

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

FRANCISCO SENNA VIEIRA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM INSTRUMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE ESTABILIDADE OXIDATIVA BASEADO EM ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.

ORIENTADOR: PROF. DR. CELIO PASQUINI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR FRANCISCO SENNA VIEIRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. CELIO PASQUINI.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Vieira, Francisco Senna (1988-).

V636d Desenvolvimento e avaliação de um instrumento para determinação de estabilidade oxidativa baseado em espectroscopia de emissão no infravermelho próximo / Francisco Senna Vieira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Celio Pasquini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

 Espectroscopia de emissão no infravermelho próximo.
 Estabilidade oxidativa.
 Óleos comestíveis.
 Instrumentação.
 Pasquini, Celio.
 Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Química.
 III.
 Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development and evaluation of a near-infrared emission spectroscopy instrument for determination of oxidative stability

Palavras-chave em inglês:

Near-infrared emission spectroscopy Oxidative stability Edible oils Instrumentation

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Celio Pasquini [Orientador] Edvaldo Sabadini Fabiano Barbieri Gonzaga

Data de defesa: 16/07/2012

Programa de pós-graduação: Química

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Celio Pasquini, pela orientação e atenção, pelas inúmeras ideias, por ter me ensinado a ter mais iniciativa, e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Jarbas José Rodrigues Rohwedder, pela enorme disposição em me ajudar nos problemas que surgiram ao longo deste trabalho, sendo incansável até que as soluções fossem encontradas.

A toda equipe do GIA, pelo apoio e amizade ao longo do período de duração do mestrado.

Às instituições CNPq, INCTAA e IQ-UNICAMP, sem as quais este trabalho não existiria.

Ao Mário da oficina de mecânica fina do IQ- UNICAMP, pela extrema dedicação e rapidez em construir os componentes necessários ao equipamento desenvolvido neste trabalho.

Ao Prof. José Carlos Marques Freitas, por ter me inspirado a me tornar um químico.

Aos Professores Marco Antonio Chaer Nascimento e Thiago Messias Cardozo, pela imensa contribuição na construção de meu pensamento científico.

A vários professores do IQ – UNICAMP, do IQ – UFRJ e do IFRJ, que contribuíram imensamente para a minha formação profissional, visão de mundo atual e perspectivas de vida.

Aos amigos Carlos Eduardo de Moura, Rene Pfeifer, Felipe Fantuzzi, Raphael Vilela, Ricardo Rodrigues, Laura Joana Lopes, Mariana Motta e Rafael Mendes, por muitas coisas.

Ao meu irmão, pelo apoio incondicional e aguentar minhas maluquices mais do que ninguém.

À minha mãe, pela vida, e por estar sempre ao meu lado, mesmo à distância, e me apoiar em minhas escolhas.

Ao meu pai, pela vida, e pelos exemplos de vida enquanto estava por aqui e que serão sempre lembrados por mim.

۷

CURRICULUM VITAE

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2011-2012: Mestrado em Química.
 Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.
 Título: Desenvolvimento e Avaliação de um Instrumento para a Determinação da Estabilidade Oxidativa Baseado em Espectroscopia de Emissão no Infravermelho Próximo.
 Orientador: Celio Pasquini
 Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 2006-2010: Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil. Título: O Papel da Interferência Quanto-Mecânica em Reações de Adição ao Eteno.

Orientador: Marco Antonio Chaer Nascimento.

 2003-2005: Ensino Profissional de nível técnico em Curso Técnico de Meio Ambiente.

CEFET Química de Nilópolis/Unidade Rio de Janeiro, CEFET QUÍMICA/RJ, Brasil.

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- 2006-2008: Departamento de Química Analítica/ Instituto de Química UFRJ DQA – Laboratório de Análise Ambiental e Mineral (LAM).
 Vínculo: Estagiário.
- 2006-2006: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho UFRJ IBCCF Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franco.
 Vínculo: Estágio.

3. PRÊMIOS E TÍTULOS

- 2011: Cum Laude UFRJ
- 2007: XX Semana Acadêmica de Química da UFF, Prêmio de Produções Científicas Otto Gottlieb, 1º lugar, Universidade Federal Fluminense.
- 2006: 2º lugar, XXVI Semana da Química, CEFET Química.

4. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

 SENNA, F., FANTUZZI, F. Métodos Gráficos e Planilhas Eletrônicas: uma Abordagem para o Ensino de Química Analítica na Graduação. VII Encontro Nacional de Pesquisadores de Educação em Ciências, 2009, Florianópolis -SC.

5. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

- SENNA, F., CARDOZO, T. M., NASCIMENTO, M. A. C. Análise da Energia de Interferência em Reações de Adição Eletrofílica. III Simpósio de Estrutura Eletrônica e Dinâmica Molecular, 2010, Brasília - DF, p.79.
- SENNA, F., CARDOZO, T. M., NASCIMENTO, M. A. C. Cálculo de Energias de Interferência em Ligações C C e C H de Hidrocarbonetos Saturados. XV
- Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2009, Poços de Caldas MG, p.306.
- SENNA, F., PASQUINI, C. Development of a Near Infrared Emission Photometer for Measuring Oxidative Stability of Oils and Fats. IUFoST - XVI World Congress of Food Science and Technology, 2012, Foz do Iguaçu - PR, p. 58.

6. ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

- FANTUZZI, F., MARÇAL, D. V. L. M., SENNA, F., VÁRIOS. XVIII Semana da Química da UFRJ, 2010.
- PFEIFER, R., SENNA, F., VÁRIOS. XVII Semana da Química da UFRJ, 2009.
- ALVARENGA S. D. S., PFEIFER, R., SENNA, F., VÁRIOS. XVI Semana da Química da UFRJ, 2008.
- FREITAS, G. N., MACEDO, R. C., SENNA, F., VÁRIOS. XV Semana da Química da UFRJ, 2007.

RESUMO

A autoxidação de lipídeos é uma das principais causas de degradação de óleos e gorduras. Este processo gera uma série de compostos indesejáveis, tais como, peróxidos, hidroperóxidos e ácidos carboxílicos de cadeia curta. A determinação da estabilidade oxidativa de um óleo, é, portanto, essencial para estimar o tempo de prateleira - um parâmetro importante para a indústria alimentícia. Para quantificar o grau de oxidação de um óleo, uma série de parâmetros pode ser utilizada, como os índices de peróxido e de anisidina, o teor de dienos conjugados, dentre outros. Métodos acelerados foram desenvolvidos para a estabilidade oxidativa - uma medida da variação do grau de oxidação ao longo do tempo -, em particular o método Rancimat. Nele, uma amostra de cerca de 3 g de óleo é aquecida em temperaturas na faixa de 100-130 ºC, e um fluxo de ar constante é passado através da amostra e carreado para um recipiente contendo água deionizada. O monitoramento da condutividade elétrica desta solução permite identificar o período de tempo necessário para que a taxa de formação de ácidos carboxílicos de cadeia curta se torne significativa. Este tempo é denominado tempo de indução (TI), e corresponde ao índice de estabilidade oxidativa (OSI -Oxidative Stability Index) do óleo. A espectroscopia de emissão no infravermelho próximo (NIRES), por outro lado, permite o monitoramento de hidroperóxidos, devido ao aumento e alargamento de uma banda em 2900 nm que ocorre ao longo do processo oxidativo. Neste trabalho foi desenvolvido e avaliado um fotômetro NIRES, dedicado para a determinação de estabilidade oxidativa. No método NIRES, uma amostra de 10 µL é aquecida a uma temperatura fixa (140 -180 °C), sendo mantido um fluxo constante de ar purificado ao redor da amostra. A emissividade do óleo em 2850 e 2675 nm é continuamente monitorada com um detector de PbS, sendo a seleção dos comprimentos de onda realizada por dois filtros de interferência. A formação de hidroperóxidos ocasiona um aumento significativo da emissividade a 2850 nm, permitiindo a determinação de TI de forma análoga ao método Rancimat.. O equipamento construído apresenta uma série de vantagens com relação ao método Rancimat, tais como: rapidez na análise, simplicidade operacional, menor consumo de amostra e a possibilidade de determinar a estabilidade oxidativa em temperaturas de fritura (140-180 ºC). A precisão do método NIRES encontrada é equivalente à precisão do método Rancimat, e existe uma correlação entre eles (R = 0.90).

ABSTRACT

Lipid autoxidation is the main cause of fats and oils deterioration. This process generates a series of undesirable compounds, such as hydroperoxides and low chain carboxylic acids. Thus, determination of oil's oxidative stability is essential for estimation of the shelf life – an important parameter for the food industry. Several parameters are used for quantifying the degree of oxidation of an oil sample, such as the peroxide value, anisidine value, and conjugated dienes. Accelerated methods have been developed for measuring oxidative stability - the variation of the degree of oxidation with time -, particularly the Rancimat method. In this method, a constant air flow passes through a 3 g oil sample, heated at 110 -130°C, and then is collected in a vessel containing deionized water. By monitoring the deionized water's conductance, an induction time (IT) – which corresponds to the Oil Stability Index (OSI) – can be determined. On the other hand, near infrared emission spectroscopy (NIRES) allows the determination of IT by monitoring the formation of hydroperoxides. As the oil undergoes autoxidation, a band at 2900 nm becomes broader and more intense. In this work, a near infrared emission spectroscopy photometer, dedicated to determination of oxidative stability, has been developed and evaluated. In the NIRES method, a 10 μ L oil sample is heated at a constant temperature (140 - 180 °C), and a purified air flow is maintained around the sample. The oil's emissivity at 2675 and 2850 nm is continually monitored with a PbS detector, and the wavelengths are selected with two interference filters. Formation of hydroperoxides increases significantly the emissivity at 2900 nm, allowing the determination of IT in a way analogous to the Rancimat method. The developed equipment presents several advantages towards the Rancimat, including: faster analysis, lower sample consumption, operational simplicity, and the possibility of measuring oxidative stability at frying temperatures. Also, the method's precision is equivalent to the Rancimat's precision, and a correlation between them has been found (R = 0.90).

ÍNDICE

| Lista de Tabelas xv |
|--|
| Lista de Figuras xvii |
| Lista de Abreviaturas xix |
| 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 1 |
| 1.1 Estabilidade Oxidativa 1 |
| 1.2 Atividade de Antioxidantes5 |
| 1.3 Efeito de Metais na Autoxidação9 |
| 1.4 Métodos de Determinação de Estabilidade Oxidativa |
| 1.5 Estabilidade Oxidativa de Biodiesel15 |
| 1.6 Espectroscopia no Infravermelho Próximo - NIR 16 |
| 1.7 Espectroscopia de Emissão no Infravermelho17 |
| 1.8 Uso da Absorção no Infravermelho para Determinação de Estabilidade Oxidativa24 |
| 1.9 Uso da Emissão no Infravermelho Próximo para Determinação de Estabilidade Oxidativa25 |
| 1.10 Objetivos |
| 2. PARTE EXPERIMENTAL |
| 2.1 Controle de Temperatura da Amostra 28 |
| 2.2 Controle da Atmosfera da Amostra31 |
| 2.3 Sistema de Modulação 32 |
| 2.4 Seletor de Comprimento de Onda |
| 2.5 Sistema de Detecção 38 |
| 2.6 Controle do Instrumento 40 |
| 2.7 Procedimento de Análise 47 |
| 2.8 Calibração do Instrumento 47 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49 |
| 3.1 Avaliação do Controle de Temperatura 49 |
| 3.2 Avaliação do Sinal Analítico |
| 3.2.1 Determinação do Ruído Instrumental |
| 3.2.2 Relação entre a Temperatura e o Ruído |

| | 3.3 Comparação entre Diferentes Tipos de Óleos | 54 |
|---|--|----|
| | 3.4 Influência da Resposta Utilizada para a Determinação de TI | 55 |
| | 3.5 Efeito da Temperatura sobre TI | 58 |
| | 3.6 Repetibilidade | 60 |
| | 3.7 Avaliação do Tempo de Integração para um Único Filtro | 67 |
| | 3.8 Avaliação Preliminar de Parâmetros Operacionais | 69 |
| | 3.8.1 Influência do Material da Célula | 69 |
| | 3.8.2 Influência do Volume de Amostra | 70 |
| | 3.9 Investigação Preliminar de Amostras de Biodiesel | 73 |
| | 3.10 Análises Comparativas com o Rancimat | 75 |
| 4 | . CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 85 |
| 5 | . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |

Lista de Tabelas

| Tabela I: Análise percentual de quatro frações de uma amostra de linoleato demetila autoxidada separadas cromatograficamente.12 |
|---|
| Tabela II: Estabilidade da temperatura registrada para um período de 1 hora em cada SP |
| Tabela III: Avaliação do sinal da célula vazia52 |
| Tabela IV: Avaliação do sinal do óleo de silicone |
| Tabela V: Tempos de indução calculados a partir das diferentes respostas 58 |
| Tabela VI: Medidas de uma amostra de óleo do milho em cinco temperaturas diferentes. Valores obtidos a partir da curva da razão |
| Tabela VII: Medidas de uma amostra de óleo do milho em cinco temperaturas diferentes. Valores obtidos a partir da curva da emissividade a 2850 nm |
| Tabela VIII: Teste-F para as variâncias calculadas a partir de e_{2850} e e_{2850}/e_{2675} . 62 |
| Tabela IX: Teste-t pareado para as médias de TI calculadas a partir de e ₂₈₅₀ e e ₂₈₅₀ /e ₂₆₇₅ |
| Tabela X: Medidas de uma amostra de óleo de milho em cinco temperaturas diferentes. Valores obtidos a partir da curva da emissão bruta a 2850 nm |
| Tabela XI: Teste-t pareado para as médias de TI calculadas a partir de L ₂₈₅₀ e e ₂₈₅₀ /e ₂₆₇₅ |
| Tabela XII: Determinação de TI de três amostras de óleos em quintuplicata 67 |
| Tabela XIII: Tempos de indução de uma amostra de óleo de milho analisada com alíquotas de volumes diferentes |
| Tabela XIV: Medidas de amostras de biodiesel realizadas a 140 °C com o fotômetro NIRES |
| Tabela XV: Amostras de óleo analisadas76 |
| Tabela XVI: Composição de ácidos graxos e quantidade de antioxidantes das amostras de óleo analisadas |
| Tabela XVII: Valores de TI obtidos para amostras de óleos comestíveisempregando o fotômetro NIRES desenvolvido e o Rancimat.78 |
| Tabela XVIII: Análise de Variância para as determinações de TI feitas com ambos os métodos |
| Tabela XIX: Teste F entre os métodos NIRES e Rancimat |

| Tabela XX: Comparação e | entre as condições | experimentais of | dos métodos | Rancimat |
|-------------------------|--------------------|------------------|-------------|----------|
| e NIRES | - | | | 84 |

Lista de Figuras

| Figura 1: Mecanismo de oxidação de um óleo genérico |
|--|
| Figura 2: Principais compostos antioxidantes5 |
| Figura 3: Concentração das espécies envolvidas em um mecanismo de autoxidação8 |
| Figura 4: Formação de peróxidos e ácidos carboxílicos ao longo do tempo em um processo de autoxidação 11 |
| Figura 5: Modelo de uma curva de estabilidade oxidativa típica obtida pelo Rancimat |
| Figura 6: Sistema formado por dois compartimentos isolados do ambiente externo, com uma radiação isotrópica arbitrária aprisionada |
| Figura 7: Diagrama de radiação térmica21 |
| Figura 8: Comparação entre espectros de absorbância e emissividade de uma amostra de óleo de silicone |
| Figura 9: Espectros de emissão bruta de uma amostra de óleo de silicone com variação da espessura |
| Figura 10: (a) Espectros de emissão obtidos pelo espectrofotômetro NIRES. (b) Curvas de estabilidade obtidas com esta metodologia |
| Figura 11: Diagrama esquemático do instrumento proposto |
| Figura 12: Processo de auto-sintonia do controlador PID utilizado |
| Figura 13: Sistema de aquecimento da amostra |
| Figura 14: Diagrama esquemático do conjunto de válvulas solenóides utilizado para controle da atmosfera da amostra |
| Figura 15: Variação da razão sinal/ruído do detector utilizado em função da freqüência de modulação |
| Figura 16: Diagrama do circuito das chaves ópticas utilizadas |
| Figura 17: Diagrama de blocos básico de um amplificador lock-in |
| Figura 18: Amplificador lock-in utilizado.Modelo LIA-MV-150, Femto |
| Figura 19: Diagrama do circuito utilizado para controle do motor de passo |
| Figura 20: Diagrama esquemático da operação do SAA1027 sobre o motor de passo |
| Figura 21: Representação do esquema de posicionamento dos filtros de interferência |
| Figura 22: Montagem atual do fotômetro |
| Figura 23: Filtros de interferência implementados no fotômetro |
| Figura 24: Etapas do algoritmo para o cálculo do CRC |

| Figura 25: Fluxograma geral do programa de controle do fotômetro 42 |
|--|
| Figura 26: Subrotina de aquisição de dados do programa |
| Figura 27: Telas geradas pelo programa de controle do instrumento - TINIRES. 46 |
| Figura 28: Células de alumínio empregadas |
| Figura 29: Tempos de estabilização em um procedimento de troca da célula de amostra |
| Figura 30: Flutuações do sinal do corpo negro medido a 2850 nm (verde) e da temperatura (vermelho) |
| Figura 31: Comparação entre curvas de estabilidade obtidas para três tipos de óleo |
| Figura 32: Curvas de estabilidade oxidativa em função de diferentes respostas 57 |
| Figura 33: Curvas de estabilidade para uma mesma amostra de óleo de milho em cinco temperaturas diferentes |
| Figura 34: Comparação entre as curvas de estabilidade obtidas com a emissividade de um único filtro (a) e com a razão entre as emissividades (b) 63 |
| Figura 35: Curvas de estabilidade obtidas em quintuplicata para uma amostra de óleo de milho, a 150 $^{\rm o}$ C |
| Figura 36: Curvas de estabilidade obtidas com o monitoramento somente do filtro a 2850 nm, com tempos de integração do sinal diferentes |
| Figura 37: Curvas de estabilidade de uma amostra de óleo de canola obtidas com a célula de ferro e com a célula de alumínio |
| Figura 38: Curvas de estabilidade obtidas com diferentes volumes de óleo 72 |
| Figura 39: Curva de estabilidade de uma amostra de biodiesel |
| Figura 40: Comparação entre os resultados obtidos com o Rancimat e com o fotômetro NIRES |
| Figura 41: Comparação entre os resultados obtidos com o Rancimat e com o fotômetro NIRES, excluindo as amostras de azeite e óleo de soja com TBHQ 82 |

Lista de Abreviaturas

- AOCS American Oil Chemists' Society
- ANOVA Analysis of Variance
- AOM Active Oxygen Method
- AOTF Acousto-Optic Tunable Filter
- AV Anisidine Value
- BHA Butylated hydroxyanisole
- BHT Butylated hydroxytoluene
- LIA Lock-in Amplifier
- NIR Near Infrared
- NIRES Near Infrared Emission Spectroscopy
- OSI Oil Stability Index
- PG Propyl gallate
- PID Proportional, Integral, Derivative
- PV Peroxide Value ou Process Variable
- SP Set point
- TBHQ tert-butylhydroquinone
- TI Tempo de Indução

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Estabilidade Oxidativa

A oxidação de lipídeos é uma das principais causas da degradação de óleos e gorduras. Ela é responsável pela diminuição do valor nutricional de óleos comestíveis, além de proporcionar ao óleo sabores desagradáveis [GERTZ e KOCHHAR 2000]. Dentre os seus principais produtos, destacam-se os peróxidos, de tal modo que o índice de peróxido (*peroxide value* – PV) é uma das medidas mais tradicionais utilizadas para determinar o grau de oxidação de um óleo ou gordura [AOCS Official Method Cd 8-53]. O tempo a partir do qual a taxa de formação de produtos de oxidação se torna apreciável é definida como a estabilidade oxidativa do material. A estabilidade oxidativa de um determinado óleo depende de uma série de fatores. Dentre eles, destacam-se a composição do material em termos de ácidos graxos¹, e a presença de antioxidantes naturais ou artificiais.

Antes do desenvolvimento de métodos automáticos para determinação do índice de estabilidade oxidativa (OSI – Oil Stability Index), o método oficial vigente era o Active Oxygen Method (AOM). O AOM consiste na oxidação estimulada de uma amostra de óleo a temperaturas elevadas (em geral, 100 °C) [AOCS Official Method Cd 12-57]. Nele, medidas do índice de peróxido são realizadas ao longo do tempo até que seja atingido um valor crítico pré-estabelecido. Posteriormente este método foi substituído pelo Rancimat [AOCS Official Method Cd 12b-92], o qual mede continuamente o grau de oxidação da amostra baseado na formação de ácidos carboxílicos de baixo peso molecular. O tempo necessário para que a oxidação efetivamente tenha início é chamado de tempo ou período de indução (TI). O TI representa o tempo necessário para o oxigênio consumir os

¹ Em se tratando de óleos vegetais, a composição em termos de ácidos graxos não se refere à presença de ácidos graxos livres no meio – que, em geral, existem em pequena proporção – mas sim aos radicais de ácidos graxos que constituem as moléculas de triacilgliceróis – os principais constituintes do óleo.

antioxidantes presentes no óleo, e é verificado experimentalmente pelo ponto no qual a taxa de formação de peróxidos ou ácidos carboxílicos se torna significativa.

Um fator indispensável no estudo de estabilidade oxidativa é considerar o mecanismo predominante nas condições experimentais. A presença de antioxidantes, a temperatura e outros parâmetros exercem influência considerável na cinética de degradação do óleo [FARHOOSH 2007, REYNHOUT 1991, SCHAICH 1992, SEPPANEN et al. 2010]. Assim, antes de detalhar cada método e suas particularidades, é essencial ter conhecimento dos diversos tipos de reação passíveis de ocorrer de acordo com as condições de trabalho. De fato, a diferença de mecanismo entre a temperatura ambiente e aquelas utilizadas na maioria dos métodos acelerados é a causa principal da dificuldade de correlacionar o tempo de indução com o tempo de prateleira.

Na faixa de 20 a 100 °C, o alto teor de umidade proporciona uma predominância de reações de hidrólise. Nesta faixa, os principais produtos de oxidação são mono e di-glicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres. Nesta mesma faixa de temperatura também ocorrem reações de autoxidação [GERTZ e KOCHHAR 2000]. Tais reações seguem um mecanismo radicalar, e são iniciadas por peróxidos presentes como contaminação e/ou íons metálicos. A presença de nitrogênio ou substâncias antioxidantes como o α-tocoferol inibem a autoxidação. A autoxidação gera aldeídos, cetonas, ácidos graxos livres, entre outros produtos. A medida do teor de produtos primários da oxidação, como hidroperóxidos, é muito empregada na determinação da estabilidade oxidativa em uma série de métodos [AOCS Official Method Cd 8-53, THOMSEN et al. 2000, VELASCO 2004, GONZAGA e PASQUINI 2006], incluindo o método proposto neste trabalho.

Nas temperaturas de fritura (140 – 180 °C), por outro lado, as principais reações são reações de polimerização [GERTZ e KOCHHAR 2000]. A polimerização é iniciada geralmente por íons H⁺, e gera dímeros e oligômeros de triglicerídeos, bem como ácidos graxos cíclicos. Tais reações também podem ser inibidas por uma série de antioxidantes.

2

Apesar da complexidade dos caminhos de reação possíveis, e da competição entre eles de acordo com as condições, o método proposto neste trabalho para determinar estabilidade oxidativa pressupõe uma via de oxidação na presença de oxigênio, a chamada autoxidação. Simplificadamente, este processo pode ser representado pelo mecanismo radicalar exibido na Figura 1. Nela, está ilustrada a autoxidação de um ácido graxo monoinsaturado arbitrário [FRENKEL 2005].

$$R_1 \longrightarrow R_2 \qquad H \qquad (1)$$

$$R_1 \xrightarrow{R_2} 0' \xrightarrow{R_1} R_2$$
(2)

$$R_1 \longrightarrow R_2 \longrightarrow R_1 \longrightarrow R_2 + Ho'$$
(4)

$$R_1 \longrightarrow R_2 \longrightarrow R_1 \longrightarrow R_2$$
 (5)

$$R_1 \longrightarrow HO' \longrightarrow R_1 \longrightarrow O$$
 (7)

$$\overset{HO}{\longrightarrow} \overset{**}{\longrightarrow} \overset{R_2}{\longrightarrow} \overset{(8)}{\longrightarrow} \overset{(8)$$

Figura 1: Mecanismo de oxidação de um óleo genérico. (1) Etapa de iniciação; (2) e (3) etapas de propagação; (4 - 9) decomposição dos hidroperóxidos.

*Composto monitorado pelo método proposto neste trabalho;

**Composto monitorado pelo método Rancimat.

A autoxidação requer uma espécie radicalar - representada por l na Figura 1

– para iniciar a reação em cadeia. Este iniciador usualmente é um radical peróxido, que pode ter sido originado de duas formas. A primeira delas é a decomposição térmica ou catalisada por metais de hidroperóxidos presentes como impureza no óleo. A outra possível origem é a decomposição térmica ou radiativa – provocada pela luz solar – de cetonas, também presentes como impureza no óleo. Uma vez formado, o iniciador irá abstrair um dos dois hidrogênios na posição alfa à insaturação. Na Figura 1, apenas uma possibilidade está ilustrada. Um radical alílico é então formado, e sofre um ataque do oxigênio, gerando um radical peróxido. Este ataque pode ocorrer também em duas posições distintas, fato que foi omitido na Figura 1 para maior clareza. Torna-se evidente então, que considerando apenas a autoxidação de um único ácido graxo monoinsaturado, quatro peróxidos distintos podem ser formados. Naturalmente, a variedade de produtos formados em um sistema com uma composição de ácidos graxos mais abrangente é muito maior do que neste exemplo.

De acordo com o mecanismo considerado, os ácidos carboxílicos de cadeia curta são formados somente em etapas de terminação. Ou seja, espera-se que somente após ter sido formada uma determinada quantidade de hidroperóxidos é que serão formados os ácidos. Métodos baseados na detecção de hidroperóxidos devem, portanto, estimar tempos de indução menores com relação a métodos baseados na detecção de ácidos carboxílicos. Conforme será descrito nas seções posteriores, o método proposto neste trabalho é baseado na detecção de hidroperóxidos de hidroperóxidos, contrastando com o Rancimat, que é sensível à presença de ácidos carboxílicos de cadeia curta.

1. 2 Atividade de Antioxidantes

Conforme discutido, outro parâmetro importante a ser considerado na degradação de lipídeos é a presença de compostos antioxidantes, tanto de origem natural quanto adicionados aos óleos para elevar o tempo de prateleira. O tempo de indução está diretamente relacionado com a ação dos agentes antioxidantes nas etapas de iniciação e propagação da reação em cadeia ilustrada na Figura 1.

Os principais antioxidantes naturais são os tocoferóis, entre eles a vitamina E (α-tocoferol), e os sintéticos mais comuns são o hidroxitolueno butilado (*butylated hydroxytoluene* – BHT), hidroxianisol butilado (*butylated hydroxyanisole* – BHA), propil galato (*propyl gallate* – PG) e a tert-butilhidroquinona (*tert-butylhydroquinone* – TBHQ). Na Figura 2 são apresentadas as estruturas destes compostos.



Figura 2: Principais compostos antioxidantes. (a) BHA; (b) BHT; (c) α-tocoferol; (d) PG.

Em um sistema modelo, formado por um único ácido graxo, a oxidação é prontamente iniciada e propagada na ausência de antioxidantes [COSGROVE et al. 1987, FRENKEL 2005, HUANG et al. 2005]. No trabalho citado, azocompostos são adicionados como iniciadores, e, não havendo antioxidantes naturais, a presença destes também é controlada. Consideremos o mecanismo de formação de hidroperóxidos:

$$LH + I \xrightarrow{k_i} L \cdot + IH \tag{1}$$

$$L \cdot + O_2 \xrightarrow{k_0} LOO \cdot \tag{2}$$

$$L00 \cdot + LH \xrightarrow{k_p} L \cdot + L00H \tag{3}$$

$$2L00 \xrightarrow{k_t} L00L + O_2 \tag{4}$$

Assumindo uma condição de estado estacionário para L' e LOO:

$$\frac{d[L \cdot]}{dt} = R_i - k_o[L \cdot][O_2] + k_p[LOO \cdot][LH] = 0$$
(5)

$$\frac{d[LOO \cdot]}{dt} = k_o[L \cdot][O_2] - k_p[LOO \cdot][LH] - 2k_t[LOO \cdot]^2 = 0$$
(6)

$$R_i - 2k_t [LOO \cdot]^2 = 0 \tag{7}$$

onde R_i é a velocidade da etapa de iniciação. A taxa de formação de hidroperóxidos será dada por:

$$\frac{d[LOOH]}{dt} = -\frac{d[O_2]}{dt} = k_p \left(\frac{R_i}{2k_t}\right)^{\frac{1}{2}} [LH]$$
(8)

Neste sistema modelo, R_i é quantificado adicionando um antioxidante em concentração conhecida, e o valor do tempo de indução estará diretamente relacionado com essa taxa de iniciação. Na presença de antioxidantes que atuam diretamente na reação em cadeia das equações 2 e 3, as seguintes etapas são adicionadas ao mecanismo:

$$LOO \cdot +AH \longrightarrow A \cdot +LOOH \tag{9}$$

$$L \cdot +AH \longrightarrow A \cdot +LH \tag{10}$$

$$A \cdot + L00 \cdot \longrightarrow + L00A \tag{11}$$

$$2A \cdot \longrightarrow A_2 \tag{12}$$

Para ser eficiente, um antioxidante deve produzir um radical A⁻ que reaja lentamente com o lipídeo LH, mas rapidamente com o radical peróxido (equação 11). Nestas condições, R_i será dada por:

$$R_i = \frac{n[AH]}{TI} \tag{13}$$

onde n é o coeficiente estequiométrico do antioxidante AH. Esta abordagem permite determinar as taxas de formação de hidroperóxidos a partir do éster metílico de diferentes ácidos graxos. Em 1987, Cosgrove, J. P. e colaboradores determinaram o valor dessa taxa para os ácidos, linoleico (18:2,² ácido *cis,cis*-9,12-octadecadienóico), linolênico (18:3, ácido (9Z,12Z,15Z)-octadecatrienóico), araquidônico (20:4, ácido 5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraenoico) e docosahexaeanóico (ácido (4*Z*,7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenóico), e concluíram que a oxidabilidade do ácido graxo aumenta com o número de insaturações.

Em 1995, Abuja, P. M. e Esterbauer, H. realizaram uma simulação da cinética de autoxidação de lipoproteínas, integrando as equações diferenciais do mecanismo apresentado. Apesar da diferença evidente entre lipoproteínas e os ácidos graxos, as considerações a respeito do mecanismo de autoxidação empregadas pelos autores foram bastante semelhantes às apresentadas aqui, inclusive a atuação de antioxidantes. Assim, o perfil das curvas de concentração das espécies em função do tempo obtido por eles (Figura 3) deve ser semelhante ao do sistema discutido neste trabalho. Nele, observa-se a que o tempo de indução é justamente o tempo necessário para que o α -tocoferol seja completamente consumido – chamado de *lag time* pelos autores.

² Na literatura especializada de óleos e gorduras, a notação N:M para representar um ácido graxo é muito utilizada. Nela, N indica o número de carbonos na molécula, e M o número de insaturações. Naturalmente, esta notação não é exata – pressupõe-se que o leitor esteja familiarizado com nomes comuns como "oleico" e "linoleico", por exemplo. Assim, costuma-se evitar o uso da nomenclatura IUPAC nestes casos, de modo a tornar a leitura do texto mais fluida.



Figura 3: Concentração das espécies envolvidas em um mecanismo de autoxidação. Retirado de [ABUJA, P. M. e ESTERBAUER, H. 1995].

Um óleo apresenta, na verdade, uma composição variada de ácidos graxos. Há também compostos antioxidantes naturais, como tocoferóis, e quantidades traço de substâncias que podem facilitar a iniciação das reações em cadeia, tais como hidroperóxidos, cetonas, e metais. É evidente, portanto, que o sistema modelo descrito anteriormente constitui uma aproximação grosseira para uma mistura complexa como um óleo natural. Contudo, a compreensão de um sistema simples como o apresentado permite inferir em um caso real quais fatores podem estar contribuindo para uma condição de maior ou menor resistência à oxidação.

1.3 Efeito de Metais na Autoxidação

Se por um lado os antioxidantes atuam como protetores do óleo, íons metálicos presentes como impureza podem catalisar a autoxidação através de uma série de mecanismos [SCHAICH 1992, MINOTTI e AUST 1992, MINOTTI 1993]. O primeiro deles é a reação direta do íon metálico com a insaturação do lipídeo, liberando um íon H⁺ e gerando o radical L⁻, que irá iniciar a reação em cadeia. Íons de Cu, Fe, Mn, Ni e Co podem atuar desta forma.

$$M^{(n+1)+} + LH \longrightarrow L \cdot + M^{n+} + H^+ \tag{14}$$

Os metais também podem atuar reagindo com o oxigênio molecular, de modo a gerar espécies reativas como HO⁻₂, O⁻₂ e H₂O₂.

$$M^{n+} + O_2 \longrightarrow M^{(n+1)+} + O_2^{-} \tag{15}$$

$$H^+ + 0 \cdot_2^- \longrightarrow HO \cdot_2 \tag{16}$$

Além de interferir na etapa de iniciação, íons metálicos também podem acelerar a reação reagindo com hidroperóxidos. Este processo ocorre preferencialmente para os íons Fe²⁺ e Fe³⁺, e favorece a formação de radicais reativos como peróxidos e alcóxidos.

$$Fe^{3+} + LOOH \longrightarrow LOO \cdot + H^+ + Fe^{2+} \tag{17}$$

$$Fe^{2+} + LOOH \longrightarrow LO \cdot + OH^{-} + Fe^{3+}$$
(18)

A taxa de reação dos peróxidos e alcóxidos com a molécula de lipídeo original (LH) é muito mais rápida do que a taxa de reação do mesmo com o radical L^{*}. Assim, a velocidade da etapa de propagação da reação em cadeia aumenta.

1.4 Métodos de Determinação de Estabilidade Oxidativa

Uma série de métodos tem sido empregada para quantificar a estabilidade de óleos e gordura, todos eles com a finalidade de estimar o tempo de prateleira do material. Há de se considerar que existem duas grandes classes de métodos. A primeira, os métodos a longo prazo, impõem a autoxidação ao óleo em temperaturas próximas à ambiente, não ultrapassando 60 ºC [FRENKEL 2005], em geral. A segunda categoria consiste de uma série de métodos acelerados, realizados tipicamente a 100 °C [AOCS Official Method Cd 12-57, AOCS Official Method Cd 12b-92, CROSS 1970]. Os métodos da primeira categoria são mais adequados na determinação do tempo de prateleira, embora apresentem a desvantagem de serem lentos e pouco práticos. Métodos acelerados devem ser utilizados com cautela para estimar tempos de prateleira, em virtude dos diferentes tipos de reação que podem ocorrer em temperaturas elevadas. Por outro lado, métodos acelerados irão estimar de maneira mais exata a estabilidade condições de fritura. O instrumento desenvolvido neste trabalho. em particularmente, opera precisamente na faixa de temperaturas de fritura (140 -180 ºC).

Os índices de peróxido (PV) e de anisidina (*anisidine value* – AV) são os testes mais comumente empregados para medir o grau de oxidação de lipídeos. O índice de peróxido é obtido por métodos titulométricos ou espectrofotométricos, e seus resultados indicam a formação de produtos de propagação da reação em cadeia. Medidas de AV, por outro lado, fornecem resultados sobre estágios mais avançados de oxidação, uma vez que o teste é baseado na reação de aldeídos com a anisidina [FRENKEL 2005]. O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) também é indicativo da formação de aldeídos, mais especificamente do malonaldeído. Hidroperóxidos provenientes da decomposição de ácidos graxos polinsaturados apresentarão ligações duplas conjugadas, que são conhecidas por absorver fortemente radiação UV (em geral, $\lambda_{máx} = 234$ nm). Assim, a quantificação de dienos conjugados também é usada para medir o grau de oxidação do óleo.

10

Os índices de peróxido e de dienos conjugados são capazes de identificar etapas iniciais de um processo oxidativo. Medidas de aldeídos ou carbonilas em geral, irão caracterizar estágios mais avançados de oxidação, dado que compostos carbonílicos são originados pela decomposição de hidroperóxidos durante a autoxidação. A Figura 4 ilustra a variação ao longo do tempo destas medidas.



Figura 4: Formação de peróxidos e ácidos carboxílicos ao longo do tempo em um processo de autoxidação. Adaptado de [FRENKEL 2005]

Nenhuma das medidas mencionadas é ideal para caracterizar o estado de oxidação do lipídeo. Por exemplo, consideremos dois óleos: o primeiro, com alto teor de ácido oleico (18:1, ácido (9Z)-9-octadecenóico); o segundo, com alto teor de ácido linolênico (18:3). Ao longo de um processo de oxidação, é natural que o segundo apresente índice de dienos conjugados maior do que o primeiro, devido à maior concentração de ácidos polinsaturados, mesmo que ambos se encontrem em um mesmo estágio de oxidação.

Em 1977, Tsoukalas, B. e Grosch, W. realizaram uma investigação detalhada de oito métodos fotométricos utilizados para medir o grau de autoxidação de óleos e gorduras. Nesse trabalho, uma amostra de linoleato de metila foi autoxidada e

separada por cromatografia em quatro frações, caracterizadas de acordo com a Tabela I. Os resultados mostram que cada método apresenta seletividade diferente para os produtos de autoxidação, comprovando que os valores de cada uma delas não podem ser tomados como medidas absolutas do grau de autoxidação de um lipídeo qualquer.

Tabela I: Análise percentual de quatro frações de uma amostra de linoleato de metila autoxidada separadas cromatograficamente. Adaptado de [TSOUKALAS e GROSCH 1977].

| Nétodo | | Compostos | Mono | Peróxidos | Peróxidos |
|--------------------|--------|-----------------------|----------------|-----------|-----------|
| Metodo | | carbonílicos voláteis | hidroperóxidos | polares-1 | polares-2 |
| Abaarbânaia na LIV | 234 nm | 0 | 76 | 6 | 18 |
| ADSOIDANCIA NO UV | 270 nm | 34 | 0 | 38 | 28 |
| DPPH | | 0 | 71 | 4 | 25 |
| Teste do Fe | | 0 | 73 | 10 | 17 |
| | 452 nm | 0 | 44 | 12 | 44 |
| IBA | 530 nm | 0 | 0 | 31 | 69 |
| AV | | 25 | 25 | 17 | 33 |
| Teste de Kreis | | 14 | 17 | 37 | 32 |
| Índice de heptanal | | 44 | 10 | 36 | 10 |
| Teste F-3 | | 0 | 77 | 4 | 20 |

Dentre os métodos acelerados para medir o OSI, destaca-se o Rancimat [AOCS Official Method 12b-92]. Nele, uma amostra de óleo é aquecida a uma temperatura controlada, tipicamente 100-130 °C. Um fluxo de ar purificado é mantido continuamente através do óleo e coletado em um frasco contendo água deionizada. O monitoramento da condutividade elétrica da água contida neste recipiente permite a identificação do momento em que a amostra começa a sofrer oxidação em um grau apreciável. Inicialmente, a condutividade permanece

12

praticamente constante, apresentando apenas uma ligeiro aumento ao longo do tempo. A oxidação do óleo produz ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, que são levados pelo fluxo de ar, acarretando em um aumento significativo da condutividade sendo medida. Assim, é possível identificar duas regiões distintas na curva de condutividade ao longo do tempo, conforme ilustrado na Figura 5. O período de tempo necessário para que se atinja a região de oxidação é o próprio TI. O valor de TI é calculado a partir da intersecção entre duas retas ajustadas para cada região da curva. O Rancimat é atualmente o método oficial para a determinação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras estabelecido pela American Oil Chemists' Society.



Figura 5: Modelo de uma curva de estabilidade oxidativa típica obtida pelo Rancimat.

Embora seja considerado o método oficial, o método Rancimat apresenta uma série de limitações. A primeira delas, comum a todos os métodos acelerados de determinação de estabilidade de óleos, está na dificuldade de estabelecer uma correlação com o tempo de prateleira, um parâmetro extremamente importante para a indústria alimentícia [DE LA PRESA-OWENS 1995, FRENKEL 2005, KAYA et al. 1993]. O tempo de prateleira é estimado por uma extrapolação de TI até a temperatura ambiente. Contudo, na literatura são descritos casos em que o tempo de prateleira é subestimado ou superestimado por esta extrapolação [KAYA

et al. 1993]. Em particular, o óleo de girassol e o azeite de oliva representam os dois extremos deste erro na extrapolação – o tempo de prateleira do óleo de girassol é subestimado, enquanto que o tempo do azeite de oliva é superestimado [FRENKEL 2005].

Outra limitação, inerente a este método em particular, é o longo tempo de análise, que pode chegar a dezenas de horas. Embora os equipamentos permitam que sejam realizadas análises em temperaturas de até 200°C, esta prática não é recomendada. Análises efetuadas em temperaturas acima de 140 °C normalmente não apresentam resultados satisfatórios [HASENHUETTL e WAN 1992]. O aumento da temperatura permite que sejam carreados ácidos graxos de cadeia curta, presentes naturalmente no óleo. É evidente que se isso acontecer uma elevação da condutividade elétrica irá ocorrer, mas sem ter relação alguma com a oxidação da amostra. Essa elevação prematura da condutividade irá se traduzir em um tempo de indução mais curto do que o real. Além disso, existe o problema da competição entre os diferentes mecanismos de oxidação em temperaturas elevadas. Em todo caso, a limitação da temperatura imposta pelo Rancimat não possibilita a análise de estabilidade oxidativa em temperaturas de fritura – em geral de 140-180 °C.

Além do método Rancimat, diversas propostas tem sido feitas na literatura, notadamente a Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR – Electron Spin Resonance) e a Calorimetria Diferencial por Varredura (DSC – Differential Scan Calorimetry) [CROSS, C. K. 1970, TAN et al. 2002, THOMSEN et al. 2000, VELASCO et al. 2004]. Ambas têm se mostrado alternativas eficientes, apresentando correlações satisfatórias tanto com o Rancimat, quanto com o AOM [VELASCO et al. 2004]. A técnica ESR, particularmente, apresenta a vantagem de detectar produtos de propagação ao invés de produtos de terminação. Os tempos de indução medidos com esta técnica são bastante inferiores àqueles determinados pelo Rancimat, embora as análises sejam efetuadas nas mesmas temperaturas. Há também trabalhos indicando a aplicabililidade da análise por cromatografia gasosa com *headspace* para determinação de estabilidade oxidativa [RICHARDS 2005]. A principal vantagem desta técnica é a utilização de volumes

14

pequenos de óleo, o que é crucial em situações nas quais se dispõe de pouca quantidade de amostra – por exemplo, em cultivos experimentais em estufas, apenas algumas gotas de óleo estarão disponíveis.

Um método importante, que também tem sido empregado recentemente, é o PDSC (*Pressure Diferential Scanning Calorimetry*). Ele é baseado no aquecimento a temperaturas elevadas (130 - 200 °C) em atmosfera de oxigênio puro e alta pressão (500 psi). Esta técnica encontra aplicações em especial para óleos de alta estabilidade, devido à alta velocidade de análise oriunda das condições experimentais drásticas utilizadas [KODALI 2005]. Óleos muito estáveis representam uma limitação do método OSI, devido ao tempo exageradamente longo necessário para analisá-los.

1.5 Estabilidade Oxidativa de Biodiesel

O biodiesel é um produto da transesterificação de estéres de glicerol, principais constituintes de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal [DANTAS et al. 2011, KARAVALAKIS 2010, KNOTHE 2006]. A transesterificação é feita usualmente com metanol ou etanol com catálise básica. Em todo caso, estando as cadeias dos ácidos graxos originais do óleo presentes no éster produzido, é natural que o biodiesel também esteja sujeito a processos de oxidação por vias semelhantes àquelas dos óleos vegetais, como reações de polimerização e autoxidação [DANTAS et al. 2011].

A medida da estabilidade oxidativa do biodiesel, assim como para o óleo comestível, é um parâmetro importante para a indústria automobilística. A polimerização resultante da degradação do biodiesel pode ocasionar a formação de gomas, o que causaria sérios problemas ao desempenho do veículo. Atualmente, as mesmas técnicas empregadas para a determinação de estabilidade oxidativa de óleos são aplicadas para o biodiesel, sendo também o Rancimat o método oficial estabelecido pela American Oil Chemists' Society. O *European Standard EN 14112* determina um valor mínimo de 6 horas (a 110 °C) para o tempo de indução de um biodiesel utilizável [KNOTHE 2006]. O instrumento

desenvolvido neste trabalho também foi aplicado para amostras dessa natureza, embora ainda de uma forma preliminar.

1.6 Espectroscopia no Infravermelho Próximo - NIR

A espectroscopia no infravermelho próximo (*near infrared* – NIR) é caracterizada pela radiação eletromagnética na faixa de comprimento de onda de 750 a 3000 nm. A radiação nesta região é responsável por transições entre estados vibracionais de uma molécula, embora apresente energia maior do que a necessária para promover excitações a partir do estado fundamental. Nela, ocorrem transições oriundas unicamente de efeitos de comportamentos anarmônicos das vibrações – as chamadas bandas de sobretom ou de combinação [PASQUINI 2003]. Algumas substâncias, como moléculas orgânicas altamente conjugadas e óxidos de terras raras apresentam transições eletrônicas nessa região do espectro [WILLIAMS e NORRIS 2001].

As bandas de sobretom correspondem às transições com número quântico vibracional (Δv) maior do que 1. Em um modelo considerando apenas osciladores harmônicos, as regras de seleção previstas pela mecânica quântica indicam tais transições como proibidas, isto é, a probabilidade de elas ocorrerem é zero. No entanto, ao incluir termos de anarmonicidade, esta probabilidade deixa de ser nula, o que explica a presença das bandas de sobretom no espectro. Ainda assim, essas probabilidades são muito pequenas quando comparadas com uma transição fundamental, de modo que elas apresentam baixa intensidade.

As bandas de combinação surgem devido à possibilidade de ocorrerem transições que não correspondem a modos vibracionais puros, mas sim a acoplamentos de dois ou mais modos vibracionais. Tais acoplamentos irão acontecer somente para modos vibracionais que compartilhem pelo menos um átomo, no caso de estiramentos, ou uma ligação, no caso de deformações angulares. É possível que bandas de combinação carreguem informação sobre vibrações que, se puras, seriam inativas.

A presença de anarmonicidade nas vibrações não apenas torna possíveis as transições de sobretom, como também modifica os espaçamentos energéticos entre os estados vibracionais da molécula – na aproximação harmônica, todos os espaçamentos referentes a um mesmo modo vibracional seriam idênticos.

A ocorrência de bandas na região do NIR requer que as vibrações correspondentes apresentem alta anarmonicidade e grande variação no momento dipolo. Essas características encontram-se especialmente nos estiramentos dos grupos N-H, C-H e O-H. Assim, qualquer substância que possua estes grupamentos em sua estrutura apresentará bandas na região do NIR, fato que justifica a universalidade da técnica.

O grande número de bandas que surgem devido à sobretons, combinações, e combinações de sobtretons torna os espectros NIR bastante complexos. Assim, a maior parte dos métodos desenvolvidos com espectroscopia NIR deve lançar mão de técnicas quimiométricas, visto que raramente uma calibração univariada fornecerá resultados satisfatórios. Particularmente na determinação de estabilidade oxidativa de óleos, foi verificada a possibilidade de trabalhar de forma univariada [GONZAGA 2006].

1.7 Espectroscopia de Emissão no Infravermelho

As técnicas de emissão no infravermelho baseiam-se no aquecimento da amostra a uma temperatura estabelecida, seguida da aquisição de espectros da radiação emitida. Para qualquer corpo em equilíbrio térmico, haverá emissão de um espectro contínuo de radiação, independente da natureza do material – chamada radiação de corpo negro, ou radiação térmica.

A radiação térmica pode ser explicada através do seguinte exemplo [LANDSBERG 1978]. Consideremos dois compartimentos isolados, formados por paredes completamente reflexivas, nos quais uma radiação isotrópica de composição arbitrária está aprisionada (Figura 6). Neste sistema, os dois compartimentos são separados por uma parede transparente a um intervalo de v₁

até v₁ + d v. Supondo que cada compartimento contenha um corpo de um material qualquer, a energia radiativa transferida de um compartimento para o outro será dada pelas funções u(v, T, x, A) e u(v, T, y, B). Neste exemplo, x e y representam a dependência da função com a geometria de cada corpo, e A e B a dependência com o material, ou seja, as características espectrais da radiação emitida por eles. Se, contudo, u(v, T, x, A) for diferente de u(v, T, y, B), haverá transferência de energia entre dois corpos com a mesma temperatura, tornando, por exemplo, o corpo A com temperatura mais elevada que B, sem nenhuma influência externa. Como isso não é possível, a dependência com a forma e a composição dos dois corpos deve ser irrelevante para tal sistema em equilíbrio térmico. Logo,a função u é necessariamente u(v, T). Assim, a radiação térmica é independente da natureza do sistema, e estará presente sempre que houver equilíbrio térmico no sistema considerado.



Figura 6: Sistema formado por dois compartimentos isolados do ambiente externo, com uma radiação isotrópica arbitrária aprisionada.

A intensidade da radiação térmica em função do comprimento de onda é dada pela distribuição de Planck:

$$H(v,T) = \frac{\frac{2\pi h v^3}{c^2}}{e^{\left(\frac{hv}{kT}\right)} - 1}$$
(19)
onde h é a constante de Planck; v é a frequência; c é a velocidade da luz no vácuo; k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta do corpo negro.

Observando a equação 19, fica evidente a independência da radiação térmica com a natureza do material emissor. A distribuição de Planck descreve um sistema formado por osciladores capazes de absorver radiação de qualquer energia, com energia distribuída de acordo com a distribuição de Boltzmann. Quando um material se comporta de tal maneira que a radiação térmica é predominante, ele é chamado de corpo negro. Um corpo negro é um objeto idealizado que absorve e emite toda a radiação incidente, e apresenta um espectro idêntico à distribuição de Planck. Na prática, um corpo negro experimental é empregado como referência de máxima emissão. Isto porque um corpo negro perfeito apresenta reflexividade e transmissividade nulas.

Em 1950, McMahon, H. O. propôs um gráfico de radiação térmica (Figura 7), baseado nas grandezas reflexividade, transmissividade e emitância³ [McMAHON 1950]. Em princípio, qualquer corpo emissor pode ser caracterizado por essas três variáveis, que representam um ponto no diagrama ternário definido. A emitância de um corpo emissor é definida como a razão entre a luminância ($L(\bar{v},T)$ – emissão bruta) dele e a luminância de um corpo negro ($L_{BB}(\bar{v},T)$), de acordo com a equação 20.

$$E = \frac{L(\bar{\nu}, T)}{L_{BB}(\bar{\nu}, T)}$$
(20)

O vértice do topo do diagrama representa o corpo negro, e indica uma situação de máxima emissão. Os demais vértices representam um metal perfeito e um vácuo perfeito – que correspondem, respectivamente, a condições de reflexividade e transmissividade aparentes máximas.

A reflexividade verdadeira é sempre menor do que a observada, devido a uma série de reflexões internas que aumentam a reflexividade observada.

³ Originalmente, McMahon, H. O. definiu esta grandeza como emissividade. Mais adiante neste trabalho, porém, o conceito de emissividade será definido diferentemente, de acordo com outra proposta na literatura. Assim, para manter a consistência, o termo emissividade foi substituído por emitância no formalismo do diagrama ternário apresentado.

Analogamente, é definida uma transmissividade aparente, que por outro lado é sempre menor do que a transmissividade real. As equações 21 - 23 definem, respectivamente, as relações entre a emitância, a reflexividade e a transmissividade aparentes. Pode ser demonstrado que o somatório delas é igual à unidade.

$$E(\lambda,T) = \frac{[1-R(\lambda,T)][1-T(\lambda,T)]}{[1-R(\lambda,T)\cdot T(\lambda,T)]}$$
(21)

$$R^*(\lambda, T) = R(\lambda, T) \left\{ 1 + \frac{T^2(\lambda, T)[1 - R(\lambda, T)]^2}{[1 - R^2(\lambda, T) \cdot T^2(\lambda, T)]} \right\}$$
(22)

$$T^*(\lambda, T) = T(\lambda, T) \left\{ \frac{[1 - R(\lambda, T)]^2}{[1 - R^2(\lambda, T) \cdot T^2(\lambda, T)]} \right\}$$
(23)

$$E(\lambda, T) + T^*(\lambda, T) + R^*(\lambda, T) = 1$$
(24)

onde R(λ ,T) e T(λ ,T) representam a reflexividade e a transmissividade reais, respectivamente.



Figura 7: Diagrama de radiação térmica. Cada extremo corresponde a uma situação ideal. (E) Corpo negro perfeito. (T*) Vácuo absoluto. (R*) Metal perfeito. Adaptado de [McMAHON 1950].

Como o corpo negro representa o máximo de radiação que pode ser emitida nas condições experimentais, a escala de emitância varia de 0 a 1, de modo que (1- E) é uma grandeza análoga a transmitância em medidas de absorção. Tal como a transmitância, esta grandeza não varia linearmente com o caminho óptico, nem com a concentração da espécie emissora. Para obter uma relação linear da emissão com a concentração, define-se a emissividade:

$$e = -\log(1 - E) \tag{25}$$

A relação linear da emissividade com a concentração é a chamada Lei de Lambert-Beer para emissão [KERESZTURY 1995].

A espectroscopia de emissão no infravermelho não está baseada na radiação térmica. Pelo contrário, esta radiação deve ser minimizada de modo a permitir a visualização das características espectrais da amostra. A informação química está presente justamente em situações nas quais a fonte emissora apresenta desvios consideráveis de um corpo negro perfeito.

Tal como nas técnicas de absorção no infravermelho, as bandas de emissão observadas correspondem a transições vibracionais da substância – que, neste caso, é a própria fonte emissora. A diferença, no caso da emissão, é que a excitação é promovida termicamente, e que o sinal medido é proveniente do decaimento de estados energéticos – ao passo que, na absorção, o sinal medido provém da própria excitação. De fato, espectros de emissividade e absorbância são equivalentes, conforme observado na Figura 8.



Figura 8: Comparação entre espectros de absorbância e emissividade de uma amostra de óleo de silicone. T= 220 °C; V = 10 μL. Retirado de [GONZAGA 2006].

A espessura do material emissor deve ser avaliada com cautela, para evitar que ele tenda a se comportar como um corpo negro. Em um trabalho anterior do grupo [GONZAGA 2006] uma série de espectros de emissão de óleo de silicone foi adquirida, variando-se a espessura do óleo (Figura 9). Quanto mais espessa a amostra, mais os espectros se aproximam de uma distribuição de um corpo negro ideal.



Figura 9: Espectros de emissão bruta de uma amostra de óleo de silicone com variação da espessura. $T = 200 \ ^{\circ}C$; Espessuras (sentido da seta) = 0,09, 0,18, 0,29, 0,40, 0,47, 0,56, 0,75, 0,95 e 1,45 mm Retirado de [GONZAGA 2006].

A espectroscopia de emissão no infravermelho médio (MIRES) tem encontrado um número muito superior de aplicações [DEBLASE e COMPTON 1991] com relação à região do infravermelho próximo (NIRES), particularmente porque a emissão tende a ser mais intensa na primeira região. Contudo, há trabalhos na literatura demonstrando aplicabilidade da técnica NIRES [NELSON-AVERY e TILOTTA 1994], e recentemente foi desenvolvido pelo grupo do IQ-UNICAMP o primeiro espectrofotômetro NIRES baseado em um filtro óptico acústico sintonizável (Acousto-Optic Tunable Filter - AOTF) [GONZAGA e PASQUINI 2005]. A técnica NIRES desenvolvida pelo grupo mostrou-se promissora, apresentando potencial para uma série de aplicações, tais como: caracterização de materiais usados em cromatografia líquida [GONZAGA et al. 2006], classificação de óleos lubrificantes, diferenciação de formas cristalinas de óxido de titânio, entre outras [GONZAGA 2006]. Uma das principais aplicações estudadas foi a possibilidade de se determinar a estabilidade oxidativa de óleos comestíveis, assunto do presente trabalho.

1.8 Uso da Absorção no Infravermelho para Determinação de Estabilidade Oxidativa

A espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier tem sido empregada na determinação de estabilidade oxidativa [CABO e GUILLÉN 2002, GUILLÉN e CABO 1999, GUILLÉN e GOICOECHEA 2007, RUSSIN et al. 2004]. Em geral, os métodos baseam-se no aquecimento de uma amostra de óleo a uma temperatura fixa, e os espectros são tomados periodicamente, de modo a monitorar variações de intensidade e frequência de bandas decorrentes da oxidação. Em 1999, Guillén, M. D. e Cabo, N. realizaram um mapeamento bastante abrangente das modificações no espectro infravermelho de óleos vegetais em processo de degradação [GUILLÉN e CABO 1999]. Em especial, destacamos a identificação da banda em 2900 nm, cuja intensidade e largura crescem à medida que são formados hidroperóxidos ao longo do processo de autoxidação.

Há também na literatura vários trabalhos nos quais a estabilidade oxidativa não é diretamente determinada, mas sim parâmetros como a composição de ácidos graxos e a presença de antioxidantes no óleo [SZLYK et al. 2005], ou mesmo no substrato do qual o óleo será extraído [KIM et al. 2006, NIEWITETZKI et al. 2010, VELASCO et al. 1999]. Particularmente para a análise de sementes intactas, a espectroscopia de refletância difusa no infravermelho próximo tem sido largamente empregada. A quantificação de compostos como tocoferóis e ligninas pode fornecer uma visão qualitativa da estabilidade do óleo, mas nunca permitir a inferência direta do período de indução ou do tempo de prateleira. Isto porque o valor de TI é resultante de um número muito grande de fatores, de modo que estimá-lo por meio da concentração de uma espécie química em particular constitui uma aproximação grosseira. Por outro lado, a análise não destrutiva de sementes permite uma seleção prévia do substrato que irá propiciar um óleo de melhor qualidade, não apenas no que diz respeito à estabilidade oxidativa, mas com relação à uma série de parâmetros importantes para a indústria alimentíca.

1.9 Uso da Emissão no Infravermelho Próximo para Determinação de Estabilidade Oxidativa

Conforme mencionado na seção anterior, foi desenvolvido pelo grupo do IQ-UNICAMP um método para determinação de estabilidade oxidativa baseado em Espectroscopia de Emissão no Infravermelho Próximo (NIRES – Near Infrared Emission Spectroscopy) [GONZAGA E PASQUINI 2006]. O método proposto utilizava um espectrofotômetro NIRES baseado em um AOTF como seletor de comprimento de onda. Para determinar TI, uma pequena quantidade de amostra era mantida a uma temperatura constante, tipicamente 160°C, e espectros de emissão na faixa de 1500 a 3000 nm eram tomados. O aumento e o alargamento da banda centrada em 2900 nm são tomados como evidência da formação de hidroperóxidos, produtos primários de degradação do óleo [GUILLÉN e CABO 1999]. Assim, após a conversão dos espectros em emissividade, o monitoramento da razão entre a área abaixo da banda de interesse (2700-3000 nm) e uma região de referência (2650 – 2700 nm) ao longo do tempo permitia a identificação de TI de forma análoga ao método Rancimat. Na Figura 10 são ilustrados os espectros de emissão e as curvas de estabilidade obtidas com essa metodologia.



Figura 10: (a) Espectros de emissão obtidos pelo espectrofotômetro NIRES. (b) Curvas de estabilidade obtidas com esta metodologia. Retirado de [GONZAGA 2006].

Embora o método de determinação de OSI utilizando NIRES tenha se mostrado promissor, o equipamento citado apresentava algumas limitações. Uma delas era o uso de um seletor de comprimento de onda desnecessariamente caro para a análise em questão – o AOTF. Além disso, a baixa intensidade de emissão prejudicava as análises realizadas abaixo de 160 °C.

1.10 Objetivos

Neste trabalho é proposto o desenvolvimento e a avaliação de um fotômetro de emissão no infravermelho próximo, baseado em filtros de interferência, dedicado à determinação de estabilidade oxidativa.

2. PARTE EXPERIMENTAL

O fotômetro construído encontra-se esquematizado na Figura 11. A amostra é aquecida em um ambiente protegido, para permitir o controle da atmosfera a seu redor e uma melhor estabilidade da temperatura. Um controlador de temperatura mantém a temperatura fixa ao longo do período de análise, além de indicar o momento em que a temperatura se estabiliza – quando devem ser iniciadas as medidas. Dois filtros de interferência são alternados para selecionar a região espectral monitorada, e um detector de PbS é utilizado como transdutor de radiação. O sistema todo é controlado por computador.



Figura 11: Diagrama esquemático do instrumento proposto. (a) Compartimento de amostra; (b) Controlador de temperatura da amostra; (c) termopar; (d) conjunto de válvulas solenóides; (e) lentes de CaF₂; (f) íris; (g) recortador de radiação; (h) filtros de interferência e motor de passo; (i) detector de PbS; (j) controlador de temperatura do detector; (k) pré-amplificador do detector; (l) amplificador lock-in.

2.1. Controle de Temperatura da Amostra

A manutenção da temperatura de aquecimento em um valor fixo, bem como o rápido estabelecimento da temperatura de interesse a partir de uma dada temperatura inicial, são fatores fundamentais para a determinação de estabilidade oxidativa. A estabilidade da temperatura é crucial não apenas pelo fato da intensidade da radiação emitida variar com a temperatura, como também pela forte dependência da cinética de oxidação com a temperatura. A rápida evolução da temperatura inicial até a temperatura escolhida para a análise também é importante. Embora na etapa de estabilização a amostra esteja na presença de uma atmosfera de N₂, há de se lembrar que reações de polimerização dos lípideos são importantes em temperaturas de 140 – 180 °C. Além disso, a decomposição térmica de determinadas impurezas pode iniciar a reação em cadeia, conforme discutido na seção 1.1.1. Assim, um tempo muito longo de estabilidação da temperatura da amostra poderia ocasionar a degradação da amostra por vias que não são de interesse analítico.

O controlador de temperatura utilizado foi o modelo CPM45, da CONTEMP. Este dispositivo funciona como um controlador PID (*Proportional, Integral, Derivative*), que atua sobre a variável de processo (*process variable -* PV) de acordo com três parâmetros. O controlador é acessado pelo usuário por duas vias: um painel digital no próprio equipamento, e por comunicação RS-485 com o computador. Um conversor RS-485/USB (modelo D501 da CONTEMP) foi utilizado como intermediário na comunicação entre o controlador e o computador.

Os parâmetros adotados pelo controlador para atuar sobre o sistema de controle são os seguintes: Banda proporcional (P), que corresponde à diferença instantânea entre a temperatura medida (PV) e a temperatura de interesse (*set point* - SP); Banda Integral (I), que corresponde ao somatório da diferença entre SP e PV ao longo de um determinado intervalo de tempo; banda derivativa (D). que corresponde à taxa de variação da diferença entre SP e PV em um dado instante [ARAKI 2004, HANGA et al. 2002]. A função de saída de um controlador PID u(t) é dada pela equação 26:

$$u(t) = K_p e + K_i \int_0^t e(\tau) d\tau + K_d \frac{de}{dt}$$
(26)

em que K_{ρ} , K_i e K_d são as constantes proporcional (P), integral (I) e derivativa (D), respectivamente; *e* é o erro instantâneo, ou seja, PV – SP; *e*(τ) é o erro em função do tempo e *t* é um determinado intervalo de tempo. No controlador utilizado, esses parâmetros podem ser ajustados manual ou automaticamente. O método automático consiste em um processo de auto-sintonia, no qual o controlador opera no modo "liga/desliga". Neste modo, o aquecedor é mantido ligado abaixo do SP, e desligado acima do SP. Naturalmente, este modo "liga/desliga" não proporciona controle algum de temperatura, tendo meramente a finalidade de fazer uma varredura de uma ampla faixa de temperatura. Essa varredura permite que o controlador encontre os parâmetros ótimos de acordo com o comportamento de um sistema em particular. Ao longo da auto-sintonia, o dispositivo registra o comportamento da temperatura do sistema e utiliza essa informação para definir os parâmetros P, I e D. Na Figura 12, é apresentado um perfil de temperatura obtido durante a auto-sintonia.



Figura 12: Processo de auto-sintonia do controlador PID utilizado. Dados obtidos monitorando a temperatura do aquecedor durante a auto-sintonia.

A chave utilizada pelo controlador para ligar ou desligar o sistema de aquecimento é um relé, que opera através de ciclos liga/desliga⁴. A duração de cada ciclo liga/desliga é configurada pelo usuário, e o tempo em que o relé permanece ligado ou desligado corresponde à função de saída do controlador u(t).

Como aquecedor, foi utilizada uma resistência de 60 W dentro de um suporte de alumínio. O isolamento térmico da amostra é mantido pelo espaçamento entre a amostra e as paredes de cobre, de acordo com a Figura 13. Como sensor de temperatura foi utilizado um termopar do tipo J. As células de amostra também foram confeccionadas em alumínio e ferro, sendo a primeira utilizada na maioria das medidas. Além do material, também futuramente serão estudados formatos diferentes da célula, com o intuito de estudar a transferência de calor entre a célula e seu suporte.



Figura 13: Sistema de aquecimento da amostra.

⁴ Ciclos liga/desliga e o modo "liga/desliga" mencionado anteriormente são duas operações distintas do controlador. Os ciclos se referem ao modo de operação do controlador funcionando de acordo com os parâmetros PID; o modo liga/desliga é maneira de atuação do dispositivo durante o processo de auto-sintonia previamente descrito.

2.2. Controle da Atmosfera da Amostra

Para renovar o oxigênio consumido pelo óleo no processo de oxidação, é necessário estabelecer um fluxo contínuo de ar purificado ao longo de todo o tempo da análise. No entanto, enquanto a temperatura ainda está em fase de estabilização, é preciso manter uma atmosfera inerte, de modo a evitar uma oxidação prematura. Assim, a amostra é mantida em atmosfera de N₂ até que a temperatura se torne estável.

A comutação da atmosfera em torno da amostra foi efetuada empregando-se um conjunto de três válvulas solenóides, todas controladas por computador via interface PCI 9111. Para evitar o aquecimento das válvulas, foi utilizado o circuito Cool Drive da NResearch Inc.. Na Figura 14 é ilustrado o arranjo das válvulas.



Figura 14: Diagrama esquemático do conjunto de válvulas solenóides utilizado para controle da atmosfera da amostra.

Para evitar a contaminação da lente de CaF₂ situada logo acima da amostra, uma parte do ar/N₂ foi desviado para manter um fluxo laminar rente à lente colimadora. Inicialmente esta proteção foi realizada somente com nitrogênio, porém verificou-se que este fluxo de N₂, mesmo acima da amostra, ocasionava interferência na análise, chegando até mesmo a inibir completamente a formação de peróxidos caso fosse mantido uma vazão elevada. Assim, optou-se por fazer o desvio após a comutação dos gases, de modo que o mesmo gás que preenchia o compartimento da amostra era usado para a limpeza da lente. A parte do gás desviada para o compartimento de amostra é mantida a uma vazão constante, monitorada por um fluxímetro. Futuramente, poderá ser feito um estudo sobre a influência da vazão dos gases nas medidas.

2.3 Sistema de Modulação

Para modular a radiação emitida pela amostra foi necessário utilizar um recortador mecânico de radiação, ou *chopper*. Um amplificador *lock-in* da FEMTO, modelo LIA–MV-150 foi empregado na filtração, amplificação e demodulação do sinal modulado obtido logo após o pré-amplificador do detector.

Para construir o *chopper*, foi utilizado um motor DC da RS, modelo 718-975 de 5900 rpm, acoplado a um disco com 8 fendas, de modo a proporcionar uma freqüência da ordem de 800 Hz. Este valor foi planejado não apenas por ser uma região livre de ruído ambiente, como também pelas informações a respeito da razão sinal/ruído fornecidas pelo manual de informação do detector (Figura 15). Experimentalmente foi verificada uma freqüência de 625 Hz.



Figura 15: Variação da razão sinal/ruído do detector utilizado em função da freqüência de modulação. Retirado do manual de informação do detector.

A freqüência do *chopper* é obtida com o uso de uma chave óptica, que consiste em um LED que emite na região do infravermelho acoplado a um fototransístor como transdutor. Na Figura 16 é representado um diagrama do circuito da chave óptica. O sinal gerado pela chave óptica é enviado tanto para o amplificador *lock-in* para ser usado como referência, quanto para o computador via interface PCI 9111, com o intuito de medir a freqüência. Por fim, um ajuste de fase foi realizado no *lock-in*, a fim de corrigir a diferença de fase entre o sinal de referência e o sinal obtido pelo detector.



Figura 16: Diagrama do circuito das chaves ópticas utilizadas.

O funcionamento básico de um amplificador *lock-in* é ilustrado na Figura 17. O sinal proveniente da medida é modulado e pré-amplificado juntamente com o ruído. O sinal de referência, por sua vez, é passado por um circuito de ajuste de fase (*phase shifter*). Em seguida, os sinais de referência e da medida são enviados a um detector sensível à fase (*phase sensitive detector* – PSD), que irá amplificar o sinal medido em sincronia com sinal de referência. Por fim, o sinal é passado por um filtro passa-baixo e demodulado.



Figura 17: Diagrama de blocos básico de um amplificador lock-in. Adaptado de [HOROWITZ e HILL 1989].

Além de controlar o ganho e o ajuste de fase, um parâmetro importante é o tempo de integração. O amplificador *lock-in* utilizado (Figura 18) permite a seleção de tempos de integração desde 3 ms até 10 s. A escolha deste tempo é baseada em dois critérios. Em primeiro lugar, a freqüência da modulação define um limite inferior para ele, pois um número mínimo de ciclos deve estar incluído no intervalo de tempo. O limite superior, por outro lado, será definido pela natureza da medida. As curvas de estabilidade oxidativa precisam ter uma resolução tal que seja possível distinguir com clareza as regiões de estabilidade e oxidação. No instrumento desenvolvido, um tempo de integração de 300 ms foi empregado no *lock-in*. Tempos de até 32 segundos foram testados, porém, através de médias dos dados adquiridos ao longo do tempo pelo programa do equipamento.



Figura 18: Amplificador lock-in utilizado.Modelo LIA-MV-150, Femto.

2.4 Seletor de Comprimento de Onda

Acima do sistema de aquecimento da amostra, foi colocada uma lente de CaF_2 , com o foco centrado na célula de amostra. Em seguida, após o *chopper*, posicionou-se um setor circular contendo dois filtros de interferência da Knight Optical, sendo o primeiro o da banda de interesse – centrado em 2850 nm com 200 nm de largura de banda – e o segundo correspondente a uma região de referência – 2675 nm com 50 nm de largura de banda. Em seguida, outra lente de CaF_2 foi utilizada para focar o feixe no detector. Embora a banda monitorada esteja centrada em 2900 nm, o filtro de 2850 nm foi utilizado por ser o mais proximo disponível. Sendo a largura de banda igual a 200 nm, o máximo da banda de interesse está dentro da faixa de transmissão do filtro.

Para mover o setor circular, e assim permitir a seleção de cada filtro de interferência, foi utilizado um motor de passo. O motor de passo, por sua vez, é controlado por computador via interface PCI 9111. Na Figura 19 é apresentado um diagrama esquemático do circuito empregado.



Figura 19: Diagrama do circuito utilizado para controle do motor de passo.

O motor de passo necessita de três sinais digitais para ser controlado adequadamente. O primeiro, denominado RESET, determina se o motor está em movimento ou não. O segundo, denominado MODE, atua como indicador do sentido de rotação do motor. Por fim, a entrada COUNT é responsável pela velocidade de movimentação do motor. O sinal enviado por esta via consiste em uma onda quadrada cuja freqüência determina a velocidade do motor.

Os três sinais descritos anteriormente são enviados pela saída digital da interface PCI 9111, e passam por um conjunto de amplificadores operacionais atuando no modo comparador – o circuito integrado LM 348 no diagrama. Os sinais provenientes do comparador são enviados para o *driver* SAA 1027. A saída de cada amplificador operacional gera sinais de -12 V e +12 V, quando a interface envia sinais de 0 V e +5 V, respectivamente. Assim, foram utilizados diodos de proteção para manter a saída em zero volts quando a saída dos amplificadores operacionais gera sinais de -12 V. Para evitar o aquecimento do motor de passo fora dos períodos de aquisição de dados, um relé de estado sólido controlado por uma saída digital da interface também utilizado na alimentação do motor de passo.

O *driver* SAA 1027 é o circuito responsável pela conversão da onda quadrada enviada pela entrada COUNT na sequência requerida para ativar alternadamente cada uma das quatro bobinas do motor. Na Figura 20, este processo de conversão é exemplificado para uma onda quadrada arbitrária enviada ao *driver*.



Figura 20: Diagrama esquemático da atuação do SAA1027 sobre o motor de passo.

O controle do motor de passo descrito acima não retorna nenhuma informação para a interface com relação ao posicionamento do mesmo. Ou seja, para posicionar os filtros no devido lugar, é necessário criar uma rotina de contagem de passos. Esta contagem, porém, não necessariamente é confiável. Desta forma, é possível a ocorrência de erros que levem a um posicionamento não reprodutível. Alternativamente, é possível obter informação sobre a posição desejada com o uso de duas chaves ópticas, cada uma delas indicando o alinhamento de um filtro no caminho óptico (Figura 21). O circuito empregado para as chaves ópticas é o mesmo apresentado na Figura 16. Com este sistema de resposta, o posicionamento de cada filtro é obtido com precisão, visto que é independente da contagem de passos.



Figura 21: Representação do esquema de posicionamento dos filtros de interferência. (a) e (c) filtro posicionado em frente ao feixe de radiação, após atingir a posição indicada por uma das chaves ópticas; (b) ambos os filtros fora da posição.

2.5. Sistema de Detecção

O transdutor de radiação empregado foi um detector fotocondutivo de PbS P2682-01, da Hamamatsu. Este detector apresenta resposta satisfatória até cerca de 3000 nm, embora seja necessário resfriá-lo para aumentar a sensibilidade e a razão sinal/ruído. Para tal, foi utilizado um controlador de temperatura C1103 da Hamamatsu, que permite um ajuste da temperatura até -30 °C. Baseando-se nas informações a respeito de relação sinal/ruído e sensibilidade contidas no folheto técnico do dispositivo, a temperatura de -20 °C foi selecionada. Entretanto, este parâmetro não foi estudado, de modo que a temperatura escolhida não necessariamente representa uma situação ótima de trabalho.

O sinal obtido pelo detector é transmitido para um pré-amplificador C3757-02 da Hamamatsu, e em seguida para o amplificador *lock-in*. O sinal amplificado e filtrado pelo *lock-in* é então levado para o computador pelo conversor analógico/digital (A/D) da interface PCI 9111.

Na Figura 22 é apresentada a configuração atual do equipamento. Nela, são ilustrados o detector e os demais componentes descritos até então. Na Figura 23, o setor circular utilizado como suporte para os filtros de interferência é enfatizado.



Figura 22: Montagem atual do fotômetro. (a) Compartimento da célula de amostra; (b) Controlador de temperatura; (c) válvulas solenóides para controle da atmosfera da amostra; (d) lente colimadora de CaF_2 e íris; (e) recortador de radiação; (f) filtros de interferência e motor de passo; (g) lente focalizadora de CaF_2 ; (h) Detector de PbS. Dimensões – altura: 42 cm; largura: 31 cm.



Figura 23: Filtros de interferência implementados no fotômetro.

2.6 Controle do Instrumento

Conforme descrito nas seções anteriores, cada uma das etapas de análise foi controlada com o uso do computador. A comunicação com o controlador de temperatura é realizada através de uma porta serial RS-485 adaptada ao dispositivo, e os demais componentes se comunicam com o computador via interface PCI 9111. O programa de aquisição de dados e automação do sistema foi escrito em linguagem Visual Basic 6.0, e a comunicação pela interface PCI 9111 foi efetuada utilizando o módulo fornecido pelo fabricante da interface, que contém as funções necessárias para esta tarefa. A comunicação com o controlador de temperatura, por outro lado, foi efetuada de acordo com o protocolo MODBUS-RTU. Este protocolo requer o envio de uma string para o dispositivo, que deve conter não somente a informação desejada, como também dois caracteres de verificação de dados, o CRC. Para calculá-lo, uma sequência de operações lógicas "ou" exclusivo (XOR) é efetuada com cada um dos bytes que compõe a string, à excessão dos dois primeiros, que representam o endereço do dispositivo e o tipo de comando - isto é, se é um comando de leitura ou de alteração de parâmetros. Inicialmente, uma operação XOR é realizada entre o primeiro byte após o byte de comando e o número 65535. O resultado é então deslocado para a direita (sentido do *bit* menos significativo) e o lugar do *bit* mais significativo é preenchido com um zero. Se o bit que foi descartado no deslocamento for 1, uma operação XOR é efetuada entre o byte atual e o polinômio de geração CRC 16 (1010 0000 0000 0001). Se o bit for zero, nenhuma ação é executada, e o resultado é novamente deslocado para a direita. Este processo é repetido oito vezes com cada byte. O resultado final, composto por dois bytes, representa o conteúdo do CRC, porém a ordem é invertida para compor a string (o byte menos significativo é enviado primeiro). Na Figura 24, as etapas deste processo são exemplificadas com um byte arbitrário.



Figura 24: Etapas do algoritmo para o cálculo do CRC. (1) Operação XOR com número 65535; (2) Deslocamento para a direita do resultado, preenchendo o espaço vazio com zero; (3) operação XOR com o CRC 16; (4) novo deslocamento.

Ao ser iniciado, o programa abre os registros de cada gás, mantendo um fluxo de N₂. Após uma estabilização inicial da temperatura, o usuário é requisitado a inserir a amostra, e mantém-se o fluxo de N₂ até que a temperatura se estabilize novamente. Em seguida, o N₂ é trocado por ar, e as medidas são iniciadas. Na Figura 25 é representado o fluxograma geral do programa, e na Figura 26 a subrotina de aquisição de dados.



Figura 25: Fluxograma geral do programa de controle do fotômetro. N1 = número de pontos na janela móvel utilizada para calcular a regressão linear; N2 = número de pontos na região de oxidação; IC = inclinação crítica.

A fim de determinar automaticamente o valor de TI, o programa monitora a inclinação da curva de estabilidade, realizando regressões lineares com uma janela móvel contendo N1 pontos (ver Figura 25), e armazenando os pontos em um vetor inicial. Quando a inclinação calculada atinge um determinado valor crítico (IC), o programa passa então a armazenar os novos pontos em um segundo vetor, correspondente à região de oxidação, até a obtenção de N2 pontos. O valor crítico é determinado experimentalmente, através do levantamento de um conjunto de curvas de estabilidade, e da verificação de quanto varia a inclinação entra cada região.

O valor de N1 deve ser selecionado com cautela. Se este número for muito pequeno, o ruído das medidas será interpretado como uma variação grande da inclinação calculada na regressão, o que faria o programa identificar de forma incorreta o ponto de mudança entre as regiões de estabilidade e de oxidação. Por outro lado, um valor excessivo de pontos para esta janela pode levar o programa a perder o TI, uma vez que N1 poderia englobar toda a região de estabilidade, e alguns pontos da região oxidativa.

No bloco "calcular TI", o programa efetua duas regressões lineares – uma com os pontos da região de estabilidade, e outra com os demais – e calcula o intercepto entre elas. O valor de N2 é selecionado a cada análise, de acordo com o número de pontos obtidos na região de estabilidade. Novamente, este número deve ser escolhido criteriosamente. Um valor muito pequeno levaria o programa a calcular a regressão na região de transição, a qual não é linear ainda. Por outro lado, se N2 for muito grande, perde-se também linearidade, pois a curva de estabilidade tende a um patamar após algum tempo. Atualmente, o valor de N2 é escolhido de modo que a região de oxidação tenha o mesmo número de pontos da região de estabilidade.

Os parâmetros ideais para a determinação de TI ainda precisam ser investigados, de modo a encontrar uma situação ótima de trabalho. Outra possibilidade ainda é a implementação de uma regressão não-linear, de modo a ajustar uma única função para toda a curva. Em todo caso, este módulo de

43

identificação automática de TI tornará o sistema como um todo mais robusto, uma vez que o resultado da análise será absolutamente independente do usuário, descartando erros pessoais na análise.



Figura 26: Subrotina de aquisição de dados do programa.

Conforme será discutido nas seções posteriores, é possível que a utilização do filtro de referência (2675 nm) seja desnecessária. Assim, a rotina de aquisição de dados foi devidamente alterada, de modo a realizar as leituras com o motor de passo parado. Atualmente, o programa permite ao usuário a opção de realizar medidas com um ou dois filtros⁵.

Na Figura 27 é exibida a tela principal do programa. Nela, a curva de estabilidade do óleo é graficada durante a análise, bem como a temperatura registrada. As medidas de temperatura, no entanto, não são sincronizadas com a leitura do detector, de modo que o monitoramento da temperatura tem como finalidade tão somente verificar, ao final da análise, a ocorrência de alguma anomalia durante o processo. A simultaneidade das leituras reduziria o número de leituras feitas pelo detector, visto que parte do tempo estaria sendo utilizado para

⁵ A subrotina de aquisição de dados com um único filtro não está representada no fluxograma, pois consiste em uma única etapa de leitura do detector por um determinado intervalo de tempo.

obter a leitura da temperatura. Assim, optou-se por realizar leituras pontuais de temperatura logo após cada média de leituras do detector. Futuramente, uma rotina de leitura do tipo *multithread* poderia ser implementada, de modo a permitir a leitura sincronizada do detector e da temperatura.



Figura 27: Telas geradas pelo programa de controle do instrumento – TINIRES. (a) Tela principal. À esquerda, a curva de estabilidade do óleo sendo analisado. À direita, os dados de temperatura obtidos ao longo da análise. (b) Seleção dos parâmetros da regressão. (c) Seleção do tempo de integração.(d) Seleção do modo de aquisição de dados.

2.7 Procedimento Experimental de Análise

Em primeiro lugar, o programa é iniciado, e, após a estabilização inicial de temperatura, entra no modo de espera de inserção de amostra. A célula de amostra é então lavada com acetona e secada. Em seguida, são pipetados 10 μ L de óleo, e a amostra é inserida. Neste ponto, o usuário deve informar ao programa que a amostra foi inserida, para que seja dada continuidade a leitura de temperatura. Enquanto a temperatura estiver oscilando, a atmosfera da amostra é mantida com N₂. Assim que a temperatura se estabiliza, o programa troca o N₂ pelo ar purificado, e as medidas são iniciadas. Atualmente, o fluxo de ar é mantido em 500 mL . min⁻¹ (30 L . h⁻¹).

Conforme representado no fluxograma da Figura 25, todo o processo de aquisição de dados e identificação das regiões de estabilidade e oxidação é controlado pelo computador. Contudo, a qualquer momento é permitido ao usuário finalizar a aquisição de dados caso julgue ser possível calcular o tempo de indução antes que o programa dê a análise por terminada. Com o aprimoramento do critério de seleção das regiões, esta interrupção manual da análise será desnecessária em qualquer caso.

2.8 Calibração do Instrumento

Conforme discutido na seção 1.2.2, as técnicas de espectroscopia de emissão no infravermelho próximo ou médio exigem o uso de um corpo negro experimental como referência de uma fonte cuja emissão é máxima na temperatura de trabalho. Isto porque a luminância por si só não possui uma relação linear com a concentração ou o caminho óptico. Assim, as medidas devem ser convertidas em emissividade, e, para isso, um corpo negro é necessário.

O corpo negro experimental utilizado foi o mesmo empregado como referência para o espectrofotômetro NIRES anteriormente desenvolvido pelo grupo. Células idênticas às utilizadas para a análise foram pintadas com uma tinta negra fosca, contendo negro de fumo. Esta abordagem demonstrou-se suficiente para as aplicações em questão – os espectros obtidos apresentaram o perfil esperado pela distribuição de Planck, e nenhum outro corpo emissor estudado apresentou emissão superior ao corpo negro. Na Figura 28, são ilustradas as células utilzadas para a amostra e como corpo negro experimental. As medidas do corpo negro foram efetuadas de acordo com o procedimento de análise descrito anteriormente.



Figura 28: Células de alumínio empregadas. À esquerda, célula para amostras; à direita, corpo negro experimental.Diâmetro externo = 1,2 cm;diâmetro interno = 0,6 cm; altura = 1,0 cm; profundidade da cavidade = 0,3 cm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do Controle de Temperatura

Antes de iniciar as análises propriamente ditas, foi necessário avaliar o desempenho do controlador de temperatura. As configurações do controlador foram alteradas de modo a serem verificadas duas condições essenciais – a velocidade com que o controlador atinge SP, e a flutuação da temperatura após a estabilização.

Além da auto-sintonia, vários outros parâmetros são passíveis de ajuste no controlador. Particularmente, foi verificado que o filtro digital, utilizado para reduzir a flutuação da leitura, precisava ser desativado. Isto porque o filtro torna o tempo de resposta do controlador mais lento, aumentando o tempo necessário para atingir a temperatura de equilíbrio em um procedimento de troca de amostra. Na Figura 29 é apresentada uma comparação do desempenho do controlador operando nas duas condições, considerando um procedimento de troca de amostra de amostra. Nela, nota-se que o tempo de estabilização torna-se até duas vezes maior para um filtro digital com constante de tempo igual a 200 segundos.



Figura 29: Tempos de estabilização em um procedimento de troca da célula de amostra. (a) com filtro digital de 200 s; (b) sem filtro digital. Curvas 1, 2 e 3: réplicas; LI e LS: limites inferior e superior, respectivamente.

Neste sistema, a temperatura é considerada estável quando mantida durante determinado intervalo de tempo dentro da faixa de SP +/- 1 °C. Após este intervalo, tipicamente de 1 minuto, a temperatura permanece estável durante todo o tempo de análise, com desvio padrão da ordem de 0,1 °C. Conforme mostrado na Tabela II, para um conjunto de 160 medições realizadas em um período de 1 hora, nota-se que este desvio não sofre influência da temperatura, de modo que independentemente da temperatura escolhida obtém-se a mesma precisão durante a análise.

Tabela II: Estabilidade da temperatura registrada para um período de 1 hora em cada SP, totalizando 160 pontos.

| SP | T _{média} | desvio |
|-------|--------------------|--------|
| (ºC) | (ºC) | padrão |
| 140,0 | 140,0 | 0,1 |
| 150,0 | 150,0 | 0,1 |
| 160,0 | 160,0 | 0,1 |
| 170,0 | 170,0 | 0,1 |
| 180,0 | 180,0 | 0,1 |

3.2 Avaliação do Sinal Analítico

3.2.1 Determinação do Ruído Instrumental

Ainda antes de serem inciadas as análises, foi realizada uma série de testes de desempenho do equipamento, a fim de quantificar o ruído instrumental na ausência de amostras. Para tal, foram tomadas leituras da célula vazia por um período de 1 hora (160 medições) em cinco diferentes temperaturas, na faixa de 140 – 180 °C. Para cada temperatura é necessário o ajuste da abertura da íris, de modo a normalizar a emissão do corpo negro. O fluxo dos gases foi mantido nas mesmas condições de uma análise normal, 500 mL . min⁻¹ de ar. Após tomadas as medidas com a célula vazia, avaliou-se também o desempenho do equipamento com uma amostra de óleo de silicone, pelo fato de ser estável nessa faixa de temperatura e apresentar bandas intensas nas regiões de ambos os filtros.

Para avaliar a incerteza nas medidas de cada filtro, foram registradas as emissões brutas de cada filtro (L₂₈₅₀ e L₂₆₇₅). Tanto para a célula vazia quanto para o óleo de silicone, observou-se que o ruído não apresenta nenhuma tendência com a variação de temperatura – a flutuação na razão sinal/ruído (S/R) aparenta ser aleatória. Além disso, a razão S/R é efetivamente maior para o filtro com largura de banda maior, como era esperado. Nas tabelas III e IV são apresentados os valores de desvio padrão e razão sinal/ruído para cada um dos sinais registrados.

Nota-se a presença de um sinal elevado para a célula vazia, de modo que para expressar a real emissão da amostra este valor deveria ser descontado. Contudo, tal alteração apenas deslocaria a escala do sinal analítico, o que é irrelevante na determinação de TI. Além disso, a medida da emissão proveniente da célula vazia adicionaria uma etapa a mais na calibração do equipamento ao trocar a temperatura de análise, o que tornaria o processo mais complicado sem nenhuma melhora no desempenho. Assim, optou-se por trabalhar diretamente

com a emissão na presença da amostra, sem considerar a emissão da célula vazia.

| | L 2850 (u. a.) | | | L 2675 (u. a.) | | |
|--------|----------------|------------------|-----|----------------|------------------|-----|
| T (ºC) | média | desvio padrão | S/R | média | desvio padrão | S/R |
| 140 | 3,338 | 0,013 | 251 | 0,580 | 0,005 | 116 |
| 150 | 4,207 | 0,021 | 198 | 0,747 | 0,006 | 123 |
| 160 | 4,230 | 0,022 | 193 | 0,815 | 0,009 | 93 |
| 170 | 4,267 | 0,018 | 239 | 0,845 | 0,007 | 119 |
| 180 | 4,218 | 0,025 | 171 | 0,857 | 0,006 | 133 |

Tabela III: Avaliação do sinal da célula vazia.

Tabela IV: Avaliação do sinal do óleo de silicone.

| | L 2850 (u. a.) | | | L 2675 (u. a.) | | |
|--------|----------------|--------|-----|----------------|--------|-----|
| T (ºC) | média | desvio | S/R | média | desvio | S/R |
| | | padrão | | | padrão | |
| 140 | 5,340 | 0,059 | 91 | 1,152 | 0,012 | 99 |
| 150 | 6,594 | 0,024 | 274 | 1,456 | 0,017 | 86 |
| 160 | 6,076 | 0,028 | 221 | 1,530 | 0,014 | 108 |
| 170 | 5,851 | 0,046 | 127 | 1,475 | 0,018 | 82 |
| 180 | 6,714 | 0,027 | 248 | 1,743 | 0,016 | 112 |

3.2.2 Relação entre a Temperatura e o Ruído

Conforme discutido na seção 1.2.2, a intensidade de radiação emitida por um corpo negro a um dado comprimento de onda cresce exponencialmente com o aumento da temperatura. Assim, é de se esperar que mesmo as pequenas flutuações observadas na temperatura sejam responsáveis por gerar uma parte significativa do ruído observado.

Para verificar se existe de fato uma correlação entre a flutuação na temperatura e o ruído, foram realizas leituras do corpo negro, mas sem movimentar os filtros – eliminando, assim, a possível contribuição do posicionamento dos filtros. Na Figura 30 são comparadas a variação do sinal obtido pelo detector e a variação da temperatura. Estas variações foram calculadas com relação às médias de temperatura e do sinal calculadas durante todo o período de medição.



Figura 30: Flutuações do sinal do corpo negro medido a 2850 nm (verde) e da temperatura (vermelho). Medidas realizadas a 150 °C. Curva suavizada com média móvel, janela de 15 pontos.

Embora o comportamento individual de cada curva seja aparentemente o mesmo, não foi possível fazer uma correlação quantitativa entre as curvas. Existe claramente uma diferença de fase entre as curvas, provavelmente porque a leitura da temperatura não está exatamente sincronizada com a leitura do detector. Mesmo que houvesse sincronia, a correlação ainda seria dificultada pois o controlador fornece valores de temperatura com apenas uma casa decimal, e o detector responde a variações de intensidade de radiação correspondentes a flutuações menores de temperatura. É possível também que esta diferença de fase esteja associada ao fato de que a temperatura é medida em um ponto abaixo da amostra, que não corresponde exatamente ao ponto emissor (Figura 13). Em todo caso, as curvas da Figura 30 fornecem uma forte evidência de que a maior parte do ruído está efetivamente associada à flutuação da temperatura.

3.3 Comparação entre Diferentes Tipos de Óleos

A primeira avaliação do desempenho do equipamento realizada com a introdução de amostras presumiu verificar a sua capacidade em discernir diferentes tipos de óleos. Para tal, foram analisadas amostras de óleo de canola, milho e soja.

Na Figura 31, verifica-se que as curvas obtidas apresentaram o perfil característico de curvas de estabilidade oxidativa. Nota-se também que as curvas dos óleos de milho e canola são bastante semelhantes, de modo que possivelmente a diferença de tempo de indução entre elas estaria inclusa no erro da medida. O óleo de soja, por sua vez, apresenta um tempo de indução visivelmente inferior. Essa relação também é consistente com a composição em termos de ácidos graxos destas amostras – os óleos de canola e milho apresentam teores mais elevados de ácidos monoinsaturados do que o de soja.


Figura 31: Comparação entre curvas de estabilidade obtidas para três tipos de óleo. $V_{amostra} = 10 \ \mu$ L; T = 160 °C.

A relação entre os tempos de indução observados é consistente com os resultados obtidos com o espectrofotômetro NIRES [GONZAGA 2006]. Os óleos de milho e canola apresentam tempos de indução cerca de 500 segundos acima do tempo de indução do óleo de soja. Os valores de TI estão na faixa esperada para análises realizadas a 160 °C com essa técnica.

3.4 Influência da Resposta Utilizada para a Determinação de TI

Nos trabalhos anteriores, a razão entre as emissividades integradas nos intervalos 2700-3000 nm e 2650-2700 nm foi utilizada como sinal analítico [GONZAGA 2006, GONZAGA e PASQUINI 2006, GONZAGA et al 2007]. No entanto, nenhum outro tipo de resposta foi avaliado, de modo que se faz necessário uma verificação criteriosa de qual tipo de resposta seria mais adequado para a análise, a fim de proporcionar curvas mais bem definidas e possivelmente uma precisão maior nos valores de TI.

Conforme discutido na seção 1.7, a emissividade é uma grandeza calculada a partir da razão entre a luminância da amostra e do corpo negro experimental. Tal como a absorbância nas medidas de absorção, a emissividade tem como finalidade linearizar a resposta espectral em uma determinada faixa de concentrações. Porém, para pequenas variações de concentração da espécie emissora, a emitância apresenta uma relação linear com a concentração. Esta relação linear é claramente observada ao fazer uma expansão em série da equação 25:

$$e = -\log(1 - E) = -2.3\ln(1 - E)$$
(27)

$$\ln(1+x) = \sum_{i=1}^{\infty} (-1)^{i+1} \left(\frac{1}{i}\right) x^i$$
(28)

$$e = -2,3\ln[1 + (-E)] = \sum_{i=1}^{\infty} (-1)^{i+1} \left(\frac{1}{i}\right) (-E)^i$$
(29)

$$e = -2,3\left(-E + \frac{1}{2}E^2 - \frac{1}{3}E^3 + \frac{1}{4}E^4 - \dots\right)$$
(30)

Para pequenos valores de emitância, o primeiro termo na Equação 30 é muito superior aos demais, de modo que eles podem ser desprezados. Logo, a emissividade nessas condições é diretamente proporcional à emitância:

$$e \approx 2,3E$$
 (31)

Consequentemente, é possível que ocorra uma relação linear entre a emitância e a concentração, desde que os valores sejam suficientemente baixos.

Tendo em vista a discussão anterior, foram testadas as seguintes medidas como sinal analítico: Emissão bruta a 2850^6 nm (L₂₈₅₀); Emitância a 2850 nm (E₂₈₅₀); diferença entre as emitâncias (E₂₈₅₀ - E₂₆₇₅); emissividade a 2850 nm (e₂₈₅₀); diferença entre as emissividades (e₂₈₅₀ - e₂₆₇₅) e finalmente a razão entre as emissividades (e₂₈₅₀/e₂₆₇₅). Para avaliar estes diferentes tipos de resposta, foi

⁶ Os termos "a 2850 nm" e "a 2675nm" são empregados ao longo do texto para se referir aos respectivos filtros de interferência utilizados. As regiões espectrais medidas por cada filtro correspondem à faixas mais amplas, de acordo com a largura de banda de cada filtro – 2750 a 2950 nm e 2650 a 2700 nm, respectivamente.

selecionada uma amostra de óleo de soja, e foram registrados diversos tipos de sinais. Na Figura 32 são apresentadas as curvas de estabilidade obtidas.



Figura 32: Curvas de estabilidade oxidativa em função de diferentes respostas. (a) L_{2850} ; (b) E_{2850} ; (c) $E_{2850} - E_{2675}$; (d) e_{2850} ; (e) $e_{2850} - e_{2675}$; (f) e_{2850}/e_{2675} . $V_{amostra} = 10 \ \mu$ L; $T = 160 \ ^{\circ}C$.

Nota-se pouca diferença no formato entre as curvas – em todas elas, é possível distinguir as regiões de estabilidade e oxidação. Em outras palavras, a faixa dinâmica de trabalho é tal que mesmo a emitância apresenta uma relação linear com a concentração dos produtos de oxidação formados.

Por outro lado, observa-se que nas curvas nas quais o sinal a 2675 nm é omitido do cálculo (curvas a, b e d) é visível um ruído de aspecto senoidal – semelhante ao observado na Figura 30. Nas demais curvas, este aspecto do ruído é corrigido – embora a amplitude do ruído aparente permanecer igual.

Na Tabela V, observa-se também que há pouca diferença entre os tempos de indução calculados. Mais adiante neste trabalho, uma avaliação quantitativa dos tipos de resposta será discutida.

| Resposta | TI (s) |
|---------------------------------------|--------|
| L ₂₈₅₀ | 967 |
| E ₂₈₅₀ | 968 |
| E ₂₈₅₀ - E ₂₆₇₅ | 958 |
| e ₂₈₅₀ | 1027 |
| e ₂₈₅₀ - e ₂₆₇₅ | 1028 |
| e ₂₈₅₀ /e ₂₆₇₅ | 1034 |

Tabela V: Tempos de indução calculados a partir das diferentes respostas.

Um fato interessante é que mesmo nas curvas referentes somente à emissão a 2850 nm o perfil é mantido – as regiões de estabilidade e de oxidação são bastante evidentes. No entanto, uma avaliação quantitativa ainda precisa ser realizada, de modo a verificar se há influência do tipo de resposta na precisão da determinação de TI. Caso a precisão seja mantida, seria possível simplificar ainda mais o instrumento, uma vez que o uso do filtro de referência seria dispensável. Esta modificação não apenas reduziria o custo e a complexidade do equipamento, como também aumentaria a razão sinal/ruído, pois o erro de posicionamento dos filtros a cada medida seria eliminado.

3.5 Efeito da Temperatura sobre TI

Com o intuito de verificar o comportamento observado nos trabalhos anteriores do grupo [GONZAGA 2006] e esperado pela natureza da análise, foram efetuadas análises de uma mesma amostra de óleo de milho em cinco temperaturas diferentes.



Figura 33: Curvas de estabilidade para uma mesma amostra de óleo de milho em cinco temperaturas diferentes. (a) curvas de emissividade a 2850 nm; (b) curvas da razão entre as emissividades a 2850 e a 2675 nm. $V_{amostra} = 10 \,\mu$ L

Nas curvas da Figura 33 observa-se um comportamento similar àquele verificado nos trabalhos anteriores, realizados com o espectrofotômetro NIRES – o valor de TI cai pela metade a cada incremento de 10 °C, aproximadamente. Além disso, devido à alta sensibilidade do detector utilizado, a largura de banda e diâmetro dos filtros de interferência, foi possível obter curvas de estabilidade aquecendo a amostra à temperaturas iguais a 140 e 150 °C. Utilizando o

espectrofotômetro, análises em temperaturas abaixo de 160 °C não eram viáveis devido à baixa intensidade do sinal analítico. Esta vantagem do sistema montado possibilitará futuras investigações em temperaturas mais baixas, o que permitirá uma comparação mais adequada com os demais métodos de determinação de estabilidade oxidativa. Por outro lado, para temperaturas superiores a 170 °C é necessário reduzir a intensidade do feixe de radiação que atinge o detector. Nestas condições, sinal analítico no início da análise já estava saturado, mesmo com o ganho mínimo do amplificador *lock-in*. Este problema foi contornado posteriormente posicionando uma íris logo acima da lente colimadora, o que permitiu um ajuste fino da intensidade do feixe que atinge o detector.

3.6 Repetibilidade

Para fazer uma avaliação da precisão do método, bem como da temperatura ideal de trabalho, foi analisada uma amostra de óleo de milho em quintuplicata, em cinco temperaturas de 140 a 180 °C. Nas tabelas VI e VII são ilustrados os resultados calculados com a razão entre as emissividades, e com a emissividade a 2850 nm, respectivamente. Todos os resultados foram calculados utilizando uma planilha ao invés do critério automático descrito anteriormente. Isto porque a inclinação das curvas varia entre uma medida e outra, o que dificultou o estabelecimento de um critério adequado para a ampla faixa estudada.

| Temperatura | | | réplica | | TI _{médio} | desvio | CV | |
|-------------|------|------|---------|------|---------------------|--------|------------|------|
| (°C) | 1 | 2 | 3 | 4 | 4 5 (s) | | padrão (s) | (%) |
| 140 | 4602 | 4497 | 4691 | 4565 | 4360 | 4543 | 124 | 2,7 |
| 150 | 2320 | 2316 | 2438 | 2291 | 2180 | 2309 | 92 | 4,0 |
| 160 | 1086 | 1159 | 1242 | 1283 | 1285 | 1211 | 87 | 7,1 |
| 170 | 421 | 560 | 588 | 561 | 512 | 528 | 66 | 12,5 |
| 180 | 263 | 181 | 188 | 296 | 203 | 226 | 51 | 22,4 |

Tabela VI: Medidas de uma amostra de óleo do milho em cinco temperaturas diferentes. Valores obtidos a partir da curva da razão entre as emissividades (*e*₂₈₅₀/*e*₂₆₇₅).

Tabela VII: Medidas de uma amostra de óleo do milho em cinco temperaturas diferentes. Valores obtidos a partir da curva da emissividade a 2850 nm (e₂₈₅₀).

| Temperatura | | | réplica | | | TI _{médio} | desvio | CV |
|-------------|------|------|---------|------|------|---------------------|------------|------|
| (°C) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | (s) | padrão (s) | (%) |
| 140 | 4551 | 4551 | 4698 | 4631 | 4389 | 4564 | 116 | 2,5 |
| 150 | 2360 | 2387 | 2408 | 2222 | 2187 | 2313 | 101 | 4,4 |
| 160 | 1162 | 1157 | 1209 | 1249 | 1266 | 1209 | 49 | 4,1 |
| 170 | 533 | 595 | 550 | 576 | 611 | 573 | 32 | 5,6 |
| 180 | 247 | 221 | 139 | 128 | 149 | 177 | 54 | 30,3 |

Nas Tabelas VI e VII, nota-se um aumento da precisão com o decréscimo da temperatura. De fato, para as medidas a 180 °C a precisão torna-se inaceitável independente da forma de calcular. Para as análises a 160 e 170 °C, a precisão de TI calculado a partir de e₂₈₅₀ aparenta ser superior àquela calculada a partir da razão. Isto se deve provavelmente à amplificação do ruído que ocorre quando a razão é calculada, como pode ser observado graficamente na Figura 34. Com o aumento do ruído, a forma da curva é alterada de tal modo que a dificulta a definição da região de transição entre as fases de estabilidade e oxidação. Entretanto, uma análise estatística dessas variâncias mostra não ser possível afirmar que haja diferença entre elas, conforme ilustra a Tabela VIII. Nas análises realizadas a 140 e 150 °C, a precisão é evidentemente indiferende à forma de calcular TI. Com o aumento de TI devido ao abaixamento da temperatura, a amplificação do ruído causada pelo cálculo da razão não é suficiente para alterar a forma da curva de estabilidade como nos demais casos.

| Temperatura | 140 | | 150 | | 160 | | 170 | | |
|-------------|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|--|--|
| | e ₂₈₅₀ | <i>e₂₈₅₀/e₂₆₇₅</i> | |
| Média | 4564 | 4543 | 2313 | 2309 | 1209 | 1211 | 573 | 528 | |
| Variância | 13352 | 15369 | 10217 | 8444 | 2440 | 7488 | 1017 | 4354 | |
| Observações | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | |
| Graus de | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | |
| liberdade | | | | | | | | | |
| F calculado | 1,15 | | 1,21 | | 3,07 | | 4,28 | | |
| F crítico | 6,39 | | 6,39 | | 6,39 | | 6,39 | | |

Tabela VIII: Teste-F para as variâncias calculadas a partir de e₂₈₅₀ e e₂₈₅₀/e₂₆₇₅.



Figura 34: Comparação entre as curvas de estabilidade obtidas com a emissividade de um único filtro (a) e com a razão entre as emissividades (b). $V_{amostra} = 10\mu L$. $T = 160 \ ^{\circ}C$.

Os resultados das Tabelas VI e VII também mostram que os tempos de indução calculados a partir de ambas as respostas são equivalentes. Na Tabela IX é apresentado o teste-t pareado realizado entre os valores de TI obtidos com e₂₈₅₀ e e₂₈₅₀/e₂₆₇₅, que confirma a equivalência das medidas.

Tabela IX: Teste-t pareado (95%) para as médias de TI calculadas a partir de e₂₈₅₀ e e₂₈₅₀/e₂₆₇₅.

| | e ₂₈₅₀ | e ₂₈₅₀ / e ₂₆₇₅ |
|----------------------|--------------------------|---|
| Média | 1767 | 1764 |
| Variância | 3096822 | 3054303 |
| Observações | 5 | 5 |
| Graus de liberdade | 4 | |
| t calculado | 0,23 | |
| t crítico bi-lateral | 2,78 | |

Os valores de TI também foram calculados utilizando somente a emissão bruta a 2850 nm (Tabela X). Embora qualitativamente as curvas sejam semelhantes, a forma das curvas de L₂₈₅₀ ficou alterada de tal modo que TI é subestimado – fato confirmado pelo teste-t pareado (Tabela XI). Isto porque a falta de linearidade no final da curva de estabilidade diminui a inclinação da reta ajustada para a região de oxidação, levando o ponto de insterseção para tempos mais curtos. Este decréscimo de TI, contudo, não é necessariamente um problema. O tempo de indução é afetado por uma série de parâmetros experimentais cuja escolha é arbitrária, de modo que o signifado do valor de TI, por si mesmo, não se representa o parâmetro de real interesse - o tempo de prateleira. Cabe lembrar que qualquer medida de estabilidade oxidativa realizada por um método acelerado medidas apenas tem sentido quando correlacionada com um outro método cuja correlação com o tempo de prateleira já esteja bem estabelecida. A relação entre os valores de TI para cada temperatura calculados com essa resposta é equivalente à calculada com as demais, e isso é evidência de que os resultados estão consistentes entre si, da mesma forma que os resultados calculados com as demais respostas. O único problema real observado foi a impossibilidade de obter TI com essa resposta à temperatura igual a 180 °C. As curvas de L₂₈₅₀ nessa temperatura mostraram-se distorcidas a tal ponto que não foi possível distinguir as regiões necessárias à determinação de TI.

| Temperatura | | TI réplica (s) | | | | | desvio | CV |
|-------------|------|----------------|------|------|------|------|------------|------|
| (°C) | 1 | 2 3 4 | | 4 | 5 | (s) | padrão (s) | (%) |
| 140 | 4107 | 4308 | 4306 | 4463 | 4182 | 4273 | 136 | 3,2 |
| 150 | 2126 | 2197 | 2263 | 1863 | 2099 | 2110 | 152 | 7,2 |
| 160 | 978 | 983 | 1046 | 1153 | 1158 | 1064 | 88 | 8,3 |
| 170 | 330 | 486 | 424 | 444 | 513 | 439 | 70 | 16,0 |
| 180 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabela X: Medidas de uma amostra de óleo de milho em cinco temperaturas diferentes. Valores obtidos a partir da curva da emissão bruta a 2850 nm. V_{amostra} = 10 μL.

Tabela XI: Teste-t pareado (95%) para as médias de TI calculadas a partir de L₂₈₅₀ e e₂₈₅₀/e₂₆₇₅.

| | e ₂₈₅₀ / e ₂₆₇₅ | L ₂₈₅₀ |
|----------------------|---|-------------------|
| Média | 2148 | 1907 |
| Variância | 3087673 | 2829502 |
| Observações | 4 | 4 |
| Graus de liberdade | 3 | |
| t calculado | 4,59 | |
| t crítico bi-lateral | 3,18 | |

Um efeito que, embora observado nos trabalhos anteriores do grupo, não pôde ser quantificado e elucidado, foi a variação da inclinação na parte oxidativa das curvas com a temperatura. O coeficiente de variação encontrado foi da ordem de 20 % para uma mesma temperatura. Uma provável explicação para esta

elevada flutuação na inclinação estaria relacionada à dificuldade de se obter um posicionamento reprodutível da célula de amostra. Após uma série de observações, foi constatado que a célula não se ajustava de forma reprodutível no suporte que a aquecia. Assim, pequenas variações no posicionamento ocorriam entre as análises, alterando a intensidade da radiação. Esta variação é responsável também pela alteração da linha base entre uma análise e outra, que pode ser observada na Figura 35.



Figura 35: Curvas de estabilidade obtidas em quintuplicata para uma amostra de óleo de milho, a 150 °C. $V_{amostra}$ = 10 µL.

Para confirmar a hipótese de que a precisão das medidas é função somente da magnitude de TI, e não da temperatura, análises em quintuplicata de óleos com estabilidades diferentes foram realizadas, a uma mesma temperatura. Os resultados são apresentados na Tabela XII, e eles mostram que a hipótese é confirmada.

| <i>.</i> | | TI r | éplica | (s) | | | desvio | CV |
|----------|------|------|--------|------|------|-------------------------|---------------|------|
| Oleo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | TI _{médio} (S) | padrão (s) | (%) |
| amendoim | 274 | 283 | 450 | 542 | 320 | 374 | 117 | 31,4 |
| milho | 1162 | 1157 | 1209 | 1249 | 1266 | 1209 | 49 | 4,1 |
| azeite | 1846 | 1871 | 1913 | 1862 | 1809 | 1860 | 38 | 2,0 |

Tabela XII: Determinação de TI de três amostras de óleos em quintuplicata. T = 160 $^{\circ}C$; V_{amostra} = 10 µL.

Por fim, nota-se que o desvio padrão encontrado é próximo ao das medidas com o espectrofotômetro NIRES. A precisão dessas medidas é também da mesma ordem que da obtida pelo método Rancimat.

3.7 Avaliação do Tempo de Integração para um Único Filtro

Conforme concluído na seção anterior, não há necessidade da utilização do filtro de referência. O perfil das curvas de estabilidade e os tempos de indução são equivalentes àqueles medidos com e₂₈₅₀/e₂₆₇₅.

Primeiramente, foi investigado o tempo de integração. Este parâmetro é importante, pois, um tempo muito curto não filtra o ruído adequadamente, alterando a forma da curva e prejudicando assim a determinação de TI. Por outro lado, um tempo muito longo pode eventualmente suavizar excessivamente a curva, de modo que, para valores baixos, a localização de TI ficaria comprometida. Para encontrar o intervalo de tempo ideal, uma mesma amostra de óleo de milho foi analisada com três tempos de integração diferentes, a 160 °C. Os resultados são apresentados na Figura 36.



Figura 36: Curvas de estabilidade obtidas com o monitoramento somente do filtro a 2850 nm, com tempos de integração do sinal diferentes. (a) 4 segundos; (b) 20 segundos; (c) 30 segundos.

Os resultados mostram que um tempo de integração de 30 segundos é suficiente para que se tenha uma definição adequada da curva. No entanto, é possível que para óleos com tempos de indução mais curtos, este valor precise ser diminuído, de modo a aumentar o número de pontos na região de estabilidade.

3.8 Avaliação Preliminar de Parâmetros Operacionais

3.8.1 Influência do Material da Célula

Considerando que alguns íons metálicos podem alterar o mecanismo das reações de autoxidação, foi realizada uma investigação preliminar da influência do material da célula. Para isso, foram efetuadas análises com uma célula de ferro para comparar os resultados com aqueles obtidos utilizando a célula de alumínio. Na figura 37 são apresentadas cinco curvas de uma mesma amostra de óleo de canola, sendo três delas realizadas na célula de ferro, e as outras duas na célula de alumínio, normalmente empregada. Observa-se claramente a imprecisão na determinação de TI com a célula de ferro – os valores variam entre 630 e 1300 segundos. Ainda assim, é notável que os valores encontram-se significativamente abaixo do valor encontrado com a célula de alumínio.



Figura 37: Curvas de estabilidade de uma amostra de óleo de canola obtidas com a célula de ferro e com a célula de alumínio. $V_{amostra} = 10 \ \mu$ L; T = 160 °C.

A ausência de reprodutibilidade nessas medidas muito provavelmente é decorrente de reações indesejáveis catalisadas por íons ferro liberados pela

superfície da célula. É possível que, a cada medida, a superfície do metal estivesse mais oxidada, de modo que a quantidade de íons Fe²⁺ e Fe³⁺ presentes no meio reacional fosse diferente em cada análise. Assim, a cada medida a autoxidação seria catalisada em graus diferentes, o que resulta na falta de reprodutibilidade observada. A própria superfície do ferro também pode atuar como um catalisador, mas ainda assim, é necessário que sua composição esteja vairando entre uma análise e outra, para justificar a baixa precisão. Se não houvesse modificações na superfície da célula entre uma análise e outra, não haveria razão para que a precisão fosse menor do que com a célula de alumínio.

Conclui-se então que a célula de ferro não é adequada para o uso no fotômetro desenvolvido, e que o material que constitui a célula deve ser selecionado com cautela. Aparentemente, a camada de passivação de óxido presente na superfície do alumínio não permite que o metal interfira no tempo de indução. Por outro lado, se há alguma influência, esta é reprodutível e se encontra presente em todas as medidas.

3.8.2 Influência do Volume de Amostra

Para avaliar o efeito do volume de amostra na determinação de TI, uma amostra de óleo de milho foi analisada empregando-se volumes de 5, 10, 15 e 20 μL. Na Figura 38 são apresentadas as curvas de estabilidade obtidas, e na Tabela XIII os tempos de indução. Como era esperado, a emissão aumenta à medida que o volume aumenta, fato que pode ser observado tanto pela linha base quanto pela inclinação da curva nas regiões de estabilidade e oxidação. Há também uma variação do ruído com o volume bastante evidente. De 5 a 20 μL, a razão S/R ruído tende a diminuir com o aumento do volume. Conforme discutido na seção 3.2.2, há fortes indícios da existência de uma correlação entre o ruído da medida de emissão e a flutuação da temperatura. É possível então, que, com uma massa maior de óleo, o equilíbrio térmico seja mais dificilmente atingido, o que explicaria o fato observado. Ao menos com o Rancimat, há na literatura trabalhos que mostram que massas maiores de óleo acarretam um aumento no coeficiente de

variação de TI, justificado pela dificuldade de se estabelecer um equilíbrio térmico na amostra [FARHOOSH 2007]. Por outro lado, razão S/R observada na medida realizada com 5 μ L é maior do que com 10 μ L. Isso ocorre porque, nessas condições, o volume de amostra já é suficientemente baixo para diminuir o sinal de forma siginificativa, reduzindo a razão S/R.

| Volumo (ul.) | | Т | (s) | |
|--------------|------|------|-------|------|
| Volume (µL) | 1 | 2 | Média | CV |
| 5 | 1826 | 1835 | 1831 | 0,35 |
| 10 | 1930 | 1796 | 1863 | 5,09 |
| 15 | 1864 | 1891 | 1878 | 1,02 |
| 20 | 2000 | 1850 | 1925 | 5,51 |
| Global | - | - | 1874 | 3,49 |

Tabela XIII: Tempos de indução de uma amostra de óleo de milho analisada com alíquotas de volumes diferentes.



Figura 38: Curvas de estabilidade obtidas com diferentes volumes de óleo.(a) $V_{amostra} = 5 \ \mu L$; (b) $V_{amostra} = 10 \ \mu L$; (c) $V_{amostra} = 15 \ \mu L$; (d) $V_{amostra} = 20 \ \mu L$. $T = 160 \ {}^{\circ}C$.

Os tempos de indução, por outro lado, não apresentaram variação significativa na faixa de 5 - 20 μ L. Aparentemente, as medidas com 5 μ L e 15 μ L apresentaram precisão maior do que a medida com 10 μ L. Porém, como as análises foram realizadas somente com duplicatas, não é possível afirmar que exista um efeito real. De fato, o coeficiente de variação calculado para todas as determinações é da mesma ordem de grandeza daquele calculado para as medidas em quintuplicata anteriormente, indicando fortemente que a precisão não é influenciada pelo volume de amostra.

Um estudo mais detalhado ainda precisa ser realizado a fim de otimizar o volume de amostra. No entanto, os dados atuais indicam ao menos a faixa a ser estudada, e que o volume de 10 µL empregado como padrão ao longo deste trabalho fornece resultados satisfatórios em termos de sensibilidade, relação sinal/ruído e precisão para a determinação de TI.

3.9 Investigação Preliminar de Amostras de Biodiesel

Conforme discutido na seção 1.6, os processos de degradação de biodiesel são de natureza semelhante às reações que ocasionam a decomposição de lipídeos – reações de autoxidação e polimerização também ocorrem com ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos. Para averiguar a viabilidade de analisar a estabilidade oxidativa de biodiesel com o instrumento desenvolvido, foram analisadas duas amostras de biodiesel. Os resultados são apresentados na Tabela XIV, e a curva de estabilidade de uma das amostras é exibida na Figura 39.

Os resultados mostram que amostras de biodiesel tendem a ser muito menos estáveis do que amostras de óleo. De fato, foi necessário reduzir a temperatura usual de análise para 140 °C. Possivelmente, esta baixa estabilidade é decorrente da perda de antioxidantes no processo de produção do biodiesel. A própria reação de transesterificação é realizada em temperaturas ligeiramente elevadas – cerca de 60 °C, no caso da esterificação com metanol –, de modo que os antioxidantes são parcialmente consumidos. A etapa de lavagem também deve ocasionar uma perda considerável dos antioxidantes. A maioria desses compostos são fenóis (ver seção 1.2), e, sendo a esterificação realizada com catálise alcalina, os antioxidantes estarão sob a forma de fenolatos. Assim, é razoável admitir que eles sejam carreados para a fase aquosa durante o processo de lavagem do biodiesel.



Figura 39: Curva de estabilidade de uma amostra de biodiesel. T = 140 $^{\circ}C$; V_{amostra} = 10 µL.

Tabela XIV: Medidas de amostras de biodiesel realizadas a 140 °C com o fotômetro NIRES. $V_{amostra}$ = 10 µL.

| Amostra - | | TI (NIR | ES) / s | |
|-----------|------|---------|---------|------|
| | 1 | 2 | MÉDIA | CV |
| B1 | 1154 | 1339 | 1247 | 10,5 |
| B2 | 3341 | 3423 | 3382 | 1,7 |

3.10 Análises Comparativas com o Rancimat

Para verificar a existência de uma correlação entre o método NIRES e o Rancimat, foram analisadas 12 amostras de óleos diferentes em duplicatas, em ambos os equipamentos. As análises no Rancimat foram efetuadas à temperatura de 120 °C, com fluxo de ar de 10 L . h⁻¹. O Rancimat utilizado foi um modelo 873, da Metrohm. As medidas no instrumento desenvolvido foram realizadas a 160 °C, com um único filtro, fluxo de ar de 500 mL.min⁻¹ e volume de amostra de 10 μ L. Na Tabela XV são descritas as especificações de cada óleo. De uma maneira geral, foram escolhidos óleos comestíveis dos tipos mais comumente encontrados comercialmente – soja, milho, canola e girassol. Também foram analisadas duas amostras de azeite de oliva extra-virgem e uma amostra de óleo de amendoim. Para cada tipo de óleo foram selecionados ao menos dois fabricantes distintos, exceto para o óleo de amendoim. Óleos com datas de fabricação mais antigas também foram analisados.

| A monostruo | Tine de Álee | Tabricanta | Data de | Data de |
|-------------|---------------------|------------|------------|----------|
| Amostra | l ipo de oleo | Fabricante | fabricação | validade |
| OC2 | canola | А | 25/01/12 | 01/10/12 |
| OC3 | canola | D | 07/12/11 | 06/12/12 |
| OM2 | milho | А | 21/12/11 | 01/07/12 |
| OM3 | milho | В | 09/02/12 | 08/02/13 |
| OS2 | soja | В | 03/02/12 | 01/08/12 |
| OS3 | soja | С | 15/02/12 | 15/11/12 |
| OG1 | girassol | А | 18/02/12 | 01/11/12 |
| OG2 | girassol | В | 16/02/12 | 15/02/12 |
| OG3 | girassol | A | 25/03/10 | 01/12/10 |
| OA1 | amendoim | Е | 08/09/09 | 08/06/10 |
| A1 | azeite extra-virgem | F | * | 01/01/14 |
| A2 | azeite extra-virgem | G | 01/02/12 | * |

Tabela XV: Amostras de óleo analisadas.

*Informação não disponível.

| Amostro | Teor de | ácidos graxos (g/13 n | nL) | Teor de antioxi | dantes (mg | /13 mL) |
|---------|----------------|-----------------------|-----------|-----------------|------------|---------|
| Amostra | Polinsaturados | Monoinsaturados | Saturados | vitamina E | TBHQ | H₃Cit |
| OC2 | 3,2 | 7,8 | 1 | 2,8 | * | * |
| OC3 | 3,7 | 7,3 | 1 | 2,4 | * | * |
| OM2 | 5,8 | 4,4 | 1,8 | 4,3 | * | * |
| OM3 | 5,9 | 4,3 | 1,8 | 2,0 | * | * |
| OS2 | 7,1 | 2,9 | 2 | 1,7 | * | * |
| OS3 | 7 | 3 | 2 | 2,8 | sim | sim |
| OG1 | * | * | 1,4 | 7,8 | * | sim |
| OG2 | 7,3 | 3,9 | 1,3 | 4,8 | * | * |
| OG3 | * | * | 1,4 | 7,8 | * | sim |
| OA1 | 2,9 | 7 | 2,1 | * | * | sim |
| A1 | * | * | * | * | * | * |
| A2 | * | * | * | * | * | * |

Tabela XVI: Composição de ácidos graxos e quantidade de antioxidantes das amostras de óleo analisadas. Dados fornecidos pelos fabricantes.

*Informação não disponível.

Na tabela XVII são apresentados os resultados obtidos. Em primeiro lugar, é evidente que os tempos de indução medidos com o fotômetro NIRES são muito inferiores àqueles determinados pelo Rancimat, como esperado. Além disso, observa-se também que os óleos de um mesmo tipo, mas com datas de fabricação mais antigas apresentam tempos de indução mais curtos, como era de se esperar. A amostra OG3, fabricada em 2010 apresenta TI cerca de 500 s menor do que as amostras OG1 e OG2, fabricadas em 2012. Com o Rancimat, esta relação também é observada.

| | TI (NIRES) / s [†] | | | | TI (Rancimat) / s [‡] | | | |
|------------|-----------------------------|------|-------|-----|--------------------------------|-------|-------|-----|
| | 1 | 2 | MÉDIA | CV | 1 | 2 | MÉDIA | CV |
| OG1 | 961 | 891 | 926 | 5,3 | 9972 | 9900 | 9936 | 0,5 |
| OG2 | 901 | 942 | 922 | 3,1 | 9500 | 9468 | 9484 | 0,2 |
| OS2 | 1593 | 1624 | 1609 | 1,4 | 14904 | 15012 | 14958 | 0,5 |
| OM2 | 1888 | 1816 | 1852 | 2,7 | 19044 | 19836 | 19440 | 2,9 |
| OM3 | 1950 | 1995 | 1973 | 1,6 | 19152 | 19728 | 19440 | 2,1 |
| OA1 | 791 | 741 | 766 | 4,6 | 11088 | 10368 | 10728 | 4,7 |
| OC2 | 1972 | 1904 | 1938 | 2,5 | 17424 | 17136 | 17280 | 1,2 |
| OC3 | 1710 | 1724 | 1717 | 0,6 | 14364 | 14976 | 14670 | 2,9 |
| OG3 | 441 | 418 | 430 | 3,8 | 7164 | 7812 | 7488 | 6,1 |
| OS3 | 2019 | 1993 | 2006 | 0,9 | 24084 | 24660 | 24372 | 1,7 |
| A 1 | 2478 | 2479 | 2479 | 0,0 | 33084 | 34128 | 33606 | 2,2 |
| A2 | 1991 | 1994 | 1993 | 0,1 | 27000 | 26856 | 26928 | 0,4 |

 Tabela XVII: Valores de TI obtidos para amostras de óleos comestíveis

 empregando o fotômetro NIRES desenvolvido e o Rancimat.

 $^{\dagger}V_{\text{amostra}} = 3 \text{ mL}; \text{ T} = 120 \ ^{\circ}\text{C}.$

 $^{\ddagger}V_{\text{amostra}} = 10 \ \mu\text{L}; T = 160 \ ^{\circ}\text{C}.$

Com o intuito de verificar a equivalência da precisão dos métodos, foi utilizado o teste-F para comparar as variâncias. Como a magnitude de TI difere significativamente de um método para o outro, o desvio padrão relativo foi utilizado no teste. Na Tabela XVIII são apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA) para cada método. A partir dela, conclui-se que as amostras são provenientes de uma mesma população, de modo que é possível calcular uma variância global para cada método e compará-los. As variâncias globais calculadas e o teste-F realizado (Tabela XIX) mostram que não é possível afirmar que exista uma diferença significativa entre a precisão dos métodos.

| Método | Fonte da variação | graus de liberdade | média quadrática | F _{calc.} | F _{1/22} (95%) |
|----------|-------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| | Entre grupos | 1 | 1262 | 0,003 | 4,301 |
| NIRES | Dentro dos grupos | 22 | 397925 | | |
| | Total | 23 | | | |
| | Entre grupos | 1 | 400417 | 0,006 | 4,301 |
| Rancimat | Dentro dos grupos | 22 | 62332065 | | |
| | Total | 23 | | | |

Tabela XVIII: Análise de Variância para as determinações de TI feitas com ambos os métodos.

Tabela XIX: Teste F entre os métodos NIRES e Rancimat.

| Variância global | Variância global | Ε. | F _{11/11} (95%) | |
|------------------|------------------|-------|--------------------------|--|
| NIRES | Rancimat | Calc. | | |
| 7,789 | 7,591 | 1,02 | 2,82 | |

Na Figura 40 é apresentada a comparação entre os métodos. Nela, verifica-se a existência de uma correlação entre os métodos (R² = 0,81; R = 0,90), muito embora a determinação de TI em cada método seja baseada em medidas de espécies químicas diferentes. Correlações maiores entre métodos baseados em formação de peróxidos (ESR) e o Rancimat já foram observadas na literatura [VELASCO et al. 2004], de modo que esta não pode ser a razão pela qual a correlação entre o NIRES e o Rancimat não ter sido maior. O fato de não ter sido observada uma correlação maior pode ser devido à grande diferença de

temperatura entre as medidas. Em geral, as medidas de ESR são realizadas na mesma temperatura do Rancimat.



Figura 40: Comparação entre os resultados obtidos com o Rancimat e com o fotômetro NIRES.

Há também de se considerar a presença de uma grande variedade de antioxidantes nas diferentes amostras de óleo. É possível que a eficiência de tais compostos varie também com a temperatura, de modo que amostras com tipos diferentes de protetores terão taxas de variação de TI/ temperatura diferentes. De fato, há na literatura [FRENKEL 2005] exemplos desta variação.

Na Figura 41, é mostrada a correlação entre os métodos excluindo as amostras de azeite e o óleo de soja contendo TBHQ. O melhoramento na correlação observado ao ser retirada a amostra contendo TBHQ poderia ser atribuído a degradação térmica deste antioxidante. Porém, há na literatura [HAMAMA e NAWAR 1991] estudos que apontam o TBHQ como um composto estável nestas condições, ao menos durante o tempo de análise. Assim, é mais provável que a atuação desta substância como antioxidante é que esteja de fato sendo diminuída com o aumento da temperatura.

A melhora na correlação devido à remoção das amostras de azeite de oliva, por outro lado, pode ser atribuída à composição bastante diferenciada deste tipo de óleo. De uma maneira geral, azeites de oliva apresentam elevados teores dos ácidos oleico (18:1) e palmítico (16:1) [SPANGENBERG et al 1998], além de conter diversos compostos fenólicos que agem como antioxidantes naturais [FRENKEL 2010]. Tanto o teor apreciável de ácidos graxos monoinsaturados quanto a presença de antioxidantes fenólicos contribuem para a alta estabilidade do azeite de oliva. Contudo, estes antioxidantes se decompõem à temperaturas relativamente baixas, de modo que mesmo o Rancimat seria incapaz de medir o seu efeito no retardamento do processo oxidativo. De fato, o TI medido pelo Rancimat aumenta a inclinação da reta na Figura 40 com relação à Figura 41 – um indicativo que, se os antioxidantes estivessem sendo preservados, o valor de TI medido pelo NIRES deveria ser mais alto. De qualquer forma, o azeite de oliva é um caso típico de superestimação de tempo de prateleira pelo Rancimat, conforme mencionado na seção 1.4. Assim, é evidente que para estimar corretamente o tempo de prateleira deste tipo de amostra devem ser empregados métodos à temperaturas mais baixas, ou mesmo realizar um estudo a longo prazo em tempo real.



Figura 41: Comparação entre os resultados obtidos com o Rancimat e com o fotômetro NIRES, excluindo as amostras de azeite e óleo de soja com TBHQ.

A regressão linear ajustada nas Figuras 40 e 41 também permite comparar a cinética do processo em cada um dos métodos. Analisando somente a temperatura, era de se esperar uma inclinação próxima de 2⁴ – o tempo de indução dobra a cada variação de 10 °C, aproximadamente. No entanto, a inclinação encontrada é cerca de metade desse valor, indicando que uma extrapolação dos tempos de indução medidos com o Rancimat levaria a valores menores na temperatura igual a 160 °C. Em um trabalho anterior do grupo [GONZAGA et al. 2007], o método NIRES foi comparado com o Rancimat, porém, a 110 °C. Nele, a inclinação obtida também foi cerca de metade da esperada – aproximadamente 2⁴ ao invés de 2⁵.

Este comportamento não está de acordo com o esperado. Como as medidas de emissão são sensíveis à presença de peróxidos – produtos de propagação – era de se esperar que, para uma mesma temperatura, fossem encontrados

valores de TI menores com o NIRES. Uma provável explicação para isso é que a temperatura registrada pelo termopar difira da real temperatura da amostra. Futuramente, pretende-se realizar uma verificação detalhada desta possibilidade com o uso de um suporte de amostra no qual o termopar esteja mais próximo da amostra.

Apesar disso, o fotômetro desenvolvido ainda se mostra superior ao Rancimat no que diz respeito ao tempo de análise, dada a impossibilidade de utilizar o Rancimat em temperaturas superiores a 130 °C. De fato, uma série de vantagens podem ser atribuídas ao método NIRES quando comparado com o Rancimat, conforme ilustra a Tabela XX. A faixa de temperatura de trabalho no método NIRES permite a análise em temperaturas de fritura, o que não é possível com o Rancimat. O volume de amostra utilizado pelo fotômetro é 300 vezes inferior ao utilizado pelo Rancimat – uma grande vantagem em situações nas quais pouca quantidade de amostra está disponível. A medida de produtos de propagação no método NIRES permite identificar estágios de oxidação bastante primitivos, ao passo que no Rancimat a oxidação é verificada pelos produtos de terminação da cadeia. A principal vantagem do método NIRES com relação ao Rancimat, porém, é o tempo de análise muito inferior.

Tabela XX: Comparação entre as condições experimentais dos métodos Rancimat e NIRES.

| Parâmetro | Rancimat | NIRES |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| temperatura da amostra (ºC) | 100 - 130 | 160 - 190 |
| fluxo de ar | através do óleo | sobre a superfície do óleo |
| quantidade de amostra | 3,0 mL | 10,0 µL |
| produto de autoxidação monitorado | ácidos carboxílicos | hidroperóxidos |
| tempo de análise | ~10 - 20 horas | ~15 - 40 minutos |

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O instrumento proposto foi construído e avaliado com sucesso, sendo possível a obtenção de curvas de estabilidade oxidativa para diferentes tipos de óleos comestíveis. A precisão obtida para as medidas de TI está próxima da precisão do método Rancimat. Além disso, o instrumento apresenta também como vantagens o consumo muito menor de amostra – 10 μ L ao invés de 3 mL – e a simplicidade operacional – basta limpar a célula de amostra entre uma análise e outra. O Rancimat possui uma série de componentes como mangueiras e conectores, que são passíveis de contaminação e tornam os procedimentos de análise mais elaborados e longos.

Independente da comparação com o Rancimat, deve ser levado em consideração o fato de que nenhum método acelerado permite uma estimativa fiel do tempo de prateleira de um óleo. Conforme discutido ao longo deste trabalho, a determinação do tempo de prateleira a partir dos tempos de indução medidos em temperaturas elevadas constitui uma aproximação devido a enorme complexidade das reações envolvidas, de modo que há casos bem estabelecidos de tempos de prateleira subestimados e superestimados [FRENKEL 2005]. Assim, um estudo de correlação dos resultados obtidos por meio do fotômetro construído com o tempo de prateleira ainda deve ser realizado.

Atualmente, as análises no instrumento desenvolvido podem ser efetuadas de dois modos distintos – utilizando somente o filtro de 2850 nm, ou com ambos os filtros. Embora o filtro de referência tenha se mostrado desnecessário, é possível que ao introduzir um detector de custo inferior – uma das propostas futuras para o trabalho – surja um *drift* significativo do sinal analítico. Caso isso seja de fato verificado, o filtro de referência irá permanecer no instrumento. A relação sinal/ruído, contudo, irá diminuir, devido ao tempo menor de leitura em cada filtro. Porém, o custo do instrumento seria significativamente diminuído com o uso de um detector mais simples. Conforme discutido, uma relação sinal ruído menor não influencia de maneira crítica a precisão com a qual se obtém os tempos de

indução, a não ser que o tempo de indução medido apresente um valor pequeno (menor que 600 s, aproximadamente).

Conforme verificado na seção 3.2.2, há fortes evidências de que a maior parte do ruído instrumental seja oriundo de flutuações na temperatura (Figura 30). Assim, espera-se em versões futuras do instrumento melhorar a estabilidade da temperatura.

Um componente do instrumento que eventualmente pode ser substituído é o amplificador *lock-in*. Até então não foi realizada nenhuma medida na ausência deste filtro, inclusive porque a montagem atual do fotômetro não está protegida da radiação ambiente. Uma série de modificações nesta etapa de filtração do ruído pode ser proposta. Em primeiro lugar, deve-se verificar a necessidade do amplificador *lock-in* se o sistema for fechado, estando protegido da radiação externa. Em segundo lugar, é possível que um modelo simplificado do dispositivo seja suficiente para a aplicação em questão. Em outras palavras, um amplificador *lock-in* produzido no próprio laboratório pode ser empregado para testar essa hipótese. Por fim, há na literatura [CLARKSON et al. 2010, XIE et al. 2010] propostas de filtros digitais para substituir o amplificador *lock-in*.

Um estudo mais detalhado do uso do instrumento para a determinação de estabilidade oxidativa de biodiesel ainda deve ser realizado. O resultado obtido para as duas amostras analisadas já são indícios de que a hipótese inicial foi confirmada – o fotômetro é capaz de determinar TI para amostras de biodiesel da mesma forma que óleos vegetais. Futuramente, as amostras de biodiesel deverão ser sintetizadas e prontamente analisadas, pois já foi constatado que os tempos de indução diminuem drasticamente após a transesterificação. A explicação mais provável é que nas condições desta reação os antioxidantes naturais sejam degradados ou mesmo eliminados em etapas de purificação. A síntese do biodiesel também permitirá investigar se as propriedades do óleo são transferidas para o biodiesel, isto é, se óleos com elevada estabilidade oxidativa proporcionam um produto igualmente mais resistente. Se isto for verificado, será possível determinar a estabilidade do biodiesel a partir de sua matéria-prima.

Outra modificação proposta para o instrumento, é a possibilidade de adaptá-lo para efetuar a análise simultânea de várias amostras. Esta adaptação aumentaria muito a eficiência analítica, e o custo seria ligeiramente impactado. Com a introdução de um sistema de espelhos e um motor de passo adicional para girar um espelho central, uma série de amostras poderia ser analisada ao mesmo tempo, sendo a leitura da emissão de cada amostra realizada sequencialmente. Tal modificação poderá ser planejada somente após ser verificada a possibilidade de manter um único filtro com um detector mais simples. Isto porque o número de amostras irá depender do tempo de leitura em cada uma delas, e esse tempo está vinculado ao número de filtros de interferência que deverão ser empregados.

Em resumo, há ainda diversas modificações que poderão ser realizadas no equipamento de modo a torná-lo robusto o suficiente para ser testado em análises de rotina, e assim verificar o seu real potencial. Entretanto, o estudo realizado neste trabalho indica não haver razões para que o instrumento desenvolvido e avaliado não possa ser empregado na substituição ao método de referência implementado com o uso do equipamento Rancimat. Naturalmente, outros fatores que extrapolam aqueles do meio acadêmico devem ser considerados para que esta substituição possa ocorrer no futuro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUJA, P. M. e ESTERBAUER, H. 1995: Simulation of Lipid Peroxidation in Low-Density Lipoprotein by a Basic "Skeleton" of Reactions, *Chem. Res. Toxicol.* <u>8</u> 753.

American Oil Chemist's Society Official Method Cd 8-53, American Oil Chemists Society, Champaign, IL, 1973.

American Oil Chemist's Society Official Method Cd 12-57, American Oil Chemists Society, Champaign, IL, 1973.

American Oil Chemist's Society Official Method Cd 12b-92, American Oil Chemists Society, Champaign, IL, 1993.

ANWAR, F.; BHANGER, M I. e KAZI, T. G. 2003: Relationship Between Rancimat and Active Oxygen Method Values at Varying Temperatures, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>80</u> 151.

ARAKI, M. 2004: PID Control, in "Control Systems, Robotics, and Automation", in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UNESCO, Eolss Publishers, Oxford,UK.

BRODNITZ, M. H. 1968: Autoxidation of saturated fatty acids. A review, *J. Agric. Food Chem.* <u>16</u> 994.

CABO, N. e GUILLÉN, M. D. 2002: Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils, *Food Chem.* <u>77</u> 503.

CLARKSON, P.; ESWARD, T. J.; HARRIS, P. M.; SMITH, A. A. e SMITH, I. M. 2010: Software simulation of a lock-in amplifier with application to the evaluation of uncertainties in real measuring systems, *Meas. Sci. Tech.* <u>21</u> 1.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F. e PRYOR, W. A. 1987: The Kinetics of the Autoxidation of Poylunsaturated Fatty Acids, *Lipids*. <u>22</u> 299.

CROSS, C. K. 1970: Oil Stability: A DSC Alternative for the Active Oxygen Method, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>47</u> 229.

DANTAS, M.B.; ALBUQUERQUE, A.R.; BARROS, A.K.; RODRIGUES FILHO, M.G.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SINFRÔNIO, F.S.M.; ROSENHAIM, R.; SOLEDADE, L.E.B.; SANTOS, I.M.G. e SOUZA, A.G. 2011: Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel, *Fuel*. <u>90</u> 773.

DAUN, J. K.; CLEAR, K. M. e WILLIAMS, P. 1994: Comparison of Three Whole Seed Near-Infrared Analyzers for Measuring Quality Components of Canola Seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>71</u> 1063.

DEBLASE, F. J.; e COMPTON, S. 1991: Infrared Emission Spectroscopy: A Theoretical and Experimental Review, *App. Spec.* <u>45</u> 611.

DE LA PRESA-OWENS, S.; LOPEZ-SABATER, M. C.e RIVERO-URGELL, M. 1995: Shelf-Life Prediction of an Infant Formula Using an Accelerated Stability Test (Rancimat), *J. Agr. Food Chem.* <u>43</u> 2879.

FARHOOSH, R. 2007: The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-Life Prediction of Soybean Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>84</u> 205.

FRENKEL, E.N. (2005) Lipid oxidation. The Oily Press.

FRENKEL, E. N. 2010: Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* <u>58</u> 5991.

GERTZ, C.; KLOSTERMANN, S. e KOCHHAR, S. P. 2000: Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* <u>102</u> 543.

GONZAGA, F. B. 2006: Tese de Doutorado – Desenvolvimento de um Espectrômetro de Emissão para a Região do Infravermelho Próximo. DQA-IQ UNICAMP.

GONZAGA, F. B.; JARDIM, I. C. S. F. e PASQUINI, C. 2006: Use of near infrared emission spectroscopy in the study of supporting materials and stationary phases for liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* <u>1122</u> 174.

GONZAGA, F. B. e PASQUINI, C. 2005: Near-infrared emission spectrometry based on an acousto-optical tunable filter, *Anal. Chem.* <u>77</u> 1046.

GONZAGA, F. B. e PASQUINI, C. 2006: A new method for determination of the oxidative stability of edible oils at frying temperatures using near infrared emission spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.* <u>570</u> 129.

GONZAGA, F. B.; PASQUINI, C.; RODRIGUES, C. E. C. e MEIRELLES, A. J. A. 2007: Comparison of near-infrared emission spectroscopy and the rancimat method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* <u>109</u> 61.

GUILLÉN, M. D. e CABO, N. 1999: Usefulness of the Frequency Data of the Fourier Transform Infrared Spectra toEvaluate the Degree of Oxidation of Edible Oils, *J. Agric. Food Chem.* <u>47</u> 709.

GUILLÉN, M. D. e GOICOECHEA, E. 2007: Detection of primary and secondary oxidation products by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and 1H nuclear magnetic resonance (NMR) in sunflower oil during storage, *J. Agric. Food Chem.* <u>55</u> 10729.

HAMAMA, A. A. E NAWAR, W. W. 1991: Thermal Decomposition of Some Phenolic Antioxidans, *J. Agric. Food. Chem.* <u>39</u>1063.

HANGA, C. C.; ASTROMB, K. J. e WANG, Q.G. 2002: Relay feedback auto-tuning of process controllers — a tutorial review, *J. Proc. Control* <u>12</u> 143.

HARTRIDGE, H. e LITTLE, A. D. 1950: Thermal Radiation from Partially Transparent Reflecting Bodies, *J. Opt. Soc. Am.* <u>40</u> 300.

HASENHUETTL, G. L. e WAN, P. J. 1992: Temperature effects on the determination of oxidative stability with the metrohm rancimat, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>69</u> 525.

HOROWITZ, P. e HILL, W. (1989) The Art of Electronics. Cambridge University Press.

HUANG, D.; OU, B. e PRIOR, R. L. 2005: The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*,53 1841.

KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S. e KARONIS, D. 2010: Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends, *Fuel.* <u>89</u> 2483.

KAYA, A.; TEKIN, A. R. e ÖNER, M. D. 1993: Oxidative Stability of Sunflower and Olive Oils: Comparison between a Modifified Active Oxygen Method and Long Term Storage, *Food Sci. Technol.* <u>26</u> 464.

KERESZTURY, G.; MINK, J. e KRISTÓF, J. 1995: Quantitative Aspects of FT-IR Emission Spectroscopy and Simulation of Emission - Absorption Spectra, *Anal. Chem.* <u>67</u> 3782.

KIM, K. S.; PARK, S. H. e CHOUNG, M. G. 2006: Nondestructive Determination of Lignans and Lignan Glycosides in Sesame Seeds by Near Infrared Reflectance Spectroscopy, *J. Agric. Food. Chem.* <u>54</u> 4544.

KNOTHE, G. 2006: Analyzing Biodiesel : Standards and Other Methods, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>83</u> 823.

KODALI, D. R. 2005: Oxidative stability measurement of high-stability oils by pressure differential scanning calorimeter (PDSC), *J. Agric. Food Chem.* <u>53</u> 7649.

LANDSBERG, P. T. (1978) Thermodynamics and Statistical Mechanics. Cap. 13, Dover Courier Publications.

McCLURE, W. F. 1994: Near-Infrared Spectroscopy: The Giant is Running Strong, *Anal. Chem.* <u>66</u> 43A.

MINOTTI, G. 1993: Sources and Role of Iron in Lipid Peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.* <u>6</u> 134.

MINOTTI, G. e AUST, S. D. 1992: Redox Cycling and Lipid Peroxidation, *Lipids* <u>27</u> 219.

NELSON-AVERY, B. A. e TILOTTA, D. C. 1994: Near-Infrared Molecular Emission from a Gas Fountain, *App. Spec.* <u>48</u> 1461.

NIEWITETZKI, O.; TILLMANN, P.; BECKER, H. C. e MÖLLERS, C. 2010: A New Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Method for High-Throughput Analysis of Oleic Acid and Linolenic Acid Content of Single Seeds in Oilseed Rape (*Brassica napus L.*). *J. Agric. Food. Chem.* <u>58</u> 94.

PAJUNEN, T. I.; JOHANSSON, M. P.; HASE, T. e HOPIA, A. 2008: Autoxidation of conjugated linoleic acid methyl ester in the presence of alpha-tocopherol: the hydroperoxide pathway, *Lipids* <u>43</u> 599.

PASQUINI, C. 2003: Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications, *J. Braz. Chem. Soc.* <u>14</u> 198.

PETISCO, C.; B. GARCIA-CRIADO, B.; B.R. VÁZQUEZ-DE-ALDANA, B. R.; HARO, A. e GARCIA-CIUDAD, A. 2010: Measurement of quality parameters in
intact seeds of Brassica species using visible and near-infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products* <u>32</u> 139.

REYNHOUT, G. 1991: The effect of temperature on the induction time of a stabilized oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>68</u> 983.

RICHARDS, A.; WIJESUNDERA, C. e SALISBURY, P. 2005: Evaluation of oxidative stability of canola oils by headspace analysis, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>82</u> 869.

RUSSIN, T. A.; VOORT, F. R. e SEDMAN, J. 2004: Rapid determination of oxidative stability of edible oils by FTIR spectroscopy using disposable IR cards, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>81</u> 111.

SCHAICH, K. M. 1992: Metal and Lipid Oxidation. Contemporary Issues, *Lipids* <u>27</u> 209.

SEPPANEN, C. M. ;SONG, Q. e CSALLANY, A. S. 2010: The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>87</u> 469.

SIEMENS, B. J. e DAUN, J. K. 2005: Determination of the Fatty Acid Composition of Canola, Flax, and Solin by Near-Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* <u>82</u> 153.

SPANGENBERG, J. E.; MACKO, S. A. e HUNZIKER, J. 1998: Characterization of Olive Oil by Carbon Isotope Analysis of Individual Fatty Acids: Implications for Authentication. *J. Agric. Food Chem.* <u>46</u> 4179.

SZLYK, E.; SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A. e KOWALCZYK-MARZEC, A. 2005: NIR Spectroscopy and Partial Least-Squares Regression for Determination of Natural α-tTocopherol in Vegetable Oils, *J. Agric. Food Chem.* <u>53</u> 6890.

TAN, C. P.; MAN, Y. B. C.; SELAMAT, J. e YUSOFF, M. S. A. 2002: Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods, *Food Chem.* <u>76</u> 385.

THOMSEN, M. K.; KRISTENSEN, D.e SKIBSTED, L. H. 2000: Electron Spin Resonance Spectroscopy for Determination of the Oxidative Stability of Food Lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>77</u> 725.

TIAN, K. e DASGUPTA, P K. 1999: Determination of oxidative stability of oils and fats, *Anal. Chem.* <u>71</u> 1692.

TILOTTA, D. C.; BUSCH, K. W. e BUSCH, M. A. 1989: Fourier Transform Flame Infrared Emission Spectroscopy, <u>43</u> 704.

TSOUKALAS, B. e GROSCH, W. 1977: Analysis of Fat Deterioration – Comparison of Some Photometric Tests, *J. Am. Oil Chem. Soc.* <u>54</u> 490.

VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L. e SKIBSTED, L. H. 2004: Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry, *Food Chem.* <u>85</u> 623.

VELASCO, L.; MÖLLERS, C e BECKER, H. C. 1999: Estimation of seed weight, oil content and fatty acid composition in intact single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy *Euphytica*. <u>106</u> 79.

WILLIAMS, P. e NORRIS, K. (2001) Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd Edition, American Association of Cereal Chemists, Inc.

XIE, Q.; LI, J.; GAO, X.; e JIA, J. 2010: Fourier domain local narrow-band signal extraction algorithm and its application to real-time infrared gas detection, Sensors and Actuators B. <u>146</u> 35.