



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
Instituto de Física  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS



## **TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**Desenvolvimento de métodos ópticos analíticos baseado na fluorescência multidimensional para quantificar biodiesel em blendas de diesel-biodiesel**

CAMPO GRANDE-MS  
2024

**Desenvolvimento de métodos ópticos analíticos baseado na fluorescência multidimensional para quantificar biodiesel em blendas de diesel-biodiesel**

**FERNANDO RODRIGUES DA CONCEIÇÃO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais do Instituto de Física da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito a obtenção do título de Doutor em Ciências dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Anderson R. L. Caires

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Nicolodelli

CAMPO GRANDE-MS  
2024



Ata de Defesa de Tese  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais  
Doutorado

Aos dezesseis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e quatro, às sete horas e trinta minutos, na Videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Anderson Rodrigues Lima Caires (UFMS), Ivan Pires de Oliveira (UFMG), Keurison Figueredo Magalhães (UERN), Reinaldo Francisco Teófilo (UFV) e Samuel Leite de Oliveira (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **FERNANDO RODRIGUES DA CONCEIÇÃO**, CPF 01987766164, do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "Desenvolvimento de métodos ópticos analíticos baseado na fluorescência multidimensional para quantificar biodiesel em blendas de diesel-biodiesel" e orientação de Anderson Rodrigues Lima Caires. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AValiação
Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Interno)		Aprovado
Dr. Cicero Rafael Cena da Silva (Interno) (Suplente)	_____	_____
Dr. Gustavo Nicolodelli (Interno) (Suplente) (Coorientador)	_____	_____
Dr. Ivan Pires de Oliveira (Externo)		Aprovado
Dr. Keurison Figueredo Magalhães (Externo)		Aprovado
Dr. Reinaldo Francisco Teófilo (Externo)		Aprovado
Dr. Samuel Leite de Oliveira (Interno)		Aprovado

RESULTADO FINAL:

Aprovação  Aprovação com revisão  Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada a declarar.

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

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha esposa Aline, ao meu filho Eduardo e a minha filha Lara*

## AGRADECIMENTOS

À Deus;

À minha querida e amada esposa Aline;

Ao meu querido e amado filho Eduardo;

À minha querida e amada filha Lara;

Aos meus pais;

Aos meus avós Adélio e Amélia – em memória;

Ao Professor Anderson R. L. Caires por sua paciência, confiança, amizade e orientação;

Ao Professor Gustavo Nicolodelli pela coorientação durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Professor Samuel Leite de Oliveira pelas sugestões;

Aos meus amigos e colegas do Grupo de Óptica e Fotônica que contribuíram diretamente e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul, campus Nova Andradina, por conceder o meu afastamento integral para desenvolver este trabalho.

## RESUMO

Neste trabalho as matrizes de excitação-emissão, não polarizada ( $MEE_{NP}$ ) e polarizada ( $MEE_p$ ), de blendas de diesel-biodiesel não diluídas ( $BDB_{ND}$ ) e diluídas ( $BDB_D$ ), foram analisadas através do método análise dos fatores paralelos (PARAFAC). Através dessa análise, modelos analíticos para prever o teor de biodiesel em  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$  foram construídos. Em relação a análise PARAFAC das  $MEE_{NP}$  das  $BDB_{ND}$  ( $MEE_{NP-BDB_{ND}}$ ), os valores dos “loadings” relacionados à concentração foram utilizados para a construção do modelo pseudo-univariado. Esse modelo apresentou limites de detecção ( $LOD$ ) e limite de quantificação ( $LOQ$ ) de 2,5% e 11% (m/m), respectivamente. De acordo com os valores da raiz do erro quadrático médio de predição ( $RMSEP$ ) e desvio padrão relativo de predição ( $RSDP$ ), o modelo pseudo-univariado apresentou robustez na predição de biodiesel nas amostras do conjunto de validação externa, com valores entre 0,53-0,70% (m/m) e 3,65-5,10%, respectivamente. Para a análise das  $MEE_p$  das  $BDB_{ND}$  ( $MEE_{p(ND)}$ ) e das  $BDB_D$  ( $MEE_{p(D)}$ ), o PARAFAC foi aplicado para avaliar as melhores variáveis de excitação-emissão para a construção de modelos analíticos a partir dos resultados de fluorescência polarizada. Adicionalmente, medidas de fluorescência 2D polarizada das amostras de validação externa foram utilizadas para validação dos modelos. Para as  $MEE_{p(ND)}$ , as melhores curvas analíticas foram obtidas nas polarizações HV e HH, com valores de  $LOD$  iguais a 1,05% (m/m) e 0,12% (m/m) enquanto os valores de  $LOQ$  foram de 3,31% (m/m) e 0,38% (m/m), respectivamente. Em relação ao teor de biodiesel predito, o modelo obtido na polarização HV apresentou os melhores valores de  $RMSEP$  e  $RSDP$ , os quais foram 0,32% (m/m) e 2,14%, respectivamente. Para as  $MEE_{p(D)}$ , todas as curvas analíticas apresentaram baixos valores de  $LOD$  e  $LOQ$ . No entanto, apenas o modelo obtido na polarização VV, apresentou os melhores valores de  $RMSEP$  e  $RSDP$ , os quais foram 0,49% (m/m) e 3,24%, respectivamente. Portanto, de acordo com os valores de  $RMSEP$  e  $RSDP$ , o melhor modelo óptico analítico foi obtido através da análise das  $MEE_{p(ND)}$  com PARAFAC com as polarizações HV e HH. Além dos modelos ópticos analíticos, as propriedades moleculares das  $BDB_D$  foram avaliadas através da espectroscopia de emissão multidimensional resolvida por anisotropia (ARMES). Como resultado, os mapas de anisotropia (MDA) foram construídos e evidenciaram baixos valores de anisotropia de fluorescência dos fluoróforos que compõem as  $BDB_D$ . Esses baixos valores de anisotropia de fluorescência foram atribuídos a despolarização por rotação dos fluoróforos.

**Palavras-Chave:** Biodiesel; Diesel; Quantificação; MEE; MEEp; PARAFAC; ARMES

## ABSTRACT

In this work, the unpolarized ( $MEE_{NP}$ ) and polarized ( $MEE_p$ ) excitation-emission matrices of undiluted ( $BDB_{ND}$ ) and diluted ( $BDB_D$ ) diesel-biodiesel blends were analyzed using the parallel factor analysis method (PARAFAC). Through this analysis, analytical models to predict the biodiesel content in  $BDB_{ND}$  and  $BDB_D$  were constructed. Regarding the PARAFAC analysis of the  $MEE_{NP}$  of the  $BDB_{ND}$  ( $MEE_{NP-BDB_{ND}}$ ), the loadings values related to the concentration were used to construct the pseudo-univariate model. This model presented limits of detection ( $LOD$ ) and limit of quantification ( $LOQ$ ) of 2.5% and 11% w/w, respectively. According to the values of the root mean square error of predictions ( $RMSEP$ ) and relative standard deviation of prediction ( $RSDP$ ), the pseudo-univariate model showed robustness in predicting biodiesel in the samples from the external validation set, with values between 0.53-0.70% w/w and 3.65-5.10%, respectively. For the analysis of the  $MEE_p$  of  $BDB_{ND}$  ( $MEE_{p(ND)}$ ) and  $BDB_D$  ( $MEE_{p(D)}$ ), PARAFAC was applied to evaluate the best excitation-emission variables for the construction of polarized analytical models. Additionally, polarized 2D fluorescence measurements of external validation samples were used to validate the polarized models. For  $MEE_{p(ND)}$ , the best analytical curves were obtained in HV and HH polarizations, with  $LOD$  values equal to 1.05% w/w and 0.12% w/w while the  $LOQ$  values were 3.31% w/w and 0.38% w/w, respectively. In relation to the predicted biodiesel content, the model obtained in HV polarization presented the best  $RMSEP$  and  $RSDP$  values, which were 0.32% w/w and 2.14%, respectively. Regarding  $MEE_{p(D)}$ , all analytical curves showed low  $LOD$  and  $LOQ$  values. However, only the model obtained in VV polarization presented the best  $RMSEP$  and  $RSDP$  values, which were 0.49% w/w and 3.24%, respectively. Therefore, according to the  $RMSEP$  and  $RSDP$  values, the best analytical optical model was obtained through the analysis of  $MEE_{p(ND)}$  with PARAFAC, in HV and HH polarizations. In addition to analytical optical models, the molecular properties of  $BDB_D$  were evaluated using anisotropy resolved multidimensional emission spectroscopy (ARMES). As a result, anisotropy maps were constructed and showed low fluorescence anisotropy values of the fluorophores that belong to  $BDB_D$ . These low fluorescence anisotropy values were attributed to rotational depolarization of the fluorophores.

**Keywords:** Biodiesel; Diesel; Quantification; EEM; EEMp; PARAFAC; ARMES

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Funil de decantação apresentando as fases originadas do processo de produção do biodiesel. O biodiesel corresponde a fase superior e os resíduos a fase inferior.....27
- Figura 2.** Polarizadores de excitação (esquerda) e emissão (direta) sobre uma base giratória Newport (RSP-1T).....30
- Figura 3.** Polarizadores de excitação (esquerda) e emissão (direta) adicionados e alinhados ao espectrofotômetro UV-vis.....30
- Figura 4.** Configuração dos polarizadores de excitação (Ex.) e emissão (Em.) no fluorímetro.....31
- Figura 5.** Espectros de FTIR das amostras de óleo e biodiesel de soja.....41
- Figura 6.** Matrizes de excitação-emissão não polarizadas de B0<sub>ND</sub> (Diesel) até B100<sub>ND</sub> (Biodisel). ER representa o espalhamento Rayleigh de primeira ordem. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade.....42
- Figura 7.** Intensidade de fluorescência em 435 nm em função do teor de biodiesel nas BDB<sub>ND</sub> sob excitação em 400 nm. A linha vermelha corresponde a regressão linear.....43
- Figura 8.** Mapas de contorno recuperados para os componentes (a) C<sub>1</sub> e (b) C<sub>2</sub>, e seus respectivos espectros de excitação (linha preta) e emissão (linha vermelha) em (c) e (d).....44
- Figura 9.** Validação do modelo através da SHA. (a), (b) e (c) correspondem aos espectros de emissão enquanto (d), (e) e (f) correspondem aos espectros de excitação. A legenda corresponde a comparação entre as divisões, por exemplo: os componentes C1 e C2 da metade AB estão sendo comparadas com os componentes C1 e C2 da metade CD, assim sucessivamente para todas as combinações restantes.....45
- Figura 10.** Pseudo-univariada representação do componente C<sub>1</sub> (círculos pretos) e C<sub>2</sub> (círculos vermelhos). (b) RMSECV versus o número de componentes do modelo PARAFAC.....46
- Figura 11.** Espectro de transmitância dos polarizadores de excitação-emissão obtidos nas configurações VV (linha preta) e VH (linha vermelha). A linha de base foi feita no ar.....49
- Figura 12.** MEEp de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de RB em GNaOH obtidas nas polarizações (a)VV, (b)VH, (c)HV e (d)HH.....50
- Figura 13.** Mapa de anisotropia da RB em solução aquosa de glicerol. A barra de cores corresponde aos valores de anisotropia de fluorescência calculado através da Equação 14.....51



<b>Figura 14.</b> Decaimento da fluorescência de 0,2 mg.L <sup>-1</sup> de RB em solução aquosa de glicerina contendo 0,5 mM de NaOH.....	52
<b>Figura 15.</b> (a) espectro de absorção na região UV-vis das <i>BDB<sub>ND</sub></i> e (b) comportamento da banda centrada em 527 nm em função do teor de biodiesel nas <i>BDB<sub>ND</sub></i> .....	54
<b>Figura 16.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização VV. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	55
<b>Figura 17.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização VH. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	56
<b>Figura 18.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização HV. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	56
<b>Figura 19.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização HH. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	57
<b>Figura 20.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização VV.....	59
<b>Figura 21.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização VH.....	59
<b>Figura 22.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização HV.....	60
<b>Figura 23.</b> MEEp <sub>(ND)</sub> recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização HH.....	60
<b>Figura 24.</b> Comportamento da intensidade de emissão do componente C1: (a) VV, (c) VH, (e) HV e (g)HH. Comportamento da intensidade de emissão do componente C2: (b) VV, (d) VH, (f) HV e (h) HH.....	62
<b>Figura 25.</b> (a) espectro de absorção UV-vis das <i>BDB<sub>D</sub></i> diluídas em EGTW80. (b) comportamento da banda centrada em 264 nm em função do teor de biodiesel nas <i>BDB<sub>D</sub></i> .....	78
<b>Figura 26.</b> MEEp <sub>(D)</sub> das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização VV. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	68
<b>Figura 27.</b> MEEp <sub>(D)</sub> das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização VH. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	68
<b>Figura 28.</b> MEEp <sub>(D)</sub> das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização HV. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....	69

**Figura 29** -  $MEEp_{(D)}$  das blends de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização HH. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....69

**Figura 30.**  $MEEp$  total das  $BDB_D$  obtidas através da Equação 14. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.....70

**Figura 31.** Validação do modelo através da SHA para a polarização VV. (a), (b) e (c) correspondem aos espectros de emissão enquanto (d), (e) e (f) correspondem aos espectros de excitação. A legenda corresponde a comparação entre as divisões, por exemplo: os componentes C1 e C2 da metade AB estão sendo comparadas com os componentes C1 e C2 da metade CD, assim sucessivamente para todas as combinações restantes.....71

**Figura 32.**  $MEEp$  recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização VV.....72

**Figura 33.** MDA das  $BDB_D$ : (a)  $B0_D$ , (b)  $B10_D$ , (c)  $B20_D$ , (d)  $B30_D$ , (e)  $B40_D$ , (f)  $B50_D$ , (g)  $B60_D$ , (h)  $B70_D$ , (i)  $B80_D$ , (j)  $B90_D$ . No interior das linhas sólidas e tracejadas contém informações da  $r_{BD}$  referentes aos componentes C1 e C2. A barra de cores corresponde aos valores de  $r_{BD}$ .....74

**Figura 34.** Decaimento de fluorescência das  $BDB_D$ : (a)  $B0_D$ , (b)  $B10_D$ , (c)  $B20_D$ , (d)  $B30_D$ , (e)  $B40_D$ , (f)  $B50_D$ , (g)  $B60_D$ , (h)  $B70_D$ , (i)  $B80_D$  e (j)  $B90_D$ . Os decaimentos foram obtidos com uma excitação em 280 nm e a emissão monitorada com filtro passa banda acima de 320 nm.....76

**Figura 35.** Comportamento da intensidade de emissão em 335 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_D$  nas polarizações (a) VV, (c) VH, (e) HV, (g) HH e (i) ET. Comportamento da intensidade de emissão em 382 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_D$  nas polarizações (b) VV, (d) VH, (f) HV, (h) HH e (j) ET.....79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores dos parâmetros utilizados na validação da curva analítica $L_{C_1(ND)}$ : “loadings” do modo A do conjunto de validação ( $L_{validação}$ ), conjunto de validação B13 <sub>(ND)</sub> e B15 <sub>(ND)</sub> e teor biodiesel predito ( $BDB_{pred(ND)}$ ).....	47
<b>Tabela 2</b> – Valor médio do teor de biodiesel predito nas blendas B13 <sub>(ND)</sub> e B15 <sub>(ND)</sub> ( $\overline{DBB}_{(ND)pred.}$ ) e figuras de mérito referente a validação do modelo $L_{C_1(ND)}$ .....	48
<b>Tabela 3</b> – Resultados obtidos através da análise MEEp <sub>(ND)</sub> -PARAFAC para as polarizações VV, VH, HV e HH.....	61
<b>Tabela 4</b> – Valores do teor de biodiesel predito nos conjuntos de validação B13 <sub>(ND)</sub> e B15 <sub>(ND)</sub> , obtidos a partir da fluorescência 2D, nos $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 355 \text{ nm}/404 \text{ nm}$ .....	64
<b>Tabela 5</b> – Média dos valores de biodiesel preditos nas amostras de validação B13 <sub>(ND)</sub> e B15 <sub>(ND)</sub> ( $\overline{BDB}_{pred.}$ ) e figuras de mérito referente a validação dos modelos .....	64
<b>Tabela 6</b> – Valores de $r_{BD}$ nos comprimentos de onda de máxima intensidade de excitação/emissão( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) dos componentes C1 e C2.....	75
<b>Tabela 7</b> – Valores do tempo de vida médio e tempo de correlação rotacional das $BDB_D$ referente aos componentes C1 e C2.....	77
<b>Tabela 8</b> – Valores de limite de detecção ( $LDD$ ) e quantificação ( $LDQ$ ) obtidos com 5% de nível de significância. ....	91
<b>Tabela 9</b> – Valores de biodiesel predito nas amostras de validação B13 <sub>D</sub> e B15 <sub>D</sub> , obtidos a partir da fluorescência 2D, nos $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 300 \text{ nm}/335 \text{ nm}$ e $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 382 \text{ nm}/382 \text{ nm}$ , respectivamente para os componentes C1 e C2.....	92
<b>Tabela 10</b> – Média dos valores de biodiesel preditos nas amostras de validação B13 <sub>D</sub> e B15 <sub>D</sub> ( $\overline{BDB}_{Dpred.}$ ) e figuras de mérito referente a validação dos modelos.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AFM - “*Atomic Force Microscopy*” (microscopia de força atômica)
- ARMES - “*Anisotropy Resolved Multidimensional Emission Spectroscopy*” (espectroscopia de emissão resolvida por anisotropia)
- ATR - “*Attenuated Total Reflectance*” (reflectância total atenuada)
- BDB - Blendas Diesel-Biodiesel
- BDB<sub>D</sub>* - Blendas Diesel-Biodiesel diluída
- BDB<sub>ND</sub>* - Blendas Diesel-Biodiesel não diluída
- BEN - Balanço Energético Nacional
- CNPE - Conselho Nacional de Políticas Energéticas
- CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono
- CONCORDIA - “*Core Consistency Diagnostic*” (Diagnóstico de Consistência do Tensor Núcleo)
- D<sub>H</sub> - Diâmetro Hidrodinâmico EDL – Espalhamento Dinâmico da Luz
- EF - Espectroscopia de Fluorescência
- EGTW80 - Emulsão de Tween 80 com Etilenoglicol
- EN 14078 - Norma que regulamente a utilização do FTIR para avaliar o teor de biodiesel em BDB.
- EP - Emulsão Padrão
- ER - Espalhamento Rayleigh
- FM - Fluorescência Multidimensional
- FTIR - “*Fourier Transform Infrared*” (infravermelho por transformada de Fourier)
- G - Fator de correção das diferentes sensibilidades do detector de emissão
- GNaOH - Solução de glicerol e NaOH utilizada para diluir a rodamina B
- GtCO<sub>2</sub> - Gigatonelada de dióxido de carbono
- <sup>1</sup>H - Próton hidrogênio
- HH - Polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Horizontal-Horizontal
- HPAs - Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos
- HV - Polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Horizontal-Vertical
- KOH - Hidróxido de Potássio

*LOD* - Limite de Detecção

*LOQ* - Limite de Quantificação

*MCR-ALS* - “*Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Square*” (resolução de curva multivariada – mínimos quadrados alternantes)

*MDA* - Mapas de Anisotropia

*MEE* - Matrizes de Excitação-Emissão

*MEE<sub>p( Branco )</sub>* - Matrizes de Excitação-Emissão da emulsão de EGTW80

*MEE<sub>NP</sub>* - Matrizes de Excitação-Emissão não polarizada

*MEE<sub>NP</sub>-PARAFAC* - Matrizes de Excitação-Emissão não polarizada associadas com PARAFAC

*MEE<sub>p</sub>* - Matrizes de Excitação-Emissão polarizada

*MEE<sub>p(D)</sub>* - Matrizes de Excitação-Emissão polarizada diluídas

*MEE<sub>p(D)</sub>-PARAFAC* - Matrizes de Excitação-Emissão polarizada diluídas associadas com PARAFAC

*MEE<sub>p(ND)</sub>* - Matrizes de Excitação-Emissão polarizada não diluídas

*MEE<sub>p(ND)</sub>-PARAFAC* - Matrizes de Excitação-Emissão polarizada não diluídas associadas com PARAFAC

*MEE<sub>p(RB)</sub>* - Matrizes de Excitação-Emissão polarizada da rodamina B

*MEE-PARAFAC* - Matrizes de Excitação-Emissão associadas com PARAFAC

*MEE<sub>VV</sub>* - Matriz de Excitação-Emissão com os polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Vertical-Vertical

*MEE<sub>VH</sub>* - Matriz de Excitação-Emissão com os polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Vertical-Horizontal

*MEE<sub>VH corrigida</sub>* - Matriz de Excitação-Emissão com os polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Vertical-Horizontal corrigida pelo fator G

*MEE<sub>HV</sub>* - Matriz de Excitação-Emissão com os polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Horizontal-Vertical

*MEE<sub>HH</sub>* - Matriz de Excitação-Emissão com os polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Horizontal-Horizontal

*MgSO<sub>4</sub>* - Sulfato de Magnésio

*NaCl* - Cloreto de sódio

*NaOH* - Hidróxido de Sódio

*OPLS-DA* - “*Orthogonal Projections on the Latent Structure Discrimination Analysis*” (projeções ortogonais na análise de discriminação de estrutura latente)

PARAFAC - “*Parallel Factors Analysis*” (análise dos fatores paralelos)

PCA - “*Principal Component Analysis*” (análise das componentes principais)

PLS - “*Partial Least Square*” (mínimos quadrados parciais)

RB - Rodamina B

RB(GNaOH) - Rodamina B em solução aquosa de glicerol e NaOH

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMSEP - “*Root Mean Square Error of Prediction*” (raiz quadrada do erro médio de predição)

RSDP - “*Relative Standard Deviation of Prediction*” (desvio padrão relativo de predição)

SHA - “*Split Half Analysis*” (análise da divisão pela metade)

Trp - aminoácido triptofano

TSEFS - “*Total Synchronous Fluorescence Spectroscopy*” (espectroscopia de fluorescência total sincronizada)

Tyr - aminoácido tirosina

UV-vis - Ultravioleta-visível

VH - Polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Vertical-Horizontal

VV - Polarizadores de excitação-emissão configurados nas posições Vertical-Vertical

$r$  - Anisotropia de fluorescência

$r_{BD}$  - Anisotropia de fluorescência da rodamina B

$r_s$  - Resíduo studentizado

RB - Rodamina B

$\lambda_{em}$  - comprimento de onda de emissão

$\lambda_{ex}$  - comprimento de onda de excitação

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b> .....	16
<b>Capítulo 1 – Revisão da literatura</b> .....	18
1 Emissão de dióxido de carbono e o papel do biodiesel.....	18
1.1 Métodos espectroscópicos de análise do teor de biodiesel em blendas de diesel-biodiesel.....	18
1.2 Espectroscopia de fluorescência multidimensional.....	21
1.3 Matriz de excitação-emissão em análise química.....	22
1.4 Espectroscopia de emissão multidimensional resolvida por anisotropia (“Anisotropy Resolved Multidimensional Emission Spectroscopy” - ARMES).....	23
<b>Capítulo 2 – Objetivos</b> .....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos</b> .....	26
3.1 Preparo das amostras.....	26
3.1.1 Produção do biodiesel.....	26
3.1.2 Produção das blendas de diesel-biodiesel não diluídas.....	27
3.1.3 Produção das blendas de diesel e biodiesel diluídas.....	27
3.1.4 Solução padrão de Rodamina B.....	28
3.2 Caracterização da óptica.....	29
3.2.1 Avaliação da reação de transesterificação.....	29
3.2.2 Obtenção das matrizes de excitação-emissão não polarizada das $BDB_{ND}$ .....	29
3.2.3 Alinhamento dos polarizadores.....	29
3.2.4 Obtenção dos espectros de absorção na região UV-vis.....	31
3.2.5 Matrizes de excitação-emissão polarizadas das blendas de diesel-biodiesel não diluídas.....	31
3.2.6 Matrizes de excitação-emissão polarizadas das blendas de diesel-biodiesel diluídas.....	32
3.2.7 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo das blendas de diesel-biodiesel diluídas.....	32
3.3 Análise dos dados.....	33
3.3.1 Análise multivariada das $MEE_{NP}$ das blendas não diluídas.....	33
3.3.2 Análise multivariada das $MEE_p$ das blendas diluídas e não diluídas.....	33
3.3.3<<Construção das curvas analíticas e análise da regressão linear.....	34
3.3.4 Análise da regressão.....	36
3.3.4.1 Análise de resíduo studentizado.....	36
3.3.4.2 Análise de linearidade – Teste $F$ .....	36
3.3.4.3 Determinação do limite de detecção ( $LDD$ ) e limite de quantificação ( $LDQ$ ).....	37
3.3.4.4 Avaliação do desempenho dos modelos de calibração.....	37
3.3.5 Construção dos mapas de anisotropia.....	38
3.3.6 Determinação do tempo de correlação rotacional.....	39

<b>Capítulo 4 – Aplicação da fluorescência multidimensional não polarizadas nas blendas de diesel-biodiesel não diluídas.....</b>	<b>41</b>
4 Resultados e discussão.....	41
4.1 Avaliação de transesterificação do óleo de soja.....	41
4.2 Matrizes de excitação-emissão não polarizadas blendas de diesel-biodiesel não diluídas.....	42
4.3 Análise PARAFAC das MEE <sub>ND</sub> .....	43
4.4 Conclusão do capítulo.....	48
<b>Capítulo 5 – Avaliação e validação das análises de fluorescência multidimensional polarizada.....</b>	<b>49</b>
5 Resultados e discussão.....	49
5.1 Avaliação dos polarizadores – transmissão.....	49
5.2 Avaliação dos polarizadores – alinhamento.....	50
5.3 Conclusão do capítulo.....	52
<b>Capítulo 6 – Aplicação da fluorescência multidimensional polarizada nas blendas de diesel-biodiesel não diluídas.....</b>	<b>54</b>
6 Resultados e discussão.....	54
6.1 Absorção UV-vis das blendas não diluídas.....	54
6.2 Matriz de excitação e emissão polarizada das blendas de diesel-biodiesel não diluídas.....	55
6.3 Análise PARAFAC das MEE <sub>p(ND)</sub> .....	57
6.4 Construção de modelos analíticos .....	61
6.5 Conclusão do capítulo.....	64
<b>Capítulo 7 – Aplicação da fluorescência multidimensional polarizada nas blendas de diesel-biodiesel diluídas.....</b>	<b>66</b>
7 Resultados e discussão.....	66
7.1 Absorção na região UV-vis das blendas diluídas.....	66
7.2 Matriz de excitação e emissão polarizada das blendas de diesel- biodiesel diluídas.....	67
7.3 Espectroscopia de emissão multidimensional resolvida por anisotropia das blendas de diesel-biodiesel diluídas.....	73
7.4 Construção de modelos analíticos para quantificação de biodiesel em blendas de diesel-biodiesel diluídas.....	77
7.5 Conclusão do capítulo.....	82
<b>Considerações finais.....</b>	<b>85</b>
<b>Referências.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>98</b>



## Introdução

Para mitigar os efeitos da emissão de gases de efeito estufa, como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a busca por fontes renováveis de energia tem se tornado crescente nas últimas décadas. No Brasil, devido a utilização de combustíveis fósseis, o setor do transporte foi o que mais contribuiu para a emissão de CO<sub>2</sub> em 2022 [1]. Com objetivo de reduzir essa emissão, o biodiesel foi incorporado a matriz energética Brasileira, o qual juntamente com o diesel, forma as chamadas blends de diesel-biodiesel (*BDB*). Todavia, o teor de biodiesel nas *BDB* deve atender a legislação do país que recorrem ao biodiesel com uma fonte renovável de energia.

Para atender a legislação vigente, vários métodos analíticos baseados em espectroscopia óptica têm sido propostos, tais como espectroscopia de absorção UV-vis, espectroscopia na região do infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de espalhamento Raman, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de fluorescência (EF)[2–12]. Por apresentar alta sensibilidade e seletividade, a espectroscopia de fluorescência (EF) apresenta potencial para o desenvolvimento de método óptico analítico com objetivo de atender a legislação vigente. Adicionalmente, existem trabalhos reportados na literatura que mostram o potencial de aplicação da EF na quantificação do biodiesel nas *BDB* [5,6]. Entretanto, esses trabalhos apresentam apenas o potencial da técnica e não resultados referentes a validação do método, além de propor modelos analíticos baseados em espectros convencionais de fluorescência 2D, mesmo se tratando de análises de amostras complexas, como é o caso das *BDB* que são constituídas de multifluoróforos.

Para caracterizar amostras com multifluoróforos é recomendado a análise por meio da fluorescência multidimensional, obtida a partir da construção da matriz de excitação e emissão (MEE), pois ela possibilita avaliar a emissão total dos fluoróforos que compõem a amostra, em um extenso intervalo de comprimento de onda de excitação e emissão [13,14]. Além disso, é importante que um método estatístico multivariado seja aplicado sobre o grande volume de dados gerado pela fluorescência multidimensional, que no caso das MEE, a análise dos fatores paralelos (“*Parallel Factor Analysis - PARAFAC*”) é recomendada [15–17]. Nessa perspectiva, este trabalho irá apresentar resultados relacionados a utilização das MEE, não polarizada e polarizada, associada com a análise estatística multimodos PARAFAC para o desenvolvimento de métodos ópticos-analíticos com o objetivo de quantificar o teor de biodiesel em *BDB<sub>ND</sub>* e *BDB<sub>D</sub>*. Adicionalmente, os resultados da aplicação do PARAFAC na identificação dos principais

fluoróforos que compõem as blendas serão apresentados, pois esse procedimento foi de suma importância na avaliação das propriedades moleculares das *BDB<sub>D</sub>*, como por exemplo, a anisotropia de fluorescência.

## Capítulo 1 – Revisão da literatura

### 1 Emissão de dióxido de carbono e o papel do biodiesel

De acordo com o crescimento econômico e industrial dos países, principalmente os asiáticos, a emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) aumentou substancialmente entre 1940 e 2021, passando de 4,85 GtCO<sub>2</sub> em 1940 para 37,50 GtCO<sub>2</sub> em 2022 [18]. Em contraste, a China contribuiu com aproximadamente 31% das emissões de CO<sub>2</sub> em todo o mundo no ano de 2021[19]. Em relação ao Brasil, o Balanço Energético Nacional (BEN) mostrou que a matriz energética brasileira recebeu contribuição de 52,6% de energia proveniente de fontes não renováveis[1]. Impulsionado pelo setor de transporte, o diesel representou 44,6 % de todo combustível consumido por esse setor enquanto a gasolina e o etanol contribuíram com 27,1% e 16,9%, respectivamente [1]. Adicionalmente, o setor do transporte contribuiu substancialmente com a emissão de CO<sub>2</sub> no Brasil em 2022, cuja contribuição foi de 49,73 % em relação aos outros setores produtivos brasileiro (agricultura, elétrica, industrial etc.)[1].

Para mitigar os efeitos ambientais causados pela queima do diesel, o diesel comercial contém biodiesel em sua composição, formando as *BDB*. É conhecido que a queima de biodiesel em motores de combustão interna, reduz cerca de 40 a 65 % da emissão de gases de efeito estufa [20]. Além disso, o biodiesel é um combustível biodegradável obtido de fontes renováveis (óleo vegetais e/ou gordura animal) e comumente produzido através do processo transesterificação [21,22]. No processo de transesterificação, os triglicerídeos presentes nos óleos vegetais e gordura animal reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, gerando éster (biodiesel) e glicerina como produtos resultantes da reação[20–22].

#### 1.1 Métodos espectroscópicos de análise do teor de biodiesel em blendas de diesel-biodiesel

Com a introdução das *BDB* no mercado, surgiu a necessidade de desenvolver métodos analíticos que permitem avaliar o cumprimento das legislações e regulamentações quanto ao percentual de biodiesel adicionado ao diesel comercializado nos postos de combustíveis. Para avaliar o teor de biodiesel nas *BDB*, métodos analíticos baseados em análise espectral tem sido proposto[2–8,10–12,23,24]. Em relação ao uso da espectroscopia de absorção UV-vis para quantificar o teor de biodiesel em *BDB*, Correa *et al.* (2015) propuseram monitorar a porcentagem de biodiesel na *BDB* a partir da

formação do composto ácido hidroxâmico de ferro III, que ocorre a partir da reação entre os ésteres com hidroxolamina hidrocloreídrica e nitrato de ferro III [2]. Os autores identificaram que esse composto apresenta banda de absorção centrada em 435 nm, que aumenta linearmente em função do aumento de biodiesel nas blendas [2]. Li *et al.* (2020) monitoraram o comportamento da banda de absorção centrada em 324 nm em função do teor de biodiesel nas *BDB* e encontraram boa correlação linear entre as duas variáveis [3]. Shimamoto *et al.* (2016) realizaram um estudo comparativo entre a espectroscopia de absorção UV-vis e espectroscopia na região do infravermelho, seguindo a norma EN 14078, e mostraram que a espectroscopia de absorção UV-vis apresenta potencial para ser aplicada na quantificação de biodiesel nas *BDB* [8]. Apesar do sucesso da aplicação da espectroscopia de absorção UV-vis na quantificação do teor de biodiesel nas *BDB*, algumas limitações, como utilização de solventes para o preparo das amostras, ainda persistem. Adicionalmente, sobreposições de bandas de absorção do diesel e biodiesel podem ocorrer entre 230-260 nm, dificultando a obtenção de informações relevantes para construção de métodos analíticos que tem como objetivo quantificar biodiesel em *BDB* [2].

A espectroscopia na região do infravermelho médio por transformada de Fourier (FTIR) é adotada como método padrão de quantificação de biodiesel em blendas [25]. Esse método é norteado pelo método padrão europeu EN 14078, que consiste em construir uma curva analítica a partir das *BDB* diluídas [9,23]. Adicionalmente, ele relaciona a intensidade de absorção da ligação C=O em  $1745\text{ cm}^{-1}$  em função do teor de biodiesel.[9,23]. Pinho *et al.* (2014) utilizaram essa metodologia para quantificar biodiesel de soja e mamona nas *BDB* [9]. Como resultado, os autores mostraram que a norma EN 14078 apresenta problemas, como alteração de intensidade e deslocamento de banda em  $1745\text{ cm}^{-1}$ , conforme o tipo de biomassa e o álcool utilizado no processo de transesterificação [9].

Liu *et al.* (2019) propuseram a espectroscopia de espalhamento Raman associada com análise das componentes principais (“*Principal Component Analysis*” - PCA) e PLS para classificar e quantificar o biodiesel nas blendas [11]. Dantas *et al.* (2017) associaram os resultados de espalhamento Raman com o método resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes (“*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*” MCR-ALS) para quantificar biodiesel e adulterantes em diesel [12]. É importante destacar que a espectroscopia Raman é uma técnica não destrutiva e necessita mínimos preparos das amostras [26]. Todavia, as amostras caracterizadas por essa técnica

podem apresentar fluorescência, efeito que negligência de forma parcial ou total os espectros Raman [26].

Yung *et al.* (2019) utilizaram a espectroscopia de RMN para caracterizar óleo e biodiesel de palma, além de identificar a presença desse biodiesel nas *BDB* e adulterações com óleo [24]. Máquina *et al.* (2020) associaram a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  com o método projeções ortogonais na análise de discriminação de estruturas latentes (OPLS-DA) para monitorar biodiesel de crambe em blenda B10 [4]. De acordo com os resultados reportados, a espectroscopia de RMN apresenta ótima seletividade na diferenciação e quantificação de biodiesel em *BDB*, além de possibilitar a identificação de possíveis contaminantes. Entretanto, devido ao alto custo do espectrômetro de RMN, complexidade na interpretação dos resultados e a necessidade da utilização de solventes, essa técnica fica limitada somente a análises laboratoriais específicas.

Devido a sensibilidade, seletividade, possibilidade de realizar análises *in loco* e ao potencial de desenvolvimento de dispositivos portáteis, a EF tem se mostrado promissora na quantificação de biodiesel em diesel [5–7]. Scherer *et al.* (2014) monitoraram o comportamento da intensidade da fluorescência em função do teor de biodiesel nas *BDB*. Os autores excitaram as *BDB* em 260 e 405 nm e monitoraram as áreas espectrais de emissão nas regiões de 280 a 800 nm e 415 a 800 nm, respectivamente. Como resultado, encontraram uma excelente linearidade entre área e teor de biodiesel [5], porém o método não foi validado externamente. Caires *et al.* (2014) explicaram o comportamento da intensidade de fluorescência em função do aumento do teor de biodiesel nas *BDB* e atribuíram o aumento da intensidade ao aumento da viscosidade das *BDB* [6]. Caires *et al.* (2012) avaliaram o comportamento da fluorescência em função do teor de biodiesel produzidos para diferentes fontes oleaginosas (óleo de canola, girassol, milho e soja). Eles mostraram que o método proposto, baseado na fluorescência das blendas, não depende da fonte oleaginosa utilizada na produção do biodiesel [7].

Particularmente, a EF se torna atraente, por ser capaz de identificar fluoróforos, tais como, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) encontrados no diesel e gasolina e os tocoferóis, carotenoides, clorofila, riboflavina, vitaminas (A, K e D) e produtos de oxidação presentes em óleos vegetais e biodieseis [27–33]. Por exemplo, a EF pode ser utilizada como técnica analítica, não destrutível, para identificar a adulteração do óleo diesel com substâncias com características semelhantes ao do biodiesel [5]. Todavia, os trabalhos que mostram a potencialidade da EF no processo de quantificação do teor de biodiesel apresentam algumas limitações porque normalmente

requerem um pré-preparo das amostras, como por exemplo a diluição. Ademais, as escolhas dos comprimentos de onda de excitação e emissão para construção de curva analítica são baseadas em critérios que não fornecem informação completa da fluorescência das blendas, visto que elas são amostras complexas por conter diferentes fluoróforos que absorvem e emitem em diferentes comprimentos de onda. Nesse cenário, ainda existe a necessidade de desenvolver um método que permite determinar a fluorescência total das blendas, bem como elucidar regiões de emissão que apresentam linearidade em função do aumento do teor de biodiesel, para que seja possível elaborar um método analítico robusto que possibilite quantificar biodiesel nas blendas de forma precisa e acurada.

## **1.2 Espectroscopia de fluorescência multidimensional**

Conforme discutido anteriormente, o uso da fluorescência convencional (2D) na caracterização de amostras complexas, como por exemplo as *BDB*, não é ideal. Para esse tipo de amostras, a fluorescência multidimensional (FM) é a mais indicada, pois ela permite que toda as informações referente as excitações, emissões e intensidades sejam combinadas em uma matriz [13]. Adicionalmente, a FM fornece todas as assinaturas espectrais dos mult fluoróforos que compõem a amostra em estudo [13], a qual pode ser aplicada de dois modos: no modo MEE e através da fluorescência total sincronizada (“*Total Synchronous Fluorescence Spectroscopy*” - TSFS). Cada modo apresenta vantagens e desvantagens [13]. No modo MEE, a vantagem é que a trilinearidade do sistema é mantida, o que facilita a aplicação de métodos quimiométricos, como o PARAFAC, sobre a sua estrutura de dados. Por outro lado, a presença dos espalhamentos Rayleigh e Raman podem dificultar a obtenção de modelos que representam o sistema em estudo [15,16,34]. Em relação a TSFS, é possível obter a fluorescência total da amostras sem a presença dos espalhamentos. Porém, a aplicação de métodos quimiométricos, como o PARAFAC, exigem que as matrizes sincronas sejam convertidas em estruturas trilineares antes de serem analisadas, o que aumenta o número de passo no pré-processamento de dados [35,36]. Nesse contexto, o modo MEE foi adotado neste trabalho.

### 1.3 Matriz de excitação-emissão em análise química

Baseada na espectroscopia de FM, as MEE apresentam potencial na análise de sistemas multifluoróforos [14]. Essa técnica consiste em coletar informações da intensidade de fluorescência em função da variação do comprimento de onda de excitação e emissão. Como resultado, é possível construir um mapa de contorno multidimensional,  $\lambda_{ex}(nm) \times \lambda_{em}(nm) \times$  Intensidade (u.a.), contendo informação da fluorescência total do sistema [13]. Os mapas de contorno (MEE) contém diversas informações das variáveis excitação, emissão e intensidade, portanto decompor esse conjunto de dados é importante para extrair informações mais gerais e robustas do sistema em estudo [37].

Para decompor as MEE, métodos de análise multivariada são indicados, cujo mais utilizado é o PARAFAC [15,16,37]. Em geral, o método PARAFAC consiste em decompor o arranjo tridimensional de dados, gerados pelas MEE, em três matrizes,  $A$ ,  $B$  e  $C$ , chamadas de “loadings”, cujo modelo trilinear é encontrado ao minimizar a soma dos quadrados dos resíduos  $e_{ijk}$  da Equação 1 [15].

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad \text{Equação 1}$$

Na Equação 1 temos que  $x_{ijk}$  corresponde aos elementos da matriz de dados  $X$  e  $a_{if}$ ,  $b_{jf}$  e  $c_{kf}$  são elementos das matrizes  $A$ ,  $B$  e  $C$  que fornecem, após a decomposição para um dado número de fatores  $f$ , o comportamento das concentrações e os espectros de excitação e emissão bidimensional de cada componente que contribuem para a fluorescência total do sistema em estudo [15,38].

A análise das MEE associada com PARAFAC (MEE-PARAFAC) vem sendo aplicada com sucesso em diversos tipos de amostras contendo multifluoróforos, como por exemplo na análise da matéria orgânica de solos e seus derivados. Zhu *et al.* (2021) utilizaram MEE-PARAFAC para explorar as características de interação de componentes individuais de matéria orgânica dissolvida (MOD), proveniente de esterco de galinha, vaca e porco, com compostos de Cu(II), Pb(II) altamente tóxico e Cd(II) [39]. Qin *et al.* (2021) avaliaram, através da MEE-PARAFAC, as propriedades ópticas e as contribuições da MOD em amostras de quatro tipos de solos (negro, roxo, amarelo e vermelho) em função do uso (seco, arrozais e florestais) ao longo do tempo [40]. Tadini *et al.* (2015) aplicaram EEM-PARAFAC para caracterizar o perfil de emissão da humina e identificar os fluoróforos de solos amazônicos, além de avaliar as respectivas contribuições [41]. Santos *et al.* (2015) utilizaram as EEM-PARAFAC para identificar

e avaliar as contribuições dos fluoróforos presentes em solos do tipo espodosolo humilúvico e latossolo amarelo. Os resultados encontrados sugeriram mudanças da estrutura química, associadas aos ácidos húmicos, extraídos ao longo de diversas camadas dos solos analisados [41]. Matos *et al.* (2022) utilizaram EEM-PARAFAC e PCA para avaliar MOD de efluentes gerados por indústria frigorífica [42].

As análises EEM-PARAFAC têm sido reportadas na área de combustíveis derivados de petróleo Kong *et al.* (2020) caracterizaram e identificaram HPAs de derivados de petróleo, tais como gasolina, diesel, combustível de avião e óleo lubrificante[43]. Os autores obtiveram um modelo de cinco componentes e relacionaram o perfil de excitação (emissão) aos HPAs naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno e criseno [43]. Christensen *et al.* (2005) aplicaram MEE-PARAFAC para avaliar contaminantes de derivados de petróleo proveniente de um acidente de navio. Como resultado, os autores encontraram alta similaridade entre os componentes do óleo do tanque do navio com os componentes de óleo encontrados no local do acidente [44]. Alostaz *et al.* (2008) aplicaram MEE-PARAFAC e identificaram o perfil de emissão dos principais HPAs presentes em derivados de petróleo (gás condensado, gasolina, diesel e óleo cru) [45]. Câmara *et al.* (2024) desenvolveram um método para quantificar o solvente querosene em combustível de aviação através da associação MEE-PARAFAC e MEE-MCR-ALS [46]. Nesse contexto, a combinação da análises de MEE com PARAFAC, apresenta-se como uma potencial ferramenta para caracterização das *BDB* e construção de modelos analíticos para quantificar biodiesel em *BDB*.

#### **1.4 Espectroscopia de emissão multidimensional resolvida por anisotropia (“Anisotropy Resolved Multidimensional Emission –pectroscopy” - ARMES)**

Além de conter informação da fluorescência total, as MEE podem ser utilizadas para gerar informações da anisotropia de fluorescência do sistema em estudo [13,47,48]. Para isso, polarizadores são adicionados nos monocromadores de excitação e emissão para a obtenção das matrizes de excitação-emissão polarizadas (MEEp), nas polarizações vertical-vertical (VV), vertical-horizontal (VH), horizontal-vertical(HV) e horizontal-horizontal(HH) [49]. Sob posse dessas matrizes, a anisotropia de fluorescência do sistema em estudo pode ser calculada [13,47,48,50]. Além disso, métodos quimiométrico, como PARAFAC e MCR, são utilizados para resolver problemas de sobreposição entre os



constituídas das amostras e possibilita a avaliação da anisotropia de fluorescência das contribuições [13,47,48,51].

A anisotropia de fluorescência, FM e quimiometria são elementos que combinados, geram a espectroscopia de emissão resolvida por anisotropia (ARMES). ARMES produz uma estrutura de dados multidimensional que correlaciona comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ), comprimentos de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) ou  $\Delta\lambda$  (TSFS), intensidade  $I$  e anisotropia ( $r$ ). Devido a sua sensibilidade a mudanças estruturais, os mapas de anisotropia (MDA), obtidos através da ARMES, fornecem informações adicionais sobre a estrutura de sistemas moleculares [48], como por exemplo rotação, volume hidrodinâmico, difusão molecular, entre outras propriedades [50].

Browne *et al.* (2019) utilizaram ARMES para avaliar as mudanças estruturais da proteína Imonoglobulina G (IgG) em função da temperatura. Nesse trabalho os autores apresentaram diferentes pré-processamento das MEEP antes de obter os MDA [48]. Boucau *et al.* (2017) propuseram em seu trabalho um método baseado em MCR para recuperar anisotropia do pirileno em glicerol e de uma mistura de Eritrosina B e Floxina B [51]. Adicionalmente, Groza *et al.* (2015) utilizaram ARMES para avaliar as alterações químicas e estruturais induzida por temperatura da albumina sérica humana (“*human serum albumin*” - HSA)[52]. Além disso, os autores aplicaram MCR nos dados das matrizes polarizadas, geraram os MDA das HSA, e obtiveram como resultado a recuperação das emissões dos aminoácidos triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) em diferentes ambientes, além da fosforescência do Trp em temperatura ambiente [52]. Nesse cenário, as *BDB* apresentam uma série de moléculas fluorescentes, que podem apresentar diferentes comportamento em suas estruturas devido a adição de biodiesel ou a diluição das *BDB*. Dessa forma, a ARMES fornece possibilidade de avaliar o comportamento dos fluoróforos que compõem as *BDB* em ambientes diluídos.

## Capítulo 2 - Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Associar a fluorescência multidimensional (não polarizada e polarizada), no modo MEE, com o PARAFAC no desenvolvimento de métodos ópticos analíticos para quantificar teor de biodiesel em *BDB* (não diluídas e diluídas).

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Produzir biodiesel de soja através do processo de transesterificação;
- ✓ Avaliar a transesterificação do óleo de soja através da espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- ✓ Produzir blendas de diesel-biodiesel para construção e validação de curvas analíticas;
- ✓ Caracterizar as blendas não diluídas através da fluorescência multidimensional, no modo MEE, não polarizada ( $MEE_{NP}$ ) e polarizada ( $MEE_p$ );
- ✓ Caracterizar as blendas diluídas em EGTW80 através da fluorescência multidimensional polarizada, no modo  $MEE_{p(D)}$ , nas polarizações de excitação-emissão: vertical-vertical (VV); vertical-horizontal (VH); horizontal-vertical (HV) e horizontal-horizontal (HH);
- ✓ Decompor as  $MEE_{NP}$  através do PARAFAC ( $MEE_{NP}$ -PARAFAC) para obtenção de contribuições (“loadings” do modo A, B e C);
- ✓ Utilizar os resultados da  $MEE_{NP}$ -PARAFAC para avaliar a composição das  $BDB_{ND}$  e construir um modelo analítico multivariado para quantificar biodiesel nessas blendas;
- ✓ Aplicar o PARAFAC sobre as  $MEE_{p(D)}$  ( $MEE_{p(D)}$ -PARAFAC) para obter os espectros de excitação e emissão em cada polarização;
- ✓ Utilizar os resultados  $MEE_{p(D)}$ -PARAFAC para selecionar as melhores variáveis de excitação-emissão para construir modelos analíticos em cada polarização e validar esses modelos através da fluorescência 2D polarizada;
- ✓ Aplicar a análise de resíduos studentizados e o teste F para avaliar a presença de “outliers” e a linearidade dos modelos analíticos;
- ✓ Determinar os *LDD* e *LDQ* das curvas analíticas;
- ✓ Validar externamente os modelos analíticos;
- ✓ Determinar acurácia e precisão desses modelos na predição de biodiesel em  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$ .

## Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentados os materiais e os métodos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Eles foram reunidos em três principais seções, as quais são: Preparo das amostras (seção 3.1), Caracterização óptica e complementares (seção 3.2) e análise de dados (seção 3.3).

### 3.1 Preparo das amostras

#### 3.1.1 Produção do biodiesel

As amostras de biodiesel foram produzidas pelo processo de transesterificação do óleo de soja refinado (LIZA®), na razão molar de 1:6 (óleo/álcool). Como catalizador, foi utilizado o hidróxido de potássio (KOH) (2% de massa em relação a massa de óleo) dissolvido em metanol PA a 50 °C sob agitação em uma chapa de agitação magnética. Após dissolução total do KOH, o metóxido de potássio foi adicionado ao óleo de soja aquecido a 60 °C e em seguida, a mistura foi colocada sob agitação por 2 h para garantir a completa transesterificação do óleo de soja. Posteriormente, o resultante foi transferido para um funil de decantação e mantido em repouso por 24 h.

Após 24 h de repouso duas fases foram observadas, conforme apresentado na Figura 1: a primeira (inferior) contendo os resíduos resultantes do processo de transesterificação (glicerina, catalisador, álcool e óleo) e a segunda (superior) composta principalmente de ésteres metílicos (biodiesel). Após a remoção da primeira fase, o biodiesel foi submetido ao processo de lavagem, conforme as seguintes etapas: na primeira, o biodiesel foi misturado com água destilada para eliminar traços de componentes polares (glicerina, KOH etc.) e na segunda, foi adicionado ao biodiesel solução aquosa saturada de cloreto de sódio (NaCl). Nas duas etapas, a fase aquosa foi eliminada por decantação.

Após a lavagem, o biodiesel foi filtrado com papel de filtro qualitativo na presença de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) para a eliminação da água remanescente. Em seguida, o metanol residual presente no biodiesel foi rotaevaporado a 60 °C. Por fim, biodiesel foi adicionado em um frasco âmbar, embrulhado com papel alumínio e armazenado na geladeira.



**Figura 1.** Funil de decantação apresentando as fases originadas do processo de produção do biodiesel. O biodiesel corresponde a fase superior e os resíduos a fase inferior.

### 3.1.2 Produção das blendas de diesel-biodiesel não diluídas

As  $BDB_{ND}$  foram preparadas com o diesel S500 padrão, fornecido pela empresa Taurus Petróleo Ltda, juntamente com o biodiesel de soja produzido neste trabalho. Para a produção das blendas, dois conjuntos de amostras foram considerados: conjunto de calibração e conjunto de validação. O conjunto de calibração foi utilizado para gerar as curvas analíticas e o conjunto de validação para avaliar o potencial de predição do biodiesel nas blendas.

Para produzir as blendas do conjunto de calibração, uma massa total de 15 g foi considerada, para cada blenda, e uma faixa de 0 a 100% m/m de biodiesel em sua composição foi escolhida. Em relação ao teor de biodiesel nas blendas, a porcentagem de biodiesel foi aumentada em passos de 10 % m/m, totalizando 22 amostras, todas preparadas em duplicatas. Para compor o conjunto de validação, quatro amostras de  $BDB_{ND}$  foram produzidas: duas contendo 13% m/m e duas contendo 15% m/m de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . Adicionalmente, para as matrizes polarizadas, o conjunto de validação foi composto de três amostras para cada blenda de validação. Todas as blendas foram chamadas de  $Bx_{(ND)}$ , onde x corresponde a porcentagem, em massa, de biodiesel na blenda e o índice ND significa não diluída e indica que as blendas não foram diluídas.

### 3.1.3 Produção das blendas de diesel e biodiesel diluídas

Para preparar as blendas de diesel-biodiesel diluídas ( $BDB_D$ ), uma emulsão padrão (EP) de Tween 80 (TW80) em etilenoglicol (EG) foi preparada. Para isso, 0,2% v/v do emulsificante TW80 da marca Sigma Aldrich foram adicionados a 99,8 % de EG PA da marca Synth Em seguida, essa EP foi agitada manualmente até ficar homogênea. É

importante destacar que essa quantidade de TW80 está acima da concentração micelar crítica (CMC) para esse emulsificante [53,54]. Após a homogeneização, emulsões trabalho (ET), contendo 0,12% v/v de  $BDB_{ND}$  e 99,88% de EP foram produzidas em balões volumétricos. As ET foram produzidas em duplicatas para cada  $BDB_{ND}$  no intervalo de composição de 0% a 100% m/m de biodiesel nas blendas, em passos de 10% m/m de biodiesel, totalizando 22 amostras. Em seguida, 30% da ET de cada blenda foi diluída em 70% v/v de EG. Em relação a produção das amostras de validação externa, o mesmo procedimento foi adotado. Assim, seis amostras de validação externa, três com 13 % m/m e três com 15% m/m de biodiesel nas blendas foram produzidas. Amostras com 30% da EP (sem  $BDB_{ND}$ ) foram diluídas em 70% de EG e chamadas de EGTW80. Essas amostras foram adotadas como referências (branco) na FM, EDL e AFM.

Todas as amostras foram rotuladas como  $Bx_{(D)}$ , onde  $x$  corresponde a porcentagem, em massa, de biodiesel das  $BDB_{ND}$  e o índice  $D$  mostra que elas foram diluídas de acordo com o procedimento descrito acima. Além disso, a emulsão EGTW80 foi escolhida devido o EG apresentar valor de viscosidade (16,1 cP) maior do que os solventes Diclorometano (0,45 cP) e Hexano (0,31 cP), os quais são normalmente utilizados para diluir  $BDB$ .

### 3.1.4 Solução padrão de Rodamina B

Para avaliar o alinhamento dos polarizadores e a implementação do algoritmo de processamento de dados para a obtenção dos MDA, o valor da anisotropia de fluorescência da Rodamina B ( $r_{BD}$ ) em uma solução aquosa de glicerol foi utilizada como padrão. Para isso, o glicerol PA da marca Dinâmica, Rodamina B (RB) PA da marca Vetec, hidróxido de sódio PA (NaOH) da marca Dinâmica e água destilada foram utilizados. Primeiramente, uma solução aquosa contendo água destilada e 0,5 mM de NaOH foi preparada. Em seguida, o glicerol foi diluído na solução aquosa na razão de 95:5 (glicerol:solução aquosa). Após a diluição do glicerol, a solução foi chamada de GNaOH. Em seguida, a massa de RB foi aferida e dissolvida em GNaOH, considerando uma concentração final de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , conforme descrito em Maruyama *et al.* (2019) [55]. Adicionalmente, RB em GNaOH foram produzidas em triplicatas e rotuladas de RB(GNaOH).

## 3.2 Caracterizações óptica

### 3.2.1 Avaliação da reação de transesterificação

A reação de transesterificação do óleo de soja foi avaliada através da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Para isso, os espectros de absorção do óleo de soja e biodiesel foram mensurados em um espectrômetro de infravermelho médio Perkin-Elmer Spetrum 100 series, equipado com acessório de refletância total atenuada (“*Attenuated Total Reflectance*” - ATR) de cristal de germânio. Todos os espectros foram coletados entre 3200 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$  e 10 acumulações, em temperatura ambiente.

### 3.2.2 Obtenção das matrizes de excitação-emissão não polarizada das $BDB_{ND}$

As matrizes de excitação-emissão não polarizada ( $MEE_{NP}$ ) foram obtidas em um espectrofluorímetro FluoroMate FS-2 (SCINCO, Seoul, Korea) composto por monocromadores de excitação e emissão, uma lâmpada de xenônio de 150 W e uma fotomultiplicadora R-928 como detector. Para a obtenção das  $MEE_{NP}$  das  $BDB_{ND}$ , uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e quatro faces polidas foi utilizada. A cubeta contendo amostra de  $BDB_{ND}$  foi posicionada de acordo com a configuração geométrica do ângulo de 90° entre o feixe de excitação e emissão. Em seguida, as  $MEE_{NP}$  das  $BDB_{ND}$  foram coletadas nos intervalos de excitação e emissão de 205 a 555 nm e 215 a 755 nm, com incrementos de 5 nm e 2 nm, respectivamente. Adicionalmente, a sensibilidade da fotomultiplicadora foi ajustada em 550 V. Por fim, é importante destacar que todas as  $MEE_{NP}$ , conjunto de calibração e validação, foram mensuradas a partir das  $BDB_{ND}$  como inicialmente preparadas, ou seja, sem serem diluídas ou passarem por quaisquer pré-preparo e a temperatura ambiente.

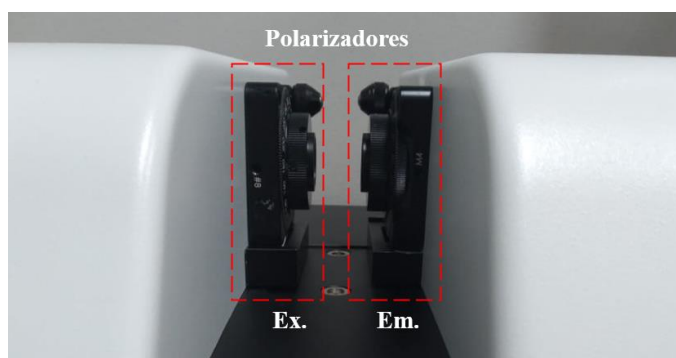
### 3.2.3 Alinhamento dos polarizadores

Antes de obter as matrizes de excitação-emissão polarizadas ( $MEE_p$ ), a janela óptica e o alinhamento dos polarizadores de excitação e emissão foram avaliados. Primeiramente, os polarizadores de excitação e emissão foram colocados em uma base giratória da marca Newport (RSP-1T), calibrada de 0 a 360° com erro instrumental de  $\pm 1,0^\circ$ , conforme mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Polarizadores de excitação (esquerda) e emissão (direta) sobre uma base giratória Newport (RSP-1T).

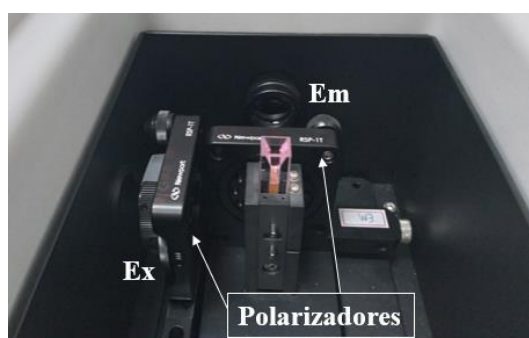
Após ajustar os polarizadores sobre as bases giratórias, o conjunto foi adicionado no espectrômetro de absorção UV-vis Lambda 265 (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), conforme apresentado na Figura 3. Em seguida os espectros de transmitância foram obtidos com a linha de base feita no ar, e com os polarizadores de excitação e emissão nas posições VV e VH. Adicionalmente, VV significa que os polarizadores de excitação-emissão foram orientados na vertical enquanto VH significa que o polarizador de excitação foi orientado na vertical e de emissão na horizontal. Após a obtenção dos espectros, os seguintes critérios foram considerados para avaliação da janela óptica e alinhamento dos polarizadores: (1) na polarização VV espera-se que a transmitância da radiação ocorra entre os polarizadores; (2) na polarização VH espera-se valores de transmitância próximo de zero.



**Figura 3.** Polarizadores de excitação (esquerda) e emissão (direta) adicionados e alinhados ao espectrofotômetro UV-vis.

Além dos espectros de transmitância, o valor da anisotropia de fluorescência da solução de RB(GNaOH) foi utilizada como padrão para avaliar o alinhamento e funcionamento dos polarizadores. Para isso, amostras de RB(GNaOH), cujo preparo está descrito no item 3.1.4, foram adicionadas em uma cubeta de quartzo com as quatro faces polidas e caminhos ópticos de 3 e 10 mm da marca Starna Scientific. Em seguida as

matrizes de excitação-emissão polarizadas da solução de RB(GNaOH) ( $MEEp_{(RB)}$ ) foram coletadas nas seguintes polarizações: VV(Vertical-Vertical), VH (Vertical-Horizontal), HV (Horizontal-Vertical) e HH (Horizontal-Horizontal). As  $MEEp_{(RB)}$  foram obtidas no mesmo espectrofluorímetro descrito no item 3.2.2. Os intervalos de excitação de 490 a 600 nm e emissão de 550 a 645 nm, com incrementos de 2 nm e 1 nm, foram utilizados para a obtenção das  $MEEp_{(RB)}$ . Adicionalmente, as excitações foram realizadas ao longo do eixo de menor caminho óptico da cubeta. As aberturas das fendas de excitação e emissão foram de 2,5 nm e 5,0 nm, respectivamente. Todas as  $MEEp_{(RB)}$  foram coletadas com a tensão da fotomultiplicadora ajustada em 600 V e com ângulo de 90° entre o feixe a excitação e emissão, conforme apresentado na Figura 4. Além disso, o tempo de integração, o tempo de resposta e a velocidade de escaneamento foram de 20 ms, 0,1 s e 600 nm.min<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as  $MEEp_{(RB)}$  foram coletadas em temperatura ambiente.



**Figura 4.** Configuração dos polarizadores de excitação (Ex.) e emissão (Em.) no fluorímetro.

### 3.2.4 Obtenção dos espectros de absorção na região UV-vis

Os espectros de absorção das amostras de  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$  foram obtidos em um espectrômetro de absorção UV-vis Lambda 265 (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) na região espectral de 200 a 900 nm. Para isso, as amostras foram adicionadas em uma cubeta de quartzo de dimensão 3 x 10 nm e os espectros coletados pela face de menor caminho óptico. Todos os espectros foram coletados em temperatura ambiente.

### 3.2.5 Matrizes de excitação-emissão polarizadas das blendas de diesel-biodiesel não diluídas

Após avaliar a janela de transmissão e o alinhamento dos polarizadores, as  $MEEp$  das  $BDB_{ND}$  ( $MEEp_{(ND)}$ ) foram coletadas no mesmo fluorímetro descrito no item 3.2.2. Como porta amostra, a mesma cubeta descrita no item 3.2.3 foi utilizada. Além disso, as



excitações foram realizadas ao longo do eixo de menor caminho óptico da cubeta. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram obtidos no intervalo de 330-480 nm e 352-650 nm, com incrementos de 5 nm e 1 nm, respectivamente. As aberturas das fendas de excitação e emissão foram de 5,0 nm para os dois monocromadores. Todas as  $MEEp_{(ND)}$  foram coletadas com a tensão da fotomultiplicadora ajustada em 550 V e com ângulo de 90° entre o feixe de excitação e emissão (Figura 4). Além disso, o tempo de integração, o tempo de resposta e a velocidade de escaneamento foram de 20 ms, 0,1 s e 600 nm.min<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as  $MEEp_{(ND)}$  foram coletadas em temperatura ambiente.

### **3.2.6 Matrizes de excitação-emissão polarizadas das blendas de diesel-biodiesel diluídas**

Para a obtenção das  $MEEp$  das  $BDB_D$  ( $MEEp_{(D)}$ ) foram utilizados o fluorímetro e a cubeta descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.4. As  $MEEp_{(D)}$  foram coletadas no intervalo de excitação de 270 a 410 nm e emissão de 372 a 550 nm. Além disso, os incrementos de excitação e emissão foram de 5 nm e 1 nm, respectivamente. Todas as  $MEEp_{(D)}$  foram coletadas com a fotomultiplicadora ajustada em 700 V e com as fendas de excitação e emissão abertas em 5,0 nm para ambos os monocromadores. Adicionalmente, o tempo de integração, o tempo de resposta e a velocidade de escaneamento foram de 20 ms, 0,1 s e 600 nm.min<sup>-1</sup>, respectivamente. As  $MEEp_{(D)}$  foram coletadas com ângulo de 90° entre o feixe a excitação e emissão, conforme apresentado na Figura 4. Para a obtenção das matrizes de excitação-emissão do solvente ( $MEEp_{(branco)}$ ), o mesmo procedimento foi adotado. Todas as  $MEEp_{(D)}$  foram obtidas em temperatura ambiente.

### **3.2.7 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo das blendas de diesel-biodiesel diluídas**

Para avaliar o tempo de correlação rotacional, medidas do tempo de vida de fluorescência das  $BDB_D$  e da RB(GNaOH) foram realizadas em um espectrômetro de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (“*Time Correlated Single Photon Counting*” - TCSPC) (FluorTime 100, PicoQuant®, Berlim, Alemanha). As amostras foram excitadas empregando pulsos de luz emitidos por um diodo emissor de luz (LED) no comprimento de onda de 280 nm, com frequência de repetição ajustada em 1,25 MHz e potência de emissão de 1,3 μW. Os pulsos foram gerados com o auxílio de um

modulador de frequência PDL 800-B (PicoQuant). Após a excitação em 280 nm, os decaimentos foram monitorados através do filtro passa banda WG320 nm (320 nm)

Após a obtenção das curvas de decaimentos, os dados foram ajustados através do programa FluoFit (PicoQuant) através da seguinte equação:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $I(t)$  corresponde a intensidade do decaimento de fluorescência,  $A_i$  são as amplitudes (fatores pré-exponenciais),  $t$  é o tempo em ns e  $\tau_i$  é o tempo de vida de fluorescência em ns [56,57]. Adicionalmente, ajustes bi exponenciais foram aplicados e valores de chi-quadrado ( $\chi^2$ ) entre 0,95 e 1,04 foram considerados adequados. Após os ajustes, o tempo de vida médio de cada amostra foi calculado através da seguinte equação [56]:

$$\tau_{\text{médio}} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i} \quad \text{Equação 3}$$

### 3.3 Análise dos dados

#### 3.3.1 Análise multivariada das MEE<sub>NP</sub> das blendas não diluídas

As MEE<sub>NP</sub> foram analisadas pelo PARAFAC (MEE<sub>NP</sub> - PARAFAC) através do pacote drEEM [34], executado no software Matlab R2020a. Para a análise, as MEE<sub>NP</sub> foram organizadas em ordem ascendente do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ , formando uma arranjo de tamanho  $12 \times 484 \times 23$ . Em seguida, esse arranjo foi pré-processado (delimitação das regiões de decomposição) e decomposto pelo PARAFAC. Para a escolha do número de componentes e validação do modelo, a análise do tensor central (CONCORDIA) e a análise da divisão pela metade (“*Split Half Analysis*” - SHA) foram utilizadas, respectivamente [16,34]. Para avaliar o potencial da calibração multivariada, o PARAFAC foi aplicado apenas no conjunto de dados que apresentaram comportamento linear em função do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ .

#### 3.3.2 Análise multivariada das MEE<sub>p</sub> das blendas diluídas e não diluídas

O método PARAFAC foi aplicado sobre as MEE<sub>p(ND)</sub> e MEE<sub>p(D)</sub> com objetivo de avaliar as possíveis contribuições dos fluoróforos (composição, máxima excitação e emissão) nas polarizações VV, VH, HV e HH, além da MEE<sub>p(D)</sub> total das  $BDB_D$ . Boucau *et al.* (2018) aplicaram o método MCR em cada polarização para obtenção da anisotropia

do sistema por eles estudado [51]. No trabalho, os autores afirmam que o PARAFAC também pode ser utilizados para gerar modelos por polarização.

Nesse contexto, o PARAFAC foi aplicado sobre as  $MEEp_{(ND)}$  e  $MEEp_{(D)}$  através do pacote drEEM [34], executado no software Matlab R2020a. Adicionalmente, é importante pontuar que as  $MEEp_{(ND)}$  e  $MEEp_{(D)}$  foram analisadas separadamente, porém o procedimento metodológico, como organização da estrutura de dados, pré-processamento de dados, decomposição e validação do modelo foram o mesmo para ambos conjunto de dados. Assim, cada polarização das  $MEEp_{(ND)}$  e  $MEEp_{(D)}$  foram organizadas, em ordem ascendente do teor de biodiesel nas blendas, formando um arranjo tridimensional de dados de tamanho: *número amostras*  $\times$  *número de comprimento de onda de emissão*  $\times$  *número de comprimento de onda excitação*. É importante ressaltar que o tamanho do arranjo, depende do número de variáveis utilizadas na decomposição de cada polarização. Em seguida, o conjunto de dados referente a sua respectiva polarização foram pré-processados (delimitação das regiões de decomposição, remoção de espalhamento e interpolação) e decomposto pelo PARAFAC. Adicionalmente, a remoção dos espalhamentos e interpolação foram aplicados somente nas polarizações em que o espalhamento foi observado. Em relação a escolha do número de componentes e validação do modelo, o CONCORDIA e a SHA foram utilizadas, respectivamente [16,58].

### 3.3.3 Construção das curvas analíticas e análise da regressão linear

As curvas analíticas apresentadas neste trabalho foram construídas a partir dos seguintes procedimentos: (1) inspeção da máxima intensidade de excitação-emissão das  $MEE_{NP}$  das  $BDB_{ND}$ ; (2) representação pseudo-univariada obtidas através da  $MEE_{NP}$ -PARAFAC das  $BDB_{ND}$ ; e (3) máxima intensidade de excitação-emissão recuperada a partir da  $MEEp_{(ND)}$ -PARAFAC das  $BDB_{ND}$  e das  $BDB_D$ . Esses procedimentos serão descritos a seguir.

#### Procedimento 1

De posse das  $MEE_{NP}$  das  $BDB_{ND}$ , uma inspeção foi realizada sobre a  $MEE_{NP}$  da amostra  $B0_{(ND)}$  com objetivo de encontrar a região de máxima intensidade de excitação-emissão. Essa inspeção foi realizada através da ferramenta “*Data Reader*” do software Origin Lab. Então, a máxima intensidade de emissão, para uma dada excitação, foi

plotada em função do teor de biodiesel. Em seguida, a região de linearidade foi identificada e a análise da regressão foi aplicada sobre esse conjunto de dados.

## Procedimento 2

O modelo PARAFAC pode ser usado para prever a concentração do analito de interesse em novas amostras [59]. Para isso, um gráfico chamado representação pseudo-univariada é construído através dos “loadings” da concentração (“loadings” do modo A), de cada componente obtido através do PARAFAC, em função da concentração do analito de referência ( $BDB_{ND}$ ) [59,60]. Nesse contexto, a representação pseudo-univariada foi utilizada para a construção de um modelo, cujo objetivo foi avaliar o teor de biodiesel em  $BDB_{ND}$ . Em seguida, a validação cruzada (“leave-one-out cross validation” -  $LOOCV$ ) foi aplicada sobre o modelo e a figura de mérito raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (“Root Mean Square Error Cross Validation” -  $RMSECV$ ) (Equação 4) foi utilizada como critério de escolha do melhor componente para a construção da representação pseudo-univariada [59,60]. A figura de mérito  $RMSECV$  pode ser escrita como

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{l_{cv}} (L_i - \hat{L}_i)^2}{n_{cv}}} \quad \text{Equação 4}$$

onde  $L_i$  e  $\hat{L}_i$  são os valores dos “loadings” do modo A atuais e preditos a partir MEE<sub>NP</sub>-PARAFAC do conjunto de calibração, respectivamente, e  $n_{cv}$  corresponde ao número de amostras deixadas de fora na validação cruzada [59].

## Procedimento 3

De posse das melhores variáveis de excitação e emissão, obtidas após a decomposição das MEE<sub>p(ND)</sub> e MEE<sub>p(D)</sub> pelo PARAFAC, curvas analíticas foram construídas para cada polarização. Para isso, as intensidades experimentais, de cada polarização, foram plotadas em função do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$ . Em seguida, as intensidades que apresentaram um comportamento linear com a adição de biodiesel nas blendas, foram utilizadas para a análise da regressão. Adicionalmente, diferente do procedimento 2, a análise PARAFAC não foi utilizada para gerar modelos analíticos pseudo-univariados, pois a intenção desta análise foi obter as melhores variáveis que possibilitam gerar modelos analíticos que possam ser validados de forma

mais simples do que o modelo pseudo-univariado, como por exemplo, através dos espectros de fluorescência 2D das amostras do conjunto de validação externa.

### 3.3.4 Análise da regressão

Para a análise da regressão, a análise de resíduo studentizado e teste F foram utilizados para a detecção de “outliers” e avaliação de linearidade entre as variáveis dependentes e independentes, respectivamente. Além disso, o limite de detecção (*LDD*) e quantificação (*LDQ*) foram estimados para todos os modelos obtidos neste trabalho. Adicionalmente, os limites de confiança dos coeficientes da regressão foram calculados com o nível de significância  $\alpha = 5\%$  com  $n - p$  graus de liberdade, onde  $n$  é o número de amostras do conjunto de calibração e  $p$  ( $p= 2$  para regressão linear) é o número de parâmetros do modelo [61].

#### 3.3.4.1 Análise de resíduo studentizado

A presença de “outliers”, nas curvas analíticas, foi avaliada através da análise de resíduos studentizados ( $r_s$ ) [62], expresso pela seguinte equação:

$$r_s = \frac{y_i - y_i'}{\sqrt{MSE_i(1-h_{ii})}} \quad \text{Equação 5}$$

onde,  $y_i$  corresponde aos valores observados e  $y_i'$  é a estimativa da observação, levando em consideração a observação excluída do conjunto de dados antes da regressão,  $MSE$  é a média quadrática do erro da regressão sem a amostra que se deseja estimar e  $h_{ii}$  é influência da amostra [63]. A influência é valor da diagonal principal da matriz chapéu  $H = CC^+$  e  $C$  corresponde ao vetor concentração. O nível de significância foi de  $\alpha = 5\%$  com  $n - p - 1$  grau de liberdade, onde  $n$  é o número de pontos da curva analítica e  $p$  é o número de parâmetros da regressão ( $p= 2$  para regressão linear). São considerados “outliers” amostras com valores de  $r_s > 3$  [62,64].

#### 3.3.4.2 Análise de linearidade – Teste F

O teste  $F$  para a regressão [61,65,66], estabelece o quociente entre a média quadrática da regressão  $MQ_{reg}$ , variância explicada pelo modelo com  $p - 1$  grau de liberdade, e média quadrática residual  $MQ_{res}$ , variância residual com  $n - p$  grau de liberdade, dada pela seguinte equação:

$$F = \frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} \quad \text{Equação 6}$$

Esse teste é baseado no teste de hipótese, cuja hipótese nula ( $H_0: b_1 = 0$ ) assume que não existe relação linear entre as variáveis, por outro lado, a hipótese alternativa ( $H_1: b_1 \neq 0$ ) assume que existe uma relação linear entre as variáveis [66]. Adicionalmente,  $b_1$  corresponde o coeficiente angular da regressão. Considerando um nível de significância de  $\alpha = 5\%$ , temos que:

- Se  $F_{calculado} > F_{tabelado}$ , então rejeita-se  $H_0$ ;
- Se  $F_{calculado} < F_{tabelado}$ , então aceita-se  $H_0$ .

### 3.3.4.3 Determinação do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) mede qualitativamente a capacidade de detecção do analito por uma técnica instrumental com um nível de significância  $\alpha$ , enquanto o limite de quantificação expressa a mínima detecção quantitativa (LOQ) do analito [67,68]. Neste trabalho, o LOD e LOQ foram determinados com 5% de nível de significância e com as seguintes equações[60,69–73]:

$$LOD = \frac{\delta(\alpha,\beta)w_{x_0}\hat{\sigma}}{b} \quad \text{Equação 7}$$

e

$$LOQ = \frac{10w_{x_0}\hat{\sigma}}{b} \quad \text{Equação 8}$$

onde  $\delta(\alpha,\beta)$  é o coeficiente  $t$  unicaudal da distribuição t-student e depende das probabilidades  $\alpha$  e  $\beta$ ,  $\hat{\sigma}$  corresponde ao desvio padrão da regressão e  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica. O parâmetro  $w_{x_0}$  (Equação 9) depende dos parâmetros da regressão, como a concentração utilizada na construção do modelo de calibração ( $C_i$ ), número das réplicas ( $K$ ) e número de pontos (amostras) presentes no modelo de calibração ( $I$ ) [72].

$$w_{x_0} = \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I} + \frac{\bar{C}^2}{\sum_{i=1}^I (C_i - \bar{C})^2}} \quad \text{Equação 9}$$

### 3.3.4.4 Avaliação do desempenho dos modelos de calibração

Para avaliar a performance do modelo de regressão na predição do teor de biodiesel nas blends do conjunto de validação externa, as seguintes figuras de mérito foram calculadas: *RMSEP* e *RSDP*. Ambas fornecem informações sobre a precisão e acurácia dos modelos na predição do teor de biodiesel nas amostras de validação externa,

respectivamente. Além disso podem ser calculados de acordo com as seguintes equações [59,74]:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (C_{ref.} - \hat{C}_{pred.})^2}{n_v}} \quad \text{Equação 10}$$

e

$$RDSP = \left( \frac{RMSEP}{BDB_{pred.}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

onde  $C_{ref.}$  e  $\hat{C}_{pred.}$  correspondem aos valores de referência e preditos de biodiesel no conjunto de validação externa,  $n_v$  é o número de amostras do conjunto de validação e  $BDB_{pred.}$  é o valor de biodiesel predito no conjunto de validação.

### 3.3.5 Construção dos mapas de anisotropia

Para a construção dos mapas de anisotropia (MDA), primeiramente é necessário que os valores de anisotropia sejam calculados, de acordo com a seguinte equação [48,49,51]:

$$r = \frac{MEE_{VV} - G \times MEE_{VH}}{MEE_{VV} + 2 \times G \times MEE_{VH}} \quad \text{Equação 12}$$

onde  $MEE_{VV}$  e  $MEE_{VH}$  correspondem as MEEp, coletadas com os polarizadores de excitação-emissão orientados nas polarizações VV (excitação-emissão) e VH (excitação-emissão) e G corresponde ao fator de correção das diferentes sensibilidades que o detector de emissão pode apresentar quando os polarizadores são orientados na vertical e horizontal [48–50]. Esse fator pode ser obtido através das MEEp coletadas nas polarizações HV ( $MEE_{HV}$ ) e HH ( $MEE_{HH}$ ), conforme descrito na equação 13 [48,50].

$$G = \frac{MEE_{HV}}{MEE_{HH}} \quad \text{Equação 13}$$

Conforme apresentado na Equação 12, o produto do fator G pelas  $MEE_{VH}$  geram as  $MEE_{VV_{corrigida}}$ . Dessa forma, a anisotropia de fluorescência (Equação 12) pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$r = \frac{MEE_{VV} - MEE_{VH_{corrigida}}}{MEE_{VV} + 2 \times MEE_{VH_{corrigida}}} \quad \text{Equação 14}$$

Adicionalmente, o denominador da equação 14 corresponde a matriz de excitação e emissão total ( $MEE_{Total}$ ). Antes que os valores de  $r$  sejam calculados, é necessário que

as MEEp sejam pré-processadas, pois os espalhamentos Rayleigh e Raman podem gerar resultados incorretos de  $r$  [48,50].

Nesse sentido, para o pré-processamento de dados das MEEp e o cálculo de  $r$  das  $BDB_D$  e da RB(GNaOH), o software Matlab R2020a e o pacote drEEM [34] foram utilizados. Em relação ao pré-processamento dos dados, primeiramente as MEEp<sub>(branco)</sub> (MEEp da EGTW80) foram subtraídas das  $MEE_{VV}$  e  $MEE_{VH}$ . Esse procedimento foi necessário para remover os eventuais espalhamentos Raman provenientes do solvente [75]. É importante salientar que as MEEp<sub>(branco)</sub> correspondem as MEEp do solvente (EGTW80), conforme descrito na seção 3.1.3. Após a subtração das MEEp<sub>(branco)</sub>, o método de suavização de Savitsky-Golay, foi aplicado para a redução de ruídos proveniente da subtração [48]. Para isso, um polinômio de segunda ordem e um número de pontos igual a 64 foram adotados como parâmetros de suavização. Adicionalmente, a ordem do polinômio e o número de pontos foram escolhidos de acordo com os seguintes critérios: (1) máxima redução dos ruídos e (2) não alteração da forma espectral das MEEp. Em seguida, o espalhamento Rayleigh foi removido e a interpolação foi aplicada nas matrizes que apresentaram espalhamento.

Para calcular o fator G, as  $MEE_{HV}$  e  $MEE_{HH}$  de cada  $BDB_D$  foram utilizadas sem pré-processamento, pois elas não apresentaram espalhamento na região analisada. Dessa forma, o fator G foi determinado e as suas respectivas matrizes foram suavizadas a partir do método de suavização de Savitsky-Golay, cujo polinômio e o número de pontos foram os mesmos utilizados nas  $MEE_{VV}$  e  $MEE_{VH}$ . Após a obtenção do fator G, as  $MEE_{VH_{corrigida}}$  de cada  $BDB_D$  foram determinadas. Realizado o pré-processamento das MEEp, o valor de  $r$  foi calculado a partir da Equação 14, e conseqüentemente os MDA de dimensão  $r \times \lambda_{ex} \times \lambda_{em}$  (anisotropia  $\times$  comprimento de onda de excitação  $\times$  comprimento de onda de emissão) foram construídos para cada  $BDB_D$ .

Em relação aos MDA da RB (NaOH), o valor de sua anisotropia de fluorescência foi adotado como padrão para avaliar se a implementação do código de pré-processamento e do cálculo de  $r$  foram realizados de forma correta.

### 3.3.6 Determinação do tempo de correlação rotacional

Para avaliar o tempo de correlação rotacional de um dado fluoróforo em um par de excitação-emissão presente no MDA, a seguinte equação foi utilizada [50]:



$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_{m\u00e9dio}}{\tau_{rot.}} \quad \text{Equa\u00e7\u00e3o 15}$$

onde  $r_0$  \u00e9 a anisotropia fundamental ( $r_0 = 0,4$ ),  $r$  \u00e9 a anisotropia para um dado ponto do MDA,  $\tau_{m\u00e9dio}$  \u00e9 o tempo de vida m\u00e9dio obtido atrav\u00e9s da Equa\u00e7\u00e3o 3 e  $\tau_{rot.}$  \u00e9 o tempo de correla\u00e7\u00e3o rotacional do fluor\u00f3foro analisado. \u00c9 importante definir que  $r_0$  corresponde ao valor m\u00e1ximo de anisotropia de fluoresc\u00eancia na aus\u00eancia da despolariza\u00e7\u00e3o entre a excita\u00e7\u00e3o-emiss\u00e3o, considerando a m\u00e1xima fotosele\u00e7\u00e3o dos fluor\u00f3foros analisados [50]. Essa equa\u00e7\u00e3o \u00e9 conhecida como equa\u00e7\u00e3o de Perrin e foi aplicada para obter informa\u00e7\u00f5es complementares a cerca dos valores de anisotropia dos fluor\u00f3foros que comp\u00f5em as *BDBD* a partir de  $\tau_{rot.}$  Adicionalmente, para fins comparativos, o  $\tau_{rot.}$  da RB tamb\u00e9m foi determinada.

De acordo com os valores de  $\tau_{m\u00e9dio}$  e  $\tau_{rot.}$  das *BDBD* e da RB, foi poss\u00edvel avaliar os valores da anisotropia da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \tau_{rot.} \gg \tau_{m\u00e9dio}, \text{ ent\u00e3o } r &\approx r_0; \\ \tau_{rot.} \ll \tau_{m\u00e9dio}, \text{ ent\u00e3o } r &\approx 0 \text{ [50]}. \end{aligned}$$

Adicionalmente, valores de  $r \approx r_0$  significa que a mol\u00e9cula em estudo n\u00e3o sofre depolariza\u00e7\u00e3o por rota\u00e7\u00e3o enquanto  $r \approx 0$  indica despolariza\u00e7\u00e3o por rota\u00e7\u00e3o.

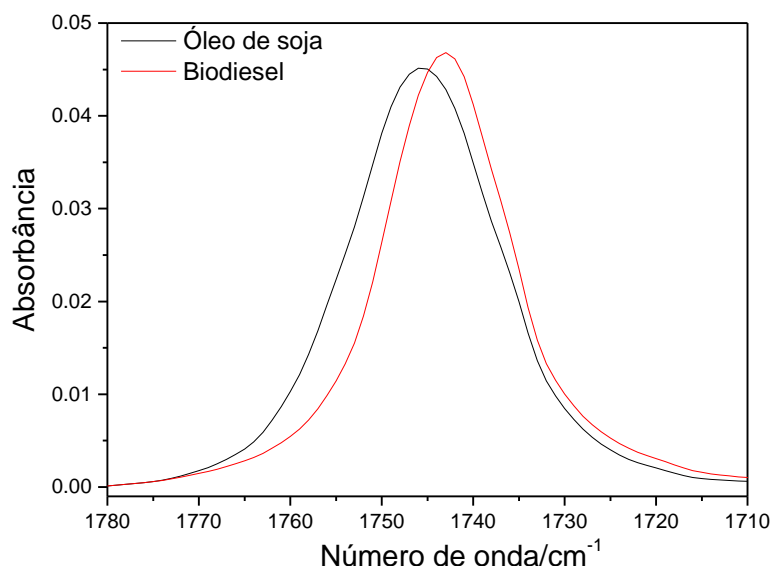
## Capítulo 4 – Aplicação da fluorescência multidimensional não polarizada em blendas de diesel-biodiesel não diluídas

Neste capítulo serão apresentados os resultados, discussão e conclusões acerca da aplicação do PARAFAC nas  $MEE_{ND}$  ( $MEE_{ND}$ -PARAFAC) no desenvolvimento de modelo analítico multivariado usado na quantificação de biodiesel em  $BDB_{ND}$ .

### 4 Resultados e discussão

#### 4.1 Avaliação da transesterificação do óleo de soja

A Figura 5 mostra os espectros de absorção na região do infravermelho médio, obtidos para as amostras de óleo de soja e biodiesel. De acordo com o comportamento dos espectros, um deslocamento da banda centrada em  $1746\text{ cm}^{-1}$  para  $1743\text{ cm}^{-1}$  foi observado. Essa banda está associada ao grupo  $C=O$  e o seu deslocamento confirma a produção de biodiesel [76].

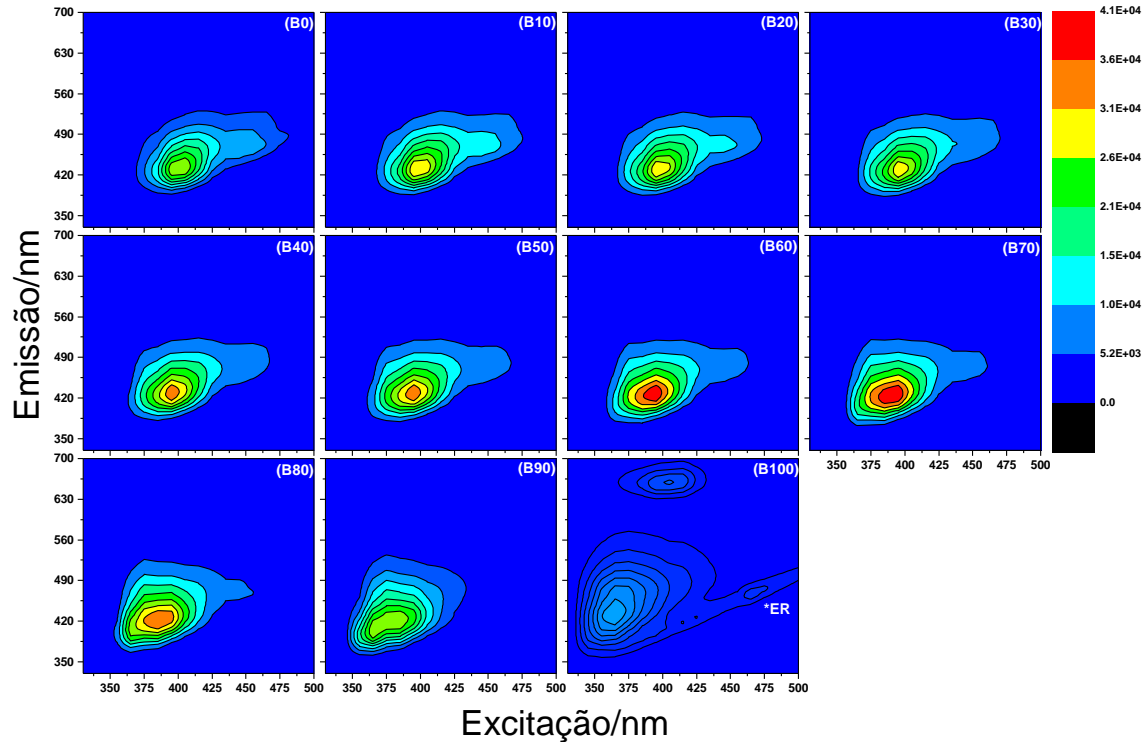


**Figura 5.** Espectros de FTIR das amostras de óleo e biodiesel de soja.

#### 4.2 Matrizes de excitação-emissão não polarizadas das blendas de diesel-biodiesel não diluídas

A Figura 6 apresenta a  $MEE_{ND}$  de  $B0_{ND}$  (Diesel),  $BDB_{ND}$  ( $B10_{ND}$  até  $B90_{ND}$ ) e  $B100_{ND}$  (Biodiesel) com fluorescência localizada em duas regiões. A primeira localizada entre 350-560 nm quando excitada de 340 a 475 nm pode ser atribuída aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presente no diesel e aos fluoróforos endógenos do biodiesel [7,31,77–79]. Em relação a segunda, menos intensa com emissão

entre 630 e 700 nm, com máxima intensidade em torno de 660 nm, observada apenas para B100<sub>ND</sub>, pode ser atribuída à emissão das moléculas de clorofila [7]. Adicionalmente, um aumento da intensidade de fluorescência foi observado em função do teor de biodiesel (B0<sub>ND</sub> – B70<sub>ND</sub>) devido ao aumento de viscosidade das BDB<sub>ND</sub> [6].

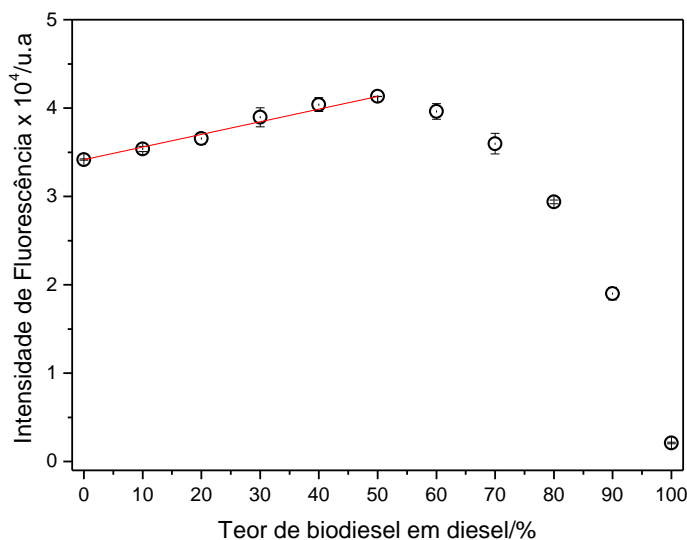


**Figura 6.** Matrizes de excitação-emissão não polarizadas de B0<sub>ND</sub> (Diesel) até B100<sub>ND</sub> (Biodiesel). ER representa o espalhamento Rayleigh de primeira ordem. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.

Baseado nos dados das MEE<sub>ND</sub>, a intensidade de emissão em 435 nm (excitação em 400 nm) foi plotada em função do teor de biodiesel no intervalo de 0-100% m/m de biodiesel em diesel, conforme apresentado na Figura 7. Sobre esses dados, um ajuste linear foi aplicado no intervalo de 0-50% m/m e o modelo dado por  $I_{NPND} = (33964 \pm 430) + (149 \pm 14)x$  foi obtido com  $R^2 = 0,9909$ , em que  $x$  corresponde o teor de biodiesel nas BDB<sub>D</sub> e os índices presentes na variável dependente indica não polarizada (NP) e não diluída (ND). Após a obtenção do modelo, os valores dos resíduos studentizados foram calculados a partir da Equação 5 e os resultados não indicaram a presença de “outliers”, uma vez que os valores de resíduos studentizados foram <3. De acordo com o teste de linearidade (teste F), os valores de  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  foram iguais a 544 e 4,96, respectivamente. Como  $F_{cal} > F_{tab}$ , a hipótese nula ( $H_0$ ) deve ser rejeitada, portanto é possível concluir, que existe uma relação linear entre  $I_{NPND}$  e o teor de

biodiesel nas  $BDB_D$ . Confirmado a linearidade do modelo apresentado na Figura 7, os valores de  $LOD = 5,3\%$  m/m e  $LOQ = 23,7\%$  m/m foram calculados. De acordo com o alto valor de  $LOQ$  é possível afirmar que o modelo dado por  $I_{NP_{ND}}$  não atende a legislação Brasileira vigente, utilizada para quantificar teor de biodiesel nas  $BDB_D$ .

Portanto, uma simples análise da máxima intensidade de fluorescência em um comprimento de onda específico de excitação e emissão não forneceu um modelo adequado para quantificar biodiesel nas  $BDB_{ND}$ .

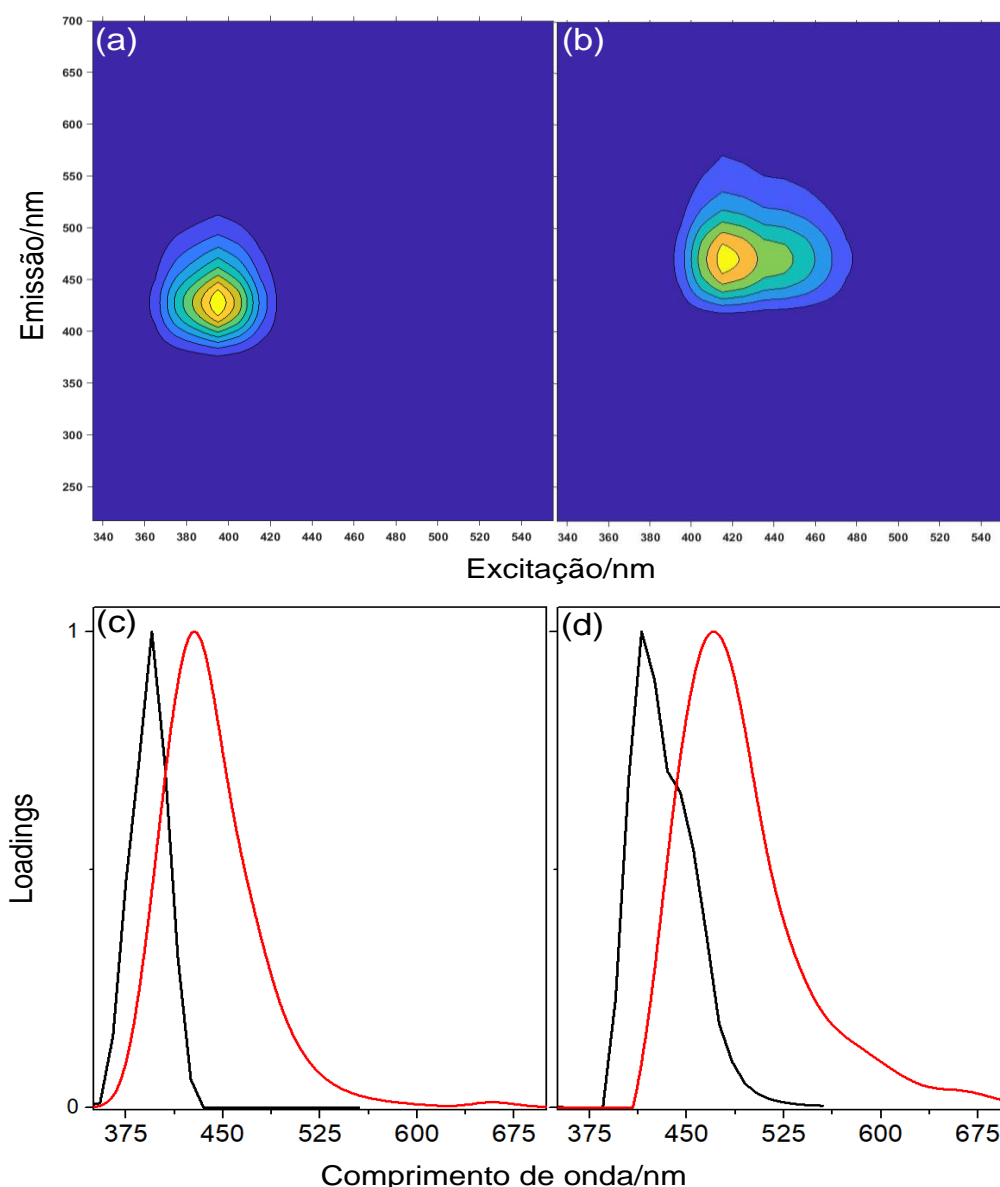


**Figura 7.** Intensidade de fluorescência em 435 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$  sob excitação em 400 nm. A linha vermelha corresponde a regressão linear.

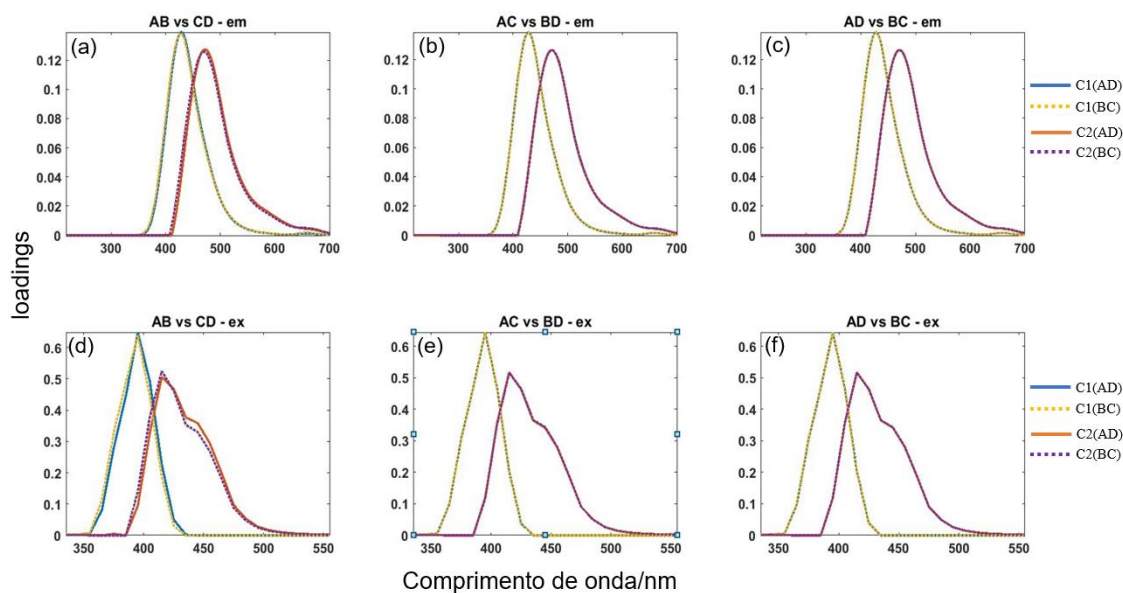
### 4.3 Análise PARAFAC das $MEE_{ND}$

As  $BDB_{ND}$  são amostras complexas e suas  $MEE_{ND}$  apresentam um número grande de variáveis de excitação-emissão. Dessa forma, a análise multivariada de dados é recomendada para esse tipo de estrutura de dados. Nesse cenário, para melhor identificar e quantificar os fluoróforos pertencentes às  $BDB_{ND}$ , o PARAFAC foi aplicado sobre as  $MEE_{ND}$  [15,37,59]. A Figura 8 mostra as  $MEE_{ND}$  recuperadas após a decomposição PARAFAC ( $MEE_{ND}$ -PARAFAC), realizada no intervalo de 0-50% m/m de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . Após a decomposição, um modelo de dois componentes (C1 e C2) foi obtido com um CONCORDIA de 85,66% [80]. Como mostrado na Figura 9, SHA evidenciou que o modelo de dois componentes apresentou similaridade espectral entre as divisões, com coeficiente de correlação maior do que 0,95 [34]. Portanto, esses resultados validaram que as  $MEE_{ND}$ , na região entre 0 e 50% m/m de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ , recebem contribuições de dois componentes (C1 e C2).

Para o componente C1, uma região de emissão entre 375 e 525 nm foi recuperada associada com excitação entre 360 e 430 nm (Figura 8a). Por outro lado, para o componente C2 (Figura 8b), a excitação e emissão foram recuperadas nos intervalos de 390-480 nm e 400-575 nm, respectivamente. Adicionalmente, os espectros de excitação e emissão dos componentes C1 e C2, recuperados através MEE<sub>ND</sub>-PARAFAC, são apresentados nas Figuras 8c e 8d, respectivamente. Para esses componentes, os comprimentos de onda de excitação (emissão) da máxima intensidade de fluorescência de C1 e C2, foram obtidos em 395 nm (430 nm) e 415nm (475 nm), respectivamente. Além disso, os espectros de emissão recuperados são similares aos HPAs presente no Diesel [44].



**Figura 8.** Mapas de contorno recuperados para os componentes (a) C<sub>1</sub> e (b) C<sub>2</sub> Espectros de excitação (linha preta) e emissão (linha vermelha) recuperadas para o componente C1 (c) e componente C2 (d).

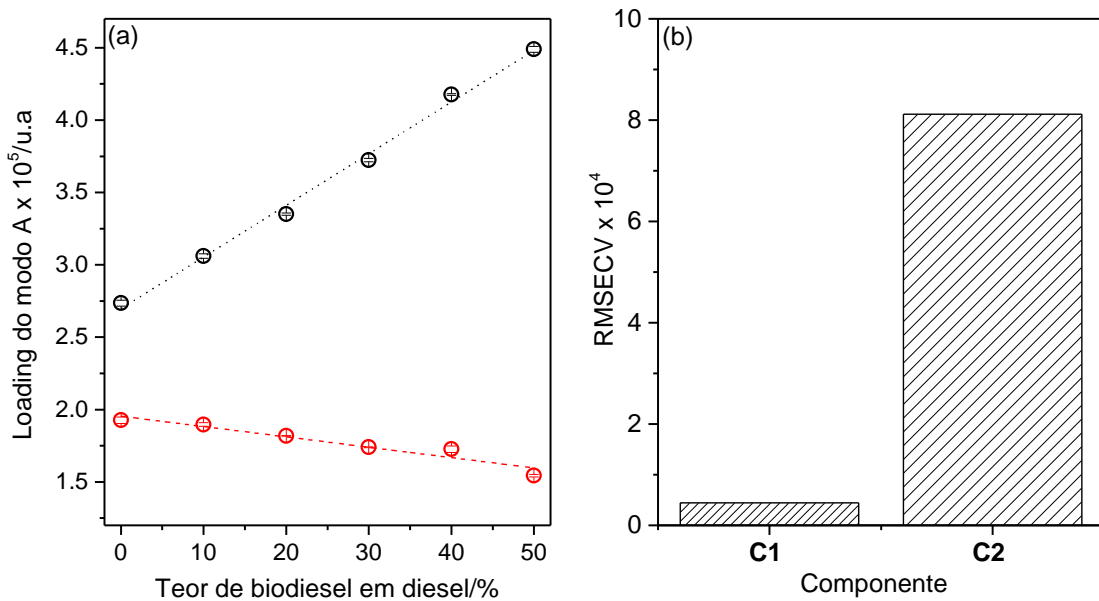


**Figura 9.** Validação do modelo através da SHA. (a), (b) e (c) correspondem aos espectros de emissão enquanto (d), (e) e (f) correspondem aos espectros de excitação. A legenda corresponde a comparação entre as divisões, por exemplo: os componentes C1 e C2 da metade AB estão sendo comparadas com os componentes C1 e C2 da metade CD, assim sucessivamente para todas as combinações restantes.

Baseado nos valores dos loadings do modo A, a representação pseudo-univariada dos componentes C1 e C2 foram plotados, conforme mostrada na Figura 10a [59,60,69]. Em seguida, ajustes lineares foram aplicados sobre a representação e os seguintes modelos de regressão foram obtidos:  $L_{C_1(ND)} = (269736 \pm 7987) + (3569 \pm 264)x$  com  $R^2 = 0,9945$ , e  $L_{C_2(ND)} = (195422 \pm 4516) - (716 \pm 68)x$  com  $R^2 = 0,9110$ , onde  $x$  corresponde ao teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . Em seguida, o teste de resíduo studentizado foi aplicado sobre as regressões e “outliers” não foram encontrados (resíduo < 3). Para avaliar a linearidade de  $L_{C_1(ND)}$  e  $L_{C_2(ND)}$ , o teste F foi aplicado, cujos valores de  $F_{cal}$  dos componentes C1 e C2 foram: 910 e 915, respectivamente. Assim, comparando  $F_{tab} = 4,96$  e  $F_{cal}$  dos componentes, é possível afirmar que existe uma relação linear entre as variáveis da representação pseudo-univariada com 5% de nível de significância.

De acordo com Martí *et al.* (2015), o melhor modelo de calibração PARAFAC pode ser encontrado através da figura de mérito  $RMSEC$  [59]. Para isso,  $RMSEC$  é plotado em função do número de componente do modelo PARAFAC. O melhor modelo é aquele que possui o menor valor de  $RMSEC$ . Nesse contexto, o melhor modelo de calibração PARAFAC para a representação pseudo-univariada, foi dado pelo componente C1, conforme mostrado a Figura 10b.

Escolhida a representação pseudo-univariada, os  $LOD$  e  $LOQ$  de  $L_{C_1(ND)}$  foram calculados. Baseados nos valores de  $LOD$  e  $LOQ$ , é possível afirmar que a curva analítica dada por  $L_{C_1(ND)}$  apresentou sensibilidade na detecção de biodiesel nas  $BDB_{ND}$  a partir de 2,5 % m/m e possibilidade de quantificar biodiesel nas  $BDB_{ND}$  a partir de 11% m/m. Portanto, é possível concluir que a curva analítica  $L_{C_1(ND)}$ , cujos parâmetros para construção foram obtidos a partir da análise MEE<sub>ND</sub>-PARAFAC, pode ser aplicada para quantificar teor de biodiesel nas blendas pertencentes ao conjunto de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>.



**Figura 10.** Pseudo-univariada representação do componente  $C_1$  (círculos pretos) e  $C_2$  (círculos vermelhos). (b)  $RMSECV$  versus o número de componentes do modelo PARAFAC.

Obtido o modelo analítico ( $L_{C_1(ND)}$ ), o próximo passo foi avaliar o seu potencial de predição de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . Para isso, a variável independente  $x$ , que corresponde ao teor de biodiesel predito nas blendas de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>, foi isolada em  $L_{C_1(ND)}$  da seguinte maneira:

$$BDB_{pred(ND)} = \frac{L_{validação} - 269736}{3569} \quad \text{Equação 16}$$

onde  $L_{validação}$  e  $BDB_{pred(ND)}$  correspondem ao “loadings” relacionado ao modo A (concentração), obtido através EEM-PARAFAC, e aos valores de biodiesel predito nas blendas de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>, respectivamente. Para obter os valores  $L_{validação}$ , primeiramente a decomposição PARAFAC foi aplicada apenas nas MEE<sub>ND</sub> do conjunto de calibração (B0<sub>(ND)</sub> até B50<sub>(ND)</sub>), cujos valores dos “loadings” pertencentes aos modos

$B$  e  $C$  foram calculados e validados pela SHA. Em seguida,  $MEE_{ND}$  das amostras de cada conjunto de validação ( $B13_{(ND)}$  e  $B15_{(ND)}$ ) foram adicionadas ao conjunto de calibração e uma nova decomposição PARAFAC foi feita para calcular  $L_{validação}$ , agora com  $B$  e  $C$  fixos [81,82]. Adicionalmente, os valores de  $L_{validação}$  foram obtidos separadamente para cada conjunto, ou seja, primeiramente foi realizada uma decomposição para  $B13_{(ND)}$  e posteriormente uma decomposição para  $B15_{(ND)}$ , visto que uma nova decomposição deve ser feita cada vez que novas amostras de validação são disponíveis [82]. Os valores de  $L_{validação}$  e  $BDB_{pred(ND)}$ , obtidos para  $B13_{(ND)}$  e  $B15_{(ND)}$ , estão contidos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Valores dos parâmetros utilizados na validação da curva analítica  $L_{C_1(ND)}$ : “loadings” do modo A do conjunto de validação ( $L_{validação}$ ), conjunto de validação  $B13_{(ND)}$  e  $B15_{(ND)}$  e teor biodiesel predito ( $BDB_{pred(ND)}$ ).

Amostras	$L_{validação}$	Conjunto de validação	$BDB_{pred(ND)}$
1	318709	B13 <sub>(ND)</sub>	13,72
2	318334		13,62
4	322992	B15 <sub>(ND)</sub>	14,92
5	321226		14,43

Para avaliar a robustez da curva analítica  $L_{C_1(ND)}$  na predição dos teores de biodiesel nas amostras de validação, as figuras de mérito  $RMSEP$  e  $RSDP$  foram consideradas e os seus respectivos valores estão contidos na Tabela 2. De acordo com os baixos valores de  $RMSEP$  é possível afirmar que o modelo pseudo-univariado ( $MEE_{ND}$ -PARAFAC) apresentou ótima acurácia na predição do teor de biodiesel nas blendas de validação. Além do  $RMSEP$ , Martí *et al* (2015) afirma que a acurácia do modelo pode ser avaliada através do quociente da média dos valores preditos com os valores de concentração de referência, cujos valores próximos de um indica que o método é bem acurado [59]. Para as blendas  $B13_{(ND)}$  e  $B15_{(ND)}$  essa razão foi aproximadamente 1 e 0,97, respectivamente. Adicionalmente, os valores de  $RSDP$  obtidos para as blendas  $B13_{(ND)}$  e  $B15_{(ND)}$  foram de 5,10% e 2,65%, respectivamente. Valores dentro de 10 % são aceitáveis e indica que o método é preciso [83]. Portanto, de acordo com esses resultados, é possível concluir que o modelo pseudo-univariado, obtido através da  $MEE_{ND}$ -PARAFAC, apresentou robustez na avaliação do teor de biodiesel nas amostras do conjunto de validação externa.



**Tabela 2** – Valor médio do teor de biodiesel predito nas blendas B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub> ( $\overline{DBB}_{(ND)pred.}$ ) e figuras de mérito referente a validação do modelo  $L_{C_1(ND)}$ .

<i>Curva analítica</i>	<i>Figura de mérito</i>	<i>Conjunto de validação</i>	
		<i>B13</i>	<i>B15</i>
$L_{C_1(ND)} = (269736 \pm 7987) + (3569 \pm 264)x$	$\overline{DBB}_{(ND)pred.}$ (%)	13,67	14,67
	<i>RMSEP</i> (%)	0,67	0,41
	<i>RSDP</i> (%)	4,91	2,77

#### 4.4 Conclusão do capítulo

Para atender a legislação vigente, os resultados da fluorescência multidimensional não polarizada, no modo MEE<sub>NP</sub> das  $BDB_{ND}$ , associada com análise univariada de dados não foi suficiente para construir um método analítico para quantificar biodiesel em  $BDB_{ND}$  não diluídas. O alto valor de *LDQ* (23.7 % m/m) inviabilizou a quantificação de biodiesel nas amostras do conjunto de validação. Portanto, não foi possível construir um método analítico baseado na simples análise da máxima intensidade de excitação (emissão) 400 nm(435nm) das EEM de blendas de diesel-biodiesel não diluídas.

Devido ao grande número de variáveis de excitação e emissão, as MEE<sub>ND</sub> das  $BDB_{ND}$  foram associadas com PARAFAC (EEM<sub>ND</sub>-PARAFAC) e a calibração pseudo-univariada foi aplicada para construção do modelo analítico para predição do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . De acordo com os resultados de *RMSEP* e *RSDP*, o modelo pseudo-univariado mostrou robustez na predição do teor de biodiesel nas blendas de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub> e, portanto, a associação das EEM<sub>ND</sub> com PARAFAC pode ser utilizada como método analítico para quantificar biodiesel em amostras sem qualquer pré-preparo.

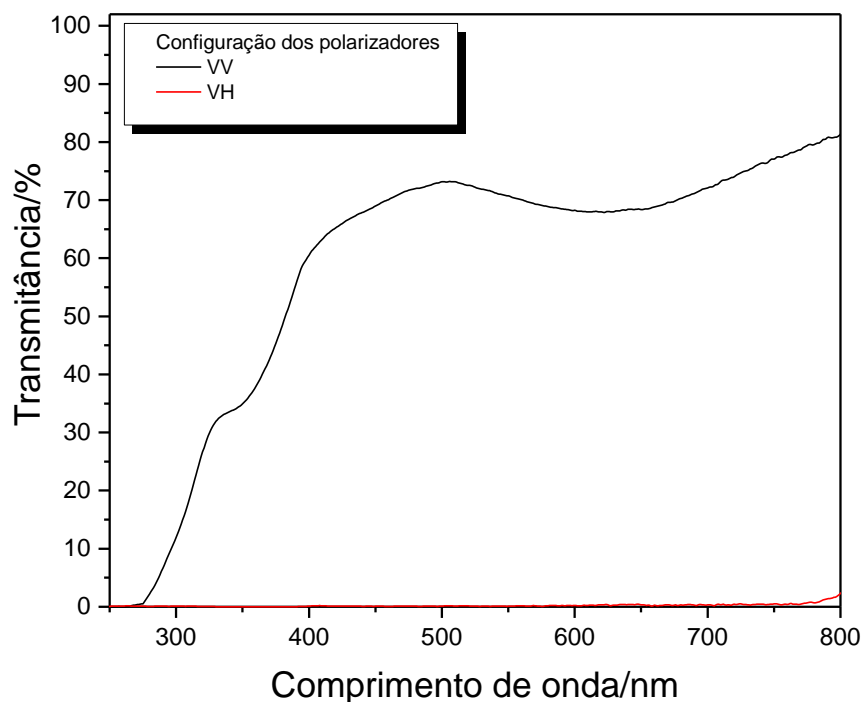
## Capítulo 5 – Avaliação e validação das análises de fluorescência multidimensional polarizada

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes ao funcionamento (janela de transmitância) e o alinhamento dos polarizadores, obtidos através da espectroscopia de absorção na região do UV-vis e da anisotropia de fluorescência da RB(NaOH). A avaliação da janela de transmissão e o alinhamento foram de suma importância na obtenção dos resultados apresentados nos Capítulos 6 e 7, por isso merecem um capítulo para sua discussão.

### 5 Resultados e discussão

#### 5.1 Avaliação dos polarizadores – transmissão

Para avaliar a janela de transmissão dos polarizadores de excitação-emissão, os espectros de transmitância de ambos foram obtidos no intervalo de 200 nm a 800 nm, conforme apresentado na Figura 11. De acordo com os espectros de transmitância, obtido na configuração VV, é possível afirmar que os polarizadores apresentaram uma janela de transmissão de 250 nm a 800 nm. Por outro lado, quando os polarizadores foram configurados na posição VH, a transmitância entre 250 nm e 750 nm assumiram valores em torno de zero. Esse resultado indica o correto funcionamento dos polarizadores de excitação-emissão no intervalo de 250 a 750 nm.

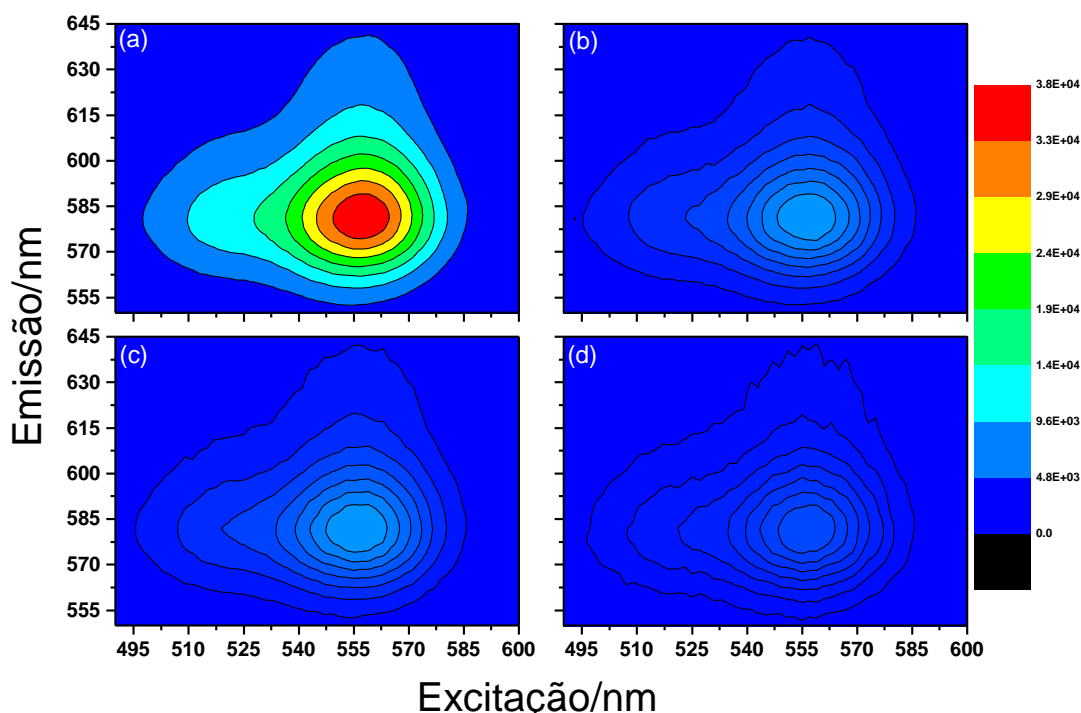


**Figura 11.** Espectro de transmitância dos polarizadores de excitação-emissão obtidos nas configurações VV (linha preta) e VH (linha vermelha). A linha de base foi feita no ar.

## 5.2 Avaliação dos polarizadores – alinhamento

A aplicação da fluorescência multidimensional polarizada na obtenção de informações acuradas das propriedades moleculares da amostra de interesse, como por exemplo a anisotropia de fluorescência, depende estritamente do correto alinhamento dos polarizadores de excitação e emissão [50]. Para avaliar o alinhamento dos polarizadores, a anisotropia de fluorescência ( $r$ ) de uma molécula padrão pode ser utilizada. Nesse contexto, para avaliar o correto alinhamento dos polarizadores utilizado neste trabalho, a anisotropia de fluorescência RB(GNaOH) foi considerada [49].

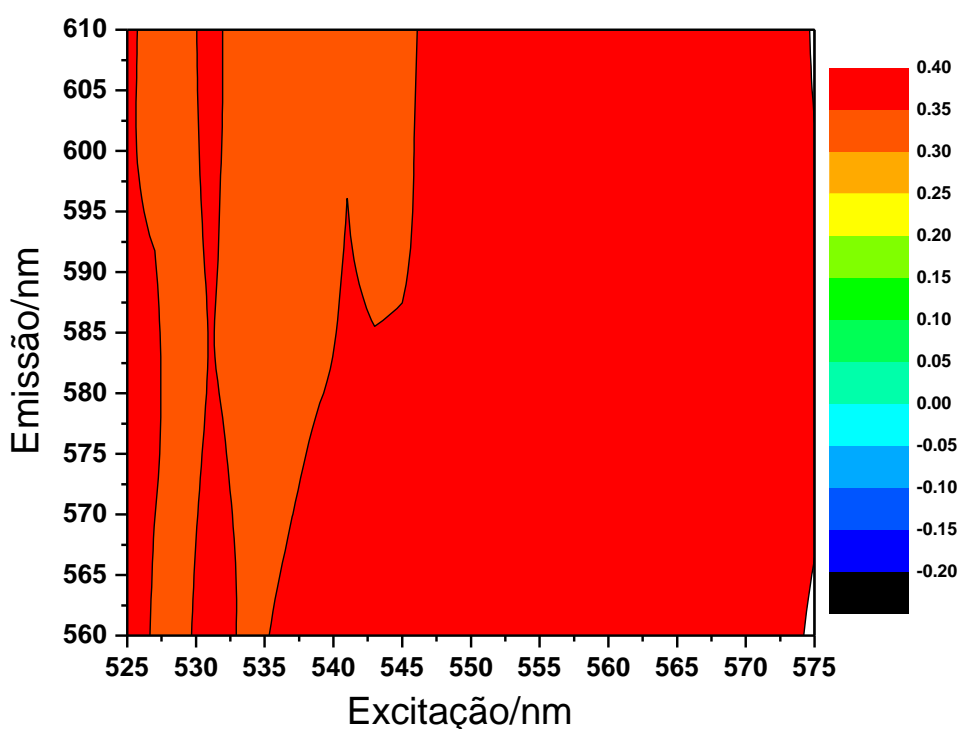
A Figura 12 apresenta as MEEp da RB(GNaOH), obtidas nas polarizações VV, VH, HV e HH, respectivamente. Para todas as polarizações, a RB apresentou emissões compreendidas entre 555 e 645 nm quando excitada entre 495 e 585 nm, com a máxima intensidade de excitação (emissão) centrada em torno 557 nm (580 nm).



**Figura 12.** MEEp de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de RB em GNaOH obtidas nas polarizações (a) VV, (b) VH, (c) HV e (d) HH. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.

A partir das MEEp e da Equação 14, o MDA da RB(NaOH) foi construído. A Figura 13 apresenta o MDA da RB(NaOH), obtido no intervalo de excitação e emissão entre 525-575 nm e 560-610 nm, respectivamente. Adicionalmente, o intervalo de excitação-emissão em que a anisotropia ( $r_{RB}$ ) foi calculada correspondem as regiões de máxima intensidade de excitação-emissão das MEEp (Figura 12). De acordo com MDA,

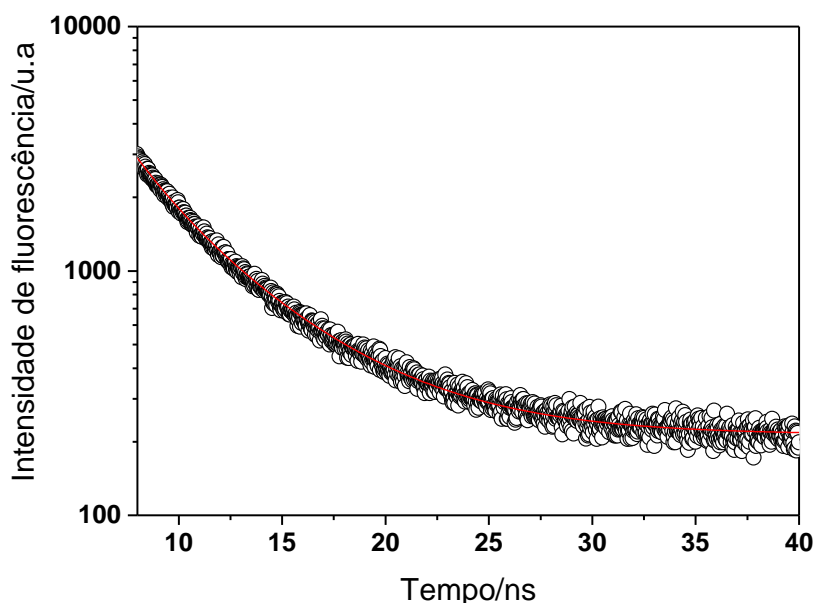
a RB(GNaOH) apresentou valores de anisotropia de fluorescência próximo de  $r_0$ , no intervalo de excitação compreendido entre 553 e 575 nm. Nesse intervalo, o valor da anisotropia para excitação (emissão) em 555 nm (579 nm) foi de  $r_{RB} = 0,37 \pm 0,02$ . Maruyama *et al.* (2019) obtiveram o valor de  $r = 0,35$  em temperatura ambiente [55]. Ameloot *et al.* (2013) reportaram em seu trabalho um valor de  $r = 0,39$  em um intervalo de excitação entre 540-580 nm e emissão centrada em 573 nm [49]. Após a obtenção desses resultados, posições na base giratória, correspondente as posições VV, VH, HH e HV, foram definidas como padrão para obtenção das MEEp das  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$ . Além disso, os resultados de  $r_{RB} = 0,37 \pm 0,02$  indica que o algoritmo de processamento das MEEp foi implementado corretamente.



**Figura 13.** Mapa de anisotropia da RB em solução aquosa de glicerol. A barra de cores corresponde aos valores de anisotropia de fluorescência calculado através da Equação 14.

A Figura 14 apresenta o decaimento da fluorescência da RB(NaOH). O decaimento foi obtido através do monitoramento da emissão acima de 320 nm com excitação em 280 nm. Os dados foram ajustados com a Equação 2 e um modelo bi exponencial forneceu tempo de vida de fluorescência  $\tau_1 = 6,03 \pm 0,07$  ns e  $\tau_2 = 2,43 \pm 0,07$  ns, com  $\chi^2 = 1,05 \pm 0,02$ . Com os valores de  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  e as constantes de decaimento ( $A_1$  e  $A_2$ ) o tempo de vida médio da RB  $\tau_{médioRB} = 4,63 \pm 0,11$  ns foi calculado através da Equação 3.

Sob posse dos valores de  $r_{RB}$  e  $\tau_{médiorB}$ , o tempo de correlação rotacional da RB (GNaOH)( $\tau_{rotRB}$ ) foi estimado através da Equação 15. O valor de  $\tau_{rotRB} = 57,12 \pm 1,42$  ns foi obtido e o valor corrobora com o valor de  $58 \pm 8$  ns reportado na literatura [84]. Portanto, a RB em GNaOH apresentou o tempo de correlação rotacional maior do que o tempo de vida médio ( $\tau_{rotRB} \gg \tau_{médiorB}$ ), comportamento que justifica o alto valor da anisotropia [50].



**Figura 14.** Decaimento da fluorescência de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de RB em solução aquosa de glicerina contendo  $0,5 \text{ mM}$  de NaOH.

### 5.3 Conclusão do capítulo

De acordo com a espectroscopia de absorção UV-vis foi possível inferir que os polarizadores de excitação e emissão possuem uma janela de transmissão de  $250 \text{ nm}$  a  $750 \text{ nm}$ . Além disso, quando colocados na configuração VH, a transmissão da radiação foi obtida próxima de zero. Esses resultados indicam que os polarizadores utilizados para obter as MEEp estão funcionando perfeitamente.

Através da fluorescência multidimensional polarizada foi possível construir o MDA da RB em solução aquosa de glicerol contendo  $0,5 \text{ mM}$  de NaOH. De acordo com o mapa, um valor de anisotropia  $r_{RB} = 0,37 \pm 0,02$  foi estimado na excitação (emissão) em  $555 \text{ nm}$  ( $579 \text{ nm}$ ), valor que corrobora com os reportados em Maruyama *et al.* (2019) [55] e Ameloot *et al.* (2013) [49]. Portanto, esse resultado mostrou que os polarizadores foram calibrados corretamente e que esse protocolo pode ser aplicado para a obtenção de outras MEEp. Além disso, o correto valor de anisotropia, mostra que o algoritmo de processamento de dados das MEEp foi implementado corretamente.

Além da fluorescência multidimensional polarizada, a fluorescência resolvida no tempo foi utilizada na caracterização da RB(GNaOH). Assim, um ajuste bi exponencial foi aplicado sobre o decaimento de fluorescência e um  $\tau_{médio_{RB}} = 4,63 \pm 0,11$  ns foi estimado. Adicionalmente, o tempo de correlação rotacional da RB(NaOH) foi calculado, cujo valor foi de  $\tau_{rot_{RB}} = 57,12 \pm 1,42$  ns. Esse valor corrobora com o  $58 \pm 8$  ns reportado na literatura [84] e justifica o alto valor de anisotropia da RB em GNaOH.

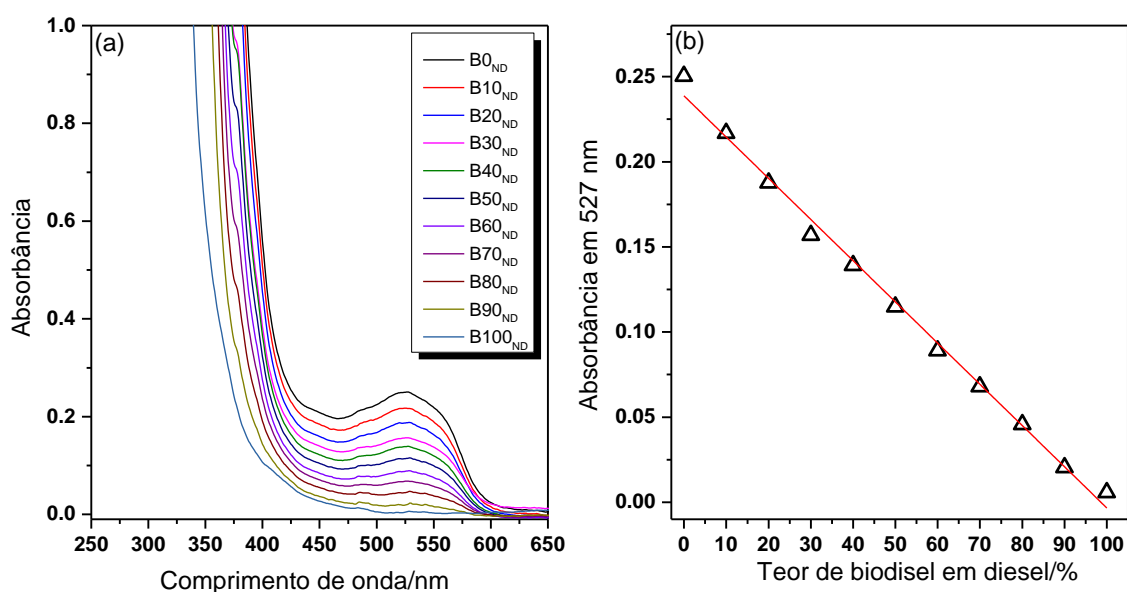
## Capítulo 6 – Aplicação da fluorescência multidimensional polarizada nas blendas de diesel-biodiesel não diluídas

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização das  $BDB_{ND}$  através das matrizes de excitação-emissão polarizada ( $MEEp_{(ND)}$ ). Além disso, os resultados da associação dessas matrizes com PARAFAC na identificação das melhores variáveis de excitação-emissão para a construção de curvas analíticas, que foram validadas com medias de fluorescência 2D das amostras de validação externa, também serão apresentados.

### 6 Resultados e discussão

#### 6.1 Absorção UV-vis das blendas não diluídas

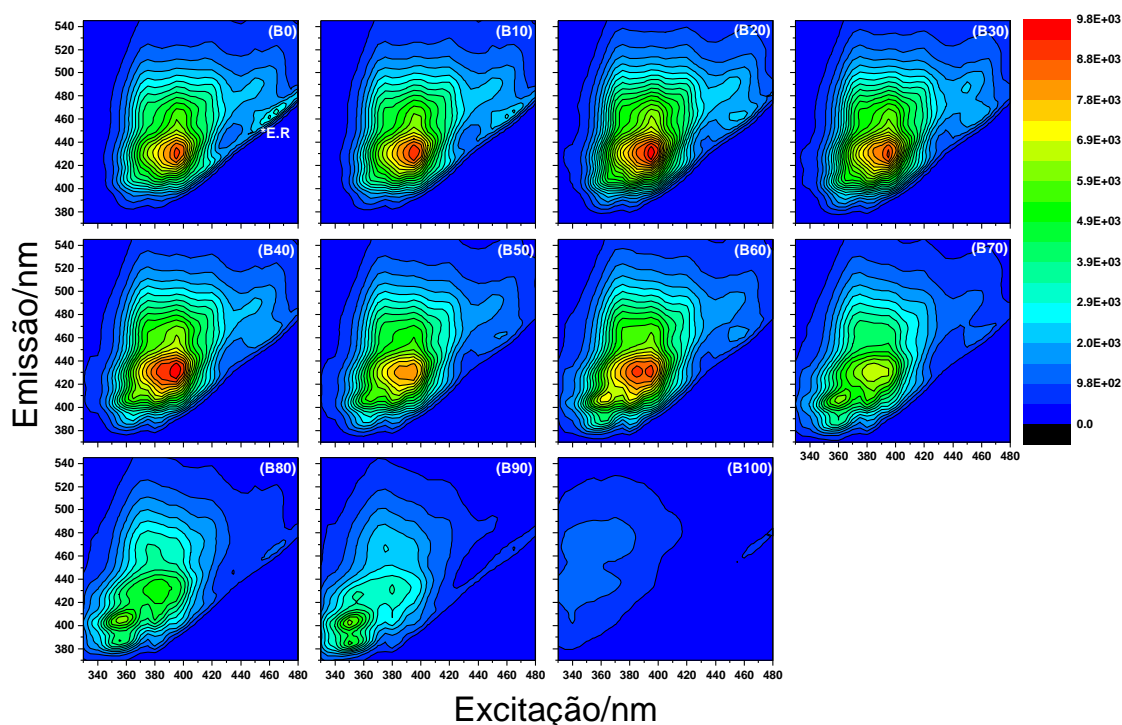
A Figura 15a apresenta os espectros de absorção das  $BDB_{ND}$  na região entre 250 e 650 nm. Conforme observado, as  $BDB_{ND}$  apresentaram um ombro de absorção localizado entre 325 e 450 nm que pode ser atribuído aos HPAs presentes na composição no diesel [85–87] e dos fluoróforos endógenos do biodiesel [28,30,32]. Adicionalmente, a banda de absorção observada entre 450 e 600 nm, centrada em 527 nm, pode ser atribuídas aos corantes que são adicionados ao diesel [85,88–91]. A Figura 15b mostra o comportamento da absorbância das  $BDB_{ND}$  em 527 nm em função do teor de biodiesel no intervalo de  $B0_{ND}$  a  $B100_{ND}$ . Como observado, os valores da absorbância em função da adição de biodiesel nas  $BDB_{ND}$  reduziram linearmente de acordo com a função  $A_{527\text{ nm}} = (239 \pm 3)10^{-3} - (242 \pm 6)10^{-5}x$  com  $R^2=0,9940$ .



**Figure 15.** (a) espectro de absorção na região UV-vis das  $BDB_{ND}$  e (b) comportamento da banda centrada em 527 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ .

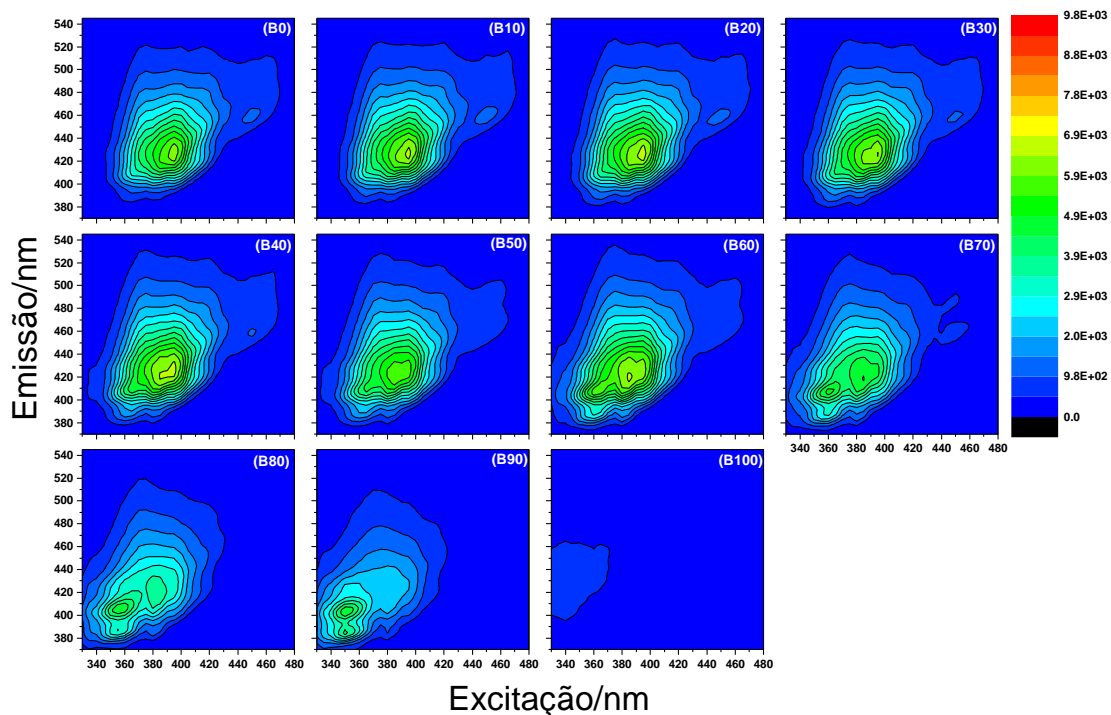
## 6.2 Matriz de excitação e emissão polarizada das blendas de diesel-biodiesel não diluídas

As Figuras 16, 17, 18 e 19 apresentam as  $MEEp_{(ND)}$  das  $BDB_{ND}$ , obtidas com os polarizadores de excitação-emissão configurados nas polarizações VV, VH, HV e HH, respectivamente. As emissões compreendidas entre 380 e 540 nm, obtidas para excitações situadas no intervalo de 330 a 460 nm, podem ser atribuídas aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aos fluoróforos endógenos do biodiesel [7,76–79]. Adicionalmente, uma banda de excitação e emissão compreendida entre 340-370 nm e 380-440 nm, foi observada nas  $MEEp_{(ND)}$  das  $BDB_{ND}$  localizadas entre B60<sub>ND</sub> e B90<sub>ND</sub>, nas polarizações VV, VH e HV. Esse perfil de excitação-emissão estão relacionados aos produtos de oxidação presentes no biodiesel e em óleos vegetais [29], tais como dienos, trienos e tetraenos conjugados [30,31].

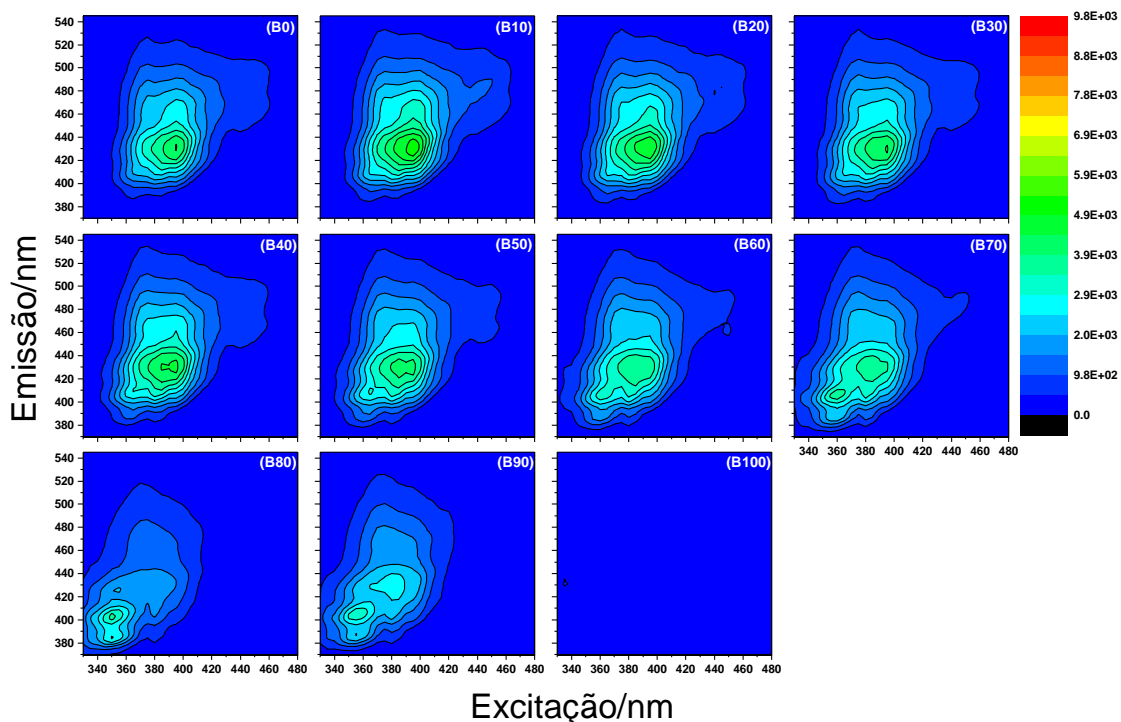


**Figura 16.**  $MEEp_{(ND)}$  das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização VV. ER representa o espalhamento Rayleigh de primeira ordem. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.

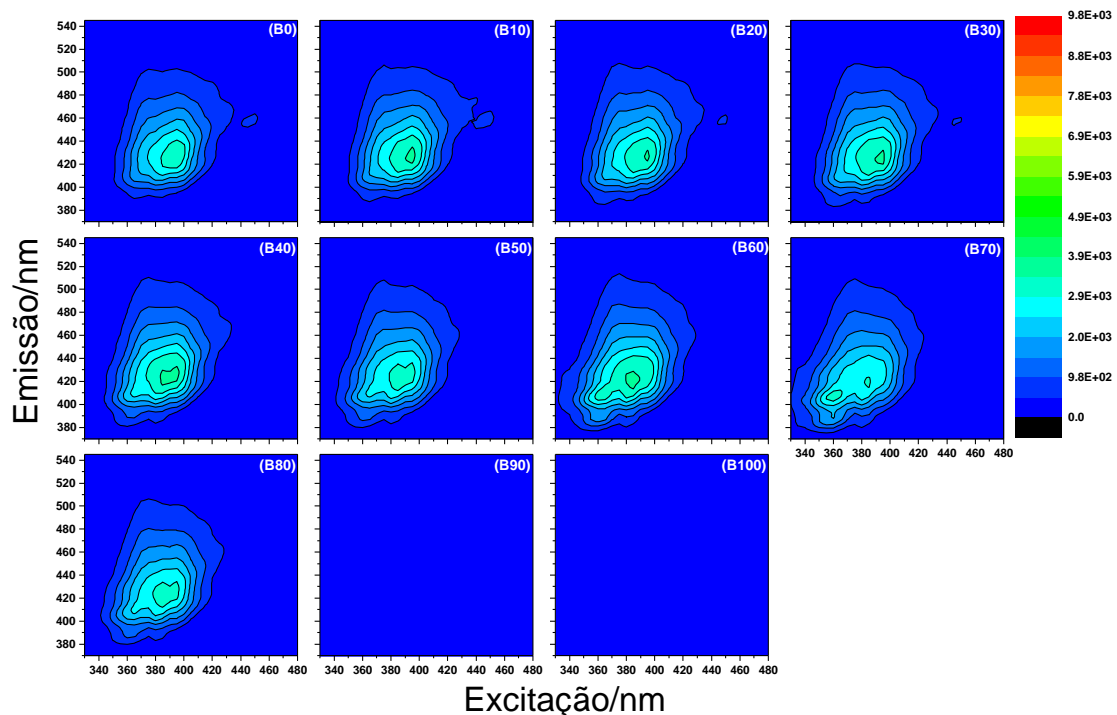




**Figura 17.**  $MEEp_{(ND)}$  das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização VH. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.



**Figura 18.**  $MEEp_{(ND)}$  das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização HV. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.



**Figura 19.** MEEp<sub>(ND)</sub> das blendas de diesel biodiesel obtidas para a polarização HH. A barra de cor corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.

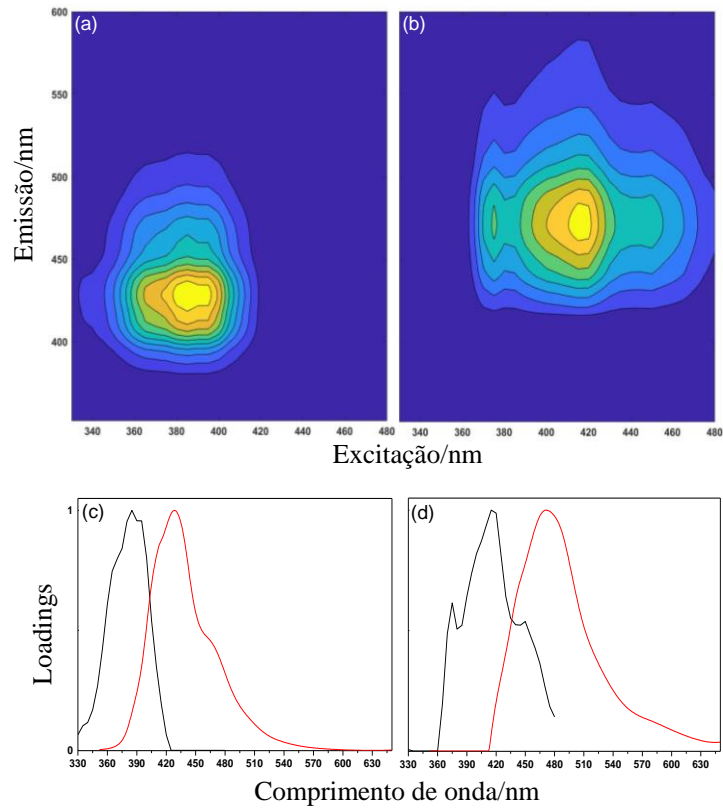
### 6.3 Análise PARAFAC das MEEp<sub>(ND)</sub>

Por causa dos mult fluoróforos presentes na composição das  $BDB_{ND}$ , as MEEp<sub>(ND)</sub> apresentaram bandas largas de excitação-emissão e um grande número de variáveis relacionadas a excitação, emissão e intensidade. Essas variáveis podem ser utilizadas na construção de modelos analíticos, que permitem avaliar o teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . Entretanto, a construção de modelos analíticos a partir de uma simples análise da intensidade de emissão, para um dado par de excitação-emissão, em função do teor de biodiesel não é uma tarefa fácil de ser realizada, uma vez que não é possível afirmar, a priori, que todas as intensidades de emissão contidas nas MEEp<sub>(ND)</sub> são lineares em função da adição de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ . Nesse contexto, o PARAFAC foi associado com as MEEp<sub>(ND)</sub> (MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC) para avaliar as possíveis variáveis de excitação-emissão, que apresentam o comportamento linear da intensidade de emissão em função do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ .

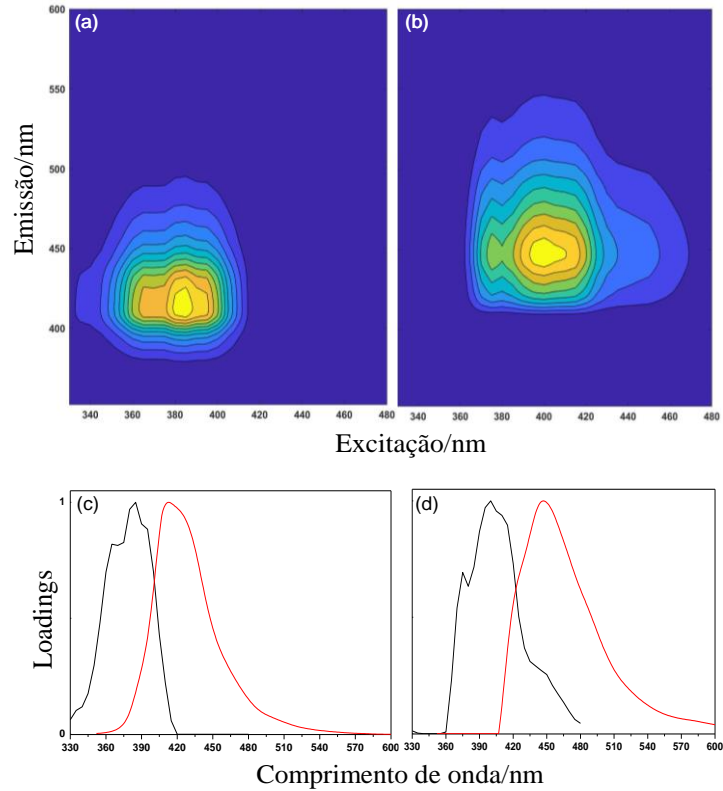
Em relação aos resultados da MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC, as Figuras 20(a-b), 21(a-b), 22(a-b) e 23(a-b) apresentam as MEEp<sub>(ND)</sub> enquanto as Figuras 20(c-d), 21(c-d), 22(c-d) e 23(c-d) mostram os espectros de excitação e emissão 2D, recuperados para as polarizações VV, VH, HV e HH, respectivamente. Adicionalmente, a Tabela 3 contém informações referente a decomposição das MEEp<sub>(ND)</sub>, tais como o número de

componentes, valor de CONCORDIA, os máximos comprimentos de onda de excitação-emissão ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) e as amostras utilizadas na validação do modelo MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC pelo método SHA. De acordo com as informações contidas na Tabela 3, um modelo de dois componentes (C1 e C2) foi encontrado para cada polarização, com valores de CONCORDIA acima de 50% [80]. Todos os modelos foram validados pela SHA, conforme as comparações espectrais apresentadas nas Figuras A1-A4 (Anexo). No entanto, é notável que o número de amostras utilizadas na construção e validação do modelo PARAFAC variou de acordo com a polarização (Tabela 1). Por exemplo, o modelo PARAFAC da polarização VV foi validado com matrizes de B0<sub>ND</sub> a B70<sub>ND</sub>. Quando adicionado ao conjunto de dados a matriz da amostra B80<sub>ND</sub>, para a mesma polarização, o modelo não foi validado. Esse mesmo comportamento também foi observado para as demais polarizações. Essa variação do número de amostras utilizadas na construção e validação do modelo PARAFAC pode ser atribuída a perda da trilinearidade da estrutura de dados das MEEp. Adicionalmente, o modelo PARAFAC para a  $MEE_{ND(total)}$  não foi validado pela SHA, portanto não foram utilizados.

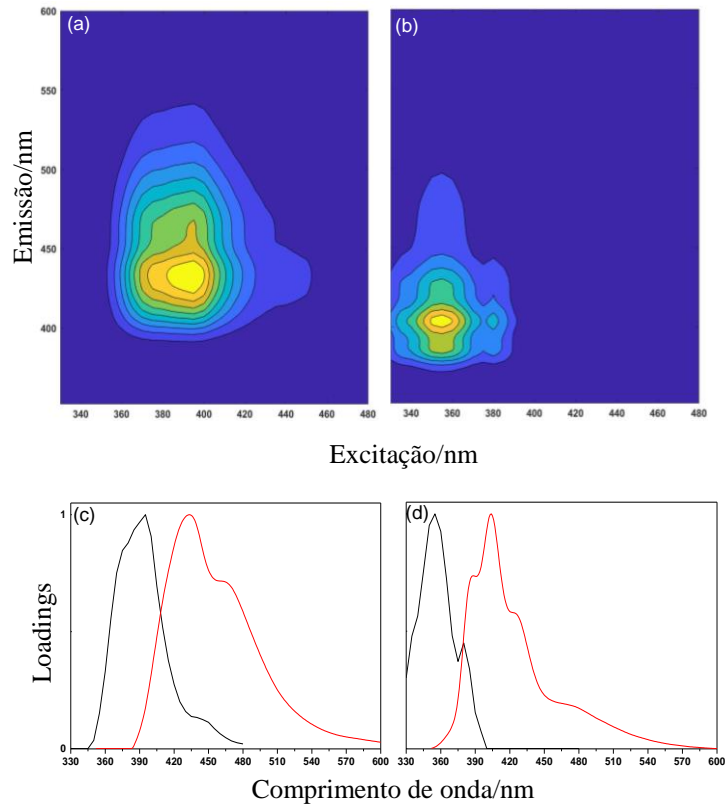
Para a polarização VV (Figura 20), a MEEp<sub>(ND)</sub> referente ao componente C1 (Figura 20a) foi recuperada em uma região de emissão compreendida entre 375 e 525 nm e associada a uma excitação entre 340 e 420 nm enquanto para o componente C2 (Figura 20b), a emissão foi recuperada entre 425 e 575 nm com excitação entre 370 e 480 nm. Em relação aos componentes C1 e C2, na polarização VH (Figuras 21a e 21b), as MEEp<sub>(ND)</sub> recuperadas foram obtidas nas mesmas regiões encontradas para a polarização VV. Por outro lado, para as polarizações HV (Figuras 22a e 22b) e HH (Figuras 23a e 23b), a MEEp<sub>(ND)</sub> do componente C1 foi recuperada na região de emissão localizada entre 375 e 550 nm com excitação entre 360 e 460 nm enquanto para o componente C2, a MEEp<sub>(ND)</sub> foi recuperada na região de emissão compreendida entre 362 e 500 nm associada a excitação entre 330 e 400 nm. Em relação aos espectros de excitação e emissão bidimensional, recuperados a partir da MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC, as máximas intensidades de excitação-emissão ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) estão contidos na Tabela 3. De acordo com esses resultados, esses componentes podem estar associados ao perfil de excitação-emissão dos HPAs do diesel [45,92] e dos fluoróforos do biodiesel [29–33]. Portanto, é possível afirmar que MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC permitiu recuperar as informações da excitação e emissão dos fluoróforos em cada polarização.



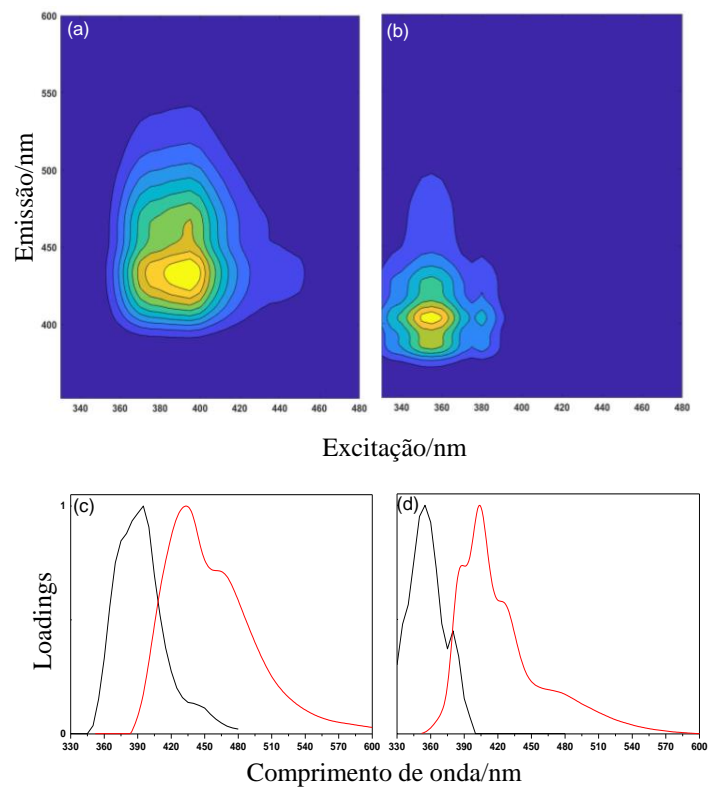
**Figura 20.**  $MEEP_{(ND)}$  recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização VV.



**Figura 21.**  $MEEP_{(ND)}$  recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização VH.



**Figura 22.**  $MEEP_{(ND)}$  recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização HV.



**Figura 23.**  $MEEP_{(ND)}$  recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização HH.

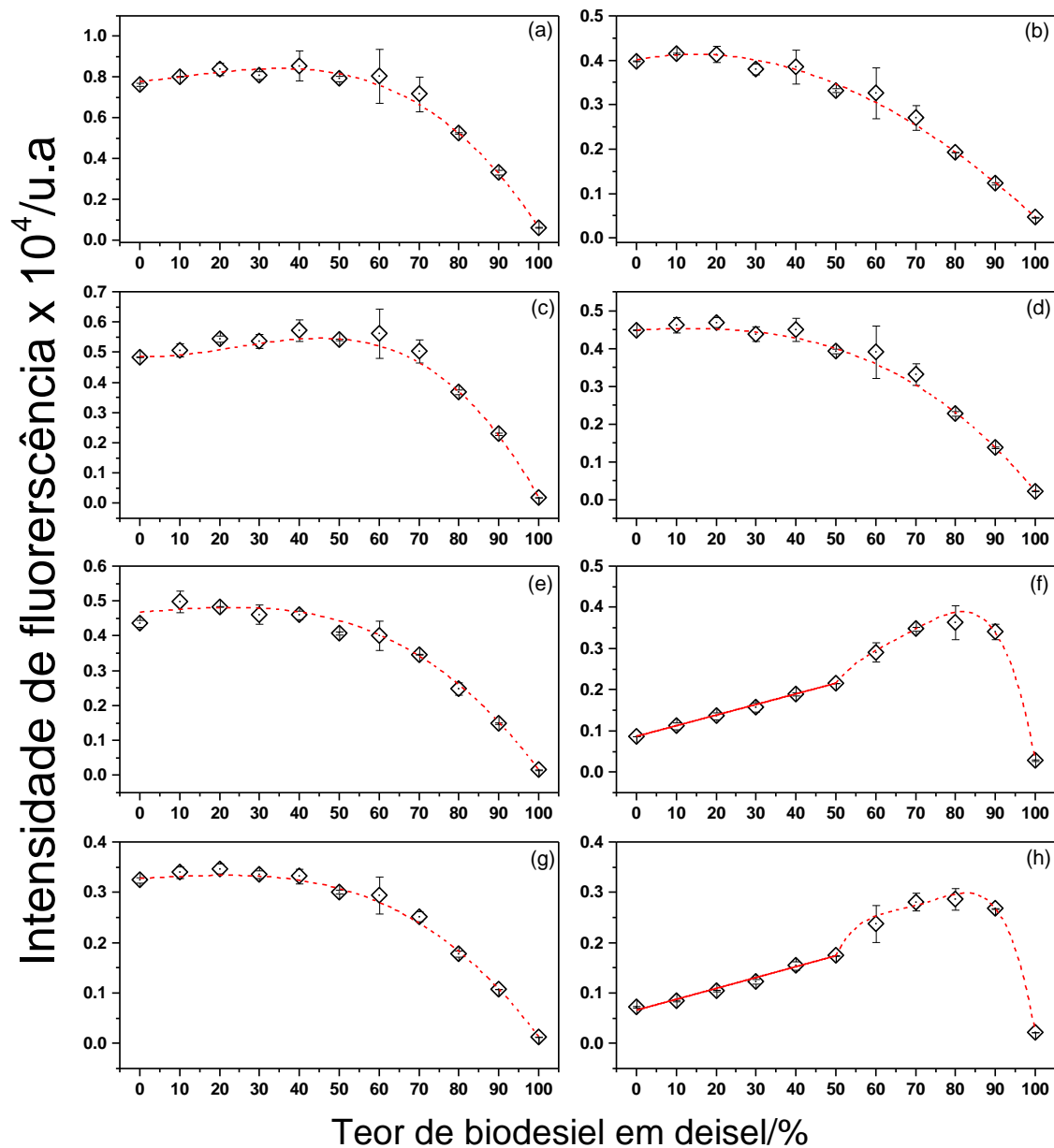
**Tabela 3** – Resultados obtidos através da análise MEE<sub>p(ND)</sub>-PARAFAC para as polarizações VV, VH, HV e HH.

Polarização	Nº de componente	CONCORDIA (%)	C1 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	C2 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Intervalo de validação
VV	2	78,88	385/428	415/471	B0 – B70
VH		74,36	385/413	400/447	B0 – B60
HV		98,89	395/433	355/404	B0 – B90
HH		98,89	395/433	355/404	B0 – B90

#### 6.4 Construção de modelos analíticos

De acordo com as informações contidas na Tabela 3, as máximas intensidades de emissão dos componentes C1 e C2 foram plotadas em função do teor de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ , conforme apresentado na Figura 24. Adicionalmente, as máximas intensidades de emissão foram obtidas através das MEE<sub>p(ND)</sub> das  $BDB_{ND}$ . Portanto, as intensidades dos componentes C1 e C2 são medidas experimentais das  $BDB_{ND}$  e não os “loadings” relacionados a concentração, que são obtidos através do PARAFAC. No capítulo 4, os “loadings” obtidos através da MEE<sub>ND</sub>-PARAFAC foram utilizados na construção de um modelo analítico. No entanto, do ponto de vista de uma aplicação tecnológica, através da construção de um dispositivo portátil que possa ser aplicado *in loco*, o método apresenta desvantagens devido ao alto tempo de aquisição das matrizes de excitação-emissão das amostras de validação. Nesta seção, as máximas intensidades experimentais polarizadas dos componentes C1 e C2 foram utilizadas na construção de curvas analíticas, as quais foram aplicadas para quantificar biodiesel em  $BDD_{ND}$  através de uma simples medida de fluorescência 2D das amostras de validação.

Conforme pode ser visto na Figura 24, as intensidades experimentais do componente C1 (coluna 1) não apresentou comportamento linear nas polarizações analisadas. Por outro lado, as intensidades experimentais do componente C2 (coluna 2) apresentou comportamento linear apenas nas polarizações HV e HH, no intervalo de 0 a 50 % m/m de biodiesel nas  $BDB_D$ . Para esse componente, ajustes lineares foram aplicados e os modelos  $I_{C2(HV_{ND})} = (867 \pm 5) + (260 \pm 1)10^{-1}x$  com  $R^2 = 0,9999$  (Figura 25f) e  $I_{C2(HH_{ND})} = (659 \pm 85) + (22 \pm 2)x$  com  $R^2 = 0,9952$  (Figura 25h), foram obtidos.



**Figura 24.** Comportamento da intensidade de emissão do componente C1: (a) VV, (c) VH, (e) HV e (g) HH. Comportamento da intensidade de emissão do componente C2: (b) VV, (d) VH, (f) HV e (h) HH.

Devido ao comportamento linear entre 0% e 50% m/m de biodiesel nas  $BDB_{ND}$ , a análise de resíduos studentizados (Equação 5) e o teste F (Equação 6) foram aplicados sobre os modelos  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$ . Em relação ao teste de “outliers”, nenhuma amostra anômala foi identificada nos modelos, uma vez que os valores de resíduos studentizados foram  $<3$  [60,62]. No que diz respeito ao teste de linearidade,  $F_{Cal_{C2(HV_{ND})}} = 261112$  e  $F_{Cal_{C2(HH_{ND})}} = 1032$  foram maiores do que  $F_{tab} = 7,71$ ,

confirmando que o teor de biodiesel adicionado nas  $BDB_{ND}$  impacta linearmente nas intensidades de emissão dos respectivos modelos.

Avaliada a linearidade dos modelos, os  $LOD$  e  $LOQ$  foram calculados. De acordo com os valores de  $LOD$  é possível afirmar que curvas analíticas  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$  apresentaram sensibilidade na detecção de biodiesel nas  $BDB_{ND}$  a partir de 1,05 % m/m e 0,12 % m/m, respectivamente. Em relação aos valores de  $LOQ$ , as curvas apresentaram possibilidade de quantificar biodiesel nas  $BDB_{ND}$  a partir de 3,31% m/m e 0,38 % m/m, respectivamente. Adicionalmente, esses valores de  $LOD$  e  $LOQ$  foram melhores do que aqueles obtidos no modelo pseudo-univariado apresentado no capítulo 4, mostrando a vantagem de utilizar MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC como seletor de variáveis lineares para a construção de modelos analíticos.

Baseado nos resultados das análises de “outliers”, teste F,  $LOD$  e  $LOQ$  as curvas analíticas  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$  foram aplicadas para quantificar teor de biodiesel nas blendas pertencente ao conjunto de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>. Para isso, a variável independente  $x$ , que corresponde ao teor de biodiesel predito nas blendas de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>, foi isolada em  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$  da seguinte maneira:

$$BDB_{ND_{pred(HV)}} = \frac{I_{C2(HV_{ND})_{val.}}^{-867}}{26} \quad \text{Equação 17}$$

e

$$BDB_{ND_{pred(HH)}} = \frac{I_{C2(HH_{ND})_{val.}}^{-659}}{22} \quad \text{Equação 18}$$

onde  $I_{C2(HV_{ND})_{val.}}$  e  $I_{C2(HH_{ND})_{val.}}$  correspondem aos valores de intensidade de validação e  $BDB_{ND_{pred(HV)}}$  e  $BDB_{ND_{pred(HH)}}$  correspondem aos valores de biodiesel predito no conjunto de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>. A Tabela 4 apresenta os valores de biodiesel predito no conjunto de validação, obtidos a partir da intensidade de fluorescência 2D, nos pares  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  do componente C2 (Tabela 3), nas polarizações HV e HH.



**Tabela 4** – Valores do teor de biodiesel predito nos conjuntos de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub>, obtidos a partir da fluorescência 2D, nos  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 355 \text{ nm}/404 \text{ nm}$ .

Amostras de validação	$BDB_{ND_{pred}(HV)}$	$BDB_{ND_{pred}(HH)}$
B13	13,73	13,27
	13,69	13,54
	13,50	13,86
B15	14,46	15,73
	15,10	14,83
	15,07	15,85

Em relação a validação externa das curvas analítica, a Tabela 5 contém os valores do teor médio de biodiesel predito ( $\overline{BDB}_{ND_{pred}}$ ) nas amostras B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub> e os valores das figuras de mérito  $RMSEP$  e  $RSDP$ . Baixos valores de  $RMSEP$  e valores da razão entre o teor de biodiesel predito e de referência  $\overline{BDB}_{D_{pred}}/BDB_{D_{ref}} \approx 1$ , indicam que o modelo é acurado para predizer o teor de biodiesel nas blendas [59]. Em relação ao  $RSDP$ , valores de até 10% são aceitáveis, e indicam que o método é preciso [83]. Baseados nos valores de  $RMSEP$ ,  $\overline{BDB}_{ND_{pred}}/BDB_{ND_{ref}}$  e  $RSDP$ , é possível concluir que as curvas analíticas  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$  apresentaram ótima acurácia e precisão na predição do teor de biodiesel nas amostras do conjunto de validação e, portanto, podem ser utilizadas para atender a legislação vigente do CNPE [93].

**Tabela 5** – Média dos valores de biodiesel preditos nas amostras de validação B13<sub>(ND)</sub> e B15<sub>(ND)</sub> ( $\overline{BDB}_{pred}$ ) e figuras de mérito referente a validação dos modelos.

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Curvas Analítica	$BDB_{Ref}$ (%)	$\overline{BDB}_{pred}$ (%)	$RMSEP$ (%)	$RSDP$ (%)	$\overline{BDB}_{ND_{pred}}/BDB_{ND_{ref}}$
355/404	$I_{C2(HV_{ND})}$	13	13,64	0,65	4,98	~1,00
		15	14,88	0,32	2,14	0,99
	$I_{C2(HH_{ND})}$	13	13,56	0,61	4,66	~1,00
		15	15,47	0,65	4,35	~1,00

## 6.5 Conclusão do capítulo

As MEEp<sub>(ND)</sub> foram obtidas para as  $BDB_{ND}$  e os principais fluoróforos, tais como HPAs do diesel e produtos de oxidação, tocoferóis e carotenoides do biodiesel foram identificados. Porém, devido ao grande número de fluoróforos pertencentes a esse sistema, não foi possível determinar, diretamente nas MEEp<sub>(ND)</sub>, qual a melhor região de excitação-emissão para a construção de curvas analíticas.

Nesse contexto, a análise MEEp<sub>(ND)</sub>-PARAFAC foi utilizada para encontrar as melhores variáveis de excitação-emissão para construção de curvas analíticas para quantificar o teor de biodiesel nas *BDB<sub>ND</sub>*. Como resultado, uma forte correlação linear entre a intensidade de emissão e teor de biodiesel nas *BDB<sub>ND</sub>*, entre B0<sub>ND</sub> e B50<sub>ND</sub>, foram encontradas a partir dos dados experimentais do componente C2, nas polarizações HV e HH. Para esse componente, a máxima excitação (emissão) foi encontrada centrada em 355 (404) nm para ambas as polarizações. Para a polarização HV, a curva analítica  $I_{C2(HV_{ND})} = (867 \pm 5) + (260 \pm 1)10^{-1}x$  apresentou valores de *LOD* e *LOQ* iguais a 1,05 % m/m e 3,31% m/m, respectivamente. Já para a polarização HH, a curva analítica  $I_{C2(HH_{ND})} = (659 \pm 31) + (22 \pm 2)x$  apresentou valores de *LOD* e *LOQ* iguais a 0,12 % m/m e 0,38 % m/m, respectivamente.

De acordo com as figuras de mérito *RMSEP* e *RSDP*, as curvas analíticas  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$  apresentaram ótima acurácia e precisão na predição de biodiesel nas amostras de validação externa B13<sub>ND</sub> e B15<sub>ND</sub>. Para a curva analítica  $I_{C2(HV_{ND})}$ , foram obtidos valores de *RMSEP* = 0,65 % m/m e *RSDP* = 4,98% para a blenda B13<sub>ND</sub> e *RMSEP* = 0,32 % m/m e *RSDP* = 2,14 % para B15<sub>ND</sub>. Em relação a curva analítica  $I_{C2(HH_{ND})}$ , valores de *RMSEP* = 0,61 m/m e *RSDP* = 4,66 % foram obtidos para a B13<sub>ND</sub> e valores de *RMSEP* = 0,65 % m/m e *RSDP* = 4,35 % para a blenda B15<sub>ND</sub>. Portanto, baseados nesses valores, é possível afirmar que as curvas analíticas  $I_{C2(HV_{ND})}$  e  $I_{C2(HH_{ND})}$  podem ser utilizadas para atender a legislação vigente do CNPE. Além disso, é importante ressaltar que todos os modelos foram validados com medidas de fluorescência 2D das amostras de validação externa.

De forma em geral, a fluorescência multidimensional polarizada das *BDB<sub>ND</sub>*, na forma de MEEp<sub>ND</sub> associada com PARAFAC pode ser aplicado para avaliar as contribuições dos fluoróforos presentes nas *BDB<sub>ND</sub>* em relação as suas respectivas polarizações. Além disso, essa análise mostrou que o PARAFAC pode ser aplicado na seleção das melhores variáveis de excitação-emissão para construção de modelos analíticos.

## Capítulo 7- Aplicação da fluorescência multidimensional polarizada nas blendas de diesel-biodiesel diluídas

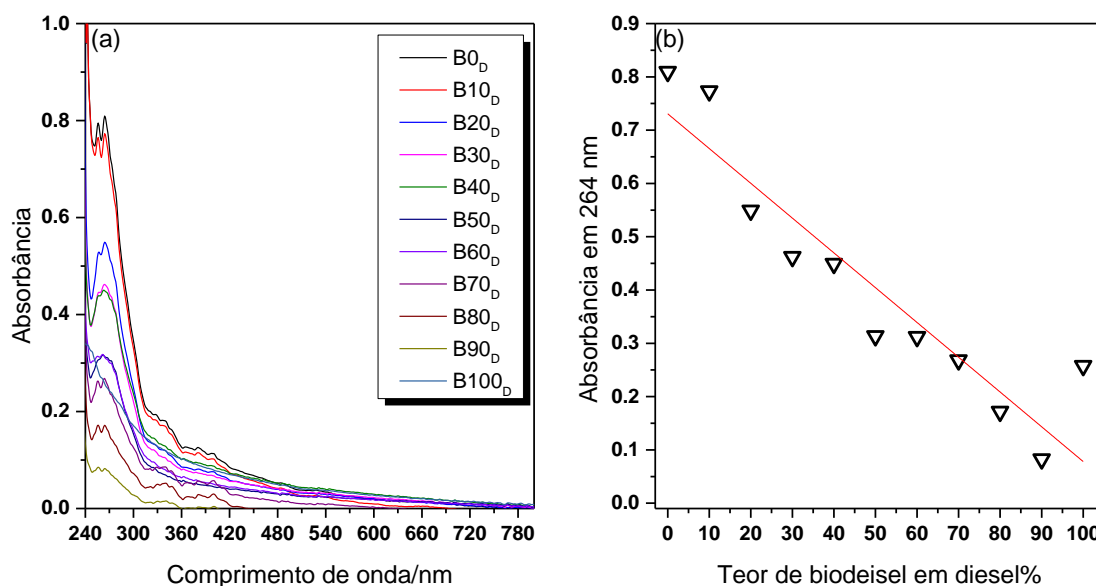
No capítulo anterior, a fluorescência multidimensional polarizada (MEEp) juntamente com análise estatística multivariada (PARAFAC), foram aplicados no estudo das propriedades ópticas e moleculares  $BDB_{ND}$ . Além disso, modelos analíticos foram desenvolvidos com objetivo de avaliar o teor de biodiesel em  $BDB_{ND}$ . No entanto, devido a não diluição das amostras, propriedades como anisotropia de fluorescência ( $r$ ) e tempo de correlação rotacional  $\tau_{rot}$  das  $BDB_{ND}$  não foram determinadas. Neste capítulo, serão apresentados resultados obtidos da aplicação da espectroscopia de emissão resolvida por anisotropia (ARMES) nas  $BDB_D$ . ARMES juntamente com a fluorescência resolvida no tempo, permite obter informações sobre o tempo de correlação rotacional das moléculas que compõem o sistema molecular em estudo.[48,50].

### 7 Resultados e discussão

#### 7.1 Absorção na região UV-vis das blendas diluídas

A Figura 25a apresenta os espectros de absorção das  $BDB_D$  na região entre 240 e 800 nm. Conforme observado, as  $BDB_D$  apresentaram bandas absorção localizadas entre 240 e 420 nm, todas centrada em 264 nm. Essas bandas estão associadas aos HPAs presentes na composição do diesel [5,6,87,94] e aos ésteres metílicos [33], tocoferóis, carotenóides [28], trienos e tetraenos conjugados pertencente as  $BDB_D$  que contém biodiesel em sua composição [28,32,77]. Adicionalmente, os ésteres metílicos, tocoferóis e carotenoides também contribuíram para as bandas de absorção da blenda  $B100_D$  na região espectral analisada. A Figura 25b apresenta o comportamento da absorbância em 264 nm em função do teor de biodiesel nas  $DBD_D$ .

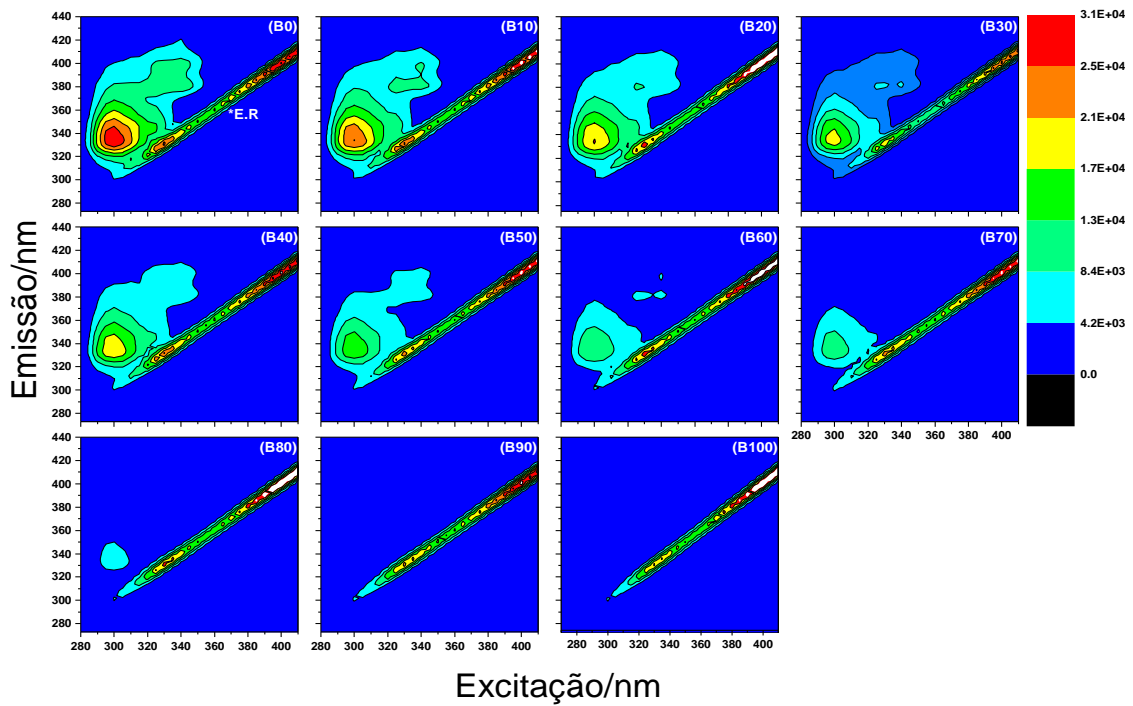
De acordo com o comportamento observado, a absorbância em 264 nm decaiu linearmente em função da adição do teor de biodiesel, entre  $B0_D$  e  $B90_D$ , de acordo com a função  $A_{264\text{ nm}} = (78 \pm 11)10^{-2} - (65 \pm 19)10^{-4}x$  com  $R^2=0,8512$ . Essa redução nos valores de absorbância pode ser atribuída a diluição do diesel pelo biodiesel durante a produção das  $BDB_D$ . Adicionalmente, o ponto referente a blenda  $B100_D$  ficou fora da curva devido ao espalhamento da luz.



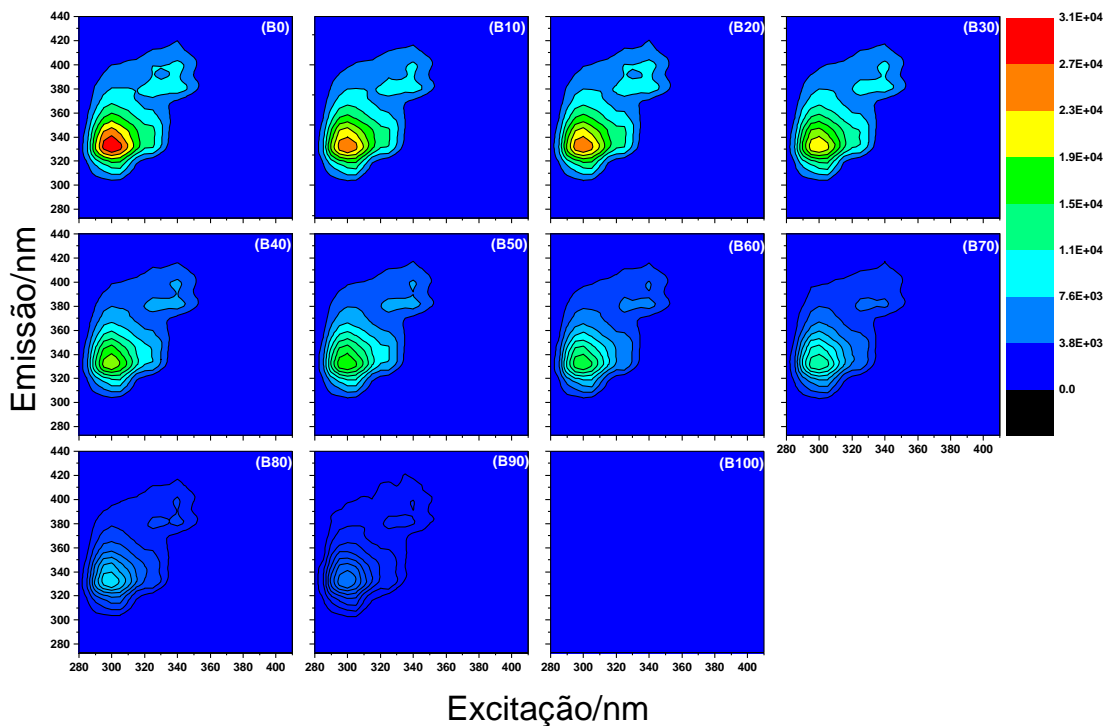
**Figura 25.** (a) espectro de absorção UV-vis das  $BDB_D$  diluídas em EGTW80. (b) comportamento da banda centrada em 264 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_D$ .

## 7.2 Matriz de excitação e emissão polarizada das blendas de diesel-biodiesel diluídas

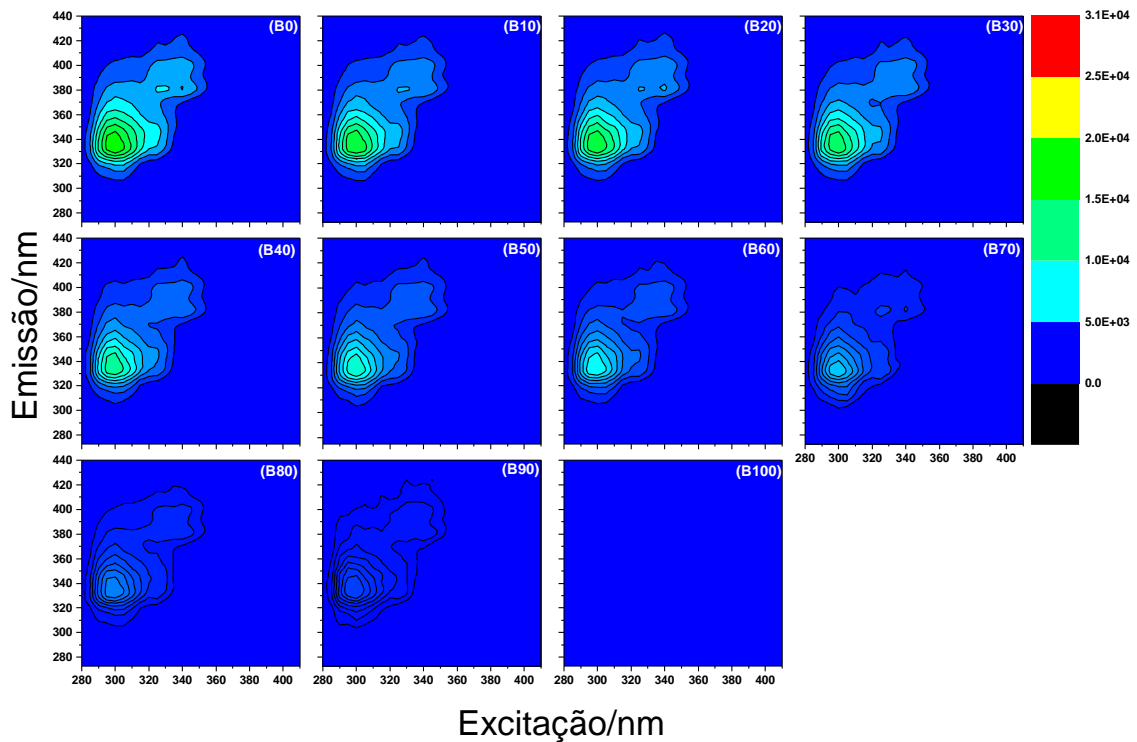
As Figuras 26, 27, 28 e 29 apresentam as  $MEE_{p(D)}$  das  $BDB_D$  em emulsão de EGTW80, obtidas nas polarizações VV, VH, HV e HH, respectivamente. Além das  $MEE_{p(D)}$ , as  $MEE_{(D)}$  total das  $BDB_D$  foram obtidas através do denominador da Equação 14, conforme apresentado na Figura 30. Como pode ser observado, todos os mapas de contorno de B0<sub>D</sub> a B90<sub>D</sub>, apresentaram emissões compreendidas entre 300 e 420 nm quando excitadas no intervalo de 280 a 350 nm. Essas emissões podem ser atribuídas ao perfil de excitação-emissão dos HPAs pertencente ao diesel e aos fluoróforos endógenos do biodiesel [7,29,31,32,78,79]. Adicionalmente, a blenda B100<sub>D</sub> não apresentou fluorescência na escala de intensidade em que as demais blendas foram analisadas.



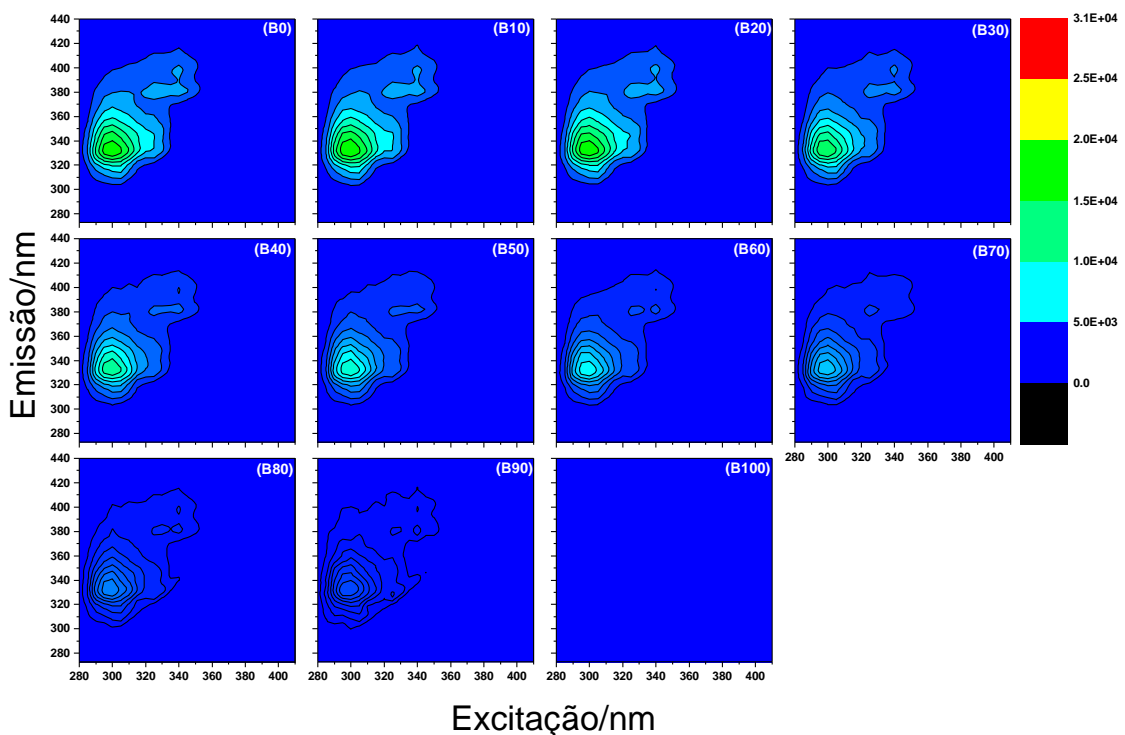
**Figura 26.**  $MEEp_{(D)}$  das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização VV. ER representa o espalhamento Rayleigh de primeira ordem. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.



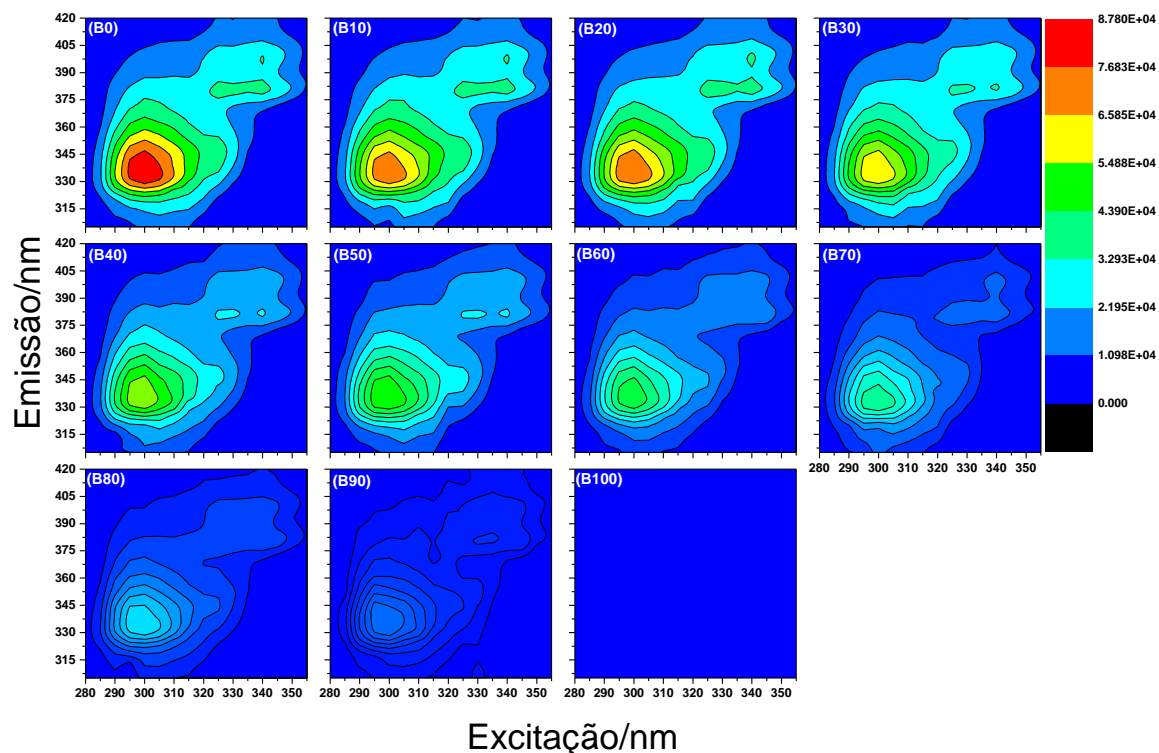
**Figura 27.**  $MEEp_{(D)}$  das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização VH. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.



**Figura 28.** MEEp(D) das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização HV. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.



**Figura 29 -** MEEp(D) das blendas de diesel biodiesel diluídas em solução de EGTW80 obtidas para a polarização HH. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.

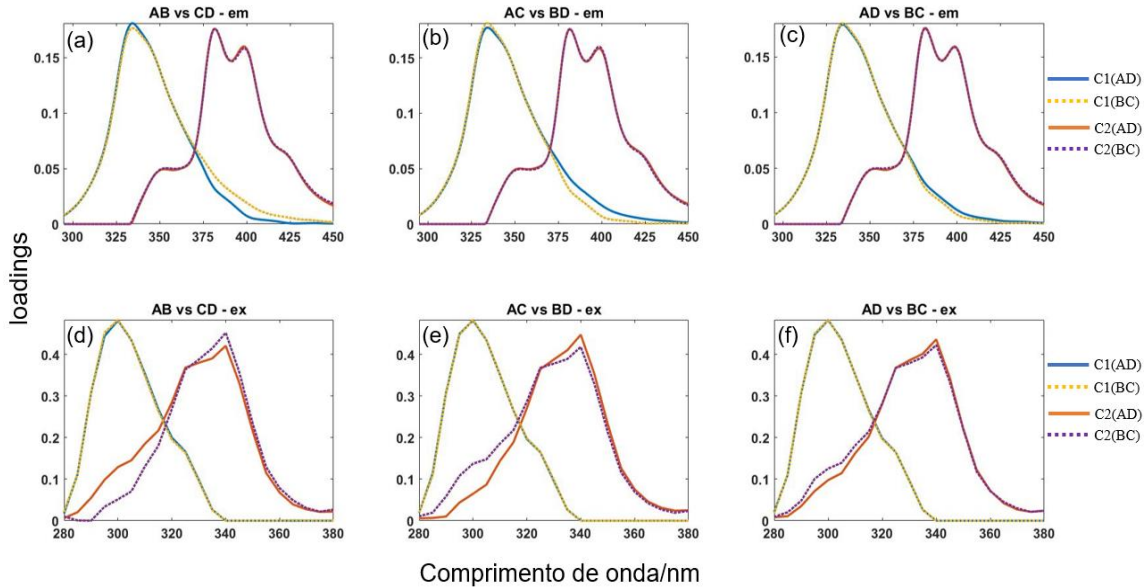


**Figura 30.** MEEP total das  $BDB_D$  obtidas através da Equação 14. A escala de cores corresponde aos valores de intensidade de fluorescência.

As  $BDB_D$  são amostras complexas e apresentam em sua composição diversos fluoróforos que contribuem para a fluorescência total das MEEP. De acordo com a estrutura de dados, o método multivariado PARAFAC é recomendado para análise das MEE, pois após a decomposição, ele fornece como resultado os espectros de excitação e emissão bidimensional dos componentes que contribuem para a fluorescência total da amostra [15,16,37].

A decomposição das  $MEEP_{(D)}$  pelo PARAFAC ( $MEEP_{(D)}$ -PARAFAC) forneceu resultados referente aos espectros de excitação e emissão dos componentes (fluoróforos) que contribuíram para a fluorescência das  $BDB_D$ , nas polarizações VV, VH, HV e emissão total (ET). Após a análise  $MEEP_{(D)}$ -PARAFAC, modelos de dois componentes (C1 e C2) foram obtidos para cada polarização e ET, cujos valores de CONCORDIA foram iguais a 96,20%, 96,93%, 97,95%, 93,89% e 94,75% para as polarizações VV, VH, HV, VV e ET, respectivamente. A SHA foi aplicada para a validação dos modelos e o coeficiente de correlação para as comparações foi alcançado [34]. A Figura 31 mostra a comparação espectral das divisões, obtidas através da SHA para a polarização VV. Para as demais polarizações e ET as comparações espectrais não serão mostradas, pois elas apresentaram o mesmo resultado obtido para a polarização VV. Portanto, baseado nessas evidências,

podemos concluir que as  $MEE_{p(D)}$  e  $MEE_{(D)}$  total das  $BDB_D$  receberam contribuições de dois componentes (C1 e C2).

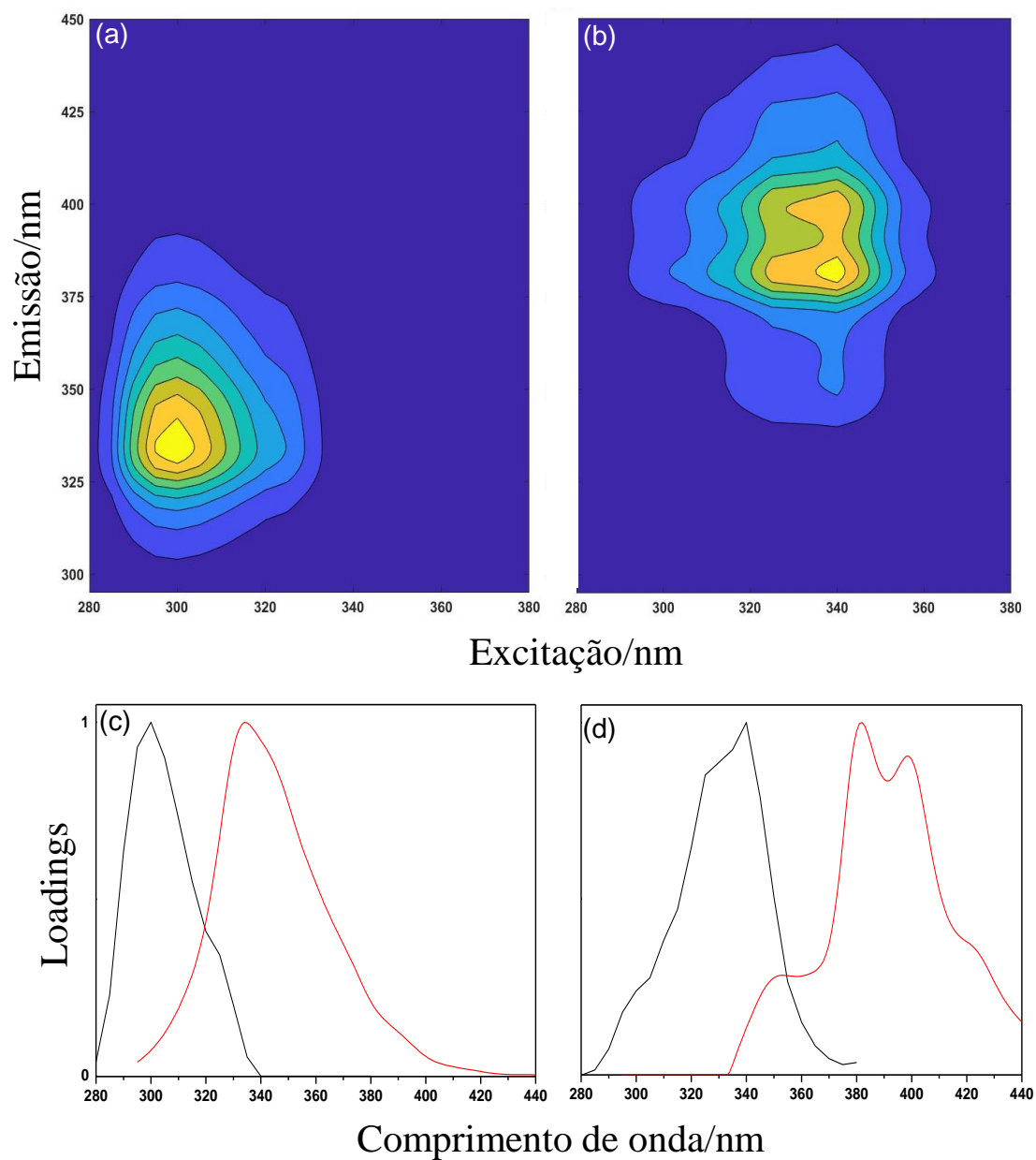


**Figura 31.** Validação do modelo através da SHA para a polarização VV. (a), (b) e (c) correspondem aos espectros de emissão enquanto (d), (e) e (f) correspondem aos espectros de excitação. A legenda corresponde a comparação entre as divisões, por exemplo: os componentes C1 e C2 da metade AB estão sendo comparadas com os componentes C1 e C2 da metade CD, assim sucessivamente para todas as combinações restantes.

Após a validação dos modelos, as  $MEE_{p(D)}$ ,  $MEE_{(D)}$  total e os espectros de excitação e emissão bidimensional, de cada polarização e ET, foram recuperados. A Figura 32 mostra a  $MEE_{p(D)}$  e os espectros de excitação e emissão recuperados para a polarização VV. Para as demais polarizações e para a ET, as  $MEE_{p(D)}$ ,  $MEE_{(D)}$  total e os espectros de excitação e emissão foram recuperados na mesma região da polarização VV e por isso não serão apresentados. Para o componente C1 (Figura 32a), a emissão compreendida entre 300 e 400 nm correspondente a excitação de 280 a 335 nm, foi recuperada. Em relação ao componente C2 (Figura 32b), a emissão recuperada ocorreu entre 330 e 450 nm para excitação localizada entre 290 e 450 nm. Os espectros de excitação e emissão bidimensional dos componentes C1 e C2, recuperados pelo PARAFAC, são apresentados nas Figuras 32c e 32d, respectivamente. Os comprimentos de onda de excitação (emissão), relacionados aos componentes C1 e C2 apresentaram valores de máxima intensidade centrados em 300 nm (335 nm) e 340 nm (382 nm), respectivamente. De acordo com esses resultados, é possível afirmar que o perfil de



excitação/emissão dos componentes C1 e C2 estão relacionados aos HPAs [95] presentes no diesel e aos fluoróforos endógenos do biodiesel [32,33].

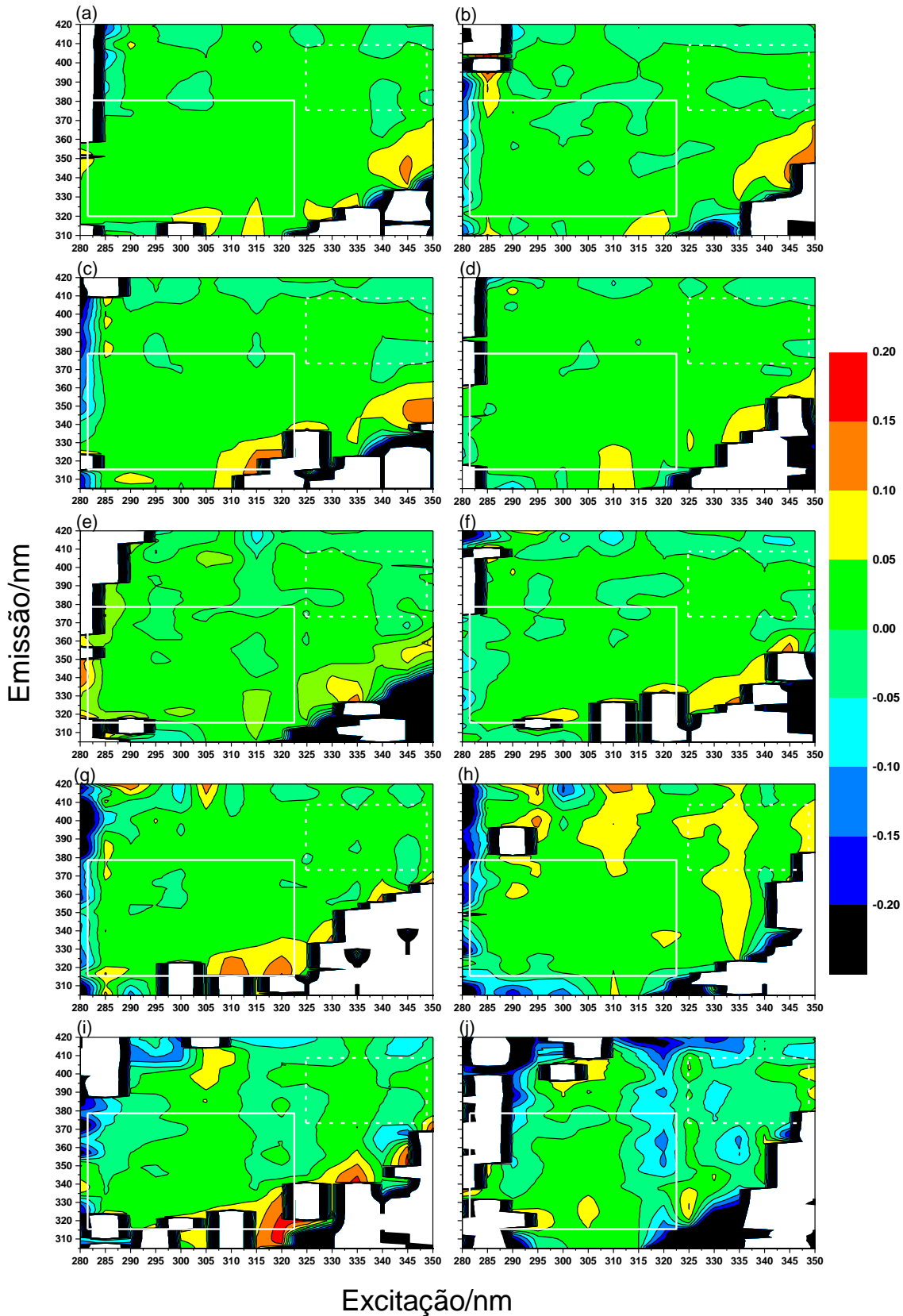


**Figura 32.** MEEp recuperada para os componentes (a) C1 e (b) C2 e seus respectivos espectros de excitação e emissão em (c) e (d) para a polarização VV.

### 7.3 Espectroscopia de emissão multidimensional resolvida por anisotropia das blendas de diesel-biodiesel diluídas

Para extrair informações da influência do solvente sobre a estrutura das moléculas que compõem as  $BDB_D$  em EGTW80, tais como a anisotropia de fluorescência e tempo de correlação rotacional, os MDA foram construídos a partir das  $MEE_{p(D)}$  das  $BDB_D$ .

A Figura 33 mostra os MDA, obtidos através das informações contidas nas  $MEE_{p(D)}$  e da aplicação da Equação 14, cujos eixos x, y e z correspondem aos comprimentos de onda de excitação, emissão e aos valores da anisotropia de fluorescência das  $BDB_D$  ( $r_{BD}$ ), respectivamente. Os MDA das  $BDB_D$  foram obtidos em um intervalo de emissão entre 310 e 420 nm para uma excitação entre 280 e 350 nm, com valores de anisotropia localizados no intervalo de  $0,20 < r_{BD} < -0,20$ . Apesar dos valores de  $r_{BD}$  terem sido calculados em um extenso intervalo de excitação e emissão, apenas os valores de  $r_{BD}$  contidos dentro das linhas sólidas e tracejada são confiáveis, pois é nessa área que as principais excitações e emissões dos fluoróforos foram encontrados através da  $MEE_{p(D)}$ -PARAFAC. Valores de anisotropia fora dessa área não são acurados, pois receberam contribuições dos espalhamentos e ruídos presentes na estrutura de dados das  $MEE_{p(D)}$  [48,50]. Em relação a blenda B100<sub>D</sub>, o MDA não foi construído porque as  $MEE_{p(D)}$  não apresentou emissões significativas para essa blenda.



**Figura 33.** MDA das  $BDBD$ : (a) B0<sub>D</sub>, (b) B10<sub>D</sub>, (c) B20<sub>D</sub>, (d) B30<sub>D</sub>, (e) B40<sub>D</sub>, (f) B50<sub>D</sub>, (g) B60<sub>D</sub>, (h) B70<sub>D</sub>, (i) B80<sub>D</sub>, (j) B90<sub>D</sub>. No interior das linhas sólidas e tracejadas contém informações da  $r_{BD}$  referentes aos componentes C1 e C2. A barra de cores corresponde aos valores de  $r_{BD}$ .

A Tabela 6 contém os valores de  $r_{BD}$  relacionadas as intensidades mais significativas dos componentes C1 e C2. Conforme pode ser observado, os valores de anisotropia foram baixos, aproximadamente zero. Adicionalmente, baixos valores de anisotropia de fluorescência referente aos HPAs são encontrados na literatura [96–98]. No entanto, como os componentes C1 e C2 não estão associados apenas com os HPAs, os valores de anisotropia apresentados na Figura 39, também podem ser atribuídos aos diversos fluoróforos que compõem as  $BDB_D$ .

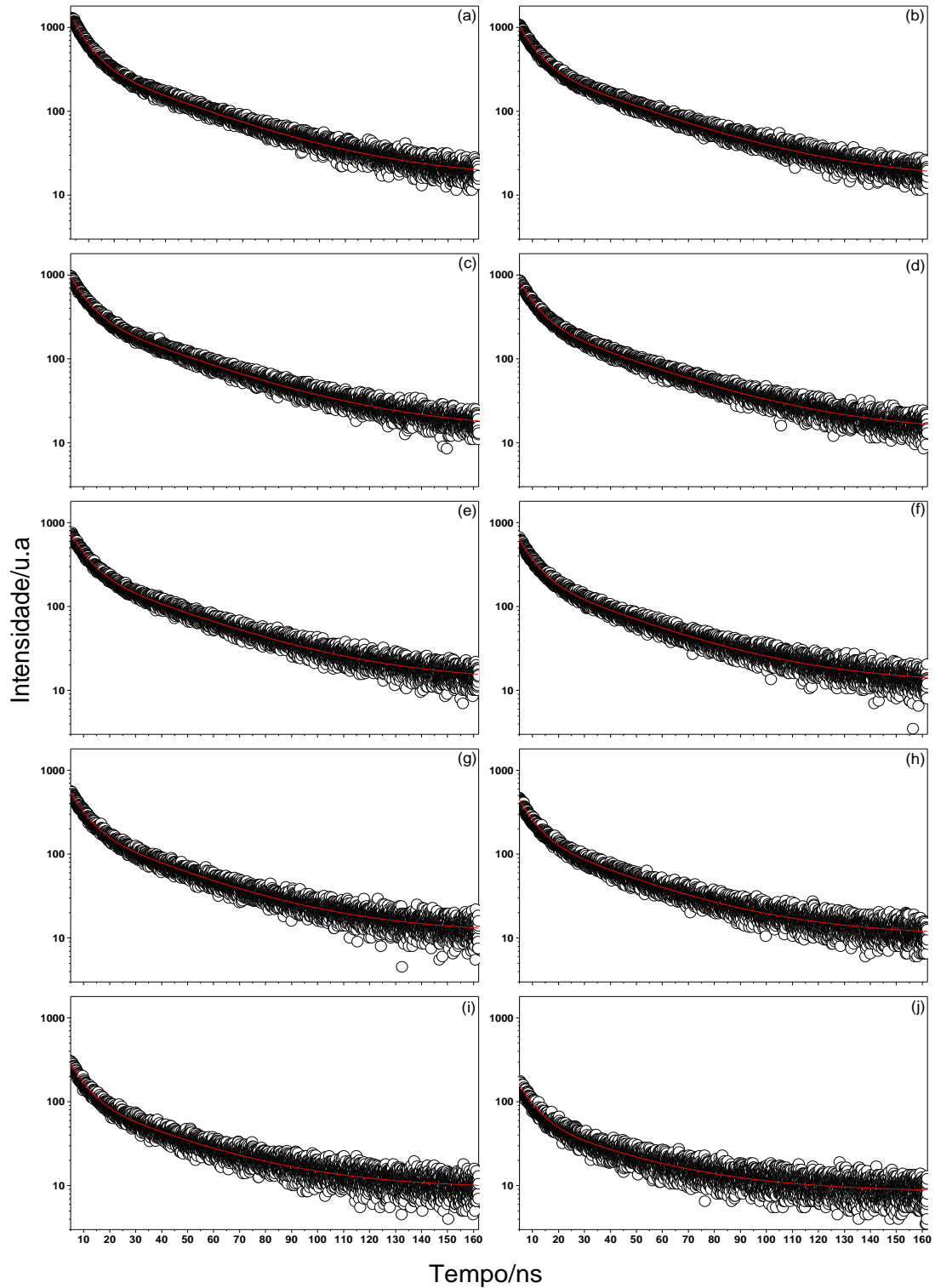
**Tabela 6** – Valores de  $r_{BD}$  nos comprimentos de onda de máxima intensidade de excitação/emissão ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) dos componentes C1 e C2.

Blendas	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 300 nm /335 nm	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 340 nm /382 nm	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 340 nm /398 nm
B0	0,020 ± 0.007	-0,008 ± 0.003	0,010 ± 0.005
B10	0,012 ± 0.005	-0,002 ± 0.009	0,010 ± 0.001
B20	0,021 ± 0.002	-0,004 ± 0.001	0,012 ± 0.003
B30	0,015 ± 0.000	0,010 ± 0.001	0,010 ± 0.001
B40	0,020 ± 0.000	-0,010 ± 0.010	0,000 ± 0.001
B50	0,015 ± 0.012	0,010 ± 0.040	0,000 ± 0.010
B60	0,020 ± 0.010	0,020 ± 0.020	0,024 ± 0.001
B70	0,010 ± 0.010	0,020 ± 0.030	0,040 ± 0.010
B80	0,020 ± 0.010	0,030 ± 0.010	0,020 ± 0.003
B90	0,030 ± 0.020	-0,010 ± 0.000	0,003 ± 0.030

Devido a sua sensibilidade a mudanças estruturais [48,99], as informações contidas no MDA podem ser utilizadas para a obtenção de informações de propriedades moleculares, como por exemplo o tempo de correlação rotacional das moléculas que compõem as  $BDB_D$ . Despolarização por rotação afeta significativamente os valores de anisotropia de fluorescência, ou seja, se o tempo de correlação rotacional ( $\tau_{rot.}$ ) for maior do que o tempo de vida médio ( $\tau_{rot.} \gg \tau_{médio}$ ), então  $r \approx r_0$ . Por outro lado, se o tempo de correlação rotacional é menor do que o tempo de vida médio ( $\tau_{rot.} \ll \tau_{médio}$ ), então  $r \approx 0$  [50].

Nesse contexto, através da Equação de Perrin (Equação 15) é possível obter  $\tau_{rot.}$  a partir dos valores de anisotropia fluorescência e do tempo de vida médio dos fluoróforos. Para obter  $\tau_{rot.}$  dos fluoróforos das  $BDB_D$ , primeiramente o decaimento da fluorescência foi mensurado, conforme apresentado na Figura 40. Esse decaimento foi obtido a partir da excitação em 280 nm com monitoramento da fluorescência acima de 320 nm, cuja região de emissão está relacionada aos fluoróforos associados aos componentes C1 e C2. Todos os decaimentos foram ajustados com a Equação 2 e um

modelo bi exponencial foi encontrado para cada blenda, cujos valores dos parâmetros utilizados ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $\tau_1$  e  $\tau_2$ ) e de  $\chi^2$  estão apresentados na Tabela A1 (Anexo).



**Figura 34.** Decaimento de fluorescência das  $BDB_D$ : (a)  $B0_D$ , (b)  $B10_D$ , (c)  $B20_D$ , (d)  $B30_D$ , (e)  $B40_D$ , (f)  $B50_D$ , (g)  $B60_D$ , (h)  $B70_D$ , (i)  $B80_D$  e (j)  $B90_D$ . Os decaimentos foram obtidos com uma excitação em 280 nm e a emissão monitorada com filtro passa banda acima de 320 nm.

Após a obtenção dos modelos de decaimento, os parâmetros de ajuste  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $\tau_1$  e  $\tau_2$  foram aplicados na Equação 3, e os valores do tempo vida médio ( $\tau_{m\u00e9dio}$ ) foram calculados e apresentados na Tabela 7. Sob posse dos valores de  $\tau_{m\u00e9dio}$  e da anisotropia, os tempos de correla\u00e7\u00e3o rotacional das mol\u00e9culas relacionadas aos componentes C1 e C2,  $\tau_{rot.(C1)}$  e  $\tau_{rot.(C2)}$ , foram estimados atrav\u00e9s da Equa\u00e7\u00e3o 15, cujos valores est\u00e3o contidos na Tabela 8.

De acordo com os valores de  $\tau_{rot.(C1)}$  e  $\tau_{rot.(C2)}$ , \u00e9 poss\u00edvel afirmar que os baixos valores de  $r_{BD(C1)}$  e  $r_{BD(C2)}$  podem ser atribuídos a perda de emiss\u00e3o por despolariza\u00e7\u00e3o rotacional, pois  $\tau_{rot.(C1)} \ll \tau_{m\u00e9dio}$  e  $\tau_{rot.(C2)} \ll \tau_{m\u00e9dio}$ . Mol\u00e9culas com longo tempo de vida, podem rotacionar sua estrutura durante a sua perman\u00eancia no estado excitado por causa da influ\u00eancia das mol\u00e9culas do solvente [50,100–102]. Como efeito, o momento dipolo de transi\u00e7\u00e3o entre a absor\u00e7\u00e3o e emiss\u00e3o tem a sua orienta\u00e7\u00e3o espacial alterada, e como consequ\u00eancia, baixos valores de anisotropia podem ser encontrados [50]. Em contraste, a RB(GNaOH) apresentou tempo m\u00e9dio de vida menor do que as mol\u00e9culas presentes nas  $BDB_D$ , portanto alto valor de sua anisotropia de fluoresc\u00eancia foi encontrado (Cap\u00edtulo 5).

**Tabela 7** – Valores do tempo de vida m\u00e9dio e tempo de correla\u00e7\u00e3o rotacional das  $BDB_D$  referente aos componentes C1 e C2.

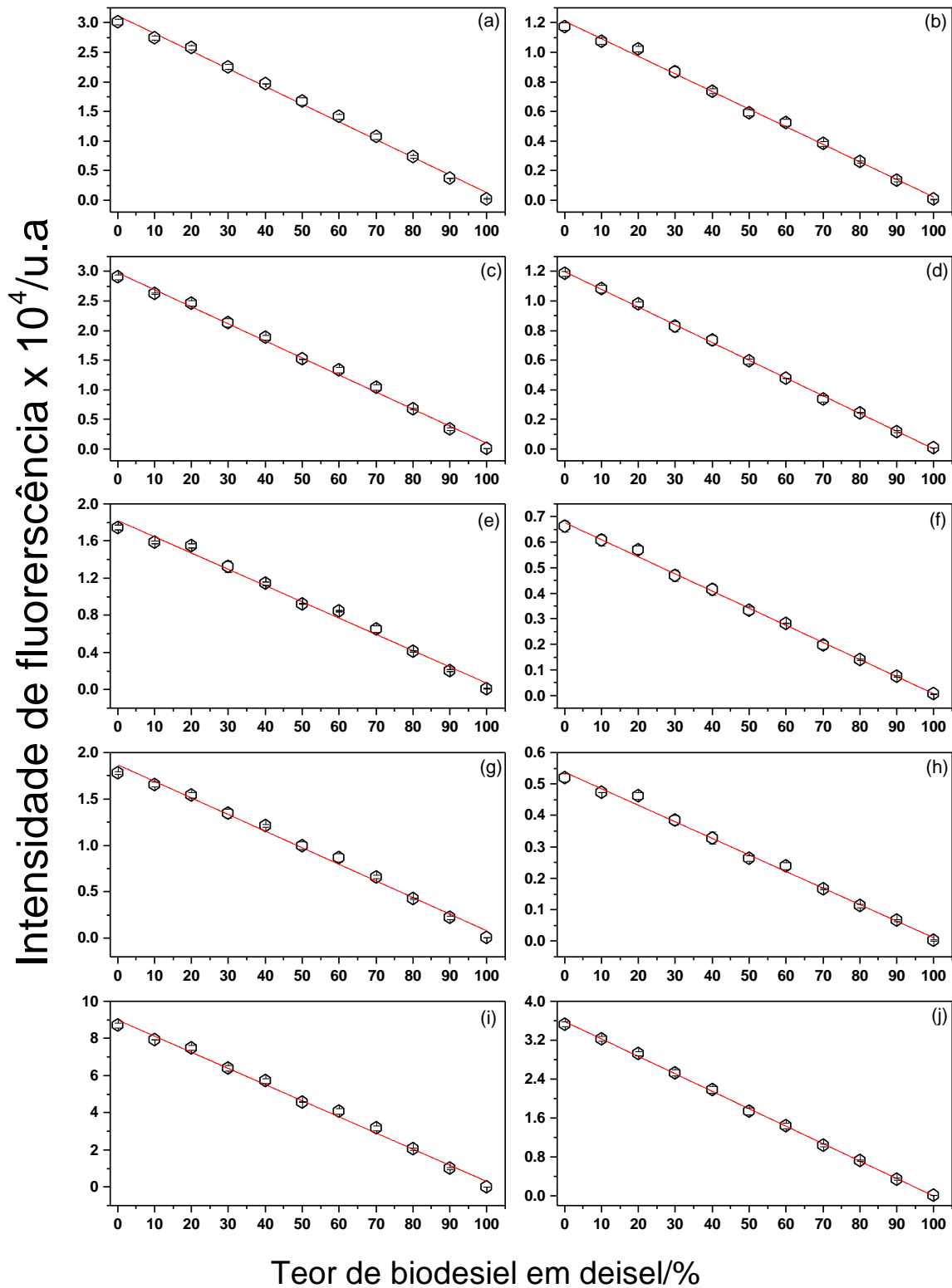
Blenda	$\tau_{m\u00e9dio}$ (ns)	$\tau_{rot.(C1)}$ (ns)	$\tau_{rot.(C2)}$ (ns)
B0 <sub>D</sub>	29,75 ± 0,12	1,57 ± 0,60	0,76 ± 0,39
B10 <sub>D</sub>	29,74 ± 0,30	0,92 ± 0,40	0,76 ± 0,08
B20 <sub>D</sub>	29,81 ± 0,16	1,65 ± 0,16	0,92 ± 0,24
B30 <sub>D</sub>	29,36 ± 0,29	1,14 ± 0,08	0,75 ± 0,08
B40 <sub>D</sub>	29,49 ± 0,31	1,55 ± 0,08	0,07 ± 0,07
B50 <sub>D</sub>	28,93 ± 0,23	1,13 ± 0,94	0,74 ± 0,07
B60 <sub>D</sub>	28,36 ± 0,60	1,49 ± 0,79	1,81 ± 0,28
B70 <sub>D</sub>	28,43 ± 0,36	0,73 ± 0,75	3,15 ± 0,90
B80 <sub>D</sub>	27,81 ± 0,32	1,46 ± 0,77	1,46 ± 0,23
B90 <sub>D</sub>	26,93 ± 0,10	2,18 ± 1,57	0,20 ± 2,05

#### 7.4 Constru\u00e7\u00e3o de modelos anal\u00edticos para quantifica\u00e7\u00e3o de biodiesel em blendas de diesel-biodiesel dilu\u00eddas.

Ap\u00f3s a avalia\u00e7\u00e3o das propriedades moleculares das  $BDB_D$  em emuls\u00e3o de EGTW80, o potencial anal\u00edtico da fluoresc\u00eancia multidimensional polarizada e a utiliza\u00e7\u00e3o do PARAFAC na sele\u00e7\u00e3o das melhores vari\u00e1veis de excita\u00e7\u00e3o-emiss\u00e3o, para constru\u00e7\u00e3o de modelos anal\u00edticos, foram avaliados. Para isso, as m\u00e1ximas intensidades

de excitação e emissão dos componentes C1 e C2, obtidos através MEEp<sub>(D)</sub>-PARAFAC, foram utilizados para a construção de modelos analíticos para quantificar biodiesel nas blendas B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>. Para relembrar, as máximas intensidades de excitação (emissão) dos componentes C1 e C2 foram encontrados centrados em 300 (335 nm) e 340 (382 nm), respectivamente. Adicionalmente, as máximas intensidades de emissão foram obtidas através das MEEp das *BDB<sub>D</sub>*, cujas intensidades dos componentes C1 e C2 são medidas experimentais das *BDB<sub>D</sub>* e não os “loadings” do modo A, obtidos através da MEEp<sub>(D)</sub>-PARAFAC. É importante observar que esse procedimento foi adotado com o objetivo de avaliar o potencial de predição do biodiesel em blendas em EGTW80 com medidas de fluorescência 2D das amostras de validação externa, pois esse procedimento facilita a obtenção de informação das blendas de validação em relação as MEEp.

A Figura 41 mostra o comportamento das intensidades de emissão centradas em 335 nm (primeira coluna) e 382 nm (segunda coluna) em função do teor de biodiesel nas *BDB<sub>D</sub>*. Ajustes lineares foram aplicados para cada polarização e emissão total (ET), no intervalo de 0 e 100% m/m de biodiesel nas *BDB<sub>D</sub>*. Em relação a emissão em 335 nm (componente C1), os modelos  $I_{335(VV_D)} = (31189 \pm 940) - (298 \pm 16)x$  com  $R^2 = 0,9945$ ,  $I_{335(VH_D)} = (29802 \pm 856) - (288 \pm 13)x$  com  $R^2 = 0,9951$ ,  $I_{335(HV_D)} = (18225 \pm 750) - (175 \pm 12)x$  com  $R^2 = 0,9898$ ,  $I_{335(HH_D)} = (18708 \pm 705) - (178 \pm 11)x$  com  $R^2 = 0,9914$  e  $I_{335(ET_D)} = (90038 \pm 3028) - (869 \pm 51)x$  com  $R^2 = 0,9932$  foram obtidos para todas as polarizações e emissão total (ET). Para a emissão em 340 nm (componente C2), o mesmo procedimento foi adotado e as funções  $I_{382(VV_D)} = (12110 \pm 320) - (118 \pm 5)x$  com  $R^2 = 0,9959$ ,  $I_{382(VH_D)} = (11990 \pm 167) - (119 \pm 2)x$  com  $R^2 = 0,9989$ ,  $I_{382(HV_D)} = (6773 \pm 154) - (67 \pm 2)x$  com  $R^2 = 0,9970$ ,  $I_{382(HH_D)} = (5382 \pm 186) - (52 \pm 3)x$  com  $R^2 = 0,9930$  e  $I_{ET(HH_D)} = (35888 \pm 466) - (359 \pm 8)x$  com  $R^2 = 0,9991$  foram obtidas para as polarizações VV, VH, HV e HH e emissão total (ET).



**Figura 35.** Comportamento da intensidade de emissão em 335 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_D$  nas polarizações (a) VV, (c) VH, (e) HV, (g) HH e (i) ET. Comportamento da intensidade de emissão em 382 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_D$  nas polarizações (b) VV, (d) VH, (f) HV, (h) HH e (j) ET.



Para avaliar a presença de “outliers” e a linearidade entre as variáveis dependente (intensidade polarizada) e independente (teor de biodiesel nas  $BDB_D$ ), análise de resíduo studentizado e teste F foram aplicados nos modelos de regressão polarizados. Em relação ao teste de “outliers”, nenhuma amostra anômala foi identificada nos modelos, uma vez que os valores de resíduos studentizados foram  $<3$  [62,64]. Em relação ao teste de linearidade,  $F_{Cal.}$  foi maior que  $F_{Tab.}$  para todas as polarizações e ET, confirmando que o teor de biodiesel adicionado nas  $BDB_{ND}$ , impacta linearmente nas intensidades de emissão dos respectivos modelos. Após a análise de “outliers” e teste de linearidade, os  $LOD$  (Equação 7) e  $LOQ$  (Equação 8) foram calculados e os valores estão apresentados na Tabela 8. De acordo com os valores de  $LOD$  e  $LOQ$ , todos os modelos apresentaram possibilidade de quantificar biodiesel nas blendas do conjunto de validação externa (B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>).

**Tabela 8** – Valores de limite de detecção ( $LOD$ ) e quantificação ( $LOQ$ ) obtidos com 5% de nível de significância.

	$\lambda_{ex.}/\lambda_{em}$ 300/335 (nm)	$LOD$ (%)	$LOQ$ (%)	$\lambda_{ex.}/\lambda_{em}$ 340/382 (nm)	$LOD$ (%)	$LOQ$ (%)
Curvas analíticas	$I_{335(VV_D)}$	1,60	7,10	$I_{382(VV_D)}$	1,37	6,10
	$I_{335(VH_D)}$	1,51	6,67	$I_{382(VH_D)}$	0,70	3,14
	$I_{335(HV_D)}$	2,17	9,62	$I_{382(HV_D)}$	1,17	5,18
	$I_{335(HH_D)}$	2,00	8,85	$I_{382(HH_D)}$	1,79	7,94
	$I_{335(ET_D)}$	2,83	8,89	$I_{382(ET_D)}$	1,05	3,31

Baseado nos resultados do  $LOD$  e  $LOQ$ , todas as curvas analíticas foram aplicadas para quantificar o teor de biodiesel nas blendas B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>. Para isso, a variável independente  $x$ , que corresponde ao teor de biodiesel predito nas blendas de validação B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>, foi isolada em cada modelo polarizado da seguinte forma:

$$BDB_{D_{pred.(335)}(VV)} = \frac{I_{335(VV_D)_{val.}} - 31189}{-298} \quad \text{Equação 23}$$

onde  $I_{335(VV_D)_{val.}}$  e  $BDB_{D_{pred.(335)}(VV)}$  correspondem aos valores de intensidade de validação e biodiesel predito no conjunto de validação externa B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>, na polarização VV e na excitação (emissão) 300 nm (335 nm) (componente C1), respectivamente. Adicionalmente, o mesmo procedimento foi adotado para todos os

modelos polarizados, e equações semelhantes (não apresentadas) a Equação 23 foram encontradas para cada polarização. A Tabela 9 apresenta os valores de biodiesel preditos nas amostras de validação externa que foram obtidas a partir da fluorescência 2D, nos pares de excitação (emissão) utilizadas na construção das curvas analíticas.

**Tabela 9** – Valores de biodiesel predito nas amostras de validação B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>, obtidos a partir da fluorescência 2D, nos  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 300 \text{ nm}/335 \text{ nm}$  e  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 382 \text{ nm}/382 \text{ nm}$ , respectivamente para os componentes C1 e C2.

Curvas Analítica	Valores de biodiesel preditos nas amostras de validação externa					
	B13 <sub>(1)</sub>	B13 <sub>(2)</sub>	B13 <sub>(3)</sub>	B15 <sub>(1)</sub>	B15 <sub>(2)</sub>	B15 <sub>(3)</sub>
$I_{335(VV_D)}$	12,25	12,81	12,34	15,48	15,12	15,68
$I_{335(VH_D)}$	12,58	9,50	11,86	15,23	12,31	11,91
$I_{335(HV_D)}$	13,17	11,46	11,40	14,65	12,70	14,37
$I_{335(HH_D)}$	12,94	14,47	12,75	14,26	14,85	16,49
$I_{335(ET_D)}$	11,67	9,82	11,22	14,53	12,47	12,40
$I_{382(VV_D)}$	14,02	14,98	14,95	14,55	18,60	16,15
$I_{382(VH_D)}$	18,88	21,40	19,15	32,87	18,57	21,18
$I_{382(HV_D)}$	14,11	13,93	13,41	14,26	17,04	15,34
$I_{382(HH_D)}$	12,25	10,22	11,02	13,11	11,88	13,74
$I_{382(ET_D)}$	16,56	18,55	17,04	26,01	17,86	18,79

Em relação a validação das curvas analíticas, a Tabela 10 contém os resultados referente ao teor médio de biodiesel predito  $\overline{BDB}_{D_{pred.}}$  e as figuras de mérito  $RMSEP$  e  $RSDP$  das amostras de validação externa B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>. Além disso, a Tabela 10 contém valores do quociente da média dos valores preditos com os valores de concentração de referência ( $\overline{BDB}_{D_{pred.}}/BDB_{D_{ref.}}$ ). Baixos valores de  $RMSEP$  e valores da razão  $\overline{BDB}_{D_{pred.}}/BDB_{D_{ref.}} \approx 1$ , indicam que o modelo é acurado para prever o teor de biodiesel nas blendas [59]. Adicionalmente, valores de  $RSDP$  de até 10% são aceitáveis e indicam que o método é preciso [83]. Portanto, baseado nessas informações, é possível concluir que as curvas analíticas  $I_{335(VV_D)} = (31189 \pm 940) - (298 \pm 16)x$ ,  $I_{335(HV_D)} = (18225 \pm 750) - (175 \pm 12)x$ ,  $I_{335(HH_D)} = (18708 \pm 705) - (178 \pm 11)x$  e  $I_{382(HV_D)} = (6773 \pm 154) - (67 \pm 2)x$  apresentaram boa acurácia e precisão na predição do teor de biodiesel nas amostras do conjunto de validação e, portanto, podem ser utilizadas para atender a legislação vigente do CNPE [93].

**Tabela 10** – Média dos valores de biodiesel preditos nas amostras de validação B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub> ( $\overline{BDB}_{D_{pred.}}$ ) e figuras de mérito referente a validação dos modelos.

Curvas Analítica	$BDB_{Ref.}$ (%)	$\overline{BDB}_{D_{pred.}}$ (%)	RMSEP (%)	RSD <sub>p</sub> (%)	$\overline{BDB}_{D_{pred.}}/BDB_{D_{ref.}}$
$I_{335(VV_D)}$	13	12,47	0,59	4,51	0,96
	15	15,43	0,49	3,24	1,03
$I_{335(VH_D)}$	13	11,31	2,14	16,46	0,87
	15	13,15	16,84	15,79	0,88
$I_{335(HV_D)}$	13	12,01	1,29	9,89	0,92
	15	13,91	1,39	9,28	0,93
$I_{335(HH_D)}$	13	13,39	0,86	6,63	1,03
	15	15,20	0,96	6,43	1,01
$I_{335(ET_D)}$	13	10,90	2,24	17,23	0,84
	15	13,13	2,11	14,08	0,86
$I_{382(VV_D)}$	13	14,65	1,71	13,15	1,13
	15	16,43	2,20	14,67	1,10
$I_{382(VH_D)}$	13	19,81	6,90	53,10	1,52
	15	24,21	11,11	74,06	1,61
$I_{382(HV_D)}$	13	13,82	0,87	6,69	1,06
	15	15,55	1,27	8,45	1,04
$I_{382(HH_D)}$	13	11,16	2,02	15,52	0,86
	15	12,91	2,23	14,85	0,86
$I_{382(ET_D)}$	13	17,38	2,58	19,81	1,33
	15	20,89	4,00	26,64	1,39

## 7.5 Conclusão do capítulo

A espectroscopia de absorção na região UV-vis mostrou que os HPAs presente no diesel e os fluoróforos endógenos do biodiesel, contribuíram para a absorbância das  $BDB_D$ . Adicionalmente, os valores da absorbância em 264 nm diminuiu linearmente em função da adição de biodiesel nas blendas devido a diluição do diesel.

Com a fluorescência multidimensional polarizada foi possível obter as  $MEE_{p(D)}$  das  $BDB_D$  nas polarizações VV, VH, HV, HH e  $MEE_{(D)total}$ . De acordo com os resultados, as  $MEE_{p(D)}$  e  $MEE_{(D)total}$  receberam maiores contribuições dos HPAs pertencente ao diesel e dos fluoróforos endógenos do biodiesel. As  $MEE_{p(D)}$  e  $MEE_{(D)total}$  foram decompostas através do PARAFAC e um modelo de dois componentes foram recuperados e validados pela SHA, para cada polarização e emissão total (ET). Como resultado, os espectros de emissão 2D foram recuperados com as máximas intensidades de excitação (emissão) centradas em 300 (335) nm e 340 (382) nm, em todas as polarizações e ET. Esses espectros foram atribuídos aos HPAs e aos fluoróforos endógenos (tocoferóis, tetraenos conjugados e ésteres metílicos insaturados) do biodiesel.

Os MDA foram construídos a partir da fluorescência multidimensional polarizada das  $BDB_D$  em EGTW80. Como resultado, baixos valores de anisotropia de fluorescência foram encontrados para os fluoróforos que compõem as  $BDB_D$ . Adicionalmente, os resultados de fluorescência resolvida no tempo, mostraram que esses fluoróforos apresentaram longo tempo de vida médio ( $\tau_{médio}$ ) e baixo valor de tempo de correlação rotacional ( $\tau_{rot.}$ ). Portanto, como  $\tau_{rot.} \ll \tau_{médio}$ , os baixos valores de anisotropia foram atribuídos a despolarização por rotação dos fluoróforos analisados.

De acordo com o comportamento da intensidade de emissão, modelos analíticos foram construídos a partir da máxima intensidade de emissão centrada em 335 nm e 382 nm em função do teor de biodiesel nas  $BDB_D$ , para todas as polarizações e ET. Ajuste lineares foram aplicados sobre o conjunto de dados e análise de resíduo studentizado foi utilizada para avaliar a presença de “outliers”. Além disso, teste F foi aplicado para avaliar a linearidade entre as variáveis utilizadas na construção do modelo. Como resultado, não foram identificadas amostras anômalas nos modelos e a linearidade entre as variáveis foram confirmadas estatisticamente. Os valores dos  $LOD$  e  $LOQ$  foram calculados, e os resultados mostraram que todos os modelos apresentaram possibilidade de quantificar o teor de biodiesel nas amostras de validação externa B13<sub>D</sub> e B15<sub>D</sub>. De acordo com os valores das figuras de mérito  $RMSEP$  e  $RSDp$ , e da razão  $\overline{BDB}_{D_{pred.}}/BDB_{D_{ref.}}$ , foi possível concluir que as curvas analíticas  $I_{335(VV_D)} = (31189 \pm 940) - (298 \pm 16)x$ ,  $I_{335(HV_D)} = (18225 \pm 750) - (175 \pm 12)x$ ,  $I_{335(HH_D)} = (18708 \pm 705) - (178 \pm 11)x$  e  $I_{382(HV_D)} = (6773 \pm 154) - (67 \pm 2)x$  apresentaram ótima acurácia e precisão na predição do teor de biodiesel nas amostras do conjunto de validação e, portanto, podem ser utilizadas para atender a legislação vigente do CNPE, que prevê 13 % e 15% m/m de biodiesel em diesel em 2024 e 2026, respectivamente.

De forma geral, a espectroscopia de fluorescência multidimensional (MEEp<sub>(D)</sub>) associada com análise estatística multivariada (PARAFAC) forneceu informações referentes a composição das  $BDB_D$ . Os MDA foram construídos a partir das MEEp<sub>(D)</sub> e baixos valores de anisotropia foram encontrados devido ao baixo tempo de correlação rotacional dos fluoróforos analisados. Por fim, baseados nas máximas intensidades de emissão, modelos analíticos foram construídos e validado externamente. Esses modelos podem ser utilizados para a construção de dispositivos portáteis, que tem como finalidade quantificar biodiesel nas blendas. Portanto, de acordo com os resultados aqui

apresentados, a fluorescência multidimensional polarizada associada com o PARAFAC se mostrou uma ferramenta poderosa no que diz respeito ao desenvolvimento de métodos de caracterização e quantificação de amostras complexas, como as *BDB<sub>D</sub>* em emulsão de EGTW80.

## Considerações finais

A associação da fluorescência multidimensional (não polarizada e polarizada), no modo MEE, com a análise estatística multivariada (PARAFAC) se mostrou eficaz na identificação dos principais fluoróforos que compõem as  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$  (não diluídas e diluídas).

Além da identificação dos principais fluoróforos, a associação das  $MEE_{NP}$  e  $MEE_p$  com PARAFAC, permitiu a construção de modelos ópticos analíticos que foram utilizados para quantificar teor de biodiesel nos conjuntos de validação externa das  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$ . Em relação a  $MEE_{ND}$ -PARAFAC, um modelo de calibração multivariada foi construído, o qual apresentou ótimos resultados na predição do teor de biodiesel em  $BDB_{ND}$ .

Nas  $MEE_p$ , as melhores variáveis de excitação-emissão foram avaliadas através do PARAFAC para a construção de modelos analíticos. Esse procedimento permitiu a construção de vários modelos analíticos que foram utilizados para quantificar biodiesel em  $BDB_{ND}$  e  $BDB_D$ , com simples medidas de fluorescência 2D das amostras de validação.

Baseado nos resultados de validação externa e na simplificação do procedimento metodológico, é possível afirmar que o melhor modelo óptico analítico foi obtido através da análise das  $MEE_{p(ND)}$ -PARAFAC, nas polarizações HV e HH. Com ele, o teor de biodiesel pode ser quantificado com robustez sem a necessidade de preparo das amostras de validação.

## Referências

- [1] Empresa de Pesquisa Energética (EPE), Balanço Energético Nacional 2023, (2023). [https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-681/BEN\\_Síntese\\_2023\\_PT.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-681/BEN_Síntese_2023_PT.pdf).
- [2] M.A.A. Silva, R.A. Correa, M.G. de O. Tavares, N.R. Antoniosi Filho, A new spectrophotometric method for determination of biodiesel content in biodiesel/diesel blends, *Fuel*. 143 (2015) 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.048>.
- [3] J. Li, W. Wang, F. Li, Analysis of the biodiesel blend ratio of blended fuel oils based on ultraviolet spectrophotometry, *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* (2020) 1–14. <https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1811431>.
- [4] A.D.V. Máquina, B.V. Siteo, W. de Oliveira Cruz, D.Q. Santos, W.B. Neto, Analysis of <sup>1</sup>H NMR spectra of diesel and crambe biodiesel mixtures using chemometrics tools to evaluate the authenticity of a Brazilian standard biodiesel blend, *Talanta*. 209 (2020) 120590. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120590>.
- [5] M.D. Scherer, S.L. Oliveira, S.M. Lima, L.H.C. Andrade, A.R.L. Caires, Determination of the Biodiesel Content in Diesel/Biodiesel Blends: A Method Based on Fluorescence Spectroscopy, *J. Fluoresc.* 21 (2011) 1027–1031. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0815-x>.
- [6] A.R.L. Caires, M.D. Scherer, J.E. De Souza, S.L. Oliveira, J.-C. M’Peko, The role of viscosity in the fluorescence behavior of the diesel/biodiesel blends, *Renew. Energy*. 63 (2014) 388–391. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.09.041>.
- [7] A.R.L. Caires, V.S. Lima, S.L. Oliveira, Quantification of biodiesel content in diesel/biodiesel blends by fluorescence spectroscopy: Evaluation of the

- dependence on biodiesel feedstock, *Renew. Energy*. 46 (2012) 137–140.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.03.026>.
- [8] G.G. Shimamoto, M. Tubino, Alternative methods to quantify biodiesel in standard diesel-biodiesel blends and samples adulterated with vegetable oil through UV–Visible spectroscopy, *Fuel*. 186 (2016) 199–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.076>.
- [9] D.M.M. Pinho, V.O. Santos, V.M.L. dos Santos, M.C.S. Oliveira, M.T. da Silva, P.G.T. Piza, A.C. Pinto, M.J.C. Rezende, P.A.Z. Suarez, Evaluating the use of EN 14078 for determination of biodiesel in diesel blends sold in the Brazilian market, *Fuel*. 136 (2014) 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.043>.
- [10] R.M. Correia, E. Domingos, V.M. Cáo, B.R.F. Araujo, S. Sena, L.U. Pinheiro, A.M. Fontes, L.F.M. Aquino, E.C. Ferreira, P.R. Filgueiras, W. Romão, Portable near infrared spectroscopy applied to fuel quality control, *Talanta*. 176 (2018) 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.094>.
- [11] Z. Liu, N. Luo, J. Shi, Y. Zhang, C. Xie, W. Zhang, H. Wang, X. He, Z. Chen, Raman spectroscopy for the discrimination and quantification of fuel blends, *J. Raman Spectrosc.* (2019) jrs.5602. <https://doi.org/10.1002/jrs.5602>.
- [12] W.F. Cordeiro Dantas, J.C. Laurentino Alves, R.J. Poppi, MCR-ALS with correlation constraint and Raman spectroscopy for identification and quantification of biofuels and adulterants in petroleum diesel, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 169 (2017) 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.04.002>.
- [13] G. Fiona, Anisotropy Resolved Multidimensional Emission Spectroscopy (ARMES) as a tool for biophysical analysis, 2021.  
<http://hdl.handle.net/10379/17028>.
- [14] K.J. Cooper, F.F. Whitaker, A.M. Anesio, M. Naish, D.M. Reynolds, E.L. Evans, Dissolved organic carbon transformations and microbial community response to variations in recharge waters in a shallow carbonate aquifer, *Biogeochemistry*.



- 129 (2016) 215–234. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0226-4>.
- [15] R. Bro, PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149–171. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00032-4).
- [16] K.R. Murphy, C.A. Stedmon, D. Graeber, R. Bro, Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC, *Anal. Methods.* 5 (2013) 6557. <https://doi.org/10.1039/c3ay41160e>.
- [17] C.M. Andersen, R. Bro, Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data, *J. Chemom.* 17 (2003) 200–215. <https://doi.org/10.1002/cem.790>.
- [18] I. Tiseo, Annual carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) emissions worldwide from 1940 to 2022, (2023). <https://www.statista.com/statistics/276629/global-co2-emissions/>.
- [19] I. Tiseo, Largest global emitters of carbon dioxide 2021, by country, (2023). <https://www.statista.com/statistics/271748/the-largest-emitters-of-co2-in-the-world/>.
- [20] O. Ogunkunle, N.A. Ahmed, A review of global current scenario of biodiesel adoption and combustion in vehicular diesel engines, *Energy Reports.* 5 (2019) 1560–1579. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.10.028>.
- [21] T. Issariyakul, A.K. Dalai, Comparative kinetics of transesterification for biodiesel production from palm oil and mustard oil, *Can. J. Chem. Eng.* 90 (2012) 342–350. <https://doi.org/10.1002/cjce.20679>.
- [22] A. Demirbas, Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats, *Energy Convers. Manag.* 49 (2008) 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2007.05.002>.
- [23] N. Perston, Ben ; Harris, Biodiesel Blend Analysis by FT-IR (ASTM D7371 and EN 14078), 2009. <https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44->

- [24] M.H. Ng, C.L. Yung, Nuclear magnetic resonance spectroscopic characterisation of palm biodiesel and its blends, *Fuel*. 257 (2019) 116008.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116008>.
- [25] ANP, RESOLUÇÃO ANP Nº 864, DE 20.12.2021, DOU 21 DE DEZEMBRO DE 2021, (2021). <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-864-2021-estabelece-as-especificacoes-dos-combustiveis-de-referencia-utilizados-nos-ensaios-de-avaliacao-de-consumo-de-combustivel-e-de-emissoes-veiculares-para-a-homologacao-de-veiculos-automotores-novos-e-de-m>.
- [26] C. Muehlethaler, L. Gueissaz, G. Massonnet, Forensic Paint Analysis, in: *Encycl. Forensic Sci.*, Elsevier, 2013: pp. 265–272. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00109-4>.
- [27] C.V. de Souza, S.M. Corrêa, Polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel emission, diesel fuel and lubricant oil, *Fuel*. 185 (2016) 925–931.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.054>.
- [28] V.D. Silva, J.N. Conceição, I.P. Oliveira, C.H. Lescano, R.M. Muzzi, O.P.S. Filho, E.C. Conceição, G.A. Casagrande, A.R.L. Caires, Oxidative Stability of Baru (*Dipteryx alata* Vogel) Oil Monitored by Fluorescence and Absorption Spectroscopy, *J. Spectrosc.* 2015 (2015) 1–6.  
<https://doi.org/10.1155/2015/803705>.
- [29] Y.G.M. Kongbonga, H. Ghalila, M.B. Onana, Y. Majdi, Z. Ben Lakhdar, H. Mezlini, S. Sevestre-Ghalila, Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy, *Food Nutr. Sci.* 02 (2011) 692–699.  
<https://doi.org/10.4236/fns.2011.27095>.
- [30] M. Insausti, A. de Araújo Gomes, J.M. Camiña, M.C.U. de Araújo, B.S.F. Band, Fluorescent fingerprints of edible oils and biodiesel by means total synchronous fluorescence and Tucker3 modeling, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol.*

- Spectrosc. 175 (2017) 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.12.027>.
- [31] K.F. Magalhães, A.R.L. Caires, T.A. Chimenez, M.C. Fripp, F. Machado, S.L. Oliveira, Fluorescence Spectroscopy as an Alternative Analytical Tool for Monitoring Biodiesel Oxidative Stability: Thermal Oxidation Effect on the Endogenous Chromophores and Fluorophores in Biodiesel, in: 2018: pp. 111–125. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-73552-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-73552-8_5).
- [32] K.F. Magalhães, G. Orellana, A.R.L. Caires, S.L. Oliveira, Fluorescence lifetime of endogenous fluorophores for assessing the thermal degradation of biodiesel, J. Clean. Prod. 397 (2023) 136595. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136595>.
- [33] K.F. Magalhães, A.R.L. Caires, M.S. Silva, G.B. Alcantara, S.L. Oliveira, Endogenous fluorescence of biodiesel and products thereof: Investigation of the molecules responsible for this effect, Fuel. 119 (2014) 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.024>.
- [34] drEEM, decomposition routines for Emission-Excitation Matrices, (2021). <https://dreem.openfluor.org/>.
- [35] K. Kumar, A. Kumar Mishra, Parallel factor (PARAFAC) analysis on total synchronous fluorescence spectroscopy (TSFS) data sets in excitation–emission matrix fluorescence (EEMF) layout: Certain practical aspects, Chemom. Intell. Lab. Syst. 147 (2015) 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.08.008>.
- [36] K. Kumar, A.K. Mishra, Application of parallel factor analysis to total synchronous fluorescence spectrum of dilute multifluorophoric solutions: Addressing the issue of lack of trilinearity in total synchronous fluorescence data set, Anal. Chim. Acta. 755 (2012) 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.024>.
- [37] L. Li, Y. Wang, W. Zhang, S. Yu, X. Wang, N. Gao, New advances in fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy for the characterization of dissolved organic matter in drinking water treatment: A review, Chem. Eng. J.

381 (2020) 122676. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122676>.

- [38] E. Sanchez, B.R. Kowalski, Tensorial resolution: A direct trilinear decomposition, *J. Chemom.* 4 (1990) 29–45.  
<https://doi.org/10.1002/cem.1180040105>.
- [39] Y. Zhu, Y. Jin, X. Liu, T. Miao, Q. Guan, R. Yang, J. Qu, Insight into interactions of heavy metals with livestock manure compost-derived dissolved organic matter using EEM-PARAFAC and 2D-FTIR-COS analyses, *J. Hazard. Mater.* 420 (2021) 126532. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126532>.
- [40] X. Qin, B. Yao, L. Jin, X. Zheng, J. Ma, M.F. Benedetti, Y. Li, Z. Ren, Characterizing Soil Dissolved Organic Matter in Typical Soils from China Using Fluorescence EEM-PARAFAC and UV-Visible Absorption, *Aquat. Geochemistry.* 26 (2020) 71–88. <https://doi.org/10.1007/s10498-019-09366-7>.
- [41] C.H. Santos, G. Nicolodelli, R.A. Romano, A.M. Tadini, P.R. Villas-Boas, C.R. Montes, S. Mounier, D.M.B.P. Milori, Structure of Humic Substances from Some Regions of the Amazon Assessed Coupling 3D Fluorescence Spectroscopy and CP/PARAFAC, *J. Braz. Chem. Soc.* (2015). <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150076>.
- [42] M.C. Matos, A.M. Tadini, F.R. da Conceição, A.M. Junior, C.R. Menegatti, S. Mounier, A.R.L. Caires, G. Nicolodelli, Dissolved organic matter in bovine slaughterhouse wastewater using fluorescence spectroscopy associated with CP/PARAFAC and PCA methods, *Appl. Opt.* 61 (2022) 6590.  
<https://doi.org/10.1364/AO.461746>.
- [43] D. Kong, Y. Cui, L. Kong, S. Wang, Classification of oil pollutants based on excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and two-dimensional discriminant analysis, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2281. Kong (2020) 117799. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117799>.
- [44] J.H. Christensen, A.B. Hansen, J. Mortensen, O. Andersen, Characterization and

- Matching of Oil Samples Using Fluorescence Spectroscopy and Parallel Factor Analysis, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2210–2217. <https://doi.org/10.1021/ac048213k>.
- [45] M. Alostaz, K. Biggar, R. Donahue, G. Hall, Petroleum contamination characterization and quantification using fluorescence emission-excitation matrices (EEMs) and parallel factor analysis (PARAFAC), *J. Environ. Eng. Sci.* 7 (2008) 183–197. <https://doi.org/10.1139/S07-049>.
- [46] A.B.F. Câmara, W.J.O. da Silva, A.C. d. O. Neves, H.O.M.A. Moura, K.M.G. de Lima, L.S. de Carvalho, Excitation-emission fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and MCR-ALS with area correlation for investigation of jet fuel contamination, *Talanta.* 266 (2024) 125126. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125126>.
- [47] Y. Casamayou-Boucau, A.G. Ryder, Extended wavelength anisotropy resolved multidimensional emission spectroscopy (ARMES) measurements: better filters, validation standards, and Rayleigh scatter removal methods, *Methods Appl. Fluoresc.* 5 (2017) 037001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aa7763>.
- [48] M. Steiner-Browne, S. Elcoroaristizabal, Y. Casamayou-Boucau, A.G. Ryder, Investigating native state fluorescence emission of Immunoglobulin G using polarized Excitation Emission Matrix (pEEM) spectroscopy and PARAFAC, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 185 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.12.007>.
- [49] M. Ameloot, M. VandeVen, A.U. Acuña, B. Valeur, Fluorescence anisotropy measurements in solution: Methods and reference materials (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 85 (2013) 589–608. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-11-11-12>.
- [50] J.. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- [51] Y. Casamayou-Boucau, A.G. Ryder, Accurate anisotropy recovery from

- fluorophore mixtures using Multivariate Curve Resolution (MCR), *Anal. Chim. Acta.* 1000 (2018) 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.031>.
- [52] R.C. Groza, B. Li, A.G. Ryder, Anisotropy resolved multidimensional emission spectroscopy (ARMES): A new tool for protein analysis, *Anal. Chim. Acta.* 886 (2015) 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.011>.
- [53] Y. Bide, M.A. Fashapoyeh, S. Shokrollahzadeh, Structural investigation and application of Tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination, *Sci. Rep.* 11 (2021) 17068. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96199-6>.
- [54] V. Shukla, S.K. Upadhyay, Kinetics of tween-80 micellar catalysed chloramine-T oxidation of vitamins in HClO<sub>4</sub> medium, *Indian J. Chem. Technol.* 16 (2009) 46–51. [https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/3221/1/IJCT\\_16\(1\)\\_46-51.pdf](https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/3221/1/IJCT_16(1)_46-51.pdf).
- [55] K. Maruyama, K. Soube, Evaluation of Fluorescence Anisotropy in Fluorescein and Rhodamine B Solutions, *Shimadzu Excell. Sci.* (2019). [https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim\\_document\\_file/applications/application\\_note/10545/jpa419008.pdf](https://www.shimadzu.com/an/sites/shimadzu.com.an/files/pim/pim_document_file/applications/application_note/10545/jpa419008.pdf).
- [56] W.F. Falco, A.M. Queiroz, J. Fernandes, E.R. Botero, E.A. Falcão, F.E.G. Guimarães, J.-C. M'Peko, S.L. Oliveira, I. Colbeck, A.R.L. Caires, Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 299 (2015) 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.12.001>.
- [57] A.M. Queiroz, A.V. Mezacasa, D.E. Graciano, W.F. Falco, J.-C. M'Peko, F.E.G. Guimarães, T. Lawson, I. Colbeck, S.L. Oliveira, A.R.L. Caires, Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 168 (2016) 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.05.033>.

- [58] P.C. do Nascimento, J.L. Lani, E. de S. Mendonça, H.J. de O. Zoffoli, H.T.M. Peixoto, Teores e características da matéria orgânica de solos hidromórficos do Espírito Santo, *Rev. Bras. Ciência Do Solo*. 34 (2010) 339–348.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000200007>.
- [59] R.B. Martí, J.F. Baldrich, Fundamentals of PARAFAC, in: 2015: pp. 7–35.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00001-1>.
- [60] A.C. Olivieri, Analytical Figures of Merit: From Univariate to Multiway Calibration, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5358–5378.  
<https://doi.org/10.1021/cr400455s>.
- [61] V.J. Barwick, Preparation of Calibration Curves A Guide to Best Practice, 2003.  
[https://www.researchgate.net/publication/334063221\\_Preparation\\_of\\_Calibration\\_Curves\\_A\\_Guide\\_to\\_Best\\_Practice](https://www.researchgate.net/publication/334063221_Preparation_of_Calibration_Curves_A_Guide_to_Best_Practice).
- [62] I. Pardoe, Applied Regression Modeling, in: *Appl. Regres. Model.*, 3rd ed., 2021: pp. 228–230, ISBN 9781119615880.
- [63] W. Kutner, Michael H; Nachtshein, Christopher J; Neter, John; Li, Applied Linear Statistical Models, Quinta edi, 2005.
- [64] S. Marinović, M. Krištović, B. Špehar, V. Rukavina, A. Jukić, Prediction of diesel fuel properties by vibrational spectroscopy using multivariate analysis, *J. Anal. Chem.* 67 (2012) 939–949. <https://doi.org/10.1134/S1061934812120039>.
- [65] R.J. Freund, W.J. Wilson, D.L. Mohr, Linear Regression, in: *Stat. Methods*, Elsevier, 2010: pp. 321–374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374970-3.00007-X>.
- [66] H.-Y. Kim, Statistical notes for clinical researchers: simple linear regression 2 – evaluation of regression line, *Restor. Dent. Endod.* 43 (2018).  
<https://doi.org/10.5395/rde.2018.43.e34>.

- [67] E. Bernal, Limit of Detection and Limit of Quantification Determination in Gas Chromatography, in: *Adv. Gas Chromatogr.*, InTech, 2014. <https://doi.org/10.5772/57341>.
- [68] M.M.C. Ferreira, *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*, Editora da Unicamp, 2015. <https://doi.org/10.7476/9788526814714>.
- [69] M.. Rodríguez-Cuesta, R. Boqué, F.. Rius, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, A. Garrido Frenich, Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence and parallel factor analysis, *Anal. Chim. Acta.* 491 (2003) 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00786-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00786-4).
- [70] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, I. García, D. Giménez, E. Meléndez, Capability of detection and three-way data, *Anal. Chim. Acta.* 559 (2006) 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.069>.
- [71] M.. Ortiz, L.. Sarabia, A. Herrero, M.. Sánchez, M.. Sanz, M.. Rueda, D. Giménez, M.. Meléndez, Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with partial least squares, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 69 (2003) 21–33. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(03\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(03)00110-2).
- [72] C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, Detection limits with specified assurance probabilities, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506–2514. <https://doi.org/10.1021/ac00147a014>.
- [73] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities<sup>1</sup>Adapted from the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) document “Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection, *Anal. Chim. Acta.* 391 (1999) 105–126. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00104-X).
- [74] A.M.. Davies, T. Fearn, Back to Basics: Calibration Statistics, *Spectrosc. Eur.* 18



(2006) 31–32.

- [75] F. Gordon, Y. Casamayou-Boucau, A.G. Ryder, Evaluating the interaction of human serum albumin (HSA) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) liposomes in different aqueous environments using anisotropy resolved multi-dimensional emission spectroscopy (ARMES), *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 211 (2022) 112310.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112310>.
- [76] T.A. Chimenez, K.F. Magalhães, A.R.L. Caires, S.L. Oliveira, Fluorescence as an Analytical Tool for Assessing the Conversion of Oil into Biodiesel, *J. Fluoresc.* 22 (2012) 1177–1182. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1057-x>.
- [77] K.F. Magalhães, A.R.L. Caires, M.S. Silva, G.B. Alcantara, S.L. Oliveira, Endogenous fluorescence of biodiesel and products thereof: Investigation of the molecules responsible for this effect, *Fuel*. 119 (2014) 120–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.024>.
- [78] D. Patra, A. Mishra, Total synchronous fluorescence scan spectra of petroleum products, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 304–309.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-002-1330-y>.
- [79] A. Patra, D ; Sireesha, Lk ; Mishra, Characterization and investigation of polycyclic aromatic compounds present in petrol, diesel, kerosene and 2T oil using excitation emission matrix fluorescence, *Indian J. Chem. Sect. A-Inorganic Bio-Inorganic Phys. Theo.* Vol.40(4) (2001) 374–379.
- [80] R. Bro, H.A.L. Kiers, A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models, *J. Chemom.* 17 (2003) 274–286.  
<https://doi.org/10.1002/cem.801>.
- [81] R.; Bro, ADVANCED PARAFAC MODELING, (2023).  
<https://ucphchemometrics.com/3-advanced-parafac-modeling/>.

- [82] M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, D. Giménez, Identification and quantification of ciprofloxacin in urine through excitation-emission fluorescence and three-way PARAFAC calibration, *Anal. Chim. Acta.* 642 (2009) 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.040>.
- [83] F.T. Peters, H.H. Maurer, Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review, *Accredit. Qual. Assur.* 7 (2002) 441–449. <https://doi.org/10.1007/s00769-002-0516-5>.
- [84] A.J.W.G. Visser, K. Vos, A. Van Hoek, J.S. Santema, Time-resolved fluorescence depolarization of rhodamine B and (octadecyl)rhodamine B in triton X-100 micelles and aerosol OT reversed micelles, *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 759–765. <https://doi.org/10.1021/j100314a034>.
- [85] V. Analytics, VUV SPECTROSCOPY: SCIENCE IN A NEW LIGHT, (n.d.). <https://vuvanalytics.com/discover-vuv/>.
- [86] E. Mansouri, V. Yousefi, V. Ebrahimi, S. Eyvazi, M.S. Hejazi, M. Mahdavi, A. Mesbahi, V. Tarhriz, Overview of ultraviolet-based methods used in polycyclic aromatic hydrocarbons analysis and measurement, *Sep. Sci. PLUS.* 3 (2020) 112–120. <https://doi.org/10.1002/sscp.201900077>.
- [87] T.M. Halasinski, F. Salama, L.J. Allamandola, Investigation of the Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Absorption Spectra of Hydrogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Cations, *Astrophys. J.* 628 (2005) 555–566. <https://doi.org/10.1086/430631>.
- [88] D.D.S. Fernandes, A.A. Gomes, M.M. de Fontes, G.B. da Costa, V.E. de Almeida, M.C.U. de Araújo, R.K.H. Galvão, G. Vêras, UV-Vis Spectrometric Detection of Biodiesel/Diesel Blend Adulterations with Soybean Oil, *J. Braz. Chem. Soc.* (2013). <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130259>.
- [89] M.A.G. Trindade, N.R. Stradiotto, M.V.B. Zanoni, Corantes marcadores de combustíveis: legislação e métodos analíticos para detecção, *Quim. Nova.* 34

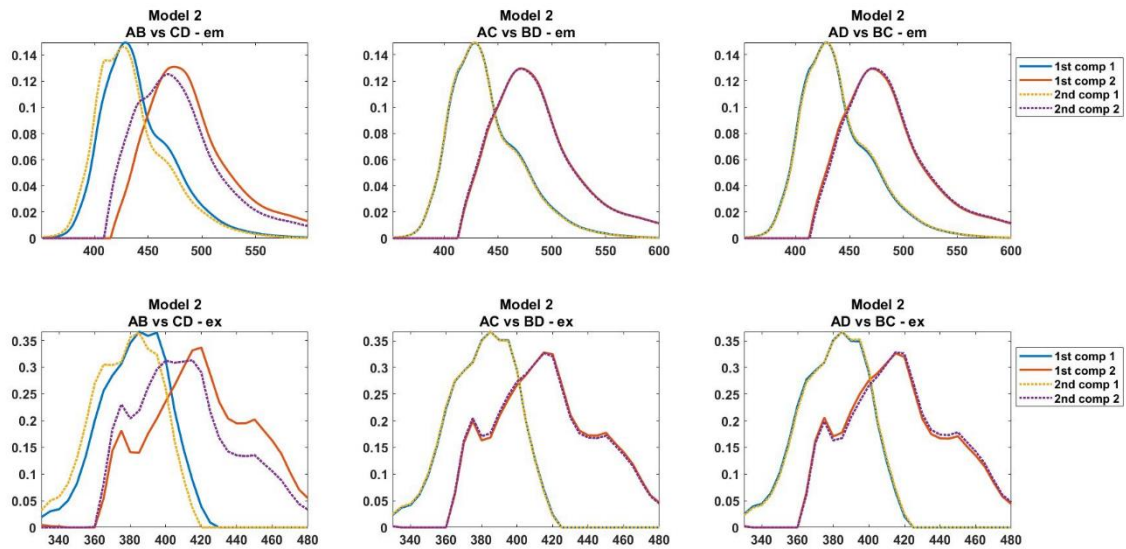
(2011) 1683–1691. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000002>.

- [90] C.-P. Leung, S.Y.-K. Tam, Quantitative determination of solvent red 24 in hydrocarbon oils by derivative spectroscopy, *Analyst*. 110 (1985) 883. <https://doi.org/10.1039/an9851000883>.
- [91] M. do S. Maia Quintino, W.P. Oliveira Filho, F. da S. Vinhado, W.G. dos Santos, R.B. Cesarino Dutra, P.A. de Oliveira, P.P.K. Gonçalves Costa, I.P. Soares, Uso da espectrofotometria UV-Vis para diferenciar as colorações do biodiesel de palma e do corante marcador de óleo diesel, *Quim. Nova*. (2017). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170044>.
- [92] M. Alostaz, K. Biggar, R. Donahue, G. Hall, Soil type effects on petroleum contamination characterization using ultraviolet induced fluorescence excitation-emission matrices (EEMs) and parallel factor analysis (PARAFAC), *J. Environ. Eng. Sci.* 7 (2008) 661–675. <https://doi.org/10.1139/S08-037>.
- [93] Conselho Nacional de Política Energética - CNPE, Resolução no 3, de 20 de março 2023., (2023). <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=515&pagina=2&data=29/03/2023&captchafield=firstAccess>.
- [94] S.K. Panigrahi, A.K. Mishra, Identification of pyrene in complex sample matrix using time-resolved fluorescence measurement coupled with PARAFAC analysis, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 383 (2019) 111991. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111991>.
- [95] N. Ferretto, M. Tedetti, C. Guigue, S. Mounier, R. Redon, M. Goutx, Identification and quantification of known polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in complex mixtures using fluorescence excitation–emission matrices and parallel factor analysis, *Chemosphere*. 107 (2014) 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.087>.
- [96] M.H. Ihde, A.M. Steelman, M. Bonizzoni, Fluorescent Probes for the

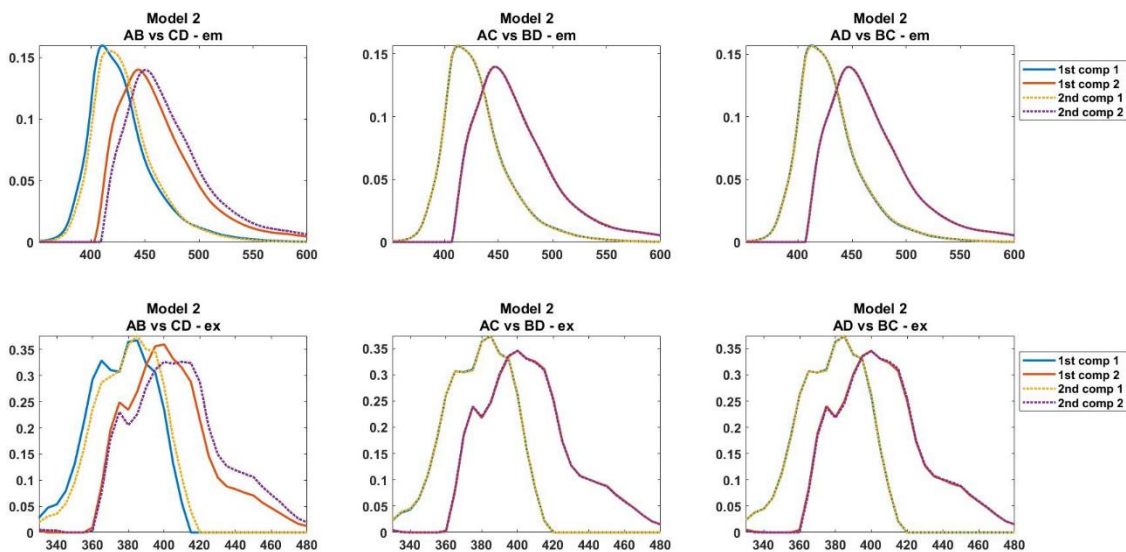
- Supramolecular Interactions responsible for Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Hyperbranched Polyelectrolytes in Aqueous Media, *Isr. J. Chem.* 61 (2021) 261–272. <https://doi.org/10.1002/ijch.202000097>.
- [97] M.J. Morra, M.O. Corapcioglu, R.M.A. von Wandruszka, D.B. Marshall, K. Topper, Fluorescence Quenching and Polarization Studies of Naphthalene and 1-Naphthol Interaction with Humic Acid, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54 (1990) 1283–1289. <https://doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400050014x>.
- [98] A. Kawski, I. Weyna, Z. Kojro, A. Kubicki, Fluorescence Anisotropy and Decay Times of Pyrene and Pyrene Excimer in Cellulose Acetate Films at Various Temperatures, *Zeitschrift Für Naturforsch. A.* 38 (1983) 1103–1106. <https://doi.org/10.1515/zna-1983-1011>.
- [99] M. Steiner-Browne, S. Elcoroaristizabal, A.G. Ryder, Using polarized Total Synchronous Fluorescence Spectroscopy (pTSFS) with PARAFAC analysis for characterizing intrinsic protein emission, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 194 (2019) 103871. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.103871>.
- [100] M.A. Haidekker, T.P. Brady, D. Lichlyter, E.A. Theodorakis, Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes, *Bioorg. Chem.* 33 (2005) 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2005.07.005>.
- [101] M.A. Haidekker, E.A. Theodorakis, Molecular rotors—fluorescent biosensors for viscosity and flow, *Org. Biomol. Chem.* 5 (2007) 1669–1678. <https://doi.org/10.1039/B618415D>.
- [102] S. Sasaki, G.P.C. Drummen, G. Konishi, Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry, *J. Mater. Chem. C.* 4 (2016) 2731–2743. <https://doi.org/10.1039/C5TC03933A>.

## Anexo

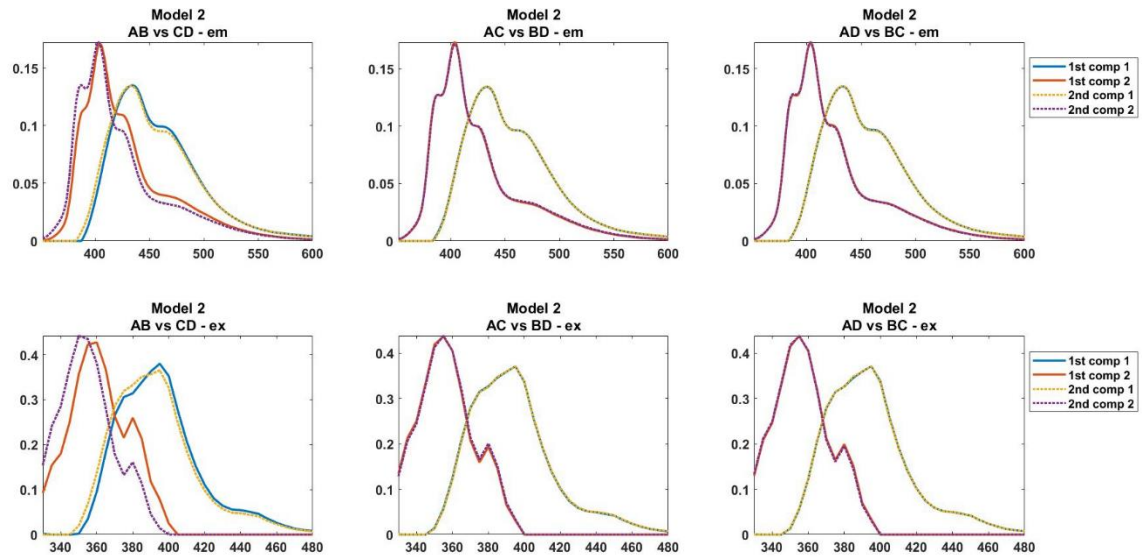
### Figuras



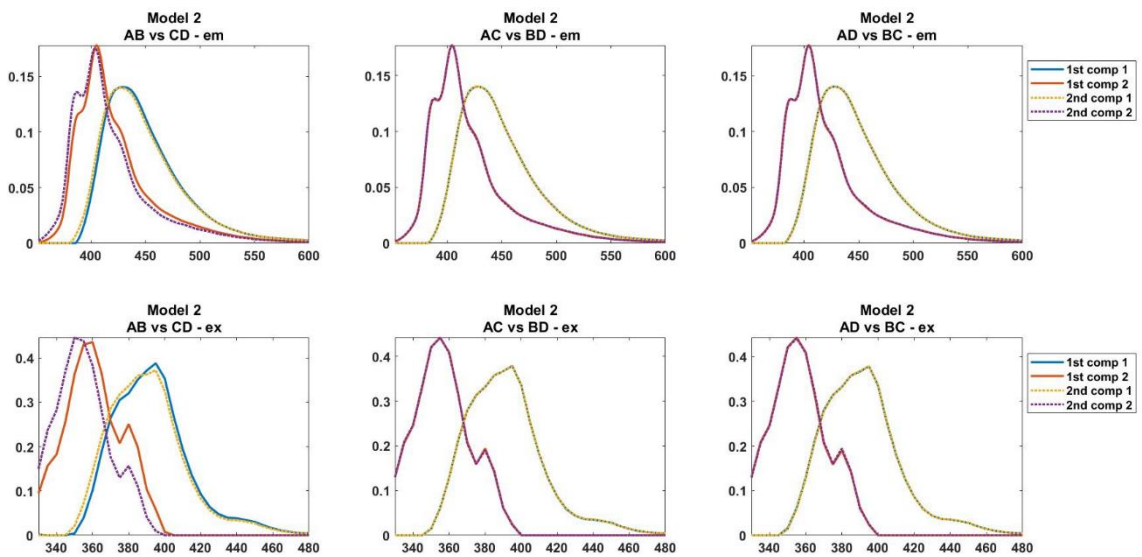
**Figura A1.** SHA do modelo PARAFAC obtido para a polarização VV das MEEp<sub>(ND)</sub>. O modelo de dois componentes apresentou similaridade espectral entre as divisões, com coeficiente de correlação maior do que 0,95.



**Figura A2.** SHA do modelo PARAFAC obtido para a polarização VH das MEEp<sub>(ND)</sub>. O modelo de dois componentes apresentou similaridade espectral entre as divisões, com coeficiente de correlação maior do que 0,95.



**Figura A3.** SHA do modelo PARAFAC obtido para a polarização HV das MEEp<sub>(ND)</sub>. O modelo de dois componentes apresentou similaridade espectral entre as divisões, com coeficiente de correlação maior do que 0,95.



**Figura A4.** SHA do modelo PARAFAC obtido para a polarização HH das MEEp<sub>(ND)</sub>. O modelo de dois componentes apresentou similaridade espectral entre as divisões, com coeficiente de correlação maior do que 0,95.

## Tabela

**Tabela A1** – Parâmetros de ajuste dos decaimentos de fluorescência apresentados na Figura 40.



Blendas	$A_1$	$\tau_1$	$A_2$	$\tau_2$	$\chi^2$
B0 <sub>1(D)</sub>	350,18	37,53	721,50	6,062	0,96
B0 <sub>2(D)</sub>	343,30	37,66	700,10	6,078	1,04
B10 <sub>1(D)</sub>	340,73	37,25	682,80	6,147	0,99
B10 <sub>2(D)</sub>	322,64	37,88	665,70	6,098	0,98
B20 <sub>1(D)</sub>	310,59	37,49	628,90	6,118	0,97
B20 <sub>2(D)</sub>	306,59	37,98	637,90	6,206	0,96
B30 <sub>1(D)</sub>	269,14	37,51	554,10	6,190	0,98
B30 <sub>2(D)</sub>	276,77	36,80	553,50	6,100	0,97
B40 <sub>1(D)</sub>	239,83	37,68	491,30	6,246	0,94
B40 <sub>2(D)</sub>	240,67	37,18	494,90	6,184	0,94
B50 <sub>1(D)</sub>	203,70	36,40	406,40	6,150	0,99
B50 <sub>2(D)</sub>	201,59	36,89	407,10	6,236	0,98
B60 <sub>1(D)</sub>	180,30	35,34	354,30	6,107	0,98
B60 <sub>2(D)</sub>	174,26	36,57	354,40	6,206	0,97
B70 <sub>1(D)</sub>	144,88	35,47	281,80	6,010	0,95
B70 <sub>2(D)</sub>	141,05	36,27	289,30	6,149	0,95
B80 <sub>1(D)</sub>	93,87	34,95	185,50	6,047	0,96
B80 <sub>2(D)</sub>	90,98	35,72	186,40	6,102	0,95
B90 <sub>1(D)</sub>	49,92	34,57	102,20	6,128	0,95
B90 <sub>2(D)</sub>	51,47	33,98	100,30	5,931	0,95


Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 308 (2024) 123773

Contents lists available at ScienceDirect

**Spectrochimica Acta Part A:**  
Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/spectrochimica-acta-part-a-molecular-and-biomolecular-spectroscopy](http://www.journals.elsevier.com/spectrochimica-acta-part-a-molecular-and-biomolecular-spectroscopy)



## A fluorescence-based multivariate method for biodiesel quantification in undiluted diesel-biodiesel blends without sample preparation

Fernando R. Conceição<sup>a,b</sup>, Flávio S. Michels<sup>a</sup>, Evaristo A. Falcão<sup>c</sup>, Gustavo Nicolodelli<sup>d</sup>, Samuel L. Oliveira<sup>a</sup>, Anderson R.L. Caires<sup>a,\*</sup>

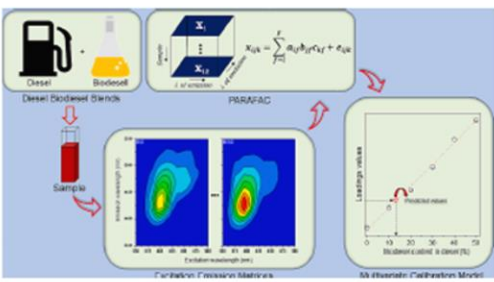
<sup>a</sup> Optics and Photonics Group, Institute of Physics, Federal University of Mato Grosso do Sul, PO Box 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil  
<sup>b</sup> Federal Institute of Mato Grosso do Sul, 79750-000 Nova Andradina, SP, Brazil  
<sup>c</sup> Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, PO Box 364, 79604-970 Dourados, MS, Brazil  
<sup>d</sup> Department of Physics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

---

### HIGHLIGHTS

- Excitation-emission matrices (EEMs) of diesel-biodiesel blends (DBBs) were investigated.
- EEMs and PARAFAC were used to build a model for assessing biodiesel content in DBBs.
- An analytical curve was built to quantify the biodiesel content in undiluted DBBs.
- The proposed method allows the quantification with no sample preparation requirements.
- The robustness of the model was confirmed by analyzing external samples.

### GRAPHICAL ABSTRACT



---

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Biodiesel  
 Diesel  
 Quantification  
 Fluorescence  
 EEM  
 PARAFAC

### ABSTRACT

In this work, excitation-emission matrices (EEMs) were used in association with parallel factor analysis (PARAFAC) to assess biodiesel content in undiluted diesel-biodiesel blends (DBBs) without pre-sample preparation. EEMs were decomposed using the PARAFAC (EEMs-PARAFAC), and the loading values of the PARAFAC component as a function of biodiesel content in the blends were used to build an analytical model to quantify the biodiesel content in DBBs. The proposed model presenting a limit of detection (LOD) and a limit of quantification (LOQ) of 2.5% and 11% w/w, respectively, successfully predicted the biodiesel content in the validation samples. The robustness of the model was confirmed by a close analysis of the root mean square error of prediction, standard error of prediction, relative standard deviation of prediction, and Bias. Therefore, an accurate and robust analytical model based on EEMs-PARAFAC was developed to quantify the biodiesel content in undiluted DBBs without sample preparation.

Link de acesso: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2023.123773>



*To be published in Applied Optics:*

**Title:** Evaluation of dissolved organic matter in bovine slaughterhouse wastewater using fluorescence spectroscopy associated with CP/PARAFAC and PCA methods

**Authors:** Murillo Matos, Amanda Tadini, Fernando Conceição, Amilcar Junior, Carlos Menegatti, Stephane Mounier, Anderson Caires, Gustavo Nicolodelli

**Accepted:** 08 July 22

**Posted** 11 July 22

**DOI:** <https://doi.org/10.1364/AO.461746>

© 2022 Optica

**Link de acesso:** <https://doi.org/10.1364/AO.461746>