via deposição por *sputtering*, que permite desde o crescimento de filmes em superfícies até o crescimento de NPs diretamente em meios líquidos [28]. Neste sentido óleos vegetais já mostraram grande potencial como meio estabilizante para nanopartículas quando depositadas via *sputtering* [29]. No entanto os efeitos das NPs nas características do óleo e do biodiesel não foram abordados, principalmente no que diz respeito à estabilidade.

Desta forma neste trabalho será estudada a influência da intensidade do laser de excitação sobre a estabilidade oxidativa, em medidas de fluorescência em tempo real e *in situ*, e a dependência do volume de amostra em contato com o laser de excitação. Será analisada também a influência da presença de NPs na estabilidade oxidativa de óleo vegetal e biodiesel de girassol, variando-se o tempo de deposição, visando também a caracterização deste material depositado, além do estudo das propriedades óticas das amostras na presença deste.

# 2. Revisão de Literatura

# 2.1. Óleo vegetal e biodiesel

Os interesses que motivam estudos em biodieseis e óleos vegetais se misturam em determinadas áreas, como a de biocombustíveis por exemplo, no controle de qualidade, normativas junto à Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), adulterações em misturas, entre outras. Porém, o óleo vegetal em geral se divide em uma gama muito grande de aplicações, como citado anteriormente. Vejamos um apanhado geral de óleo e biodiesel em seus contextos específicos, levantando a importante questão da estabilidade oxidativa.

Óleos vegetais apresentam diversas aplicações, este fato se deve em parte à variedade de fontes disponíveis para sua extração. Compostos e características contidas nas fontes são presentes também em seus respectivos óleos, tornando-os assim atrativos para as mais diversas aplicações dependendo da fonte utilizada [1]. Devido à sua origem orgânica, como veremos com mais detalhes na Seção 2.5., o óleo vegetal é instável do ponto de vista das cadeias moleculares, deste modo, o monitoramento e a busca por maneiras de aumentar a sua estabilidade são de grande interesse econômico.

O biodiesel surge impulsionado por questões ambientais e a escassez futura dos combustíveis de origem mineral, tornando necessário o avanço no desenvolvimento de novas fontes de energia renováveis frente às de origem fóssil. O biodiesel tem como matéria-prima óleos vegetais ou gorduras animais e possui propriedades similares ao diesel, mas emitindo cerca de 20% menos poluentes durante a queima no motor [4-7]. Especificamente, se comparado com o diesel, tem-se uma redução nas emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), material particulados como monóxido de carbono (CO) e diversos óxidos de enxofre (SO<sub>X</sub>), compostos orgânicos voláteis e queima incompleta de hidrocarbonetos [7]. Todavia, apesar das vantagens ambientais, o biodiesel é mais susceptível à degradação (oxidação) que o diesel. Por isso, um parâmetro de suma importância para a avaliação da qualidade do biodiesel é a determinação de sua estabilidade oxidativa [30-36].

## 2.2. Composição e reação de transesterificação

No que diz respeito à aplicações como combustível, os óleos vegetais apresentam elevado peso molecular, o que impedem seu uso diretamente nos motores. Os óleos vegetais são formados basicamente por triglicerídeos. Os triglicerídeos são constituídos de uma molécula de glicerina ligada a três ácidos graxos. Estes ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, e a composição dos ácidos graxos presentes nos óleos reflete em suas características e propriedades, entre elas, a estabilidade oxidativa [37]. A estabilidade oxidativa está diretamente ligada ao número de insaturações, sendo a insatauração uma ligação dupla ou tripla, onde se faz presente a formação de orbital molecular  $\pi$  o qual veremos com mais detalhes na secção 4.1..

As grandes moléculas de triglicerídeo proporcionam ao óleo o seu elevado peso molecular. Submetendo o óleo a um processo de quebra das grandes moléculas de triglicerídeos temos o biodiesel, apresentando características mais favoráveis à indústria de biocombustíveis. Uma das reações mais utilizada para a obtenção do biodiesel é a transesterificação. Nesta, três moléculas de álcool reagem com um triglicerídeo resultando em uma molécula de glicerol e três alquil ésteres de ácidos graxos [38]. A reação de transesterificação pode ser acelerada com o uso de um catalisador, além disso, aquecimento e agitação também aumentam a velocidade da reação. Os catalisadores são geralmente ácidos ou básicos e a reação é reversível, por isso o álcool geralmente é colocado em excesso para favorecer a formação de biodiesel. Uma representação da reação de transesterificação é apresentada na Figura 1a. Os produtos da reação, o glicerol e o biodiesel, podem ser facilmente separados através da decantação, formando uma mistura bifásica [39].

Na Figura 1 podemos observar também a constituição básica dos óleos vegetais, ou seja, uma molécula de glicerina ligada a 3 ácidos graxos. Os radicais que correspondem aos ácidos graxos,  $\mathbf{R_1}$ ,  $\mathbf{R_2}$  e  $\mathbf{R_3}$ , são transferidos para o biodiesel. Para constituição dos principais ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, o radical  $\mathbf{Rx}$  corresponde às estruturas logo abaixo circuladas também de vermelho juntamente com a respectiva nomenclatura, ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, Figura 1b. Destaca ainda a presença de insaturações nos ácidos graxos, que interferem na estabilidade oxidativa do óleo e do biodiesel. Além disso, o esquema apresenta a reação utilizando um álcool genérico em função do radical  $\mathbf{R}^*$ , destacado em azul, de modo que, caso o álcool seja metanol, o radical  $\mathbf{R}^* = CH_3$ . Vale ressaltar também a presença da glicerina, inicialmente constituinte do triglicerídeo e ao fim da reação ligada aos radicais –OH, originalmente dos 3 álcoois, formando o glicerol [39]. Figura 1: Esquema geral para reação de transesterificação contendo principais componentes do óleo vegetal e biodiesel.



\*\*\*A presença do catalisador não é obrigatória na reação, porém a torna mais rápida.

# Insaturações.

Fonte: Próprio autor.

Além da reação de transesterificação, o biodiesel também pode ser obtido por craqueamento térmico, em que é realizada a simples quebra das moléculas do óleo através de aquecimento [39].

Além dos triglicerídeos, outros compostos podem estar presentes nos óleos vegetais, dependendo de sua fonte. Por exemplo, antioxidantes naturais como betacaroteno e alfa tocoferol, ou ainda clorofila dependendo da fonte e do modo de extração. Estes componentes não se configuram como reagentes durante a transesterificação, podendo ser transferidos para o biodiesel [11]. A estrutura molecular de alguns dos antioxidantes mais comuns em óleos vegetais pode ser vista na Figura 2.

Figura 2: Alguns antioxidantes naturais frequentemente encontrados em óleos vegetais e respectivos biodieseis.



Fonte: Adaptado de K.F. Magalhães [30] e M. Guinazi, et al. [33].

Os carotenoides constituem de um sistema de duplas ligações conjugadas, responsáveis pelo carácter antioxidante, além disso, constituem um importante grupo de pigmentos naturais

responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha nos alimentos [42, 43]. Podemos citar quanto a presença de carotenoides em óleos vegetais, os óleos de polpa de macaúba e o óleo de pequi, atentando-se para a coloração característica dos mesmos, devido à presença de betacaroteno [43].

Os tocoferóis interrompem a etapa de propagação da reação em cadeia da oxidação dos ácidos graxos (Secção 2.5.), isto devido à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos, hidrogênios ligados ao anel, para os radicais livres. Os tocoferóis se diferem pelo grau de substituição de grupos metila no anel (radicais R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> na Figura 2), podendo ser alfa, beta, gama e delta-tocoferol. Eles são também chamados de vitamina E juntamente com os tocotrienois [41, 44]. Na Tabela 1, podemos observar a quantidade em gramas de  $\alpha$ ,  $\beta+\gamma \in \delta$  tocoferóis para cada 100 gramas de óleo vegetal de diferentes fontes [44].

| Óleo           | a-Tocoferol   | (β+γ)- Tocoferóis | δ-Tocoferol     | Total |
|----------------|---------------|-------------------|-----------------|-------|
| Oliva          | 19,5±0,1      | 0,91±0,01         | -               | 20,44 |
| Semente de Uva | 12,45±0,01    | $2,14\pm0,01$     | 0,71±0,04       | 15,3  |
| Milho          | 5,60±0,02     | 41,1±0,04         | $1,82\pm0,04$   | 48,57 |
| Noz            | $1,47\pm0,01$ | 19,13±0,07        | 3,23±0,04       | 23,83 |
| Gergelim       | -             | 29,4±0,4          | $0,57{\pm}0,07$ | 29,84 |
| Amendoim       | 19,2±0,2      | 9,3±0,2           | 0,91±0,03       | 29,45 |
| Arroz          | 3,31±0,05     | 3,56±0,03         | $0,62\pm0,05$   | 7,49  |
| Girassol       | 73,0±0,3      | $1,98\pm0,06$     | $0,82\pm0,04$   | 7,82  |

Tabela 1: Distribuição em gramas de  $\alpha$ ,  $\beta+\gamma \in \delta$  tocoferóis e tocoferóis totais em alguns óleos vegetais, para cada 100 g de óleo [44].

As clorofilas, tratando-se num caráter molecular, se classificam como um complexo derivado de porfirina. Porfirinas consistem de quatro anéis pirrólicos (anéis aromáticos de cinco membros no qual um dos membros é um NH) unidos por CH's, podendo alojar um íon metálico em seu centro. No caso da clorofila este íon é o magnésio. A clorofila apresenta ainda um quinto anel acrescentado ao anel tetrapirrólico, também uma cadeia carbônica ligada ao quarto anel por um grupo éster. Na ausência do átomo de magnésio tem-se uma estrutura molecular denominada feofitina [45].

As clorofilas podem ser predominantemente dos tipos a e b, sendo de 3:1 sua proporção na natureza. Elas se diferem em um substituinte no terceiro carbono do segundo anel pirrólico, sendo que a clorofila a apresenta um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) e a clorofila tipo b um grupo aldeído (-CHO) [45].

### 2.3. Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa é uma característica muito importante de qualquer produto quando se trata de aplicações e comercialização em geral. Tanto na indústria alimentícia com a estabilidade de óleos e gorduras, quanto na indústria de combustíveis com biodiesel e algumas misturas dele com outros combustíveis fósseis [15]. A partir do momento que se faz necessário estocar e/ou determinar o tempo de prateleira para um produto em específico, a determinação da estabilidade oxidativa, ou seja, da susceptibilidade deste produto a oxidação é de suma importância.

O método Rancimat é o método padrão, normatizado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para biodieseis e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para os óleos vegetais. As especificações do método Rancimat utilizado para determinação da estabilidade oxidativa são as da norma europeia EN14112, que consiste em, submeter 3,0 g de amostra a temperatura de 110 °C sob fluxo de ar de 10 L.h<sup>-1</sup> [10, 46-47].

Além da estabilidade oxidativa, outras características são monitoradas para garantir a integridade do produto para consumo. Quanto aos óleos vegetais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária regula os padrões de qualidade segundo Instrução Normativa n° 49, de 22 de dezembro de 2006. Nesta normativa é definido o óleo vegetal como produto, suas classificações, requisitos gerais, parâmetros como embalagem e rótulo, até as características de identidade e qualidade. As características de qualidade dos óleos vegetais podem ser vistas na Tabela 2, tais como, ponto de fumaça, índice de peróxido, índice de acidez entre outros [48].

| Oleo                     | Algo        | odão  | Canola |       | Girassol |       | Milho |       | Soja  |       |
|--------------------------|-------------|-------|--------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tipo                     | 1           | 2     | 1      | 2     | 1        | 2     | 1     | 2     | 1     | 2     |
| Índice de                | ≤0,20       | >0,20 | ≤0,20  | >0,20 | ≤0,20    | >0,20 | ≤0,20 | >0,20 | ≤0,20 | >0,20 |
| Acidez                   |             | ≤0,60 |        | ≤0,60 |          | ≤0,60 |       | ≤0,60 |       | ≤0,60 |
| (mgKOH.g <sup>-1</sup> ) |             |       |        |       |          |       |       |       |       |       |
| Índice de                | ≤2,5        | >2,5  | ≤2,5   | >2,5  | ≤2,5     | >2,5  | ≤2,5  | >2,5  | ≤2,5  | >2,5  |
| Peróxidos                |             | ≤5,0  |        | ≤5,0  |          | ≤5,0  |       | ≤5,0  |       | ≤5,0  |
| (mEq.kg <sup>-1</sup> )  |             |       |        |       |          |       |       |       |       |       |
| Impurezas                |             |       |        |       |          |       |       |       |       |       |
| Insolúveis em            |             |       |        |       |          |       |       |       |       |       |
| éter de                  | $\leq 0,05$ |       |        |       |          |       |       |       |       |       |
| petróleo (%)             |             |       |        |       |          |       |       |       |       |       |

Tabela 2: Características de qualidade de óleos vegetais refinados [48].

| Umidade e      |   |
|----------------|---|
| material       | ≤0,1                                    |
| volátil (%)    |   |
| Sabões         | ≤10,0                                   |
| $(mg.kg^{-1})$ |   |
| Aspecto a      | Límpido e isento de impurezas.          |
| 25°C           |   |
| Odor e sabor   | Odor e sabor característicos do produto |
| Cor            | Cor característica do produto.          |

Fonte: Instrução Normativa nº49, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Segundo a normativa, a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais, também chamada no documento de índice de estabilidade do óleo (OIS, do inglês *Oil Stability Index*), deve ser de no mínimo 4 h. Outras características de identidade dos óleos vegetais também são abordadas no documento e podem ser observadas na Tabela 3, onde temos entre outros, densidade relativa, índice de saponificação, índice de iodo e percentual de ácidos graxos [48].

| Óleo               | Algodão | Canola |        | Girassol  | Milho             | Soja   |        |
|--------------------|---------|--------|--------|-----------|-------------------|--------|--------|
|                    |         |        | *      | *A        | *B                |        |        |
| Matéria            | ≤1,50   | ≤2,00  | ≤1,5   | ≤1,5      | ≤1,5              | ≤2,80  | ≤1,50  |
| Insaponificável    |         |        |        |           |                   |        |        |
| (g/100g)           |         |        |        |           |                   |        |        |
| Densidade Relativa | ≥0,918  | ≥0,914 | ≥0,918 | ≥0,914    | ≥0,909            | ≥0,917 | ≥0,919 |
| (a 20 °C)          | ≤0,926  | ≤0,920 | ≤0,923 | ≤0,916    | ≤0,915            | ≤0,925 | ≤0,925 |
| Índice de Refração | ≥1,458  | ≥1,465 | ≥1,461 | ≥1,461    | ≥1,467            | ≥1,465 | ≥1,466 |
| (Raia D a 40 °C)   | ≤1,466  | ≤1,467 | ≤1,468 | ≤1,471    | ≤1,471            | ≤1,468 | ≤1,470 |
|                    |         |        |        | (a 25 °C) | (a 25 °C)         |        |        |
| Índice de          | ≥189    | ≥182   | ≥188   | ≥190      | ≥182              | ≥187   | ≥189   |
| Saponificação      | ≤198    | ≤193   | ≤194   | ≤191      | ≤194              | ≤195   | ≤195   |
| (mgKOH/g)          |         |        |        |           |                   |        |        |
| Índice de Iodo     | ≥100    | ≥105   | ≥118,0 | ≥94 ≤122  | $\geq 78 \leq 90$ | ≥103   | ≥124   |
| (Wijs)             | ≤123    | ≤126   | ≤141,0 |           |                   | ≤135   | ≤139   |
| C<12               | (**)    | (**)   | (**)   | (**)      | (**)              | (**)   | (**)   |
| C12:0 (%)          | ≤0,2    | (**)   | ≤0,1   | (**)      | (**)              | ≤0,3   | ≤0,1   |
| C14:0 (%)          | ≥0,6    | ≤0,2   | ≤0,2   | ≤1        | ≤0,1              | ≤0,3   | ≤0,2   |
|                    | ≤1,0    |        |        |           |                   |        |        |
| C16:0 (%)          | ≥21,4   | ≥2,5   | ≥5,0   | ≥4,0      | ≥2,6              | ≥8,6   | ≥8,0   |
|                    | ≤26,4   | ≤7,0   | ≤7,6   | ≤5,5      | ≤5,0              | ≤16,5  | ≤13,5  |
| C16:1 (%)          | ≤1,2    | ≤0,6   | ≤0,3   | ≤0,05     | ≤0,1              | ≤0,5   | ≤0,2   |
| C18:0 (%)          | ≥2,1    | ≥0,8   | ≥2,7   | ≥2,1      | ≥2,9              | ≤3,3   | ≥2,0   |
|                    | ≤3,3    | ≤3,0   | ≤6,5   | ≤5,0      | ≤6,2              |        | ≤5,4   |

Tabela 3: Características de Identidade dos óleos vegetais refinados [48].

| C18:1 (%) | ≥14,7 | ≥51,0 | ≥14,0 | ≥43,1     | ≥75   | ≥20,0 | ≥17      |
|-----------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|----------|
|           | ≤21,7 | ≤70,0 | ≤39,4 | ≤71,8     | ≤90,7 | ≤42,2 | ≤30      |
| C18:2 (%) | ≥46,7 | ≥15,0 | ≥48,3 | ≥18,7     | ≥2,1  | ≥37,0 | ≥48,0    |
|           | ≤58,2 | ≤30,0 | ≤74,0 | ≤45,3     | ≤17   | ≤65,6 | ≤59,0    |
| C18:3 (%) | ≤0,4  | ≥5,0  | ≤0,3  | ≤0,5      | ≤0,3  | ≤2,0  | ≥3,5     |
|           |       | ≤14   |       |           |       |       | $\leq 8$ |
| C20:0 (%) | ≥0,2  | ≥0,2  | ≥0,1  | ≥0,2      | ≥0,2  | ≥0,3  | ≥0,1     |
|           | ≤0,5  | ≤1,2  | ≤0,5  | ≤0,4      | ≤0,5  | ≤1,0  | ≤0,6     |
| C20:1 (%) | ≤0,1  | ≥0,1  | ≤0,3  | ≥0,2      | ≥0,1  | ≥0,2  | ≤0,5     |
|           |       | ≤4,3  |       | ≤0,3      | ≤0,5  | ≤0,6  |          |
| C22:0 (%) | ≤0,6  | ≤0,6  | ≥0,3  | ≥0,6      | ≥0,5  | ≤0,5  | ≤0,7     |
|           |       |       | ≤1,5  | ≤1,1      | ≤1,6  |       |          |
| C22:1 (%) | ≤0,3  | ≤0,2  | ≤0,3  | (**)      | ≤0,3  | ≤0,3  | ≤0,3     |
| C24:0 (%) | ≤0,1  | ≤0,3  | ≤0,5  | ≥0,3 ≤0,4 | ≤0,5  | ≤0,5  | ≤0,5     |
| C24:1 (%) | (**)  | ≤0,4  | (**)  | (**)      | (**)  | (**)  | (**)     |

(\*) – Óleo de girassol sem alteração no conteúdo de ácido oleico; (\*A) – Óleo de girassol com médio conteúdo de ácido oleico; (\*B) – Óleo de girassol com alto conteúdo de ácido oleico; (\*\*) – Não detectável; Fonte: Instrução Normativa n°49, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Diferentemente dos óleos vegetais, quem regula a comercialização e os padrões de qualidade para o consumo do biodiesel é a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis por meio da Resolução ANP n° 45, de 25.8.2014. Além da definição de biodiesel, assim como seus parâmetros básicos, são apresentadas também nesta resolução as definições para óleo diesel e seus diferentes tipos, uma vez que o biodiesel não é comercializado puro, e sim adicionado em um percentual específico ao diesel.

As especificações do biodiesel segundo a Resolução ANP n° 45, de 25.8.2014 são apresentadas na Tabela 4. Além das especificações, consta também no documento os métodos analíticos para determinação das mesmas segundo Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e/ou *European Norm/International Organisation for Standardisation* (EN/ISSO) [38].

| Característica         | Unidade            | Limite    | Método de Análise |        |        |  |
|------------------------|--------------------|-----------|-------------------|--------|--------|--|
|                        |                    |           | ABNT              | ASTM D | EN/ISO |  |
|                        |                    |           | NBR               |        |        |  |
| Aspecto                | -                  | -         | -                 | -      | -      |  |
| Massa específica a 20  | Kg.m <sup>-3</sup> | 820 a     | 7148              | 1298   | EN ISO |  |
| °C                     |                    | 900       | 14065             | 4052   | 3675   |  |
|                        |                    |           |                   |        | EN ISO |  |
|                        |                    |           |                   |        | 12185  |  |
| Viscosidade Cinemática | $mm^2.s^{-1}$      | 3,0 a 6,0 | 10441             | 445    | EN ISO |  |
| a 40 °C                |                    |           |                   |        | 3104   |  |

| Tabela 4: Especificações do Biodiesel | [38] |
|---------------------------------------|------|
| rubblu il Especificações do Biodicser | 1201 |

| Teor de água, máx                           | mg.kg <sup>-1</sup>       | 200,0 (3) | -                                | 6304        | EN ISO<br>12937                    |
|---|---------------------------|-----------|----------------------------------|-------------|------------------------------------|
| Contaminação Total                          | mg.kg <sup>-1</sup>       | 24        | 15995                            | -           | EN 12662                           |
| Ponto de fulgor, min.                       | °C                        | 100,0     | 14598                            | 93          | EN ISO<br>3679                     |
| Teor de ésteres, min                        | % massa                   | 96.5      | 15764                            | 5453        | EN 14103                           |
| Cinzas sulfactadas,<br>máx.                 | % massa                   | 0,020     | 6294                             | 874         | EN ISO<br>3987                     |
| Enxofre total, máx.                         | mg.kg <sup>-1</sup>       | 10        | 15867                            | 5453        | EN ISO<br>20846<br>EN ISO<br>20884 |
| Sódio + Potássio, máx.                      | mg.kg <sup>-1</sup>       | 5         | 15554<br>15555<br>15553<br>15556 | -           | EN 14108<br>EN 14109<br>EN 14538   |
| Cálcio + Magnésio,<br>máx.                  | mg.kg <sup>-1</sup>       | 5         | 15553<br>15556                   | -           | EN 14538                           |
| Fósforo, máx                                | mg.kg <sup>-1</sup>       | 10        | 15553                            | 4951        | EN 14107<br>EN 16294               |
| Corrosividade ao cobre,<br>3h a 50 °C, máx. | -                         | 1         | 14359                            | 130         | EN ISO<br>2160                     |
| Número de Cetano                            | -                         | Anotar    | -                                | 613<br>6890 | EN ISO<br>5165                     |
| Ponto de entupimento de filtro a frio, máx. | °C                        | -         | 14747                            | 6371        | EN 116                             |
| Índice de acidez, máx.                      | mg<br>KOH.g <sup>-1</sup> | 0,50      | 14448                            | 664         | EN 14104                           |
| Glicerol livre, máx.                        | % massa                   | 0,02      | 15771<br>15908                   | 6584        | EN 14105<br>EN 14106               |
| Glicerol total, máx.                        | % massa                   | 0,25      | 15344<br>15908                   | 6584        | EN 14105                           |
| Monoacilglicerol, máx.                      | % massa                   | 0,7       | 15342<br>15344<br>15908          | 6584        | EN 14105                           |
| Diacilglicerol, máx.                        | % massa                   | 0,20      | 15342<br>15344<br>15908          | 6584        | EN 14105                           |
| Triacilglicerol. Máx.                       | % massa                   | 0,20      | 15342<br>15344<br>15908          | 6584        | EN 14105                           |
| Metanol e/ou Etanol,<br>máx.                | % massa                   | 0,20      | 15343                            | -           | EN 14110                           |
| Índice de Iodo                              | g.100g <sup>-1</sup>      | Anotar    | -                                | -           | EN 14110                           |
| Estabilidade à oxidação<br>a 110 °C, min.   | h                         | 6         | -                                | -           | EN 14112<br>EN 15751               |

Fonte: Resolução nº 45, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.

# 2.4. Método Rancimat®

O método Rancimat<sup>®</sup> avalia a estabilidade oxidativa através da medida do período de indução (PI). O método consiste em acelerar o processo de oxidação das amostras por meio de aquecimento térmico e fluxo constante de ar. As amostras permanecem envoltas em um bloco de aquecimento que controla sua temperatura, como indicado na Figura 3. O fluxo de ar passa pela amostra e arrasta os produtos volateis da oxidação para uma célula de medida contendo água deionizada. Nesta célula é medida a condutividade elétrica utilizando um eletrodo, os produtos da degradação aumentam a condutividade elétrica na célula [10, 46-47].

Entrada de ar Entrada de ar Célula de medida Eletrodo Água deionizada Bloco de aquecimento

Figura 3: Esquema ilustrativo das principais partes constituintes de um equipamento Rancimat®.

Fonte: Adaptado de Metrohm<sup>®</sup>.

O PI é determinado a partir do comportamento da curva de condutividade elétrica da célula e pode ser obtido por duas metodologias distintas: método das tangentes e método da segunda derivada, como apresentado na Figura 4. No método das tangentes, o PI é dado pela intersecção de duas tangentes traçadas nos limites assintóticos do tempo, tendendo a zero e tendendo a infinito. No método da segunda derivada, o PI é dado pelo valor máximo da segunda derivada da condutividade elétrica medida na célula [49-51]. Com isso podemos afirmar que o PI é determinado pelo instante em que a condutividade apresenta abrupta mudança em seu comportamento, indicando o início de um regime de oxidação mais rápido. O método da segunda deriva se torna mais exato que o método das tangentes, uma vez que, analisa o comportamento local da curva de condutividade fornecendo informações mais precisas, enquanto que o método das tangentes obtém o PI com base no comportamento da condutividade nos limites extremos, podendo não considerar flutuações dentro do intervalo.





Fonte: Próprio autor.

### 2.5. Oxidação de óleos vegetais e biodieseis

Os produtos da oxidação de ácidos graxos podem ser divididos em dois tipos, de primeira e de segunda ordem [52]. Os produtos de primeira ordem são originados na fase inicial da oxidação, sendo formados diretamente dos ácidos graxos e caracterizam-se por peróxidos e hidroperóxidos. Os produtos de segunda ordem são formados a partir da oxidação dos produtos da fase primária, e caracterizam-se por epóxidos. Estas duas classes de produtos distintos absorvem luz em diferentes regiões do espectro eletromagnético, possibilitando o monitoramento da dinâmica da oxidação de ácidos graxos utilizando a técnica de absorção UV-Vis [52].

A formação dos peróxidos e hidroperóxidos pode ser esquematizada como mostra a Figura 5. Nesta temos a desestabilização inicial devido a presença da insaturação e radicais livres na etapa de "Iniciação". Posteriormente, o rearranjo molecular e reações com átomos de oxigênio presentes no ambiente geram peróxidos e, consequentemente, hidroperóxidos. Radicais livres tornam a etapa cíclica, denominada etapa de "Propagação". Na última etapa, denominada na Figura 5 como etapa de "Término", tem-se a formação de produtos estáveis divididos em voláteis e não voláteis [53, 54].

Figura 5: Esquema geral para oxidação de ácidos graxos contendo etapas de Iniciação, Propagação e Término, formação de peróxidos e hidroperóxidos.

Iniciação RH  $\rightarrow$  R<sup>•</sup> + H<sup>•</sup> Propagação  $\stackrel{R^{\bullet} + O_2}{\rightarrow} ROO^{\bullet}$ ROO<sup>•</sup> + RH  $\rightarrow$  ROOH + R<sup>•</sup> Término  $ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow ROOR$   $ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightarrow ROOR + O_2$   $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$ Produtos  $R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow RR$ 

Fonte: adaptado de C.V. Ramalho, et al. (2006) [54].

Os produtos de primeira ordem são obtidos ao fim da fase de Propagação e os de segunda ordem durante a fase de Término. Na fase de Término temos a formação dos epóxidos a partir dos peróxidos e hidroperóxidos produtos da primeira fase. Um peróxido ou hidroperóxido formado anteriormente, juntamente com uma insaturação oriunda de alguma cadeia carbônica genérica do meio, se rearranjam devido à presença do oxigênio no peróxido/hidroperóxido [55].

A presença destes componentes no meio gera inúmeras mudanças indesejadas nas características dos óleos vegetais e/ou biodieseis, como por exemplo: o aumento do índice de acidez, mudança no odor e coloração, entre outras. Através de diferentes técnicas experimentais é possível avaliar o estado de oxidação, presença ou ausência destes compostos, além de outras características úteis na determinação de parâmetros de qualidade. O método mais utilizado para obtenção do índice de acidez é via titulometria clássica, medidas de índice de acidez são amplamente utilizadas para analisar o estado de degradação de amostras tanto de óleos vegetais quanto de biodieseis, no entanto, problemas de baixa precisão, baixa replicabilidade, ponto de viragem relativo dependendo do experimentador e toxicidade dos solventes envolvidos torna o índice de acidez menos atrativo para o monitoramento da oxidação.

# 3. Nanopartículas

O interesse no estudo de nanopartículas e nanomateriais tem aumentado muito nas últimas décadas [46]. Este crescimento tem sido motivado pelas diferentes propriedades que estes materiais apresentam, tais como reatividade [56, 57], toxicidade [57-58], absorção/espalhamento de luz [59, 60], *band-gap* [60], e ponto de fusão e calor específico [61], gerando distintas possibilidades de aplicações.

Nanomaterias são estruturas com qualquer dimensão externa, interna ou estrutura superficial em escala nanométrica. Nanopartículas (NPs) no entanto são objetos que possuam necessariamente as três dimensões em escala nanométrica [62]. Estruturas da ordem de nanômetros possuem características distintas de seu mesmo material em dimensões maiores. Estas propriedades peculiares se devem, em grande parte, à grande razão área superfícial/volume. Quanto menor a dimensão da nanoestrutura, mais significativas serão as interações diretas dos átomos mais externos com o meio [63].

### **3.1. Processos de síntese**

Os métodos de obtenção das NPs podem ser basicamente divididos entre químicos e físicos. Entre os métodos químicos temos a deposição química de vapor e a síntese em fase líquida ou coloidal [64]. Nos métodos físicos de síntese somente processos de mudanças de estado físico da matéria, sem mudança da estrutura química inicial [64]. Quantidades massivas dos elementos são submetidas a diferentes condições. No caso de interações com a luz, tem-se as técnicas de ablação a laser, ou fragmentação [65]. Podem ser utilizados também processos mecânicos, como o de moagem, reduzindo gradativamente o tamanho das partículas até a escala nanométrica [65]. Interações com o calor por exemplo, na técnica de evaporação resistiva, onde o material é evaporado e recristalizado em tamanho nanométrico [66].

A partir das técnicas de deposição física, átomos e/ou pequenos aglomerados de átomos podem ser arrancados do material maciço através do bombardeio com íons, sendo então direcionados para o substrato onde podem ser formadas as NPs e também filmes finos. Com este princípio de funcionamento tem-se as técnicas de *sputtering* e feixe de íons [67]. No processo de deposição física de vapor por evaporação em vácuo, os átomos são vaporizados pela ação da temperatura e depositam-se em um substrato específico sem colidir com nenhum outro tipo de molécula ou átomo na câmara de deposição [65]. As fontes de energia térmica podem ser filamentos de tungstênio ou feixes de elétrons de alta energia. Quanto à pressão

utilizada para as condições de vácuo, estas estão em torno de 10<sup>-4</sup> Torr, porém para evitar contaminantes, valores de 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-9</sup> Torr podem ser utilizados. Dadas as condições, esta técnica apresenta alta taxa de evaporação comparando-se com outras por deposição física de vapor [65].

No processo de vaporização ou ablação a laser, moléculas ou ainda aglomerados de átomos são arrancados de um alvo e se condensam num substrato. Se o fluxo do laser é baixo, o material é evaporado ou sublimado, sendo aquecido pela energia absorvida do laser. Caso o fluxo do laser incidido no alvo seja alto, o material converte-se em plasma formando uma pluma. Nesta pluma pode conter fragmentos <u>de átomos</u>, partículas neutras, elétrons livres e íons. Muitas variáveis podem ser controladas neste processo, tais como o comprimento de onda, a intensidade, duração e frequência dos pulsos, entre outros. Fora as influências das características do laser, temos também as propriedades do próprio alvo [64-67].

## 3.1.1. Deposição Física de Vapor por Sputtering

Neste processo de deposição física de vapor por *sputtering*, o alvo é bombardeado por íons gasosos de alta energia, resultando assim na ejeção de átomos e até pequenos aglomerados de átomos simplesmente por colisões, dependendo então da energia de incidência dos íons gasosos. Este processo é realizado numa câmara acoplada à bombas de vácuo contendo um gás inerte. Nesta câmara temos a presença de dois eletrodos, ânodo e cátodo, sendo que o cátodo o alvo do bombardeamento. O gás inerte inicialmente neutro, é ionizado por colisões com elétrons gerando plasma. Acoplado ao cátodo pode-se ter um conjunto de imãs, formando assim o *magnetron spputering* [18]. Um esquema básico da câmara de deposição física de vapor por *sputtering* pode ser vista na Figura 6.

Inicialmente, o conjunto de imãs não fazia parte do aparato de deposição sputtering. Eles foram adicionados à montagem com o intuito de aumentar a eficiência de deposição. Os imãs são posicionados junto ao alvo de modo a aprisionar os elétrons secundários em uma região próxima. Estes elétrons são denominados secundários, uma vez que são ejetados do próprio alvo devido ao bombardeamento iônico. Uma vez aprisionados nas linhas de campo magnético, aumenta-se a probabilidade de colisões entre os elétrons e os átomos neutros do gás, aumentando também a ionização do plasma, consequente, a taxa de bombardeamento do alvo e o rendimento do processo como um todo [64].



Figura 6: Esquema lateral de câmara de deposição por sputtering.

Fonte: Adaptado de D. Mazumdar (2007) [59].

O vácuo na câmara facilita a deposição do material no substrato, de modo que o material a ser deposto não colida com nenhuma partícula durante a trajetória, aumentando assim a eficiência do processo. O arranjo dos eletrodos é de tal maneira que o campo elétrico é gerado no sentido do substrato (ânodo) ao alvo (cátodo), acelerando os átomos do gás ionizado de modo que estes colidam mais fortemente no alvo [64].

## 3.1.2. Deposição por Sputtering em líquidos

A técnica de deposição física de vapor por *sputtering* é comumente utilizada para deposição de filmes, destacando-se a uniformidade, dispersão em áreas maiores se comparada com as outras técnicas e operação em baixo vácuo facilitando a montagem experimental [68]. Além destas características favoráveis à deposição em substratos sólidos, esta técnica possibilita também a deposição em substratos líquidos [68]. Para a deposição em substratos líquidos é utilizado o mesmo aparato esquematizado na Figura 6, colocando como substrato um recipiente contendo o líquido de forma que obtenha-se uma grande área superficial, como uma placa de Petri por exemplo.

A deposição em líquidos depende de características do próprio líquido, sendo obrigatória a baixa pressão de vapor. O primeiro trabalho sobre deposição de NPs em líquidos foi realizado em líquidos iônicos, onde se observou variação do tamanho médio das partículas com a mudança do tipo de líquido iônico utilizado [68]. Mostrou-se, por exemplo, que a variação no tempo de deposição não gera alteração no tamanho médio das NPs, mas sim em sua concentração [68]. A influência direta no tamanho das NPs depositadas em líquidos normalmente está relacionada com a corrente de descarga, como demonstrado por Suzuki *et al.* [69].

Outro fator que pode ser controlado e influencia no tamanho das NPs é a temperatura do líquido no qual estão sendo depositadas [70]. A mudança na temperatura reflete diretamente alterações na viscosidade do líquido e consequentemente na velocidade de difusão das NPs no meio. Esta se relaciona com as possíveis colisões estre as NPs no interior do líquido, influenciando no processo de aglomeração e aumento do tamanho médio das NPs. A primeira deposição de NPs em óleo vegetal foi realizada em 2010 em óleo de mamona [19]. Assim como os líquidos iônicos, os óleos vegetais possuem também a propriedade de estabilizar as NPs, sendo ainda biocompatíveis, de baixo custo e grande abundância [19].

## 3.2. Nanopartículas e óleo vegetal

NPs vem sendo largamente aplicadas em diferentes áreas da ciência. Devido à elevada razão área superficial *versus* volume e efeitos de confinamento quântico, as NPs apresentam mudanças em algumas propriedades físicas, químicas e biológicas quando comparadas com os "bulks" dos mesmos elementos. Deste modo, podem apresentar desde ganho de absorção e/ou emissão óptica, mudanças de condutividade elétrica e térmica, alteração do ponto de fusão, atividade antimicrobiana, e caráter catalítico em determinadas reações, entre outras [28]. Estas alterações nas propriedades dependem do composto em questão, além do tamanho e forma da nanopartícula ou nanoestrutura [28]. Este comportamento permite às NPs que sejam propostas para diferentes aplicações. Na área alimentícia para proteção de alimentos [71], transporte e entrega inteligente de cosméticos [72, 73] e fármacos [74, 75, 76], sendo abordada também a questão da toxicidade em um trabalho de revisão [77].

Nanopartículas de ouro (AuNPs) especificamente vem sendo amplamente aplicadas, por exemplo, na área de fotocatálise como mostrado por Yu e *et al.* em [78]; em química analítica para o aumento da sensibilidade de técnicas analíticas como exposto por Jiae e *et al.* em [79]. Vilas e colaboradores mostraram que variações nas rotas de síntese das Au NPs resulta que diferenças nas propriedades catalíticas e antibactericida [80]. Além disso Croissant e colaboradores mostraram aplicações de Au NPs no transporte controlada de fármacos, possibilitando a entrega controlada de altos teores de drogas para o tratamento de câncer, entre outras [81].

NPs e nanoestruturas já vêm sendo associadas a óleos em diferentes estudos [82-84]. Um dos fatores é que imersas em óleos, as NPs possibilitam maior carga de drogas em aplicações

de transporte, como mostrado por Kumar e colaboradores, que utilizou sistema *core-shell*, permanecendo o óleo no núcleo [82]. Neste sentido, o efeito da viscosidade foi observado por Taborda *et al.* no estudo do efeito de NPs e nanofluidos à base de sílica e alumina em óleos [83]. NPs foram utilizadas ainda para determinação de atividade antioxidante em óleos vegetais, Pelle e colaboradores calcularam a capacidade antioxidante com base na formação de AuNPs utilizando método colorimétrico e aplicando em azeite de oliva extra virgem [84].

## 3.5. Nanopartículas e biodiesel

Aplicações de NPs no contexto dos biocombustíveis se concentram predominantemente em duas grandes áreas, na redução de emissões de poluentes devido à combustão em motores e na própria produção do biodiesel. Serão apresentados alguns casos específicos de cada uma destas vertentes de aplicação.

A redução de emissões de poluentes sempre foi um fator importante quando se fala na queima de combustíveis. NPs vem sendo utilizadas neste contexto para reduzir a emissão de poluentes como monóxidos e dióxidos de carbono, e os óxidos de nitrogênio, sendo propostas misturadas diretamente nos combustíveis. No geral são utilizadas NPs de óxido de alumínio, sendo avaliados além dos produtos, características da combustão em sí, e a performance do motor utilizando misturas B20 de diesel-biodiesel com os nanoaditivos. Além dos estudos utilizando óxido de alumínio [6, 25, 26], foi proposto recentemente o uso de óxido de zinco [27], sendo estudadas ainda variações de diâmetro e concentração das NPs. As nanopartículas utilizadas por [6] foram obtidas comercialmente, adicionadas em forma de pó às misturas, sendo utilizado ultrassom para homogeneizar a mistura. Em [25] as NPs de óxido de alumínio também foram obtidas comercialmente e adicionadas em forma de pó às misturas por meio de agitação magnética. Venu, em [26] sintetizou nanopartículas de óxido de alumínio quimicamente utilizando método sol-gel e adicionadas às misturas em forma de pó após procedimento de secagem, sendo homogeneizada a mistura utilizando ultrassom.

Na produção do biodiesel as NPs podem ser utilizadas para o transporte de catalizadores da reação de transesterificação. Degirmenbasi e colaboradores utilizaram NPs de óxido de cálcio funcionalizadas com diferentes concentrações de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> obtendo rendimento de 97,67% na transesterificação de óleo de canola [18]. NPs de óxido de ferro foram aplicadas no transporte de catalizador por Poonjarernsilp e colaboradores, sendo utilizada uma mistura de NPs comerciais de ferro e de óxido de ferro (III), transportando um catalisador ácido sólido [19].
Outra aplicação de NPs e nanoestruturas na produção de biodiesel diz respeito à biocatálise enzimática. Este tipo particular de catálise utiliza enzimas para acelerar a reação. Estas enzimas precisam ser imobilizadas, protegendo-as para obtenção de um biocatalizador que se mantenha estável durante o processo, evitando a inativação por fatores externos [20]. Neste processo de imobilização das enzimas é que são utilizadas as NPs. Raita e colaboradores utilizaram NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> para imobilização da enzima *Thermomyces lanuginosus*, sendo realizado estudo para diferentes ligantes [21]. Analogamente, NPs porosas de sílica funcionalizadas com 3-glicidoxi propil-trimetoxisilano foram utilizadas para avaliar o uso de três diferentes enzimas na transesterificação de óleo de canola por Babaki e colaboradores em [22].

As AuNPs foram utilizadas na área de catálise para produção de biodiesel. Banetjee e *et al.* utilizaram NPs bimetálicas tipo núcleo-casca, sendo o Au ocupante do núclo, as nanopartículas foram sintetizadas quimicamente e utilizadas diretamente como catalisador na transesterificação de óleo de girassol obtendo cerca de 86,9% de rendimento com 5% de catalisador mantendo atividade durante 3 ciclos de transesterificação em [23], sendo testadas outras concentrações no trabalho. De maneira similar, AuNPs foram utilizadas ainda como suporte para cinco diferentes tipos de óxido de cálcio na avaliação catalítica para síntese de biodiesel por Bet-Moushoul e *et al.*, sendo obtido entre 90 e 97% de rendimento durante 3 h de reação para condições otimizadas [24].

Estas, entre outras aplicações das NPs e nanoestruturas no âmbito dos biocombustíveis, sem dúvida são de extrema importância dentro de seus objetivos particulares. No entanto, devemos nos atentar às consequências da presença destas nanoestruturas no biodiesel, tanto como resíduos de processos catalíticos quanto aditivos diretos para redução da emissão de poluentes. Ressaltando que em nenhum momento foi abordada nos trabalhos a presença destes nanocompostos no produto final, o biodiesel, porém, como não foi citado nenhum método de retirada das nanopartículas do meio após o uso ou mesmo no processo de decantação, os nanomaterias provavelmente se fazem presentes mesmo que em pequenas quantidades dadas suas características. A estabilidade oxidativa vem a ser uma das importantes variáveis a ser monitorada na presença de NPs, uma vez que esse fator está diretamente relacionado com a qualidade dos óleos e biodieseis, e pode influenciar diretamente no processo que envolva o tempo de prateleira, estoque, transporte, entre outras etapas importantes para o armazenamento e consumo do produto.

# 3.6. Ressonância Plasmônica

Um fenômeno físico originário em sistemas que possuem NPs metálicas, quando interagem com a radiação eletromagnética é o chamado efeito de ressonância de plasmons ou ressonância plasmônica [85, 86]. Neste fenômeno os elétrons livres presentes na superfície das NPs metálicas interagem com o campo elétrico oscilante da luz, podendo a oscilação do campo elétrico da radiação incidente induzir uma oscilação coletiva dos elétrons livres das NPs, como mostrado na Figura 7. Como consequência, os elétrons oscilando coletivamente geram localmente um novo campo elétrico restaurador [85, 86]. A esta oscilação coletiva das cargas livres das NPs é denominada efeito de ressonância plasmônica ou ressonância de plasmon.





Fonte: Adaptado de M. Notarianni e et al. (2014) [87].

O campo elétrico gerado pela oscilação coletiva das cargas livres das NPs metálicas, juntamente com o campo elétrico oscilante da luz incidente, gera um aumento no campo elétrico resultante. Este campo elétrico resultante alterara fortemente as propriedades ópticas de uma molécula que esteja próximo da superfície das nanopartículas, como será posteriormente discutido em detalhes na Seção 4.4.3..

# 4. Espectroscopia Molecular

Espectroscopia no geral diz respeito ao estudo das interações da luz com a matéria [88]. A espectroscopia molecular se restringe ao estudo destas interações com moléculas ou íons. Para estudar estas moléculas pode ser incidida energia sob as mesmas, através da resposta desta interação da radiação com as moléculas podemos obter informações importantes sobre a mesma. A energia incidida na molécula pra o estudo da interação e da dinâmica dos níveis de energia moleculares é incidida na forma de radiação eletromagnética [89]. A radiação eletromagnética pode ser classificada quanto a sua frequência ou quanto ao seu comprimento de onda, como apresentado na Figura 8. Sendo a energia da radiação proporcional a frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda, como representa a equação 1:

$$E = hv = h\frac{c}{\lambda}, \qquad (1)$$

onde *h* é a constante de Planck, v é a frequência da radiação eletromagnética, *c* é a velocidade de propagação da onda eletromagnética, e  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação [90].

Figura 8: Espectro eletromagnético, em destaque a faixa visível ao olho humano, contendo ainda detalhes das frequências e comprimentos de onda.



A interação entre a radiação incidida e a molécula não se dá de qualquer modo. Assim como no átomo, as energias associadas à estrutura interna das moléculas também são quantizadas. No átomo temos diferentes níveis eletrônicos, e os movimentos de vibração e rotação não influenciam na energia do átomo devido à sua simetria esférica. Para moléculas, estes movimentos fazem diferença, podendo os átomos que compõem a molécula vibrarem individualmente de maneiras específicas, e ainda assumir vários modos diferentes de rotação. Desta forma, além dos níveis eletrônicos, as moléculas possuem também níveis de energia vibracional e rotacional, sendo estes apresentados na Figura 9 [88, 92-93].

Cada faixa do espectro eletromagnético corresponde a uma quantidade específica de energia associada, deste modo, cada tipo de nível de energia molecular (eletrônico, vibracional ou rotacional) interage com uma região específica do espectro eletromagnético. Assim, quando uma quantidade de energia específica é incidida na molécula, ela poderá absorver a radiação e dependendo da quantidade de energia envolvida, esta radiação pode excitar um elétron, gerando uma transição eletrônica, ou ainda excitar a molécula vibracional ou rotacionalmente modificando seus modos normais de vibração e rotação respectivamente. A faixa de energia

necessária para interagir com os níveis eletrônicos moleculares corresponde à região do visível ao ultravioleta [88, 92-93].



Figura 9: Primeiros dois níveis eletrônicos de menor energia de uma molécula genérica juntamente com seus respectivos desdoramentos em níveis vibracionais e rotacionais.

Fonte: R. Eisberg, R. Resnik (1994) [94].

As transições eletrônicas demandam uma maior quantidade de energia se comparadas com mudanças de níveis vibracionais e rotacionais. Para cada nível eletrônico da molécula temos diferentes modos normais de vibração. Do mesmo modo, para cara modo normal de vibração podemos ter diferentes modos rotacionais, cada um com quantidade de energia distinta a ele associada, como é ilustrado na Figura 9.

O arranjo dos níveis de energia, desde os eletrônicos aos rotacionais, é intrínseco de cada molécula, dependendo de quantos e quais átomos a constitui. Sendo assim, torna-se único desta molécula, como uma impressão digital. Os níveis de energia moleculares podem ainda ser

levemente deformados de acordo com fatores externos como estado da molécula, sólido, líquido, ou ainda por características do meio o qual está inserida, pH, temperatura, entre outros [89-90, 92-94].

No âmbito das transições eletrônicas moleculares, dois fenômenos ópticos são foco desta abordagem, a absorção molecular e a fluorescência, os quais veremos com mais detalhes separadamente.

# 4.1. Estados Eletrônicos Moleculares

Quando dois ou mais átomos se ligam tornando-se uma molécula, os níveis eletrônicos não são mais aqueles conhecidos de cada átomo separadamente, os níveis eletrônicos são agora da molécula como um todo. Para descrever esta ligação atômica é utilizada a teoria do orbital molecular [88, 91, 95].

Os elétrons presentes no átomo podem ser representados por meio dos orbitais atômicos. Na formação de uma molécula, os orbitais atômicos da camada de valência dos átomos em questão deixam de existir, formando-se então orbitais moleculares, de modo que não é possível distinguir a que átomo pertencem os elétrons envolvidos na ligação [95].

A formação dos orbitais moleculares vai depender dos orbitais atômicos anteriormente existentes. Cada elétron é descrito por uma função de onda, sendo assim, o orbital molecular é formado pela superposição das funções de onda, ou seja, a soma ou a subtração. Desta forma teremos duas possibilidades para a função de onda resultante, gerando dois possíveis orbitais moleculares, ligante para a soma das funções de onda, e antiligante para a diferença [95].

Consideremos a ligação de dois átomos iguais, a e b, tais que, as funções de onda de seus elétrons de valência que ocupam o orbital 1*s* sejam respectivamente,  $\phi_a(1s) e \phi_b(1s)$ . Os orbitais moleculares formados serão do tipo  $\sigma$ , tais que designaremos ligante  $\sigma_s$ , e antiligante  $\sigma_s^*$ , como mostrado na Figura 10.



Figura 10: Orbitais moleculares ligante e antiligande formados em uma ligação quimica de dois átomos iguais.

Fonte: Adaptado de J.D. Ayala [96].

O orbital molecular antiligante é mais energético que o ligante, uma representação energética da ligação abordada anteriormente pode ser vista na Figura 11. Orbitais moleculares do tipo  $\sigma$  também são formados a partir da ligação de dois átomos idênticos, agora A e A', com orbitais  $2p_x$  orientados no eixo de ligação, como representado em escala de energia na Figura 11 [96, 97].



Figura 11: Representação energética dos orbitais ligante e antiligante para ligações do tipo 1s-1s e  $2p_x$ - $2p_x$ .

Quando os orbitais atômicos envolvidos na ligação molecular estiverem no mesmo eixo da ligação, teremos a formação de orbitais moleculares do tipo  $\sigma$ , podendo ser ligante ou antiligante. Porém, quando os orbitais atômicos estiverem fora do eixo da ligação teremos orbitais moleculares do tipo  $\pi$ . Consideremos a ligação de dois átomos idênticos, tais que os orbitais dos elétrons de valência sejam 2*p*, porém, diferentemente do exemplo anterior, eles não estejam no eixo de ligação, podendo ser tanto 2*p<sub>y</sub>* quanto 2*p<sub>z</sub>*. A representação energética da molécula pode ser vista na Figura 12. Vale ressaltar ainda a equivalência de energia entre os orbitais ligantes  $\pi_y \in \pi_z$ , e antiligantes  $\pi_y^* \in \pi_z^*$  [95, 97].



Figura 12: Representação energética dos orbitais ligante e antiligante para ligações do tipo  $2p_y - 2p_z$ .

Fonte: Adaptado de W.X. Rocha (1999) [98].

Desta forma podemos representar os orbitais moleculares em ordem crescente de energia como apresentado na Figura 13a. A Figura 13b mostra as possíveis transições eletrônicas moleculares. Vale ressaltar que o orbital *n* em questão trata-se do orbital anterior à ligação dos átomos para a formação da molécula, estando os níveis  $\sigma \in \pi$  com quantidade de energia inferior, o que torna a ligação satisfatória para os dois átomos, e os  $\sigma^* \in \pi^*$  com quantidade de energia superior. Podemos observar que as transições dos níveis eletrônicos ocupados,  $\sigma$ ,  $\pi \in n$ , para níveis não ocupados  $\sigma^* \in \pi^*$ , respeitando às regras de seleção [88].



Figura 13: Orbitais moleculares em escala crescente de energia e possíveis transições eletrônicas.

Fonte: Adaptado de D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, (2001) [88].

Com relação às transições eletrônicas moleculares, é comum a utilização do conceito dos orbitais HOMO e LUMO. HOMO corresponde ao orbital molecular ocupado de maior energia, do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*. Por outro lado, LUMO é o orbital molecular

não ocupado de menor energia, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*. De modo que a diferença de energia entre estes dois orbitais é quantidade mínima de energia para gerar uma transição eletrônica [88, 95].

# 4.2. Absorção UV-Vis

A absorção molecular na região do UV-Vis trata-se da absorção de energia pela molécula promovendo uma transição eletrônica. A medida de absorção molecular, como o próprio nome já indica, determina que componente espectral da luz a amostra em particular absorve, ou seja, quais comprimentos de ondas são absorvidos pela molécula.

O aparato experimental mais utilizado para medidas de absorção UV-Vis consiste basicamente de uma fonte de luz, monocromador, amostra e detector [97]. O funcionamento do mesmo consiste em realizar uma medida da intensidade inicial  $I_{0\lambda}$  associada a um comprimento de onda específico  $\lambda$ , ou seja, depois de passar pelo monocromador, posteriormente fazendo que a luz emitida pela fonte interaja com a amostra e mede-se a intensidade  $I_{\lambda}$  que atravessa a amostra [97].

A absorbância A da amostra para o comprimento de onda  $\lambda$  analisado é dada pelo logaritmo na base dez da razão entre a intensidade inicial  $(I_{0\lambda})$  e final  $(I_{\lambda})$  [97, 104], como representado na Equação 2,

$$A(\lambda) = \log_{10}\left(\frac{I_{0\lambda}}{I_{\lambda}}\right).$$
<sup>(2)</sup>

Realizando este procedimento para os demais comprimentos de onda obtém-se o espectro de absorção da amostra em particular. Nesta configuração experimental, a absorbância é determinada por transmitância, ou seja, com base na quantidade de luz que é transmitida através da amostra, sendo eficaz em soluções, que permitam diluições em meios líquidos, ou ainda em sólidos translúcidos, que permitam a passagem de luz. Sendo a transmitância dada por

$$T(\lambda) = \frac{I_{\lambda}}{I_{0\lambda}} \quad | \quad A(\lambda) = -\log_{10} T(\lambda).$$
(3)

Outro modo de determinar o quanto de luz uma amostra absorve é por meio da refletância. O funcionamento é análogo ao da transmitância, sendo medida, no entanto a intensidade luminosa que é refletida pela amostra e comparando com a intensidade inicial. Esta configuração experimental é indicada para medidas em amostras sólidas opacas, pós, ou qualquer tipo de amostra que não possibilite a passagem de luz [97, 99].

## 4.2.1. Lei de Lambert-Beer

Considerando um feixe de luz de intensidade  $I_0$ , incidindo em uma amostra com área A de espessura dx, sendo C a concentração de moléculas nesta amostra. O número de moléculas iluminado pela intensidade  $I_0$  é CAdx. Tendo em vista que certa quantidade de luz do feixe é absorvida e uma parte ainda é espalhada, a taxa de energia perdida pelo feixe é denominada secção transversal  $\sigma$ , lembrando que esta é dependente do comprimento de onda devido às características particulares da amostra.

Desta forma, podemos escrever a perda de intensidade a cada dx avançado pelo feixe como

$$\frac{dI_0}{I_0} = -\frac{\sigma CA}{A} dx,\tag{4}$$

integrando dos dois lados, sendo *L* a espessura total e *I* a intensidade do feixe ao sair da amostra tem-se:

$$\int_{I_0}^{I} \frac{dI_0}{I_0} = -\int_0^L \sigma C dx \tag{5}$$

$$\ln I - \ln I_0 = \ln \left(\frac{I}{I_0}\right) = -\sigma CL.$$
(6)

Aplicando exponencial dos dois lados

$$I(\lambda) = I_0 e^{-\sigma(\lambda)CL}, \tag{7}$$

temos a Lei de Lambert-Beer. Na Lei de Lambert-Beer a intensidade de um feixe de luz que atravessa determinada amostra depende da intensidade inicial do feixe, da espessura da amostra, da secção transversal deste material para o comprimento de onda em questão e da concentração de moléculas presente na amostra. Esta dependência da concentração é de grande importância para a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, uma vez que a partir dela a absorbância pode ser escrita em termos da concentração

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I_0 e^{-\sigma(\lambda)CL}}\right) = \log(e^{\sigma(\lambda)CL})$$
(8)

$$A(\lambda) = \sigma(\lambda)CL\log(e) = 0,4343\sigma(\lambda)CL, \qquad (9)$$

o produto 0,4343 $\sigma(\lambda)$  é definido como absorvidade molar, também chamado de coeficiente de extinção molar,  $\varepsilon(\lambda)$ . A absorbância fica escrita então como:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) CL.$$
(10)

Esta dependência linear da absorbância com a concentração permite a determinação quantitativa de substâncias. Porém deve-se ficar atento aos limites da concentração, uma vez que para concentrações maiores que 0,01 mol.L<sup>-1</sup> ocorrem variações no coeficiente de absorção

28

molar. Estas variações ocorrem devido a interações molécula-molécula que não aconteciam antes por causa da maior distância umas das outras [97, 99].

## 4.3. Fluorescência molecular

A fotoluminescência é um tipo de luminescência que caracteriza-se pela emissão de energia na forma de luz após um processo de excitação molecular induzido por um processo de absorção de luz [89]. Existem outros tipos de processos luminescentes, tais como a bioluminescência, quimiluminescência, termoluminescência, entre outros. Todavia, diferentemente da fotoluminescência, esses outros tipos de luminescência não envolvem a absorção de energia luminosa no processo inicial de excitação das moléculas [89]. Dentro da fotoluminescência existem dois processos distintos, a fluorescência e a fosforescência. Uma das coisas que difere a fluorescência da fosforescência é o tempo envolvido no processo de emissão de luz. A fluorescência é mais rápida, demorando tempos <  $10^{-5}$  s para o elétron excitado retornar ao seu estado fundamental. Já na fosforescência, o elétron excitado em questão demora tempos maiores que  $10^{-5}$  s para voltar ao estado fundamental [89, 99-100]. A Figura 14 representa o diagrama de Jablonski, ilustrando as possíveis transições eletrônicas.



Figura 14: Diagrama de Jablonski ilustrando possíveis transições entre os níveis eletrônicos e vibracionais.

Fonte: Adaptado de B. Valeur, (2001) [89].

A partir da Figura 14 podemos ver os níveis eletrônicos  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $T_1$  e  $T_2$  e os desdobramentos dos níveis vibracionais de cada um, podendo haver sobreposição dos níveis de energia vibracional de  $S_0$  com  $S_1$ , por exemplo.  $S_0$  é o nível de energia fundamental, o estado de menor energia, é o estado natural do elétron, de forma que uma vez excitado ele tende a retornar a seu estado de origem liberando o excesso de energia obtido incialmente. Os estados

S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> representam os estados singletos, sendo T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> estados eletrônicos do tipo tripleto. Nos estados singletos, o *spin* total do estado é igual à zero, ou seja, os *spins* são antiparalelos. No estado tripleto a soma dos *spins* do estado é igual a um, podendo ter dois elétrons com *spins* up por exemplo [89, 100].

Uma transição de um estado singleto para um estado tripleto é uma transição proibida devido à diferença dos *spins*, deste modo, para que uma transição deste tipo ocorra deve haver uma inversão de *spin* do elétron durante a transição, sendo denominada este tipo de transição de cruzamento intersistema (CIS). Na Figura 14 este processo é representado por **CIS**, podemos ver então no fenômeno de fosforescência devem ocorrer dois cruzamentos intersistema para que o elétron inicialmente excitado retorne para seu estado fundamental, por este motivo o fenômeno de fosforescência é mais demorado se comparado com o de fluorescência [89, 100].

Um elétron uma vez excitado para um nível eletrônico superior, não necessariamente vai emitir luz para voltar ao seu estado fundamental. Existem processos de decaimento não radiativos, ou seja, que não envolvem emissão de energia na forma de radiação, luz, que são simbolizados pelas setas onduladas na Figura 14. Estes processos são chamados de conversão interna (**CI**). A conversão interna consiste da transição de um nível eletrônico excitado para um nível de energia vibracional pertencente a um nível eletrônico de energia menor. Após a conversão interna o elétron decai vibracionalmente até o estado fundamental. Deste modo, é válido ressaltar que tendo uma molécula absorvido energia por meio da excitação um elétron de seu estado fundamental, não é obrigatório que a molécula emita energia em forma de luz, fluorescendo ou fosforescendo [89, 100].

# 4.3.1. Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

A espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo trata de técnicas experimentais utilizadas para medida do tempo de vida de fluorescência de determinada molécula. O tempo de vida de fluorescência está relacionado com o tempo que os elétrons permanecem no estado excitado antes de decaírem para estados de menor energia por meio de fluorescência [89, 90, 100].

Para medida do tempo de vida de fluorescência utiliza-se não mais uma fonte de excitação contínua, uma vez que, desta forma estaríamos constantemente excitando elétrons para níveis de energia maiores e seria impossível medir o tempo de vida. Existem predominantemente duas maneiras de estudar a fluorescência resolvida no tempo, a fluorescência por modulação de fase ou a fluorescência pulsada [89, 90, 100].

No caso da fluorescência por modulação de fase, utiliza-se uma fonte de excitação harmônica com amplitude modulada e diferentes frequências, gerando sinal de fluorescência também harmônica, o tempo de vida de fluorescência é determinado então pela diferença de fase entre os sinais harmônicos de excitação e de emissão. Os dois tipos de técnicas experimentais são apresentados na Figura 15 [89, 90, 100].

Neste trabalho foi utilizada a técnica de fluorescência pulsada, a qual, após o pulso de excitação temos o decaimento da intensidade de fluorescência em função do tempo. Este decaimento ocorre exponencialmente podendo ser descrito por uma única exponencial ou por múltiplas exponenciais.

$$I(t) = \sum_{i=1}^{n} \alpha_i \, e^{(-t/\tau_i)} \,, \tag{11}$$

sendo I(t) a variação da intensidade de em função do tempo sendo dada por um somatório de exponenciais em *i* até o número total de exponenciais necessárias *n*,  $\alpha_i$  é a amplitude,  $\tau_i$  é o tempo característico desta exponencial e *t* é tempo. Um esquema do decaimento da intensidade de fluorescência pode ser visto na Figura 16.

No caso de decaimento monoexponencial, (a) e (b) da Figura 16, o tempo de vida é determinado pelo instante que a intensidade é reduzida em 1/*e* (63,21%). Quando o decaimento da intensidade de fluorescência é composto de mais de uma exponencial, ou seja, multiexponencial (c) da Figura 16, calcula-se então um tempo de vida médio dado por [89, 90, 100]:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^{n} \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^{n} \alpha_i \tau_i}, \qquad (12)$$

onde  $\alpha_i$  é a amplitude,  $\tau_i$  o tempo de decaimento e  $\langle \tau \rangle$  é o tempo médio, cada exponencial constituinte do decaimento geral tem seu respectivo peso no cálculo do tempo de vida. O tempo de vida é dado por mais de uma exponencial em situações em que existam duas ou mais fontes de emissão no material ou amostra analisado.



Figura 15: Esquema para os diferentes modos de medida do tempo de vida de fluorescência, pulsada e por modulação de fase.

Fonte: Adaptado de B. Valeur (2001) [89].

Figura 16: Perfis de decaimento de intensidade de fluorescência pulsada.



Fonte: Adaptado de B. Herman, V.E.C. Frohlich, J.R. Lakowicz, D.B. Murphy, K.R. Spring, M.W. Davidson (2015) [101].

### 4.3.2. Monitoramento em tempo real via espectroscopia de fluorescência

O monitoramento em tempo real de fenômenos utilizando diferentes metodologias ópticas vem sendo largamente utilizado em várias áreas do conhecimento. Como exemplo, a espectroscopia Raman pode ser empregada no monitoramento da cinética de reações em química inorgânica, como a fotoredução de [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup> para [Fe(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> a partir da avaliação do decréscimo na intensidade do espalhamento das bandas em 719, 1046, 1406 cm<sup>-1</sup> [102]. A espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho próximo é aplicada com sucesso no monitoramento da fermentação de bacilos em larga escala, tonéis de 50 m<sup>3</sup>, por meio de uma análise multivariada das absorções entre 1050 e 1650 cm<sup>-1</sup> [103]. A absorção e fluorescência molecular na região do UV-Vis são utilizadas no monitoramento da biodegradação de efluentes de matadouros, a partir da banda de absorção devido à presença de hemoglobina e a fluorescência do triptofano presentes no sangue [104]. A espectroscopia de fluorescência também é utilizada no monitoramento do processo de amadurecimento de tomates [105], sendo monitoradas bandas de emissão de compostos presentes nos frutos, entre 425-475, 680-690 e 720-755 nm, quando excitados em 375, 518 e 635 nm, respectivamente.

Dentre as várias técnicas ópticas, a espectroscopia de fluorescência molecular vem se destacando nessa área de monitoramento em tempo real e *in situ* por apresentar algumas vantagens, possibilitando análises simples e de baixo custo além da alta sensibilidade; não sendo necessário preparo de amostra e ainda por permitir a montagem de um aparato portátil [105-110]. Uma das áreas promissoras para as aplicações da espectroscopia de fluorescência (EF) é em análises de biocombustíveis. No caso do biodiesel, a aplicabilidade da técnica está fundamentada na existência de fluoróforos intrínsecos originários da matéria-prima, óleos vegetais e/ou gorduras animais, que podem ser usadas como sondas fluorescentes do biodiesel [111].

De fato, a EF vem sendo proposta para avaliar e/ou investigar diferentes aspectos referentes no âmbito do óleo vegetal/biodiesel. Metodologias envolvendo trabalhos como o de Izilda e *et al.*, recentemente mostraram que a EF pode ser utilizada para monitorar em tempo real e *in situ* o processo de transesterificação para obtenção do biodiesel [12]. Todavia, eles realizaram o monitoramento a partir da fluorescência induzida por laser excitando as amostras em 532 nm com uma alta intensidade de 26 W.cm<sup>-2</sup> [12].

Outras aplicações como controle de qualidade e quantificação da concentração de biodiesel na mistura diesel-biodiesel também já foram propostas a partir da EF [13, 14]. Caires

*et al.* demonstraram que é possível determinar o teor de biodiesel na mistura diesel-biodiesel para diferentes matrizes oleaginosas quando excitadas em 260 nm [13, 112]. Outra importante aplicação da espectroscopia de fluorescência é no monitoramento da estabilidade oxidativa tanto em óleos vegetais quanto em biodieseis. Silva e colaboradores, por exemplo, analisaram a degradação térmica do óleo de baru em função do tempo, monitorando produtos de oxidação e antioxidantes naturais através da excitação em 405 nm [11]. O monitoramento da estabilidade térmica através da fluorescência de antioxidantes naturais também foi estudado por Oliveira *et al.* no óleo de nabo forrageiro utilizando excitação em 375 nm [113].

Neste sentido, várias outras aplicações estão sendo propostas para análises de biodiesel via EF [114-122]. Todavia, análises em tempo real de fluorescência em amostras susceptíveis à oxidação, a própria luz de excitação (feixe de prova) pode induzir degradação das amostras, gerando resultados falseados e equivocados. Até o presente momento, nenhum trabalho analisou de forma sistemática qual deve ser a intensidade ideal (ou uma intensidade máxima) de excitação para que esse processo de fotodegradação induzido pelo feixe de prova não ocorra. Frente a esta problemática é de suma importância avaliar qual é o efeito da intensidade do laser de excitação sobre a estabilidade oxidativa do óleo vegetal e do biodiesel durante o monitoramento em tempo real via EF.

### **4.3.3.** Metal-Enhanced Fluorescence

Como já apresentado na seção 3.6, o efeito de ressonância de plasmons surge da interação da luz com estruturas metálicas em escala manométrica, em geral NPs, podendo, no entanto, ser visível em outras estruturas. Como vimos, a oscilação do campo elétrico da luz incidente induz uma oscilação coletiva dos elétrons livres do nanomaterial, fazendo com que os elétrons oscilando coletivamente gerem um novo campo elétrico restaurador. O campo elétrico gerado pela oscilação coletiva das cargas livres das NPs metálicas ou nanomaterial em questão, resulta no surgimento de uma banda de absorção, a banda de ressonância plasmônica [123]. A natureza desta banda de absorção está associada à natureza das NPs metálicas, de modo que seu comprimento de onda característico depende do metal, tamanho, formato da NP, modificando desta forma também sua coloração. Um exemplo deste efeito é apresentado na Figura 17.

Figura 17: Mudança na coloração de solução contendo AuNPs de diferentes tamanhos diluídas em citrato de sódio.



Fonte: Adaptado de M. Notarianni e et al. (2014) [87].

Na Figura 17 temos soluções contendo AuNPs de quatro tamanhos diferentes. A diferença de tamanho gera deslocamento na banda de ressonância plasmônica, que resulta em uma alteração na cor da solução. No caso apresentado, deslocando-se do avermelhado com partículas menores, para azulado com nanopartículas maiores [87].

Adicionalmente, ao colocar uma molécula fluorescente próximo de NPs metálicas, a intensidade de fluorescência da molécula pode ser intensificada devida um fenômeno chamado de aumento da fluorescência induzida pela superfície metálica (*Metal-Enhanced Fluorescence, MEF*, em inglês), fenômeno esse que está intrinsicamente ligado ao efeito de ressonância de plasmon. Todavia, ainda hoje não estão bem definidos os mecanismos do fenômeno de MEF, sendo ainda alvo de discussão [124]. Porém ele pode ser explicado considerando o efeito de ressonância plasmônica discutido anteriormente [123-124].

Considerando que o aumento da fluorescência das moléculas se deve a um aumento também na absorção, ou seja, na taxa de excitação, as NPs próximas aos fluoróforos provocam um aumento no campo elétrico incidente devido ao efeito de ressonância plasmônica, aumentando assim a absorção da molécula [123]. Este aumento de fluorescência devido somente ao aumento da taxa absorção não gera mudanças no tempo de vida de fluorescência. No entanto, o próprio efeito de ressonância plasmônica pode aumentar a taxa intrínseca de decaimento radiativo (ver Figura 18), neste caso o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência são afetados [123-127].

Figura 18: Diagrama de Jablonski clássico e mudanças na dinâmica energética devido a presença de NPs metálicas. Sendo *E* a taxa de excitação,  $E_m$  o ganho de excitação,  $\Gamma$  a taxa de emissão de fótons,  $\Gamma_m$  o acréscimo na taxa de emissão e  $k_{nr}$  a taxa de decaimento por processos não radiativos.



Fonte: Adaptado de K. Aslan e et al. [127].

Considerando a absorção de um fóton por determinado fluoróforo genérico para seu primeiro estado eletrônico excitado singleto  $S_1$ , o qual pode emitir um fóton com taxa  $\Gamma$ , ou retornar ao estado fundamental  $S_0$  por processos de decaimento não radiativos com taxa  $k_{nr}$ . Seja ainda,  $k_q$  a taxa de despovoamento do estado  $S_1$  por possíveis transferências de energia para moléculas vizinhas por exemplo. O rendimento quântico do fluoróforo em questão pode ser escrito como [127]:

$$Q_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr} + k_q} \ . \tag{13}$$

A presença de NPs pode influenciar na dinâmica energética do fluoróforo de três maneiras diferentes [124]. Primeiramente gerando transferência de energia para o metal com taxa  $k_m$ , esta que apresenta dependência da distância com  $d^{-3}$  [128]. Outra influência das NPs é um acréscimo na taxa de excitação  $E_m$ , ocasionado pelo aumento do campo elétrico local [129-131]. A terceira influência da presença das NPs na dinâmica energética é o aumento intrínseco na taxa de decaimento radiativo do fluoróforo,  $\Gamma_m$ , modificando assim a taxa de emissão de fótons. Deste modo o rendimento quântico na presença de NPs metálicas pode ser escrito como:

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr} + k_q} \ . \tag{14}$$

# 5. Objetivos

## 5.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo estudar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis em duas situações distintas. Em uma delas propõe-se a espectroscopia de fluorescência como ferramenta para o monitoramento em tempo real e *in situ* da degradação de óleos vegetais e biodieseis. No segundo estudo é avaliada a influência da presença de nanopartículas de ouro na estabilidade oxidativa de óleos vegetais e biodieseis.

## 5.2. Objetivos específicos

-Produção de biodiesel *via* transesterificação metílica básica a partir de óleo vegetal de girassol obtido comercialmente;

-Caracterização do óleo vegetal quanto ao teor de ésteres metílicos;

-Obtenção do período de indução do óleo vegetal e do biodiesel;

-Avaliar a influência do laser de excitação no monitoramento da degradação térmica do óleo e do biodiesel de girassol;

-Depositar nanopartículas de ouro diretamente no óleo e no biodiesel *via sputtering*, não sendo necessária a adição de nenhum tipo de estabilizante para as nanopartículas;

-Detectar a presença e caracterizar as nanopartículas depositadas;

-Avaliar a influência de nanopartículas de ouro na estabilidade oxidativa do óleo e do biodiesel;

-Determinar o comportamento óptico do óleo e biodiesel na presença das nanopartículas de ouro;

# 6. Materiais e métodos

### 6.1. Produção do biodiesel

O biodiesel utilizado nas análises foi obtido *via* transesterificação metílica básica a partir de óleo de girassol Liza<sup>®</sup>. Foi utilizado metanol Vetec<sup>®</sup> PA a uma proporção molar de 6:1 álcool/óleo, e como base catalisadora, KOH Proquimio<sup>®</sup> PA sendo utilizada quantidade em massa de 2% da massa de óleo envolvida na reação. A mistura foi mantida sob agitação magnética a 50 °C durante duas horas e em repouso para decantação durante 24 h. Para retirada de água, o biodiesel foi filtrado na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro Vetec<sup>®</sup> PA, podendo ser utilizado qualquer outro sal desde que anidro. Posteriormente o biodiesel foi rotaevaporado para retirada de metanol residual.

#### 6.2. Cromatografia gasosa

Para avaliação do teor de ésteres metílicos utilizou-se cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6890 N com detector de ionização de chama equipado com coluna HP-88 100 m x 0,250 mm. Antes da injeção no cromatógrafo, foi realizado processo de esterificação da amostra *via* catálise ácida visando a quebra dos triglicerídeos, tornando-os mais voláteis [132]. Para o processo de esterificação adicionou-se 2 mL de trifluoreto de boro BF<sub>3</sub> ao óleo, juntamente com 1 mL de tolueno. A mistura foi então aquecida a 100 ° C durante 45 minutos e arrefecida até à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 5 mL de água, 3 mL de hexano e 300 mg de sulfato de sódio. O procedimento foi realizado em triplicata gerando ao seu fim valores médios para a o teor de ésteres metílicos.

Esterificada, a amostra foi injetada no cromatógrafo sob as seguintes condições: Temperatura do injetor de 225 °C; temperatura do detector de 285 °C; temperatura da coluna de 160 °C inicial por 3 minutos, rampa de 3 °C.min<sup>-1</sup> até 190 °C por 6 minutos e rampa de 6 °C.min<sup>-1</sup> até temperatura final de 230 °C por 12 minutos. O tempo total da corrida foi de 37,67 minutos, razão de *split* 100:1, fluxo de gás hidrogênio 40 mL.min<sup>-1</sup>, fluxo de ar sintético 450 mL.min<sup>-1</sup>, fluxo de gás hélio 40 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção 1,0 μL.

A identificação dos picos dos ésteres metílicos foi realizada através da comparação do tempo de retenção relativo dos picos existentes na amostra com o tempo de retenção relativo dos ésteres metílicos de ácidos graxos de *mix* padrão (Supelco FAME C8-C22, 99 % de pureza). O tempo de retenção relativo foi calculado utilizando undecanoato de metila como padrão

interno, tanto nas amostras quanto no *mix* padrão. A proporção dos ésteres metílicos foi determinada através da integração das áreas dos picos.

# **6.3. Estabilidade oxidativa (Rancimat<sup>®</sup>)**

A estabilidade oxidativa do biodiesel foi determinada pelo período de indução (PI) por meio do método Rancimat utilizando o equipamento 893 Professional Biodiesel Rancimat (Metrohm<sup>®</sup>). As análises foram feitas ao submeter 3,0 g de cada amostra à temperatura de 110 °C, com fluxo de ar de 10 L.h<sup>-1</sup>, segundo a norma europeia EN14112 e de acordo com a orientação da Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). As análises foram realizadas em duplicata.

## 6.4. Monitoramento em tempo real da Degradação Térmica por EF

#### 6.4.1. Monitoramento em tempo real da Degradação Térmica

O aparato experimental utilizado que possibilitou analisar por espectroscopia de fluorescência em tempo real e *in situ* o processo de degradação é constituído de um forno para alocar a amostra, um microcontrolador para gerenciamento do forno e um fluorímetro portátil para acompanhar a emissão durante a degradação. O esquema do aparato experimental pode ser observado na Figura 19.



Figura 19: Esquema do aparato experimental montado para o monitoramento em tempo real da fluorescência.

Fonte: Próprio autor.

O forno é constituído de um bloco maciço de alumínio aquecido internamente por quatro resistências de cerâmica, veja esquema detalhado do forno no ANEXO I. As resistências são ligadas a um microcontrolador Flyever<sup>®</sup> FE50RPN que utiliza como sensor de temperatura um Pt100 (termo resistor de platina cuja resistência a 0 °C é de 100 ohms), embutido dentro do bloco de alumínio do forno operando com resolução de 0,1 °C. A amostra a ser analisada é inserida em uma cubeta que se encaixa perfeitamente no interior do forno.

O fluorímetro portátil utilizado da MM Optics<sup>®</sup> possui como fontes de excitação um laser de diodo emitindo em 405 nm e outro com emissão em 532 nm, sendo neste trabalho utilizado somente a fonte de 405 nm. Utilizou-se uma fibra óptica tipo y para excitar e coletar a emissão na posição *front face*. O espectro de fluorescência foi obtido entre 430 e 800 nm por meio de um espectrômetro USB2000 da OceanOptics<sup>®</sup>. A potência de excitação do laser foi variada entre 0,5 e 15,0 mW a partir da variação da corrente do diodo e a potência foi monitorada com o auxílio de um medidor de potência (Power Meter 1917-R - Newport<sup>®</sup>).

Realizaram-se degradações térmicas simultaneamente com medidas de fluorescência para diferentes valores de intensidade do laser, variando entre 0,6 e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>.

Para os estudos da fluorescência durante a degradação térmica eram colocados 3,5 ml de amostra em uma cubeta, óleo vegetal ou biodiesel, e colocada no forno. A variação de temperatura era realizada em forma de rampas de aumento e diminuição, sendo monitorada a intensidade de fluorescência desde o início do procedimento. O aquecimento partia da temperatura ambiente de 20 °C até 110 °C numa taxa constante de 0,5 °C.min<sup>-1</sup> para evitar efeitos de inércia térmica por parte do forno. Ao chegar aos 110 °C a amostra era então resfriada com a mesma taxa de variação de temperatura, sendo utilizado o ambiente como fonte fria conforme esquema Figura 20.





Fonte: Próprio autor.

Esta configuração de rampas deve-se ao fato de o fenômeno de fluorescência depender da temperatura, o aumento da mesma favorece processos de conversão interna, **CI** da Figura 14 na Seção 4.2, diminuindo assim a intensidade de fluorescência durante o aquecimento e aumentando durante o resfriamento. Porém, caso os fluoróforos contidos na amostra não tenham sofrido nenhum processo degradativo com o estresse térmico, a intensidade de fluorescência deve voltar ao seu valor inicial. Desta forma, a diferença entre a intensidade de fluorescência final e inicial é proporcional à degradação da amostra em questão. Deste modo, o controle de temperatura foi configurado com rampa de aquecimento e resfriamento conforme descrito anteriormente.

#### 6.4.2. Estudo da influência da intensidade

Os estudos da influência da intensidade luminosa do feixe de excitação foram realizados também em cubeta com 3,5 mL de amostra no forno, mantendo assim o aparato, porém com variação de temperatura desligada, mantendo a temperatura constante controlada pelo ar condicionado da sala. A intensidade luminosa incidida na amostra foi controlada com auxílio do medidor de potência posicionado a mesma distância da fonte e variando-se a tensão do laser por meio de seu potenciômetro.

#### 6.4.3. Estudo da influência do volume

O estudo da influência do volume foi realizado variando-se o volume total da amostra, mantendo assim a quantidade de amostra atingida pelo feixe de excitação. O aparato experimental foi arranjado de maneira que mantivesse o mesmo caminho óptico do feixe de excitação para todos os volumes analisados, conforme pode ser visto no esquema da Figura 21.

Os estudos anteriores foram realizados com 100% da amostra em contato com o feixe de excitação, e deste modo sujeitas a processos fotodegradativos. Neste estudo de variação do volume, foram analisadas situações em que, além do total, 20, 12 e 6% da amostra era atingida pelo laser, observando assim o comportamento da fluorescência da mesma durante 180 minutos.





# 6.5. Índice de acidez

O índice de acidez foi determinado por titulação clássica segundo metodologia AOAC 940.28 utilizando-se solução éter:álcool com proporção volumétrica (2:1) (Dinâmica<sup>®</sup> P.A.), solução aquosa padrão secundário de hidróxido de potássio (KOH) (Vetec<sup>®</sup> P.A.) com concentração de 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, previamente titulada com uma solução aquosa de biftalato de potássio (Dinâmica<sup>®</sup> P.A.), e uma solução alcoólica de fenolftaleína (1%) (Dinâmica<sup>®</sup>) como indicador.

Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL foi medida a massa de 2,0 g da amostra em uma balança analítica (Bel Enginnering<sup>®</sup> – M214 Ai). Em seguida, foram adicionados 25 mL da solução éter:álcool, duas gotas de fenolftaleína e foi gotejada no frasco Erlenmeyer a solução de KOH por meio de uma bureta até aparecer a cor rósea, sendo mantida no mínimo durante 30 segundos. Foi feita então a leitura do volume gasto na titulação. Os dados foram utilizados para calcular o índice de acidez utilizando a equação:

$$IA = \frac{V N f 5,61}{m_a}$$

em que,  $V \notin o$  volume gasto de KOH na titulação (mL);  $N \notin a$  normalidade de KOH;  $f \notin o$  fator de correção para o KOH 0,1 M e  $m_a \notin a$  massa da amostra em gramas.

## 6.6. Absorção UV-Vis

As medidas de absorção UV-Vis foram realizadas utilizado espectrômetro Carry 50 (Varian<sup>®</sup>). As amostras foram diluídas em hexano grau HPLC. Para o acompanhamento da degradação foram monitoradas as bandas de 232 e 270 nm na concentração de 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Para a confirmação da presença das NPs nas amostras foi realizado monitoramento da banda de absorção em 510 nm devido à ressonância plasmônica, estando as amostras a concentração de 15,0 g.L<sup>-1</sup>.

#### 6.7. Mapa de contorno de fluorescência

Os mapas de emissão multidimensional foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro de bancada Cary Eclipse (Varian<sup>®</sup>). As amostras foram excitadas entre 285 a 450 nm com intervalo de 5 nm, sendo coletada a intensidade de emissão entre 325 e 700 nm a cada 1 nm, as fendas de excitação e emissão foram de 5 nm e a sensibilidade do detector de 600 V. As medidas duraram cerca de 15 minutos, vale ressaltar que a fonte de excitação neste caso é uma lâmpada de xenônio, e lâmpadas apresentam intensidade muito menores que fontes do tipo laser, excluindo assim a geração de processos degradativos durante esta análise. A fonte de excitação e o detector são posicionados com ângulo de separação de 90° entre eles.

## 6.8. Tempo de vida de fluorescência

As medidas de tempo de vida de fluorescência foram realizadas nas amostras puras, sem nenhuma diluição utilizando um espectrômetro de tempo de vida de fluorescência FluoTime 100 (PicoQuant<sup>®</sup>) sendo utilizado para excitação um Driver Laser de Diodo Pulsado de Picosegundo PDL800-B (PicoQuant<sup>®</sup>) com frequência de 40 MHz e largura de pulso de 5 ns, o qual é utilizado para excitar LEDs de comprimentos de onda específicos (280, 340, 370, 400, 450, 600, 632 nm), assim como nas análises para o mapa de contorno de fluorescência, a fonte de excitação e o detector são posicionados com ângulo de separação de 90° entre eles.. Para análises dos decaimentos e cálculo dos tempos de vida foi utilizado o software FluoFit (PicoQuant<sup>®</sup>).

## 6.9. Deposição das Au NPs

As amostras de óleo com nanopartículas de ouro (Ol AuNPs) foram obtidas a partir de óleo de girassol comercial Liza<sup>®</sup>. As NPs foram adicionadas no óleo vegetal utilizando uma

câmara *sputtering*, o equipamento utilizado pode ser observado na Figura 22. Mantiveram-se constantes a pressão de base e de trabalho em 160 e 330 mTorr, respectivamente. Foi mantido constante também a corrente evaporadora em 41 mA sendo variado somente o tempo de deposição para cada amostra. Foram preparadas amostras com tempos de 5, 15, e 30 minutos de deposição de ouro. O mesmo equipamento e os mesmos parâmetros foram utilizados para preparo das amostras de biodiesel contendo Au NPs, porém com tempos de 2,5, 5 e 15 minutos. Lembrando que o biodiesel foi obtido via transesterificação do óleo de girassol comercial Liza<sup>®</sup>.



Figura 22: Imagens do equipamento utilizado para deposição de NPs nas amostras estudadas.

Fonte: Próprio autor.

Vale a pena destacar na imagem a emissão da pluma de plasma de argônio formada no interior da câmara de deposição na região onde se encontra o alvo sendo bombardeado pelos átomos de argônio. Foi garantido que o processo de deposição, condições de vácuo e presença de plasma, não interferisse na estabilidade oxidativa das amostras utilizando amostras controle para o óleo e para o biodiesel. Foi realizado o mesmo procedimento de deposição de ouro, mesmas configurações de pressão e corrente evaporadora, porém, na ausência do alvo no interior da câmara. Deste modo foram obtidas amostras controle e realizadas as mesmas análises, estabilidade oxidativa utilizando método Rancimat, absorção UV-Vis, mapa de excitação/emissão e tempo de vida de fluorescência. Os resultados não apresentaram diferença entre estes as amostras controle e o óleo e biodiesel sem a submissão do processo, indicando a não influencia do mesmo nas análises realizadas.

#### 6.10. Quantificação das AuNPs por ICP-OES

A quantificação do ouro depositado nas amostras de óleo e biodiesel foi realizada por meio da técnica de Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Indutivamente Acoplado. Utilizou-se um ICP-OES iCAP 6300 Duo (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), com vista axial e radial, detector simultâneo CID (Charge Injection Device) para verificar a precisão do procedimento. Foi utilizado argônio de pureza comercial 99,999% (White Martins-Praxair) para purgar os sistemas ótico, geração de plasma, gás nebulizador e gás auxiliar. Todas as análises foram realizadas em vista axial nas seguintes condições operacionais: 1350 W de potência de RF, 12 L.min<sup>-1</sup> de fluxo de gás de plasma, 0,75 L.m<sup>-1</sup> fluxo de gás nebulizador, taxa de bomba de análise de 50 rpm, 30 s tempo de integração. Foi monitorada a linha de emissão do Au em 242,795 nm.

Foi utilizada água ultrapura (18  $\Omega$ , Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore, Bedford, MA, EUA) e ácido nítrico de traço de metal (Merck, Darmstadt, Alemanha) para preparar as soluções de trabalho. A solução de calibração foi preparada utilizando padrão Au a concentração de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de Au.

Quanto ao preparo das amostras, 0,5 mL de amostra foi precisamente pesado e colocado em um vaso de digestão de PTFE (politetrafluoretileno - teflon). Foram adicionados então 2 mL de HNO<sub>3</sub> e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrados ao recipiente de PTFE. A decomposição das amostras foi realizada em um sistema de digestão com micro-ondas (Berghof, Alemanha). Um programa de etapas (ver Tabela-5) foi aplicado às amostras. Após a digestão, a amostra foi diluída totalizando 20 mL e realizou-se a quantificação.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tempo (min) | Pressão (bar) |
|-------|------------------|-------------|---------------|
| 1     | 120              | 10          | 30            |
| 2     | 180              | 15          | 30            |
| 3     | 250              | 10          | 30            |
| 4     | 50               | 10          | 20            |

Tabela-5: Programa de aquecimento utilizado para digestão das amostras de óleo e biodiesel.

## 6.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A caracterização das AuNPs depositadas no óleo e no biodiesel foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês: *Transmission Electron Microscopy*). Foi utilizado um microscópio FEI, modelo Tecnai G2, de 200 kV. O preparo de amostra consiste de agitação em ultrassom durante 10 minutos. Uma fina camada desta solução foi

depositada em um filme de microscopia do tipo *Holey Carbon*. O filme é preparado sobre uma grade de cobre para microscopia. A fina camada de solução foi obtida com a ajuda de uma argola de 3 mm de diâmetro que é mergulhada na solução e então depositada na superfície do filme. Após secagem por 24 h, as grades foram analisadas no microscópio. As caracterizações das NPs por TEM foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMM).

# 7. Resultados e discussões

# 7.1. Composição de ésteres metílicos

A Tabela 6 mostra o percentual de ésteres metílicos do óleo de girassol, obtidos *via* cromatografia gasosa. O resultado mostra que aproximadamente 86,9% dos ésteres metílicos no óleo são insaturados. Esta característica indica grande susceptibilidade do óleo à oxidação, revelando ser uma excelente matéria prima a ser usada no presente estudo de degradação acelerada, permitindo induzir a oxidação do óleo num tempo relativamente curto.

| Ésteres metílicos               | (%) no óleo de girassol<br>(Média ± Desvio padrão) |  |
|---------------------------------|--|--|
| Palmítico, C16:0                | 5,9±0,3  |  |
| Palmitoleico, C16:1             | 0,2±0,0  |  |
| Esteárico, C18:0                | 3,2±0,1  |  |
| Oleico, C18:1                   | 36,8±0,3   |  |
| Linoleico, C18:2                | 49,5±0,1   |  |
| Linolênico, C18:3               | 0,2±0,0  |  |
| Araquídico, C20:0               | 0,2±0,0  |  |
| Cis-11-eicosênico, C20:1        | 0,2±0,0  |  |
| Behênico, C22:0                 | 0,6±0,1  |  |
| % Ésteres metílicos saturados   | 9,9  |  |
| % Ésteres metílicos insaturados | 86,9   |  |

Tabela-6: Perfil de ésteres metílicos do óleo de girassol.

# 7.2. Período de Indução

Outra análise que comprovou essa baixa estabilidade oxidativa da matéria prima e consequentemente do biodiesel foi à determinação do período de indução. O período de indução foi obtido através do método Rancimat<sup>®</sup> em acordo com a norma EN14112. As medidas foram realizadas em duplicatas sendo obtidos valores de  $(4,26\pm0,03)$  h para o óleo e  $(3,01\pm0,02)$  h para o biodiesel, ficando o óleo acima do valor mínimo de 4 h segundo norma [48], e o biodiesel abaixo do valor indicado nas normas regulatórias, que é de no mínimo 6 h [38].

Vale observar que o biodiesel apresenta período de indução menor que seu respectivo óleo vegetal, isso se deve ao processo de transesterificação, onde houve processo de aquecimento e agitação durante duas horas tendo este processo já iniciado alguns processos degradativos no biodiesel se comparado ao seu óleo vegetal, que não passou por este processo.

# 7.3. Monitoramento em tempo real

## 7.3.1. Biodiesel

O monitoramento da degradação do biodiesel em tempo real foi realizada com excitação em 405 nm, conforme já mencionado. Quando excitado neste comprimento de onda, utilizando fibra ótica sendo realizada a excitação e medida da emissão no modo "*front face*", ou seja, incidindo o feixe de excitação diretamente na amostra, estando a amostra em uma cubeta posicionada já no interior do forno de degradação conforme mostra Figura 19, o biodiesel de girassol apresenta o espectro de emissão presente na Figura 23.



Figura 23: Espectro de fluorescência do biodiesel de girassol obtido para excitação em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-</sup><sup>2</sup>.

Fonte: Próprio autor.

O espectro de emissão é composto por uma banda larga centrada em torno dos 510 nm e outra banda menos intensa que a primeira, em torno dos 660 nm. A primeira banda centrada em torno dos 510 nm pode ser atribuída à vitamina E [133], um grupo de antioxidantes naturais (tocoferóes e tocotrienois) que se faz presente em óleos vegetais e consequentemente em biodieseis, Deste modo, esta região apresenta potencialidade para o monitoramento da degradação, pois a medida que a amostra oxida estes compostos antioxidantes são quebrados diminuindo assim a intensidade da fluorescência nestas condições. A segunda banda em torno dos 660 nm se deve a presença natural da clorofila nas sementes da planta que naturalmente são transferidas para o óleo e, posteriormente para o biodiesel, durante o processo de obtenção do óleo vegetal. A intensidade da banda de emissão da clorofila também diminui com a oxidação

do biodiesel, porém a intensidade inicial de emissão da clorofila pode variar em função da fonte oleaginosa e também depende do método de extração do óleo vegetal, dificultando assim sua utilização para o monitoramento da degradação.

A Figura 24 apresenta os espectros de fluorescência do biodiesel quando submetido ao processo de aquecimento e resfriamento. O biodiesel foi inicialmente aquecido de 20 a 110°C, e posteriormente resfriado de 110°C à 20°C, com uma taxa de aquecimento/resfriamento de 0,5 °C/min. O monitoramento da fluorescência foi realizado em tempo real ao longo de todo o processo de aquecimento e resfriamento de forma que os espectros de emissão foram coletados a cada 10 min, durante 360 min, quando excitados em 405 nm e com uma intensidade de 19,1 mW/cm<sup>2</sup>. Nesta análise foi observada uma diminuição da intensidade de fluorescência em função do tempo, sendo essa diminuição mais proeminente nos primeiros minutos da análise.

Figura 24: Espectros de fluorescência do biodiesel de girassol obtidos em tempo real durante as fases de aquecimento e resfriamento com taxa de variação de 0,5 °C.min<sup>-1</sup>. Os espectros foram medidos a cada 10 min durante 360 min. As amostras foram excitadas em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>.



Fonte: Próprio autor.

Este comportamento de redução da emissão fica evidente quando plotamos a intensidade de fluorescência em 510 nm em função do tempo, revelando uma diminuição de aproximadamente 85% no valor da intensidade de emissão do biodiesel, como mostrado na Figura 25.

Objetivando avaliar se a própria luz de prova do feixe de excitação induzia alguma perturbação do resultado do monitoramento da degradação do biodiesel, outra medida foi

realizada para o biodiesel durante o aquecimento e resfriamento nas mesmas condições supracitadas, mas sem o laser de excitação ficar constantemente ligado. Nessa nova análise, o laser de excitação só era ligado por alguns segundos, a cada 90 min, durante a coleta do espectro de emissão. Nessa nova configuração experimental, foi avaliado o comportamento da fluorescência do biodiesel somente sob a ação da variação da temperatura, na ausência do monitoramento em tempo real da fluorescência.

Figura 25: Intensidade de fluorescência de amostras de biodiesel de girassol em 510 nm normalizada em função do tempo de degradação, obtida excitando em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> submetidas a diferentes condições conforme especificado.



Fonte: Próprio autor.

Esse resultado nos mostra que a redução final da intensidade de emissão foi de aproximadamente 11% quando o laser de excitação permaneceu desligado, demostrando que a redução induzida apenas pela termodegradação foi muito menor que a redução observada quando foi realizado no monitoramento em tempo real da fluorescência (85%). Nesse caso, sugerindo que além da termodegradação induzida pelo aquecimento da amostra, o feixe de prova induziu uma degradação adicional por meio do processo de fotodegradação.

De fato, a intensidade de 19,1 mW/cm<sup>2</sup> resultou em aproximadamente ~ 75% de redução na intensidade de emissão, devido ao efeito do laser de excitação. Essa comprovação pode ser observada na Figura 25, onde é mostrada uma diminuição da intensidade de emissão do biodiesel quando a amostra foi monitorada em tempo real, mantendo-se a temperatura constante

à 20 °C e com o laser de excitação continuamente ligado excitando a amostra. É importante destacar que além dos resultados obtidos via espectroscopia de fluorescência, para confirmar de fato essas degradações do biodiesel, induzidas pelo aquecimento (termodegradação) e pelo feixe do laser de excitação (fotodegradação), foram realizadas as análises do índice de acidez e absorção UV-Vis.

Pela técnica de absorção UV-Vis foi monitorada a razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm, sendo estas as regiões de absorção referentes aos produtos primários e secundários da degradação, respectivamente [11, 38, 113]. O índice de acidez e a razão entre as absorbâncias para as análises com diferentes regimes temperatura e diferentes intensidades do laser de excitação são apresentadas na Figura 26. Para fins de comparação, foram realizadas também as análises em amostras que não sofreram nenhum tipo de processo degradativo, nem monitoramento em tempo real. Na Figura 26 podemos observar o aumento das duas grandezas para as diferentes análises realizadas: amostra não degradada, amostras submetidas apenas a variação de temperatura, amostras submetidas apenas a ação do feixe de excitação com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> de intensidade e amostras submetidas simultaneamente a variação de temperatura e ação contínua do feixe de excitação. Este aumento do índice de acidez e da razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm vêm comprovando de fato que o feixe de excitação pode falsear os resultados durante o monitoramento em tempo real, por fotodegradar a amostras. Pôde-se constatar que somente a ação do laser de excitação com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> de intensidade a temperatura ambiente resultou em um aumento de cerca de 127% no índice de acidez e 20% na razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm. Lembrando que as absorbâncias em 232 e 270 nm estão relacionadas aos produtos de degradação de primeira e segunda ordem respectivamente.

Adicionalmente, os resultados da Figura 25 também mostram que a intensidade de fluorescência é dependente da temperatura da amostra, sendo que à medida que a amostra foi aquecida, a intensidade diminuiu, alcançando o menor valor para a temperatura máxima (redução de ~ 40% para a maior temperatura - 110°C), e posteriormente a intensidade aumentou durante o resfriamento. Evidentemente, a intensidade não retornou ao valor da intensidade inicial de emissão, degradação de alguns dos fluoróforos durante o processo.

Figura 26: Índice de acidez e razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm do biodiesel de girassol antes (amostra não degradada) e depois dos processos de degradação térmica e/ou fotodegradação (espectros de absorção ver ANEXO II).



Fonte: Próprio autor.

De maneira geral, esses resultados demonstram que o feixe de excitação se comportou como uma fonte adicional de degradação do biodiesel, sendo capaz de fotodegradar as amostras durante o monitoramento, e que nas condições experimentais avaliadas, o efeito de fotodegradação foi bem mais pronunciado que a degradação do biodiesel pelo efeito de termodegradação originado pelo aquecimento das amostras. Portanto, fica evidente que a intensidade do feixe de excitação pode falsear os resultados obtidos durante o monitoramento em tempo real do biodiesel.

Para determinar a fotodegradação induzida diretamente pelo feixe de excitação, um novo conjunto de medidas foi realizado mantendo a temperatura constante, coletando as intensidades de fluorescência quando o biodiesel estava submetido somente da ação do feixe de excitação com diferentes intensidades. Para tal, manteve-se a amostra em temperatura constante de 20 °C e os espectros de emissão foram coletados em tempo real durante 180 min com o feixe de excitação sempre ligado. Essa análise foi realizada para cinco valores diferentes de intensidade do feixe de excitação (0,6; 1,3; 6,4; 12,7 e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>). Estes resultados são apresentados na Figura 27, onde é mostrada a intensidade de emissão em 510 nm, coletada a cada 10 min durante 180 min, para as amostras excitadas em 405 nm. Destaca-se que a intensidade de fluorescência foi normalizada apenas para facilitar a análise comparativa dos resultados.

Figura 27: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do biodiesel de girassol em 510 nm normalizada em função do tempo de exposição para diferentes intensidades de excitação em 405 nm.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados apresentados na Figura 27 mostraram em geral a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento do tempo de exposição da amostra ao feixe de excitação para as diferentes intensidades, destacando-se o comportamento inicial para valores menores de intensidade, 0,6 e 1,3 mW.cm<sup>-2</sup>, estudos futuros devem ser realizados para responder o motivo deste comportamento. O comportamento geral mostra que a diminuição da intensidade fluorescência foi maior quanto maior a intensidade do feixe de excitação, no qual após 180 min de monitoramento foi detectada uma redução de aproximadamente 20, 26, 56, 62 e 67 % para a intensidade de 0,6; 1,3; 6,4; 12,7 e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>, respectivamente. Os mapas de excitação/emissão de fluorescência apresentados na Figura 28 mostram a redução da intensidade de fluorescência na região analisada por meio do monitoramento em tempo real, excitação em 405 nm e emissão em 510 nm.

Esta redução na intensidade sugerindo a oxidação dos antioxidantes naturais presentes no biodiesel, vitamina E, como citado anteriormente. Além disso, podemos observar uma acentuação da banda de emissão centrada em torno dos 410 nm para excitação na região dos 350 nm. Este aumento se deve ao surgimento dos produtos da degradação do biodiesel, os tetraenos conjugados, estes são moléculas fluorescentes que surgem a partir dos produtos primários e secundários de degradação do biodiesel, como discutido e mostrado em detalhes por Magalhães e colaboradores [111]. Vale ressaltar no mapa a presença de espalhamento, sendo visível em todas as amostras uma linha na região em que o comprimento de onda de

excitação é igual ao comprimento de onda de emissão, esta quantidade de luz que chega no detector na realidade não se trata de emissão da amostra e sim a própria luz de excitação espalhada.

Figura 28: Mapa de excitação/emissão de fluorescência multidimensional do biodiesel submetido a diferentes condições de temperatura e potência do feixe de excitação durante 180 min. Excitando de 285 a 450 nm e coletando a intensidade de emissão entre 325 e 700 nm estando a amostra sem diluição nenhuma e o feixe de excitação a 90° do detector. Foi destacado nos mapas o comprimento de excitação e o de emissão utilizados no experimento de monitoramento em tempo real para facilitar a interpretação dos dados.



Fonte: Próprio autor.

Podemos observar que a amostra submetida a apenas à variação de temperatura e analisada em tempo real com intensidade de excitação de 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> apresentou maior intensidade de emissão na região dos produtos de degradação, se compararmos a amostra não degradada, resultado que confirma o fato do laser de excitação gerar processos oxidativos nas amostras. Além disso, para a amostra submetida somente a ação do feixe com intensidade reduzida de 0,6 mW.cm<sup>-2</sup>, este aumento de intensidade não é visível, no entanto ainda há redução na banda monitorada em tempo real como mostrado também na Figura 27.

Estes resultados demonstram que, mesmo para uma pequena intensidade da luz de excitação (0,6 mW/cm<sup>2</sup>), não foi possível evitar a fotodegradação induzida pelo feixe de excitação. Porém, esse efeito ocorreu pois durante o monitoramento em tempo real, 100% da amostra (todo o volume de biodiesel monitorado – 3 mL) estava sendo irradiada pelo feixe de excitação. No entanto, essa situação experimental se torna inviável, quando comparada a uma situação prática de aplicação da espectroscopia de fluorescência para o monitoramento em

tempo real do biodiesel. Numa situação prática, almeja-se monitorar grandes volumes do biodiesel (tonéis com mais de milhares de litros) a partir de uma análise pontual da amostra por meio de um feixe de laser ou LED, de forma que uma pequena porcentagem da amostra, em termos de volume, seja irradiada durante o monitoramento.

Portanto, uma importante informação à respeito da aplicabilidade da fluorescência, bem como do efeito falseador que pode ser induzido pelo feixe de excitação, é avaliar como a emissão do biodiesel se comporta quando se irradia pequenos ou grandes volumes das amostras. Desta forma foi analisada a influência do feixe de excitação quando o mesmo interagiu com diferentes volumes de amostra (100, 20, 12 e 6%) durante o monitoramento em tempo real. A Figura 29 mostra o efeito apenas do feixe de excitação em função da porcentagem do volume da amostra que foi irradiada para as intensidades de 0,6 e 19,1 mW/cm<sup>2</sup> para um tempo de monitoramento de 180 min.

Figura 29: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do biodiesel de girassol em 510 nm para diferentes volumes de amostra interagindo com a luz de excitação (6, 12, 20, e 100%) utilizando dois valores para a intensidade do feixe, 19,1 e 0,6 mW.cm<sup>-2</sup>.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados mostram que para todos os volumes monitorados o feixe de excitação a 19,1 mW/cm<sup>2</sup> induziu uma fotodegradação do biodiesel. Todavia, essa degradação foi menor quanto menor foi o volume percentual da amostra que interagiu com o feixe, como pode ser visto na Figura 29. Este fato leva a crer que quando a porção de amostra excitada pelo laser é menor que o volume total da amostra processos difusivos possibilitam transporte das moléculas no recipiente, evitando que uma mesma porção de amostra fique continuamente exposta ao laser de excitação.
Ademais, os resultados também revelam que o feixe de excitação não degrada a amostra durante o monitoramento em tempo real, na situação em que é combinado uma baixa intensidade do feixe de excitação com um pequeno volume relativo de interação entre o feixe e a amostra. Isso fica evidente no caso em que o feixe de excitação não induziu fotodegradação do biodiesel durante o monitoramento em tempo real quando apenas 6% do volume da amostra interagiu com o feixe com intensidade de 0.6 mW.cm<sup>-2</sup>, como mostra a Figura 29. Resultados esses também confirmados pelas análises de absorção UV-Vis e índice de acidez. Apresentados nos gráficos a) e b) da Figura 30.

Figura 30: Índice de acidez em a), e razão entre as absorbâncias 232 e 270 nm em b), do biodiesel de girassol para diferentes volumes de interação entre a fonte de excitação e a amostra (6, 12, 20, e 100%) durante o monitoramento em tempo real comparando as intensidades de excitação de 0,6 e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> (espectros de absorção ver ANEXO III).



Fonte: Próprio autor.

O índice de acidez diminuiu a medida que o percentual de amostra atingida pelo feixe de excitação também diminuiu, assim como a razão entre as absorbâncias em 232/270 nm, Os resultados combinando a redução na intensidade no feixe de excitação com a redução no percentual de volume de amostra interagindo com o feixe de excitação apresentaram menor diferença se comparados com os valores da amostra não degradada.

Adicionalmente às análises de absorção UV-Vis e índice de acidez, temos os mapas de excitação/emissão de fluorescência para diferentes percentuais de volume interagindo com o feixe de excitação durante o experimento, além dos dois extremos de intensidades analisados neste trabalho. Como pode ser visto na Figura 31, a amostra com 100% do volume e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> de intensidade do feixe, foi a amostra que apresentou maior intensidade de emissão e maior deslocamento de banda se comparada com a amostra não degradada, isto devido à indução de processos degradativos ser mais intensa nesta configuração experimental. À medida que foi reduzido o volume de amostra interagente com o feixe de excitação, assim como a

potência do mesmo, tanto a intensidade de fluorescência quanto o deslocamento de banda se tornaram menos visíveis. Tanto é que o mapa da amostra de 6% + 0,6 mW.cm<sup>-2</sup> se mostrou o mais próximo da amostra não degradada, indicando menor influência do processo de medida. Constatou-se também a presença de espalhamento, linha em que o comprimento de onda de excitação é observado no detector, assim como nas análises da Figura 28.

Figura 31: Mapa de excitação/emissão de fluorescência multidimensional do biodiesel para diferentes volumes de amostra e intensidade do feixe de excitação durante 180 min. Excitando de 285 a 450 nm e coletando a intensidade de emissão entre 325 e 700 nm, estando a amostra sem diluição nenhuma e o feixe de excitação a 90° do detector. Foi destacado nos mapas o comprimento de excitação e o de emissão utilizados no experimento de monitoramento em tempo real para facilitar a interpretação dos dados.



Fonte: Próprio autor.

Por fim, depois de serem analisadas os efeitos da variação de intensidade do feixe de excitação e também o percentual de volume de amostra interagindo com o feixe, foi avaliado se na condição experimental de baixas intensidade do feixe e pequenos volume de interação

feixe-amostra a espectroscopia de fluorescência de fato possibilitada um monitoramento correto da termodegradação induzida pela variação da temperatura das amostras.

A partir dos resultados apresentados na Figura 32 podemos observar que foi obtida equivalência entre duas análises do monitoramento da degradação térmica do biodiesel de girassol para variação de temperatura em forma de rampa de 20 a 110 °C e 110 a 20 °C, com taxa de variação de 0,5 °C.min<sup>-1</sup> utilizando a espectroscopia de fluorescência; uma realizada monitorando em tempo real, continuamente, e a outra em instantes específicos. A análise de fluorescência em tempo real se mostrou eficaz com intensidade do feixe de excitação reduzida para 0,6 mW.cm<sup>-1</sup> e volume de amostra interagindo com o feixe reduzido para 6%, mostrando assim ausência de processo degradativo induzido pelo feixe de excitação. Desta forma, a partir de todos os resultados apresentados, demonstramos que é possível estabelecer um protocolo de análise que permite realizar a análise em tempo real sem que o feixe de excitação interfira no resultado a ser obtido.

Figura 32: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do biodiesel de girassol em 510 nm normalizada, com a fonte de excitação desligada ( $\Box$ ), e ligada ( $\circ$ ). A intensidade da fonte foi fixada em 0,6 mW.cm<sup>-2</sup> interagindo com 6% do volume total da amostra.



Fonte: Próprio autor.

## 7.3.2. Óleo Vegetal

Tendo realizado o monitoramento em tempo real da degradação térmica do biodiesel de girassol utilizando a espectroscopia de fluorescência, fez-se interessante também avaliar sua aplicabilidade também no monitoramento da degradação térmica do óleo vegetal, tendo em vista a importância do quesito estabilidade em sí e as similaridades entre o biodiesel e sua matéria prima. Desta forma, as amostras de óleo vegetal de girassol foram analisadas quanto à sua emissão quando sujeitas a excitação em 405 nm, o espectro de emissão nestas circunstâncias é apresentado na Figura 33.



Figura 33: Espectro de fluorescência do óleo de girassol para excitação em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>.

Fonte: Próprio autor.

Os fluoróforos responsáveis pela emissão do óleo vegetal também são presentes no biodiesel [111], apresentados anteriormente na Figura 23. Observamos para o óleo vegetal na Figura 33 duas bandas de emissão bem definidas, uma centrada em torno dos 510 nm e outra em torno 660 nm. A primeira, em 510 nm, se deve à presença do grupo de antioxidantes, vitamina E [133], passados ao biodiesel durante o processo de transestericação. A segunda banda, em 660 nm, devido à moléculas de clorofila presentes no óleo devido à sua origem vegetal. Se compararmos com o biodiesel, a intensidade da emissão do óleo é maior, cerca de 30 % para a banda de 510 nm e 700 % para a banda de 660 nm. Esta diferença de intensidade do biodiesel em relação ao óleo vegetal se deve ao processo de transesterificação, onde temos aquecimento e agitação por um intervalo de 2 h, favorecendo processos degradativos dos

fluorófoforos e consequentemente a diminuição das bandas características de emissão no biodiesel [114].

A Figura 34 mostra os espectros de fluorescência do óleo vegetal de girassol durante o monitoramento em tempo real de um processo de termodegradação, com aquecimento de 20 a 110 °C e o resfriamento de 110 a 20 °C, e taxa de variação térmica de 0,5 °C.min<sup>-1</sup>. Os espectros foram medidos a cada 10 min durante 360 min. A amostra foi excitada em 405 nm com intensidade de 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>. Podemos observar uma diminuição da intensidade de fluorescência em função do tempo.

Figura 34: Espectros de fluorescência do óleo de girassol obtidos em tempo real durante as fases de aquecimento e resfriamento com taxa de variação de 0,5 °C.min<sup>-1</sup>. Os espectros foram medidos a cada 10 min durante 360 min. As amostras foram excitadas em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>.



Fonte: Próprio autor.

O comportamento de diminuição da intensidade de fluorescência durante o processo de aquecimento e resfriamento em 510 nm pode ser melhor analisado na Figura 35, onde temos a intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo. Além do processo de monitoramento com intensidade da fonte a 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> são apresentadas também as medidas de fluorescência deste processo sem a influência do feixe de excitação, ou seja, medidas instantâneas em tempos específicos tendo influência somente da temperatura, e também o monitoramento em tempo real sem variação da temperatura mantendo apenas a fonte de excitação constantemente ligada durante a análises, com a intensidade de 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>. Desta

forma, podemos identificar isoladamente a contribuição da termodegradação e da fotodegradação para a redução da intensidade de fluorescência do óleo vegetal. A partir desta análise pode ser observado que a ação do feixe de excitação a 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> reduz cerca de 73,3 % dos 85,1 % obtidos no monitoramento em tempo real.

Figura 35: Intensidade de fluorescência do óleo de girassol em 510 nm normalizada em função do tempo de degradação, obtida excitando em 405 nm com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>.



Fonte: Próprio autor.

Para comprovar os resultados da degradação obtidos utilizando o monitoramento da fluorescência em tempo real foi medido também o índice de acidez e absorbância das amostras na região do UV-Vís. As medidas foram realizadas depois dos processos analisados, e também em uma amostra não degradada para padrões de comparação.

Os resultados comprovam as análises de fluorescência mostrando que de fato as amostras foram degradadas, aumentando do índice de acidez e da razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm como pode ser visto na Figura 36. Constatou-se que somente a ação do laser de excitação com 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> de intensidade a temperatura ambiente resultou em um aumento de cerca de 90% no índice de acidez e 17% na razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm.

Figura 36: Índice de acidez e razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm do óleo de girassol antes (amostra não degradada) e depois dos processos de degradação térmica e/ou fotodegradação (espectros de absorção ver ANEXO IV).



Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que, similarmente ao observado para o biodiesel, o próprio processo de monitoramento *via* fluorescência degrada a amostras devido o efeito de fotodegradação induzido pela excitação contínua do feixe de excitação na amostra. Desta forma, se fez necessário um estudo da evolução temporal da intensidade de fluorescência para diferentes intensidades do feixe de excitação. Foi monitorada então a intensidade de fluorescência durante 180 minutos utilizando cinco valores diferentes para a intensidade da fonte de excitação, 0,6, 1,3, 6,4, 12,7 e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup>. A intensidade de fluorescência em 510 nm, normalizada desta medida, pode ser visualizada na Figura 37, mostrando que a influência do feixe de excitação diminui à medida que sua intensidade diminui, ou seja, quanto menor a intensidade da fonte de excitação menor a interferência do mesmo nos processos degradativos das amostras analisadas.

Figura 37: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do óleo de girassol em 510 nm normalizada em função do tempo de exposição para diferentes intensidades de excitação em 405 nm.



Fonte: Próprio autor.

Os mapas de excitação/emissão de fluorescência da amostra não degradada juntamente com as amostras submetidas a diferentes regimes de temperatura e intensidades de excitação podem ser vistos na Figura 38. Assim como no biodiesel, pode ser vista a diminuição da banda analisada no monitoramento em tempo real com excitação em 405 nm e emissão em 510 nm.

Além da diminuição da banda monitorada, é visível uma redução da intensidade da banda característica da clorofila, para excitação 405 nm e emissão 670 nm. Diferentemente do biodiesel, não há aumento de intensidade na região de emissão em 400 nm e excitação em 350 nm. Observamos, no entanto, diminuição da banda de emissão em torno de 420 nm sob excitação de 350 nm. Isso ocorre devido à diferença de composição entre óleo e biodiesel, já que, o óleo vegetal é composto entre outras moléculas por uma mistura de ácidos graxos, enquanto que no biodiesel tratam-se de ésteres metílicos. A degradação dos ácidos graxos não gera produtos fluorescentes como ocorre com o biodiesel, com os tetraenos conjugados. Observamos então nos mapas de excitação/emissão uma diminuição da banda de emissão em 420 nm sob excitação de 350 nm, diferentemente do que foi detectado para o biodiesel e apresentado na Figura 31.

Figura 38: Mapa de contorno de fluorescência multidimensional do óleo submetido a diferentes condições de temperatura e intensidade do feixe de excitação durante 180 min. Excitando de 285 a 450 nm e coletando a intensidade de emissão entre 325 e 700 nm, estando a amostra sem diluição nenhuma e o feixe de excitação a 90° do detector. Foi destacado nos mapas o comprimento de excitação e o de emissão utilizados no experimento de monitoramento em tempo real para facilitar a interpretação dos dados.



Fonte: Próprio autor.

Um fator importante a ser considerado, como foi feito para o biodiesel, é o volume de amostra interagindo com o feixe de excitação. Para compreender qual a influência deste nas análises de degradação em tempo real, foi variado o volume de óleo vegetal em contato direto com o feixe luminoso nas proporções de 6, 12, 20 e 100% em volume. A intensidade de fluorescência foi monitorada em tempo real durante 180 minutos sendo coletados os espectros de emissão a cada 10 min. Como já foi detectada a influência do percentual de volume de amostra interagindo com o feixe de excitação no estudo realizado anteriormente com o biodiesel, na Figura 39 apresentamos o monitoramento da fluorescência apenas para o caso com redução de volume de 6% da amostra interagindo com o feixe de excitação e duas intensidades de excitação analisadas, 19,1 e 0,6 mW.cm<sup>-2</sup>.

Figura 39: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do óleo de girassol em 510 nm para 6% da amostra interagindo com o feixe de excitação utilizando dois valores para a intensidade do feixe ( $\Box$ )19,1 mW.cm<sup>-2</sup> e ( $\bullet$ ) 0,6 mW.cm<sup>-2</sup>.



Fonte: Próprio autor.

Assim como no caso observado para do biodiesel, combinando a redução na intensidade de excitação com 0,6 mW.cm<sup>-2</sup> com a redução de 100 para 6% de volume de amostra em contato com o feixe de excitação, o feixe de excitação não degradou a amostra durante o monitoramento em tempo real. As medidas de índice de acidez e a razão entre as absorbâncias em 232 e 270 nm, Figura 40, comprovam que as amostras só foram degradadas nas situações em que o feixe de excitação interagiu com um maior volume da amostras.

Figura 40: Índice de acidez, em a), e razão entre as absorbâncias 232 e 270 nm, em b), do óleo de girassol para diferentes volumes de interação entre a fonte de excitação e a amostra (6, 12, 20, e 100%) durante o monitoramento em tempo real comparando as intensidades de excitação de 0,6 e 19,1 mW.cm<sup>-2</sup> (espectros de absorção ver ANEXO V).



Na Figura 41a é possível observar a redução da intensidade de fluorescência na região do monitoramento em tempo real, excitação 405 nm e emissão em 510 nm.

Figura 41: Mapa de contorno de fluorescência multidimensional do óleo para diferentes volumes de amostra e intensidade do feixe de excitação durante 180 min. Excitando de 285 a 500 nm e coletando a intensidade de emissão entre 325 e 650 nm em a) e coletando a emissão entre 600 e 750 em b). Estando a amostra sem diluição nenhuma e o feixe de excitação a 90° do detector. Foi destacado nos mapas o comprimento de excitação e o de emissão utilizados no experimento de monitoramento em tempo real para facilitar a interpretação dos dados.



Fonte: Próprio autor.

É visível também, na Figura 41b a redução da banda de emissão da clorofila, excitação 405 nm e emissão em 660 nm, além da redução da banda mais intensa do óleo, excitação 350 nm e emissão 420 nm. As perdas de intensidade foram menos significativas a medida que o volume de amostra em contato com o feixe de excitação foi diminuído, sendo ainda menos apresentadas quando a intensidade utilizada foi de 0,6 mW.cm<sup>-2</sup>.

Vale ressaltar que a amostra que combinou redução na intensidade de excitação e no volume de amostra em contato com o feixe de excitação apresentou menor redução na intensidade de emissão se comparado com a amostra não degradada, indicando ser este o procedimento mais indicado para o monitoramento em tempo real de fluorescência.

Por fim, foi monitorada em tempo real a intensidade de fluorescência em 510 nm, sob excitação de 405 nm, do óleo vegetal durante degradação térmica com variação de temperatura de 20 a 110 °C e de 110 a 20 °C, com taxa de variação de 0,5 °C.min<sup>-1</sup>. Porém, desta vez a intensidade luminosa da fonte foi reduzida para 0,6 mW.cm<sup>-2</sup> e o volume de amostra em contato direto com a amostra para 6%. O resultado destas reduções em comparação com o processo livre de ações externas pode ser visto na Figura 42.

Figura 42: Monitoramento em tempo real da intensidade de fluorescência do óleo de girassol em 510 nm normalizada, com a fonte de excitação desligada ( $\blacksquare$ ), e ligada ( $\circ$ ). A intensidade da fonte foi fixada em 0,6 mW.cm<sup>-2</sup> interagindo com 6% do volume total da amostra.



Fonte: Próprio autor.

Como pode ser visto no gráfico a redução da potência gerou equivalência entre as duas análises, mostrando que a mudança dos parâmetros de volume de amostra em contato com o feixe de excitação e a intensidade do feixe evita que o próprio ato da medida induza processos degradativos na amostra em estudo.

# 7.4. Nanopartículas de ouro

#### 7.4.1. Caracterização e determinação da concentração de nanopartículas

A presença de AuNPs nas amostras de óleo e biodiesel de girassol foi inicialmente avaliada por meio do surgimento da banda de ressonância plasmônica nos espectros de absorção UV-Vís, tendo esta região bem definida dependendo de, entre outros fatores, formato e tamanho [134]. Os espectros de absorção coletados entre 400 e 700 nm são apresentados nas Figuras 43 e 44 abaixo para o biodiesel e para o óleo respectivamente.

Figura 43: Espectro de absorção entre 400 e 700 nm das amostras de biodiesel para diferentes tempos de deposição, juntamente com absorbância na região de 531 nm em função do tempo de deposição.



Fonte: Próprio autor.

Figura 44: Espectro de absorção entre 400 e 700 nm das amostras de óleo para diferentes tempos de deposição, juntamente com absorbância na região de 531 nm em função do tempo de deposição.



Fonte: Próprio autor.

Foi observado um aumento significativo da absorbância na região em questão, indicando assim a presença das AuNPs. Além disso, foi possível observar visualmente a mudança de coloração das amostras, como mostrado ilustrativamente na Figura 45 para o biodiesel em função do tempo de deposição.





Fonte: Próprio autor.

Para determinação da concentração de AuNPs depositado nas amostras em estudo, foi utilizada a técnica de ICP-OES. Previamente, a determinação de concentração de Au nas amostras, foi avaliado efeito da matriz (óleo vegetal ou biodiesel) no processo de quantificação das NPs. A partir das análises de absorção atômica *via* ICP-OES foram determinadas as concentrações de Au presente nas amostras, como mostra a Tabela 7. O intervalo dinâmico linear foi entre 0,20 a 5,00 mg L<sup>-1</sup>, com R<sup>2</sup> = 0,9998. O limite de detecção (LOD), calculado de acordo com as recomendações da IUPAC como 3 vezes o desvio padrão do espaço em branco (Sbl, n = 20) dividido pela inclinação da curva de calibração (m), foi de 0,002 mg L<sup>-1</sup>, com um limite de quantificação (LOQ =  $10 \times$ Sbl / m) e 0,006 mg L<sup>-1</sup> de Au.

| Amostra   | Tempo de        | Concentração                  | %RSD |
|-----------|-----------------|-------------------------------|------|
|           | deposição (min) | ( <b>mg L</b> <sup>-1</sup> ) |      |
| Biodiesel | 2,5             | 5,52 ±0,07                    | 1,30 |
|           | 5,0             | 23,06 ±0,03                   | 0,12 |
|           | 15,0            | 25,45 ±0,26                   | 1,04 |
| Óleo      | 5,0             | 10,52 ±0,09                   | 0,87 |
|           | 15,0            | $38,07 \pm 0,14$              | 0,37 |
|           | 30,0            | 221,58 ±10,06                 | 4,54 |

Tabela-7: Concentração de Au encontrada nas amostras de óleo vegetal e biodiesel juntamente com precisão para diferentes tempos de deposição.

Como esperados, a concentração de AuNPs aumentou em função do tempo de deposição. Todavia, não foi observada uma relação linear entre o tempo de deposição e a concentração de NPs, como mostra a Figura 46.



Figura 46: Concentração de Au encontrada nas amostras de óleo vegetal e biodiesel de girassol para diferentes tempos de deposição.

Fonte: Próprio autor.

Os resultados demonstram um aumento da concentração de Au, em função do tempo de deposição tanto no biodiesel quanto no óleo. Porém este aumento na concentração ocorreu muito mais rápido inicialmente para o biodiesel do que para o óleo, como pode ser visto também na Tabela 7. Para o tempo de deposição de 5 min por exemplo, o óleo apresentou concentração de  $(10,52 \pm 0,09)$  g.ml<sup>-1</sup> enquanto no biodiesel a concentração já alcançava valores de  $(23,06 \pm 0,03)$  g.ml<sup>-1</sup>. Este fato pode ter relação com a diferença de tensão superficial e de viscosidade entre o óleo e biodiesel, uma vez que a corrente evaporadora utilizada foi mantida constante para os dois líquidos, mantendo igual também para os dois a energia cinética dos átomos ou aglomerados de átomos ao chegarem na superfície do líquido [135].

Apesar da taxa de deposição de *sputtering* ser maior no biodiesel se comparado ao óleo, para tempos maiores, a formação de NPs no biodiesel tende para um platô de saturação. Esse comportamento é confirmado pela observação de formação de precipitados no fundo do recipiente para as amostras submetidas a tempos de deposições maiores que 15 minutos, indicando instabilidade das nanoestruturas em concentrações superiores a ~25 mg.L<sup>-1</sup>. Para o óleo vegetal este fato não foi observado, alcançando valores muito maiores de concentração se

comparado com os valores obtidos para o biodiesel, não apresentando ainda platô de saturação nem precipitação de material no fundo da amostra.

O fato de obtermos AuNPs estáveis no biodiesel pode ter relação com as cadeias carbônicas dos ésteres metílicos, estas presentes também nos ácidos graxos do óleo vegetal (radicais Rx, Figura 1b, página 5). Devido às condições da câmara de deposição, atmosfera apolar de argônio, as cadeias derivadas de ácidos graxos vão tender à superfície por se tratarem da parte mais apolar do óleo considerando sua composição. Estas cadeias se agregam a superfície dos aglomerados de átomos presentes na superfície do líquido impedindo que se unam aos aglomerados vizinhos, estabilizando assim as nanopartículas. Este mecanismo de estabilização foi proposto e abordado por Wender e colabores em [135].

A saturação para deposição de AuNPs em biodiesel, atingida para concentrações superiores a 25 mg.L<sup>-1</sup> pode ter relação com a mobilidade dos aglomerados de átomos de ouro na superfície do líquido durante a deposição. Esta mobilidade é controlada, entre outros parâmetros experimentais que se mantiveram constantes para todas as deposições, pelo tamanho das moléculas do meio e pela capacidade de coordenação das moléculas do meio. Quanto menor a molécula maior a mobilidade das NPs na superfície, aumentado assim a probabilidade de colisões gerando aglomerados maiores [135]. Como o biodiesel é constituído de moléculas menores que o óleo vegetal, ésteres metílicos produtos da quebra dos próprios triglicerídeos constituintes do óleo vegetal, a mobilidade das NPs é maior nele se comparado ao óleo vegetal, ocasionando o efeito de saturação não observado no óleo vegetal.

A determinação do tamanho médio das NPs depositadas nas amostras foi realizada por meio de imagens obtidas por um microscópio eletrônico de transmissão. A partir das imagens foram construídos histogramas da distribuição dos diâmetros das NPs. Foram obtidas imagens com escalas desde 5 até 200 nm, garantindo assim análises desde partículas individuais até um conjunto de partículas. Algumas imagens ilustrativas e o histograma de distribuição de diâmetro para cada tempo de deposição são apresentados nas Figuras 47, 48 e 49 para o biodiesel e nas Figuras 50, 51 e 52 para o óleo.

É possível notar que as partículas depositadas em biodiesel apresentam formatos que se aproximam do esférico, considerando tanto imagens das partículas individuais quanto as imagens com um conjunto de partículas, eliminando assim enganos devido à perspectiva. A partir dos resultados também foi possível demonstrar que de fato foram produzidas partículas em escala nanométrica. Todavia, independentemente do tempo de deposição, obtiveram-se partículas com diâmetro médio de aproximadamente 4,0 nm no biodiesel. No caso do óleo vegetal, as partículas depositadas também apresentaram formato aproximadamente esférico. Os diâmetros médios ficaram entre 3,4 e 8,0 nm para o óleo, no qual foi determinado que o comportamento do tamanho médio das partículas em função do tempo de deposição apresentou diâmetros menores e menos dispersos para tempos maiores.

O comportamento da distribuição do tamanho das nanopartículas no óleo vegetal pode ter relação com a capacidade de coordenação de superfície, sendo este governado pelas interações entre determinadas regiões das moléculas do óleo quem vem a ocupar a superfície do líquido, neste caso as insaturações presentes nas cadeias carbônicas dos ácidos graxos do óleo vegetal. Desta forma, para explicar o comportamento de NPs maiores para tempos menores no óleo vegetal devemos considerar os processos de formação das NPs e em que região do óleo estes processos podem vir a ocorrer. Considerando primeiramente um intervalo de tempo pequeno, a deposição de ouro se inicia com aglomerados e átomos de ouro ocupando apenas a superfície do líquido, cessando a deposição com um intervalo pequeno de tempo tem-se ocorrendo na superfície do óleo processos de nucleação das NPs, formando as NPs menores, porém devido a capacidade de coordenação das moléculas do óleo ocorre também o processo de crescimento, onde os núcleos formados no processo anterior se unem aos núcleos vizinhos e só então as NPs, crescidas, conseguem penetrar no interior do óleo. O segundo caso, para tempos maiores de deposição, a formação das NPs pode vir a ocorrer em camadas mais internas do óleo, uma vez que a deposição contínua força o núcleos já formados a imergir antes mesmo de seu crescimento, gerando assim NPs menores que as NPs formadas em tempos pequenos.

Figura 47: Imagens de MET com escalas de 5, 5, 50 e 50 nm respectivamente, e histograma de distribuição de diâmetro das Au NPs depositadas em biodiesel de óleo vegetal de girassol durante 2,5 min.



Fonte: Laboratório de Microscopia e Microanálise (LAMM), Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), e próprio autor.

Figura 48: Imagens de MET com escalas de 5, 5, 20 e 50 nm respectivamente, e histograma de distribuição de diâmetro das Au NPs depositadas em biodiesel de óleo vegetal de girassol durante 5,0 min.



Fonte: LAMM no CETENE, e próprio autor.

Figura 49: Imagens de MET com escalas de 5, 5, 50 e 100 nm respectivamente, e histograma de distribuição de diâmetro das Au NPs depositadas em biodiesel de óleo vegetal de girassol durante 15,0 min.



Fonte: LAMM no CETENE, e próprio autor.





Fonte: LAMM no CETENE, e próprio autor.





Fonte: LAMM no CETENE, e próprio autor.

Figura 52: Imagens de MET com escalas de 5, 5, 50 e 50 nm respectivamente, e histograma de distribuição de diâmetro das Au NPs depositadas em óleo vegetal de girassol durante 30,0 min.



Fonte: LAMM no CETENE, e próprio autor.

#### 7.4.2. Influência das Au NPs na estabilidade oxidativa

A análise da estabilidade oxidativa foi realizada a partir da evolução temporal da condutividade obtida pelo método Rancimat<sup>®</sup> de acordo com norma internacional EN14112. A Figura 53 apresenta os resultados do método Rancimat<sup>®</sup> para o biodiesel , onde se observa as alterações na condutividade à medida que se aumenta o tempo de deposição das AuNPs nas amostras. O rápido aumento da condutividade nos instantes iniciais da análise já indica a forte influência das NPs na estabilidade oxidativa.

Figura 53: Medidas de condutividade elétrica obtidas utilizando método Rancimat<sup>®</sup> segundo norma internacional EN14112 para amostras de biodiesel de girassol variando o tempo de deposição de Au.



Fonte: Próprio autor.

A partir do cálculo da segunda derivada da curva de condutividade apresentada na Figura 54 foi possível determinar o período de indução (PI) das amostras de biodiesel de girassol para os diferentes tempos de deposição de Au. Como mostra a Figura 54, o PI diminui exponencialmente em função do tempo de deposição, de modo que apenas 2,5 min de deposição geraram uma redução entorno de 3,75 vezes no PI. Note que não houve uma alteração significativa para a degradação induzida nas amostras submetidas aos tempos de deposição de 10 e 15 minutos. Este comportamento indica saturação das amostras quanto à adição de Au para mudanças no PI, de modo que o aumento no tempo de deposição (acima de 10 minutos) não gera mais diferença na estabilidade oxidativa das amostras.

Figura 54: Período de indução obtido a partir da segunda derivada das medidas de condutividade utilizando método Rancimat<sup>®</sup> para amostras de biodiesel com diferentes tempos de deposição de Au.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 55 mostra os valores da condutividade para o óleo vegetal submetido aos diferentes tempos de deposição de Au, revelando a grande influência da presença das AuNPs no PI das amostras.

Figura 55: Medidas de condutividade elétrica obtidas utilizando método Rancimat<sup>®</sup> segundo norma internacional EN14112 para amostras de óleo vegetal de girassol variando o tempo de deposição de Au.



Fonte: Próprio autor.

A partir do cálculo da segunda derivada da curva de condutividade em função do tempo foi possível determinar o PI e demonstrar a drástica diminuição da estabilidade oxidativa do óleo quando presente AuNPs nas amostras. A Figura 56 mostra que o PI apresentou decaimento exponencial à medida que aumentou-se o tempo de deposição de AuNPs, de modo que a deposição durante apenas 5 min resultou em uma redução entorno de 2,66 vezes no PI. A rápida diminuição de PI durante os quinze primeiros minutos de deposição sugere a saturação no processo de degradação das amostras quanto à presença de NPs.

Figura 56: Período de indução obtido a partir da segunda derivada das medidas de condutividade utilizando método Rancimat<sup>®</sup> para amostras de óleo vegetal com diferentes tempos de deposição de Au.



Fonte: Próprio autor.

Podemos associar esta alteração no PI às influências de metais em óleos vegetais e também em biodieseis. Sabe-se que a presença de metais acelera a oxidação devido à decomposição em hidroperóxidos e formação de espécies reativa de oxigênio [132], no entanto o efeito de NPs ainda não havia sido abordado apesar das variadas propostas de aplicações destas tanto em óleos vegetais quanto em biodieseis, como já foi abordado anteriormente. Investigações futuras devem ser realizadas para esclarecer se este comportamento é particular à AuNPs ou se apresenta também para NPs de outros materiais, ou até mesmo responder se esta é uma ação do carácter nano do composto ou do próprio ouro. Uma ótima alternativa a esta queda no PI devido à adição de NPs no óleo vegetal e no biodiesel, de modo que não venha a prejudicar as aplicações já propostas para uso de AuNPs em óleos e biodieseis, pode ser a adição de antioxidantes, porém a utilização destes antioxidantes juntamente com as NPs deve ser analisada caso a caso.

### 7.4.3. Caracterização Ótica

Além do aumento da absorbância na região já esperada, a banda de ressonância plasmônica associada a AuNPs, foi observado também um aumento na região ~318 nm, o que pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 57 e 58 para o óleo e o biodiesel respectivamente. Nesta região, a absorbância aumentou com o aumento do tempo de deposição. Este comportamento foi observado em amostras contendo AuNPs depositadas tanto óleo vegetal quanto em biodiesel.

Figura 57: Espectro de absorção entre 290 e 350 nm das amostras de óleo para diferentes tempos de deposição, juntamente com absorbância na região de 318 nm em função do tempo de deposição. Amostras diluídas em hexano a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>.



Fonte: Próprio autor.

Figura 58: Espectro de absorção entre 290 e 350 nm das amostras biodiesel de óleo para diferentes tempos de deposição, juntamente com absorbância na região de 318 nm em função do tempo de deposição. Amostras diluídas em hexano a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>.



Fonte: Próprio autor.

Adicionalmente, foram avaliadas também as alterações no comportamento da fluorescência do óleo e do biodiesel na presença de NPs. Para isso foi obtido o mapa de excitação/emissão das amostras, excitando entre 270 e 370 nm e coletando a emissão entre 275 e 600 nm, como apresentado na Figura 59.

Figura 59: Mapa de excitação/emissão de fluorescência com excitação entre 270 e 370 nm e medida da emissão entre 275 e 600 nm para as amostras de óleo vegetal de girassol com diferentes tempos de deposição de Au. Amostras diluídas em hexano a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>.



Fonte: Próprio autor.

A partir do mapa de excitação/emissão de fluorescência do óleo vegetal, observamos inicialmente a presença de duas bandas de emissão bem definidas na amostra de óleo sem AuNPs, uma mais intensa com emissão máxima em 325 nm quando excitada com 300 nm, e a segunda com emissão máxima em torno dos 410 nm com excitação em 318 nm e significativa também com excitação em 305 nm.

Um fato interessante a ser observado é que a presença das AuNPs suprimiu a banda de emissão existente em 325 nm com excitação em 300 nm e observou-se em geral um aumento da emissão na segunda banda em 410 nm com excitação em 318 nm. Vale ressaltar que a região onde foi detectado o aumento da emissão devido à presença de AuNPs coincide com a região onde ouve também um aumento da absorbância, como mostra para o óleo a Figura 57.

O aumento da intensidade de emissão na presença de NPs, juntamente com aumento da absorbância na região em questão indicam a presença do efeito de *Metal-Enhanced Fluorescence*. Outro fator que indica o efeito de metal MEF é a supressão inicial para o tempo de deposição de 5,0 min seguido de um aumento para 15 min e diminuição novamente para 30 min. Este comportamento exclui a hipótese do aumento de intensidade deva-se a algum processo degradativo devido à presença das AuNPs,

A redução da intensidade de emissão detectada na amostra com 5,0 min de deposição em óleo, Figura 59, pode ter relação com tamanho das AuNPs pois esta foi justamente a amostra que apresentou maior diâmetro médio, cerca de (8±3) nm. Para o tempo de deposição de 15 min o sistema atingiu intensidade máxima de emissão, se tornando próxima à da amostra controle para o tempo de 30 min. Esta redução da intensidade para 30 min de deposição pode ser um efeito de supressão devido à concentração ter alcançado valor relativamente alto,  $(221,58 \pm 10,06)$  mg.L<sup>-1</sup>.

O biodiesel apresentou efeito na mesma região de excitação e banda de emissão detectados no óleo, não sendo observada supressão de fluorescência para tempos pequenos de deposição, como pode ser analisado na Figura 60.





Fonte: Próprio autor.

Vale a pena ressaltar que não foi observada grande variação de tamanho nas NPs depositadas em biodiesel ficando todas em torno dos 4 nm, este fato reforça a ideia de a supressão inicial observada no óleo vegetal ter relação com o tamanho. O aumento na intensidade de emissão foi reduzido para tempos maiores de deposição, sugerindo efeito de supressão devido à alta concentração, como foi observado também no óleo vegetal.

O comportamento da emissão do biodiesel para a amostra sem deposição de NPs, como já esperado, é similar ao do óleo também sem deposição, Figura 59, fazendo-se presente inicialmente as duas bandas de emissão características em 325 nm som excitação em 300 nm e com menor intensidade a emissão em 410 nm com excitação em 318. Assim como no óleo a presença das Au NPs gerou supressão da banda mais intensa em 325 nm e um aumento de intensidade na em 410 nm, região onde também ouve aumento na absorbância (Figura 58) indicando fenômeno de MEF.

Em geral as amostras de óleo vegetal e biodiesel de girassol na presença de AuNPs apresentaram aumento de intensidade de sinal de cerca de 3 vezes para o óleo e 8 vezes para o biodiesel quando observado a emissão em ~410 nm devido uma excitação em 318 nm. Este aumento de intensidade pode ser uma ótima ferramenta a ser utilizada para melhorar limites de detecção e quantificação em aplicações da espectroscopia de fluorescência, por exemplo quantificação de biodiesel em misturas com diesel, entre outros.

Finalizando a análise da influência das AuNPs no comportamento ótico das amostras, determinamos as alterações induzidas pelas AuNPs no tempo de vida de fluorescência dos fluoróforos presentes no óleo e biodiesel. O tempo de vida de fluorescência foi medido para excitação em 280 nm. Observou-se para o óleo e o biodiesel em geral um aumento no tempo de vida de fluorescência, como mostram as Figuras 61 e 62, respectivamente.

É visível também a mudança de comportamento do decaimento, de duas exponenciais para monoexponencial. Observando o mapa de excitação/emissão e considerando o comprimento de onda de excitação de 280 nm podemos afirmar que nos decaimentos biexponencial temos a presença de duas bandas de emissão, aparecendo também a contribuição da banda centrada com excitação em ~300 nm e emissão em 325 nm. No entanto, com a presença das Au NPs a banda de 325 nm foi suprimida e a de 410 nm teve sua intensidade aumentada pelo efeito de MEF tornando o decaimento monoexponencial.

Figura 61: Decaimento de fluorescência com pulso de excitação em 280 nm para amostras de óleo com diferentes tempos de deposição de Au, juntamente com tempo de vida médio de fluorescência em função do tempo de deposição de Au. Amostras diluídas em hexano a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>. Sendo utilizado filtro para comprimentos de onda menores que 320 nm antes do detector.



Fonte: Próprio autor.

Figura 62: Decaimento de fluorescência com pulso de excitação em 280 nm para amostras de biodiesel com diferentes tempos de deposição de Au, juntamente com tempo de vida médio de fluorescência em função do tempo de deposição de Au. Amostras diluídas em hexano a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>. Sendo utilizado filtro para comprimentos de onda menores que 320 nm antes do detector.



Fonte: Próprio autor.

Além da mudança de comportamento, podemos observar também um aumento do tempo de vida de fluorescência para as amostras de óleo e de biodiesel. No biodiesel, as amostras contendo AuNPs apresentaram cerca de 80% de aumento no valor do tempo de vida médio se comparado a amostra sem deposição, para o óleo este ganho no tempo de vida de vida de fluorescência ficou entre 60 e 100%. Este efeito de aumento no tempo de vida de fluorescência também reforça a existência de MEF [123-126].

Outro fator importante a ser considerado é a independência do tempo de vida de fluorescência com a concentração [123-126]. Este fato condiz com o resultado obtido para o biodiesel, onde temos AuNPs de aproximadamente 4,0 nm para todos os tempos de deposição mudando somente a concentração com valores de tempos de vida próximos entre sí, em torno dos 3,7 ns (Figura 62b). Condiz também com o observado no óleo vegetal, que apresentou maior variação de tamanho nas AuNPs, o menor tempo de vida na presença de NPs foi obtido para a amostra com 5,0 min de deposição que contém as maiores NPs com 8 nm, os outros dois tempos de deposição, 15 e 30 min, geraram decaimentos com tempo de vida próximos aos valores apresentados também no biodiesel, inclusive com tamanhos em torno de 3,7 e 3,4 nm respectivamente. Este fato sugere que o tempo de vida tenha relação com tamanho das AuNPs.

Num apanhado geral com relação às propriedades ópticas das amostras de óleo vegetal de girassol e biodiesel pode-se dizer que a espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo apresentou potencial aplicabilidade na detecção da presença de NPs em amostras de óleo e biodiesel devido ao aumento no tempo de vida de fluorescência. Além disso, a presença de AuNPs se mostrou eficaz no aumento da intensidade de fluorescência de amostras de óleo e biodiesel, podendo desta forma, serem utilizadas com intuito de melhorar a sensibilidade e capacidade analítica da técnica de espectroscopia de fluorescência para monitorar e estudar óleos vegetais e biodieseis, podendo ser utilizada particularmente na amostra a ser analisada, de modo que, a redução do período de indução devivo à sua presença não seja um problema.

# 8. Conclusões

Resultados confirmaram que a fonte de excitação é capaz de degradar amostras durante o monitoramento em tempo real e *in situ*, tanto em amostras de óleo vegetal de girassol quanto em seu respectivo biodiesel, resultando em análises errôneas, o que não havia sido abordado anteriormente na literatura. Os resultados de UV-Vís e índice de acidez confirmam este fato. Dependendo da intensidade da excitação sob a amostra e do volume analisado, a fonte de excitação pode induzir processos oxidativos (fotodegradação) devido à baixa estabilidade oxidativa das amostras, óleo vegetal de girassol ou biodiesel do mesmo. Mostrou-se que a intensidade do feixe de excitação e o volume de amostra em contato com o laser influenciam na fotodegradação induzida. Porém, os resultados mostram que a técnica de espectroscopia de fluorescência pode ser aplicada com sucesso para o monitoramento em tempo real e *in situ* de óleo vegetal e biodiesel, desde que seja utilizada baixa intensidade da fonte luminosa interagindo com uma pequena porção do volume total da amostra.

Foram adicionadas NPs em amostras de óleo vegetal e biodiesel de girassol utilizando câmara de deposição sputtering, sendo depositadas pela primeira vez em biodiesel. A absorbância na região da banda de ressonância plasmônica apresentou comportamento linear com o aumento do tempo. O coeficiente linear obtido do ajuste se mostrou maior para o biodiesel, indicando que as NPs foram adicionadas ao mesmo com mais "facilidade", este fato pode ter relação direta com a diferença de tensão superficial entre o biodiesel e o óleo. Foi medida a concentração de Au depositada nas amostras, apresentando aumento com o tempo de deposição. Os valores alcançados no óleo vegetal foram maiores que para o biodiesel. A variação da concentração foi pequena para tempos maiores de deposição no biodiesel sugerindo saturação, sugestão confirmada pela presença de precipitação no fundo de amostras com tempo de deposição maiores que 15 minutos. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão forneceram a distribuição de tamanho das NPs depositadas. As partículas se apresentaram aproximadamente esféricas. No biodiesel não houve variação significativa no diâmetro das NPs depositadas, ficando em torno dos 4,0 nm. O óleo vegetal apresentou NPs maiores para tempos de deposição menores, comportamento este não esperado, fazendo-se necessários estudos futuros para compreender o motivo.

Avaliou-se pela primeira vez o efeito de NPs na estabilidade do óleo vegetal e do biodiesel. A estabilidade foi monitorada pela medida do período de indução segundo metodologia padrão EN14112 em equipamento Rancimat<sup>®</sup>. Observou-se rápido aumento da

condutividade nas amostras, tanto para o óleo quanto para o biodiesel, sendo observado decaimento exponencial em função do tempo de deposição de NPs.

Quanto às propriedades óticas das amostras de óleo e biodiesel na presença de Au NPs, foi observado efeito de *Metal-Enhanced Fluorescence* apresentando mais intenso no biodiesel. A emissão foi favorecida na região de ~410 nm, referente ao aumento da absorbância na região de 318 nm, gerando também supressão da emissão da banda em 325 nm com excitação em 300 nm. Foi observado também aumento no tempo de vida de fluorescência na presença de AuNPs reforçando efeito de MEF. Em algumas amostras de óleo vegetal a presença das AuNPs gerou supressão de fluorescência, o que pode estar relacionado com a variação de tamanho também observado nas mesmas, fato este também confirmado pelo comportamento do tempo de vida de fluorescência.

# Referências

[1] A.J. Dijkstra, G. Duijn, *Reference Module in Food Science - Encyclopedia of Food and Health*, 318-386 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00707-8</u>

[2] G. Badea, I. Lacatusu, N. Badea, C. Ott, A. Maghea, *Industrial Crops and Products*, 67, 18–24 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.049</u>

[3] M.S. Reddy, N. Sharma, A.K. Agarwal, *Renewable Energy* 99, 1008-1018 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.07.072

[4] H. Tse, C.W. Leung, C.S. Cheung, *Energy* 83, 343-350 (2015). http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2015.02.030

[5] A.E. Özçelik, H. Aydogan, M. Acaroglu, *Energy Conversion and Management* 96, 47-57 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2015.02.024</u>

[6] T. Shaafi, R. Velraj, *Renewable Energy* 80, 655-663 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.02.042</u>

[7] R.A. Candeia, M.C.D. Silva, J.R. Carvalho Filho, M.G.A. Brasilino, T.C. Bicudo, I.M.G. Santos, A.G. Souza, *Fuel* 88, 738–743 (2009). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2008.10.015</u>

[8] R.K. Saluja, V. Kumar, R. Sham, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 62, 866–881 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.001</u>

[9] A. Syed, Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats, cap. 4, 187-207 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-63067-056-6.00004-5</u>

[10] Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test), The European Standard EN14112, European Committee for Standardization.

[11] V.D. Silva, J.N. Conceição, I.P. Oliveira, C.H. Lescano, R.M. Muzzi, O.P.S. Filho, EC. Conceição, G.A. Casagrande, A.R.L. Caires, *Journal of Spectroscopy* 803705, 1-6 (2015). http://dx.doi.org/10.1155/2015/803705

[12] T. Izida, L. Bussler, J.R. Silva, L.H.C. Andrade, E. Simionatto, E.L. Simionatto, D.R. Scharf, S.M. Lima, *Fuel* 145, 109–115 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.077</u>

[13] A.R.L. Caires, V.S. Lima, S.L. Oliveira, *Renewable Energy* 46, 137-140 (2012). http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.03.026

[14] M. Insausti, C. Romano, M.F. Pistonesi, B.S.F. Band, *Microchemical Journal* 108 32–37 (2013). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.12.007</u>

[15] W.L.G. da Silva, A.A. Salomão, M.M.D.C. da Vila, M. Tubino, *Journal of the Brasilian Chemical Society* 28:4, 676-680 (2017). <u>http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20160202</u>

[16] A.S.N. Trindade, A.F. Dantas, D.C. Lima, S.L.C. Ferreira, L.S.G. Teixeira, *Food Chemistry* 185, 145-150 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.118</u>

[17] L.M. Katz, K. Dewan, R.L. Bronaugh, *Food and Chemical Toxicology* 85, 127-137 (2015). http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.020

[18] N. Degirmenbasi, S. Coskun, N. Boz, D.M. Kalyon, *Fuel* 153, 620-627 (2015). http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2015.03.018

[19] C. Poonjarernsilp, N. Sano, H. Tamon, *Applied Catalysis A: General* 497, 145-152 (2015). http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2015.03.013

[20] S. Menoncin, N.M. Domingues, D.M.G. Freire, J.V. Oliveira, M.D. Luccio, H. Treichel, D. Oliveira, *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 29:2, 440-443 (2009). http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n2/33.pdf

[21] M. Raita, J. Arnthong, V. Champreda, N. Laosiripojana, *Fuel Processing Technology* 134, 189-197 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.01.032</u>

[22] M. Babaki, M. Yousefi, Z. Habibi, M. Mohammadi, P. Yousefi, J. Mohammadi, J. Brask, *Renewable Energy* 91, 196-206 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.053</u>

[23] M. Banetjee, B. Dey, J. Talukdar, M.C. Kalita, *Energy* 69, 695-699 (2014). http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.03.065

[24] E. Bet-Moushoul, K. Farhadi, Y. Mansourpanah, A.M. Nikbakht, R. Molaei, M. Forough, *Fuel* 164, 119-127 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2015.09.067</u>

[25] M.S. Rao, R.B. Anand, *Applied Thermal Engineering* 98, 636-645 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2015.12.090

[26] H. Venu, V. Madhavan, *Fuel* 186, 176-189 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.046

[27] J. Syed, M. Yedithasatyam, M.R.S. Satyanarayana, R.R. Reddy, K. Rajagopal, *Journal of Cleaner Production* 137, 490-506 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.125</u>

[28] H. Wender, P. Migowski, A.F. Feil, S.R. Teixeira, J.Dupount, *Coordination Chemistry Reviews* 257, 2468-2483 (2013). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.013</u>

[29] H. Wender, L.F. Oliveira, A.F. Feil, E. Lissner, P. Migowski, M.R. Meneghetti, S.R. Teixeira, J. Dupont, Chemical Communications 46, 7019-7021 (2010). http://dx.doi.org/10.1039/C0CC01353F

[30] Z. Yaakob, B.N. Narayanan, S. Padikkaparambil, S. Unni K., M. Akbar P., *Renewable and Sustainable Energy Reviews*35,136–153(2014).http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.055
[31] H.Y. Shin, S.M. Lim, S.Y. Bae, S.C. Oh, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 92, 332–338 (2011). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2011.07.003</u>

[32] Y.H. Chen, Y.M. Luo, *Fuel Processing Technology* 92, 1387–1393 (2011). http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.03.003

[33] J. Pullen, K. Saeed, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 5924–5950 (2012). http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.06.024

[34] Z. Yang, B.P. Hollebone, Z. Wang, C. Yang, M. Landriault, *Fuel* 104, 342–350 (2013). http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.09.001

[35] Z. Yang, B.P. Hollebone, Z. Wang, C. Yang, M. Landriault, *Fuel Processing Technology* 106, 366–375 (2013). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.09.001</u>

[36] W.W. Focke, I. van der Westhuizen, A.B.L. Grobler, K.T. Nshoane, J.K. Reddy, A.S. Luyt, *Fuel* 94, 227–233 (2012). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.061</u>

[37] J.M. Yun, J. Surh, *Preventive Nutrition and Food Science* 17:2, 158-165 (2012). http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2012.17.2.158

[38] AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, **RESOLUÇÃO N° 45**, de 25-8-2014.

[39] S. Froehner, J. Leithold, *Química Nova* 30:8, 2016-2019 (2007). http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000800037

[40] K.F. Magalhães, *Tese de Doutorado em Química*, UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL (2016).

[41] M. Guinazi, R.C.R.M. Milagres, H.M.P. Sant'Ana, J.B.P. Chaves, *Química Nova* 32:8, 2098-2103 (2009). <u>http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000800021</u>

[42] F.L. de Morais, *Curso de Especialização em Qualidade em Alimentos*, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (2006).

[43] M. Uenojo, M.R.M. Junior, G.M. Pastore, *Química Nova* 30:3, 616-622 (2007). http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300022

[44] C. Bele, C.T. Matea, C. Raducu, V. Miresan, O. Negrea, *Notulae Botanic Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41:1, 93-96 (2013). <u>http://dx.doi.org/10.15835/nbha4119027</u>

[45] N.M. Streit, L.P. Canterle, M.W. do Canto, L.H. Hecktheuer, *Ciência Rural* 35:3, 748-755 (2005). <u>http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043</u>

[46] Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, Active Standard ASTM D6751. <u>http://dx.doi.org/10.1520/D6751-15CE01</u>

[47] Flüssige Kraftstoffe - Dieselkraftstoff aus Fettsäuremethylester (FAME) – Mindestanforderungen, Draft standard DIN 51606.

[48] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **INSTRUÇÃO NORMATIVA N°49**, de 22-12-2006.

[49] G. Karavalakis, S. Stournas, *Energy Fuels* 24, 3682–3686 (2010). http://dx.doi.org/10.1021/ef1004623

[50] R. de Guzman, H. Tang, S. Salley, K. Y. Simon Ng, *J Am Oil Chem Soc* 86:459–467 (2009). <u>http://dx.doi.org/10.1007/s11746-009-1373-8</u>

[51] S. Jain, M.P. Sharma, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:1, 438–448 (2011). http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.08.022

[52] F.A.M. Silva, M.F.M. Borges, M.A.Ferreira, *Química Nova* 22:1, 94-103 (1999). http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000100016

[53] D. Mafra, D.S.P. Abdalla, S.M.F. Cozzolino, *Rev. Nutr., Campinas*, 12:3, 205-212 (1999). <u>http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52731999000300001</u>

[54] V.C. Ramalho, N. Jorge, Química Nova 29:4, 755-760 (2006). http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400023

[55] D.R. Lehnen, Epoxidação de biodiesel na ausência de solvente, TCC – IG UFRGS (2011).

[56] B.R. Cuyena, *Thin Solid Films* 518, 3127-3150 (2010). http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2010.01.018

[57] E. Casals, E. Gonzalez, V.F. Puntes, *Journal of Physics D: Applied. Physics* 45:44, 443001-443016 (2012). <u>https://doi.org/10.1088/0022-3727/45/44/443001</u>

[58] S.T. Stern, S.E. McNeil, *Toxicological. Sciences* 101:1, 4-21 (2008). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm169

[59] E. Ringe, M.R. Langille, K. Sohn, J. Zhang, J. Huang, C.A. Mirkin, R.P.V. Duyne, L.D. Marks, *The Journal of Physical Chemistry Letters* 3, 1479-1483 (2012) https://dx.doi.org/10.1021/jz300426p

[60] M.L. Steigerwald, L.E. Brus, Accounts of Chemical Research, 23:6, 183-188 (1990). https://dx.doi.org/10.1021/ar00174a003

[61] S.L. Lai, J.Y. Guo, V. Petrova, G. Ramanath, L.H. Allen, *Physical. Review Letters* 77:1, 99-102 (1996). <u>https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.77.99</u>

[62] Nanoparticles – Vocabulary, BSI Standards Publication, PAS 71:2011.

[63] P.C.S. Filho, O.A. Serra, Química Nova 38:5, 679-696 (2015). http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150049 [64] H.W.L. dos Santos, *Tese de Doutorado em Física*, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (2011).

[65] M.A. Gelesky, A.P.Umpierre, G. Machado, R.R.B. Correia, W.C. Magno, J. Morais, G. Ebeling, J. Dupont, Journal of The American Chemical Society 127:13, 4588-4589 (2005). https://doi.org/10.1021/ja042711t

[66] K. Richter, A. Birkner, and A.-V. Mudring, *Angewandte Chemie International Edition* 49, 2431-2435 (2010). <u>http://dx.doi.org/10.1002/anie.200901562</u>

[67] H. Wender, L.F. de Oliveira, P. Miigowski, A.F. Feil, E. Lissner, M.H.G. Prechtl, S.R. Teixeira, J. Dupont, *The Journal of Physical Chemistry C* 114:27, 11767-11768 (2010). http://dx.doi.org/10.1021/jp102231x

[68] T. Torimoto, K. Okazaki, T. Kiyama, *Applied Physics Letters* 89:243117, 1-3 (2006). https://doi.org/10.1063/1.2404975

[69] T. Suzuki. K. Okazaki, T. Kiyama, S. Kuwabata, T. Torimoto, *Electrochemistry* 77:8, 636-638 (2009). <u>https://doi.org/10.5796/electrochemistry.77.636</u>

[70] Y. Hatakeyama, S. Takahashi, K. Nishikawa, *The Journal of Physical Chemistry C* 114:25, 11098-11102 (2010). <u>https://doi.org/10.1021/jp102763n</u>

[71] M. Carbone, D.T. Donia, G. Sabbatella, R. Antiochia, *Journal of King Saud University-Science* 28:4, 273-279 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2016.05.004</u>

[72] F. Suter, D. Schmid, F. Wandrey, F. Zülli, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 108, 304-309 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.014</u>

[73] J. Pardeike, A. Hommoss, R.H. Müller, *International Journal of Pharmaceutics* 366, 170-184 (2009). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003</u>

[74] P. Zhang, X. Liu, W. Hu, Y. Bai, L. Zhang, *Carbohydrate Polymers* 149, 224-230 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.115

[75] A.M. El-Kady, M.M. Farag, A.M.I. El-Rashedi, *European Journal of Pharmaceutical Science* 91, 243-250 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.004</u>

[76] K. Braun, A. Pochert, M. Lindén, M. Davoudi, A. Schmidtchen, *Journal of Colloid and Interface Science* 475, 161-170 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.002</u>

[77] V.G.L. Sousa, A.L. Fernando, *Food Packaging and Shelf Life* 8, 63-70 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.04.001

[78] X. Yu, J. Shi, L. Wang, W. Wang, J. Bian, L. Feng, C. Li, *Materials Letters* 182, 125-128 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2016.06.095</u>

[79] X. Jia, X. Chen, J. Han, J. Ma, Z. Ma, *Biosensors and Bioelectronics* 53, 65-70 (2014). http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.021

[80] V. Vilas, D. Philip, J. Mathew, *Journal of Molecular Liquids* 221, 179-189 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.05.066

[81] J.G. Croissant, D. Zhang, S. Alsaiari, J. Lu, L. Deng, F. Tamanoi, A.M. AlMalik, J.I. Zink, N.M. Khashab, *Journal of Controlled Release* 229, 183-191 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.030

[82] S. Kumar, P. Sangwan, V. Lather, D. Pandita, *Journal of Drug Delivery Science and Tecnology* 30, 54-62 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.016</u>

[83] E.A. Taborda, C.A. Franco, S.H. Lopera, V. Alvaro, F.B. Cortés, *Fuel* 184, 222-232 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.07.013</u>

[84] F.D. Pelle, D. Vilela, M.C. González, C.L. Sterzo, D. Compagnone, *Food Chemistry* 178, 70-75 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.045</u>

[85] J.F.L. Santos, M.J.L. Santos, A.T.F. Tavares, J. Griep, M.R.F. Rodrigues, *Química Nova* 39:9, 1098-1111 (2016). <u>http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160126</u>

[86] W.S. Chang, B. Willingham, L.S. Slaughter, S.D. Medina, P. Swanglap, S. Link, *Accounts of Chemical Research* 45:11, 1936-1945 (2012). <u>http://doi.org/10.1021/ar200337u</u>

[87] M. Notarianni, K. Vernon, A. Chou, M. Aljada, J. Liu, N. Motta, Solar Energy 109, 23-37 (2014). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.solener.2013.09.026</u>

[88] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, Thomson Learning: Mexico, 680p (2001).

[89] B. Valeur, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 399p (2001).

[90] J.R. Lakowicz, *Topics in Fluorescence: Volume 1-Techniques*, Edition Book, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 468p (2002).

[91] S.F. Stefenon, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU (2015).

[92] J.M. Hollas, Modern Spectroscopy, John Wiley & Sons, Ltd: USA, 483p (2004).

[93] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, INC: USA, 550p (2005).

[94] R. Eisberg, R. Resnick, *Física Quântica: Atomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*, Editora Campus; Elsevier, 928p (1994).

[95] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York NY, 8 ed. 1085p (2006).

[96] J.D. Ayala, *Teoria do Orbital Molecular*, Nota de Aula.

[97] J.M. G. Martinho, Química-Técnicas Experimentais: 52, 44-48 (1994).

[98] W.X. Rocha, Ligações químicas (1999).

[99] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Thomson Books: USA, 1057p (2007).

[100] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer: USA, 960p (2006).

[101] B. Herman, V.E.C. Frohlich, J.R. Lakowicz, D.B. Murphy, K.R. Spring, M.W. Davidson, Fluorescence microscopy – Basic Concepts in Fluorescence, *Molecular Expressions - Optical Microscopy Primer* (2015).

[102] S. Qin, J. Meng, X. Tang, L. Yang, *Talanta* 146, 452–456 (2016). http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.011

[103] J.A. Rauscha, R. Bienerta, C. Grimma, D.B. Sartorius, *Journal of Biotechnology* 189, 120–128 (2014). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.004</u>

[104] J.N. Louvet, B. Homeky, M. Casellas, M.N. Pons, C. Dagot, *Chemosphere* 91, 648–655 (2013). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.011</u>

[105] A.M. Hoffmann, G. Noga, M. Hunsche, Scientia Horticulturae 191, 74-81 (2015).

[106] L.Riveraa, M. Puyol, F. Villuendasb, J. Alonsoa, *Sensors and Actuators B* 134, 863–868 (2008). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.06.036</u>

[107] T. Fukuda, N. Funakia, T. Kurabayashia, M. Suzukia, D.H. Yoonb, A. Nakaharab, T. Sekiguchib, S. Shojib, *Sensors and Actuators B* 203, 536–542 (2014). http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.045

[108] A. Aït-Kaddour, T. Boubellouta, I. Chevallier, *Meat Science* 88, 675–681 (2011). http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.027

[109] A. Baker, S. A. Cumberland, C. Bradley, C. Buckley, J. Bridgemane, *Science of the Total Environment* 532, 14–19 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.114</u>

[110] Y.L. Qin, X.L. Luan, L.J. Bi, Z. Lü, Y.Q. Sheng, G. Somesfalean, C.N. Zhou, Z.G. Zhang, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87, 88–94 (2007). http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.03.002

[111] K.F. Magalhães, A.R.L. Caires, M.S. Silva, G.B. Alcantara, S.L. Oliveira, *Fuel* 119, 120–128 (2014). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.024</u>

[112] M,D. Scherer, S.L. Oliveira, S.M. Lima, L.H.C. Andrade, A.R.L. Caires, *Journal of Fluorescence* 21, 1027–1031 (2011). <u>http://dx.doi.org/10.1007/s10895-010-0815-x</u>

[113] I.P. Oliveira, A.F. Souza, C.H. Lescano, A.R.L. Caires, R.M. Muzzi, *Journal American Oil Chemist's Society* 92, 403–408 (2015).<u>http://dx.doi.org/10.1007/s11746-015-2606-7</u>

[114] T.A. Chimenez, K.F. Magalhães, A.R.L. Caires, S.L. Oliveira, *Journal of Fluorescence* 22, 1177-1182 (2012). <u>http://dx.doi.org/10.1007/s10895-012-1057-x</u>

[115] M. Insausti, A.A. Gomes, F.V. Cruz, M.F. Pistonesi, M.C.U. Araujo, R.K.H. Galvão, C.F. Pereira, B.S.F. Band, *Talanta* 97, 579-583 (2012). http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.056

[116] S.S.M. Rodrigues, A.S. Lima, L.S.G. Teixeira, Maria.G.A. Korn, J.L.M. Santos, *Fuel* 117, 520-527 (2014). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.045</u>

[117] M. Rongmei, T. Zhiyi, L. Weifeng, X. Xiaoxia, C. Qingping, Z. Haifeng, *Journal of Inspection and Quarantine* 06 (2012). <u>http://en.cnki.com.cn/Article\_en/CJFDTotal-XDSJ201206007.htm</u>

[118] G. Tomazzoni, M. Meira, C.M. Quintella, G.F. Zagonel, B.J. Costa, P.R. Oliveira, I.M. Pepe, P.R.C. Neto, *Journal American Oil Chemist's Society* 91, 215-227 (2014). http://dx.doi.org/10.1007/s11746-013-2354-5

[119] J. Prakash, A.K. Mishra, *Fuel* 108, 351-355 (2013). http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.02.043

[120] M. Meira, C.M. Quintella, A.S. Tanajura, H.R.G. Silva, J.D'E.S. Fernando, P.R.C. Neto, I.M. Pepe, M.A. Santos, L.L. Nascimento, *Talanta* 85, 430–434 (2011). http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.002

[121] M.Meira, C.M. Quintella, P.R.C. Neto, I.M. Pepe, E.M. O. Ribeiro, W.L. Silva, A.L.D. Cid, A.K. Guimarães, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 136, 726–730 (2015). <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.088</u>

[122] A.L. Carvalho, S.M.F. Santana, C.S. Silva, I.M. Pepe, M.A. Bezerra, L.M. Aragão, C.M. Quintella, L.S.G. Teixeira, *Journal Brazilian Chemical Society* 24:8, 1373-1379 (2013). http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130173

[123] G.D. Geddes, J.R. Lakowicz, *Journal of Fluorescence* 12:2, 121-129 (2002). http://doi.org/10.1023/A%3A1016875709579

[124] I. Ashraf, A. Konrad, H. Lokstein, S. Skandary, M. Metzger, J.M. Djouda, T. Maurer, P.M. Adam, A.J. Meixner, M. Brecht, *Nanoescale* 12, 4169-4204 (2017). http://doi.org/10.1039/C6NR08762K

[125] A.J. Meixner, R. Jäger, S. Jäger, A. Bräuer, K. Scherzinger, J. Fulmes, S.O. Krockhaus, D.A. Gollmer, D.P. Kern, M. Fleischer, *Faraday Discussions* 184, 321-337 (2015). http://doi.org/10.1039/C5FD00074B [126] A.M. Kem, A.J. Meixner, O.J. Martin, ACS Nano 6:11, 9828-9836 (2012). http://doi.org/10.1021/nn3033612

[127] K. Aslan, J.R. Lakowicz, H. Szmacinski, C.D. Geddes, Journal of Fluorescence 14:6, 677-679 (2004). <u>https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000047217.74943.5c</u>

[128] A. Camplon, A.R. Gallo, C.B. Harris, H.J. Robota, P.M. Whitmore, *Chemical Physics Letters*. **73**:3, 447–450 (1980). https://doi.org/10.1016/0009-2614(80)80692-0

[129] J. Kummerlen, A. Leitner, H. Brunner, F.R. Aussenegg, A. Wokaun, *Molecular Physics* 80:5, 1031–1046 (1993). <u>https://doi.org/10.1080/00268979300102851</u>

[130] K. Sokolov, G. Chumanov, T.M. Cotton, *Analytical Chemistry* 70, 3898–3905 (1998). http://doi.org/10.1021/ac9712310

[131] T. Hayakawa, S.T. Selvan, M. Nogami, *Applied Physics Letters* 74:11, 1513–1515 (1999). <u>https://doi.org/10.1063/1.123600</u>

[132] E. Choe, D.B. Min, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, 169-186 (2006). <u>http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x</u>

[133] Z. Fan, J. Krahl, Fuel 195, 123-130 (2017). http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.12.092

[134] V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi, O.M. Maragò, M.A. Iatì, Journal of Physics: Condensed Matter 29, 1-48 (2017). <u>https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3</u>

[135] H. Wender, R.V. Gonçalves, A.F. Feil, P. Migowski, F.S. Poletto, A.R. Pohlmann, J. Dupont, S.R. Teixeira, J. Phys. Chem. C, 115 (2011) 16362-16367. https://doi.org/10.1021/jp205390d

# **Publicações**

[1] F.S.Michels, M.A.G. Trindade, E.A. Falcão, R.C.A. Guimarães, S.L. Oliveira, A.R.L. Caires, *Fuel* 193, 395-400 (2017).

# Contents lists available at ScienceDirect Fuel journal homepage: www.elsevier.com/locate/fuel

Fuel 193 (2017) 395-400

Full Length Article

# The effect of the excitation light intensity during on-line monitoring of biodiesel by fluorescence spectroscopy

Flávio S. Michels<sup>a,c</sup>, Magno A.G. Trindade<sup>a</sup>, Evaristo A. Falcão<sup>a</sup>, Rita C.A. Guimarães<sup>b</sup>, Samuel L. Oliveira<sup>c</sup>, Anderson R.L. Caires<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, CP 364, 79804-970 Dourados, MS, Brazil

<sup>b</sup> Grupo de Espectroscopia e Bioinformática Aplicados a Biodiversidade e a Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, CP 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil <sup>c</sup> Grupo de Óptica e Fotônica, Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CP 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil

#### нісніснтя

- Fluorescence spectroscopy was
- applied for biodiesel analysis.
- Excitation light effect during on-line monitoring was evaluated.
- Biodiesel photodegradation may be
- induced by the excitation light.On-line monitoring can be
- successfully applied adjusting the experimental setup.
- Biodiesel thermodegradation was correctly monitored by fluorescence spectroscopy.

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 17 November 2016 Received in revised form 23 December 2016 Accepted 24 December 2016

Keywords: Biodiesel Oxidative stability Degradation Fluorescence On-line monitoring

#### G R A P H I C A L A B S T R A C T



#### ABSTRACT

In the last years, several methods based on fluorescence spectroscopy have been proposed to investigate different aspects related to biodiesel industry for presenting some advantages such as simplicity, reliability, low-cost and real-time analysis. Nevertheless, the excitation light, depending on its beam intensity, may induce by itself sample degradation during the monitoring due to the low oxidative stability of the biodiesel, providing misleading results. The present study shows for the first time a detailed analysis about how excitation light intensity may distort biodiesel analysis based on fluorescence measurements. The results revealed that fluorescence may be successfully used for on-line and *in situ* monitoring of biodiesel conditions as long as low excitation intensity interacts with a small sample volume in order to avoid biodiesel photodegradation.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

[2] P.S. Figueiredo, C.J. Candido, J.A.S. Jaques, A.A. Nunes, A.R.L. Caires, F.S. Michels, J.A. Almeida, W.F.O. Filiú, P.A. Hiane, V.A. Nasciemento, O.L. Franco, R.C.A. Guimarães, Journal of the Science of Food and Agriculture 97, 3359-3364 (2017).





# Abstract

## BACKGROUND

Sesame and flaxseed oils, which are rich in essential n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids, are widely consumed. We have determined the optical behavior with respect to the quality and identity of cold-pressed sesame and flaxseed oils. The effects of these oils and their combinations on metabolic parameters in animal models were also measured.

## RESULTS

Flaxseed oil emitted carotenoid fluorescence (500-650 nm), although it was more unstable than sesame oil, which had a larger induction period by the Rancimat method. The greater stability of sesame may be a result of the lower quantity of linolenic fatty acids. These oils were added to the feed of 56 rats, whereas animal fat was used for the control group. The sesame oil, flaxseed oil and sesame + flaxseed oils groups showed a significantly reduced adiposity index and blood glucose compared to the control group, whereas total cholesterol, high-density lipoprotein and triglycerides were lower in flaxseed oil and sesame + flaxseed oils (P < 0.05). Sesame + flaxseed oils had reduced levels of low-density lipoprotein and nonhigh-density lipoprotein (P < 0.05), indicating an anti-atherogenic effect in this group.

## CONCLUSION

Sesame oil was more stable than flaxseed oil. In an animal model, the diets with polyunsaturated fat sources proportions of 1:1 n-6:n-3 polyunsaturated fatty acids, improved the metabolic parameters, implying cardioprotective effects. © 2016 Society of Chemical Industry

# [3] I.P. Oliveira, W.A. Correa, P.V. Neves, P.V.B. Silva, C.H. Lescano, F.S. Michels, W.E. Passos, R.M. Muzzi, S.L. Oliveira, A.R.L. Caires, Photonics 4:3, 1-12 (2017).

Photonics 2017, 4(1), 3; doi:10.3390/photonics4010003

#### Open Access Article

# Optical Analysis of the Oils Obtained from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd: Mapping Absorption-Emission Profiles in an Induced Oxidation Process

Ivan P. de Oliveira <sup>1</sup>  $\cong$ , Willian A. Correa <sup>1</sup>  $\cong$ , Priscila V. Neves <sup>1</sup>  $\cong$ , Perla V. B. Silva <sup>1</sup>  $\cong$ , Caroline H. Lescano <sup>1</sup>  $\cong$ , Flávio S. Michels <sup>1</sup>  $\cong$ , Wilson E. Passos <sup>1</sup>  $\cong$ , Rozanna M. Muzzi <sup>1</sup>  $\cong$ , Samuel L. Oliveira <sup>2</sup>  $\cong$  and Anderson R. L. Caires <sup>2,\*</sup>  $\cong$ 

 Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados-MS, Brazil
 Grupo de Óptica e Fotônica, Instituto de Física, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900 Campo Grande-MS, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed.

Received: 29 November 2016 / Revised: 29 December 2016 / Accepted: 4 January 2017 / Published: 6 January 2017

🖹 View Full-Text | 🔀 Download PDF [4102 KB, uploaded 6 January 2017] | 🔛 Browse Figures

#### Abstract

Acrocomia aculeata is a palm tree typical of the Brazilian savanna. Oils extracted from the pulp and kernel of Acrocomia aculeata fruits have gained considerable attention mainly due to their nutritional and medicinal features. Despite their potential applications, a detailed analysis of their oxidative stability is still needed. The present study shows a close analysis of the oxidative stability of the oils obtained from the kernel and pulp of Acrocomia aculeata fruits, evaluating the influence of the intrinsic antioxidants and the fatty acid composition on the oil's thermal stability. A complete characterization of the physical-chemical and optical properties of the oils was performed. The results showed that 66% of the fatty acids present in the pulp oil are unsaturated, while 75% are saturated in the kernel oil. A higher content of intrinsic antioxidants was obtained in the pulp oil, and an induction period (at 110 °C) of 65 and 43 h was determined for the pulp and kernel oil, respectively. Additionally, oil absorption increases due to the formation of degradation products, and a new fluorescent compound was formed during the oil oxidation process at 110 °C. Even though the pulp presented a high content of unsaturated fatty acids, the pulp oil was more stable than the kernel oil due to its higher content of intrinsic antioxidant, especially carotenoids. The results also demonstrated that oil oxidation can be optically determined by analyzing the absorption at 232 and 270 nm, as well as the emission at 424 nm. View Full-Text

Keywords: Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd.; oxidative stability; oil degradation; UV-Vis absorption; fluorescence



ANEXO I - Esquema do forno utilizado contendo dimensões e material.

ANEXO II – Espectros de absorção da Fígura 26.







**ANEXO IV** – Espectros de absorção da Figura 36.





