



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM FÍSICA BACHARELADO

AFONSO LUIZ DANTAS MOURA

MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NO ESTUDO DE
PETRÓLEO

FORTALEZA

2019

AFONSO LUIZ DANTAS MOURA

**MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NO ESTUDO DE
PETRÓLEO**

Trabalho apresentado ao Programa de Graduação em Física Bacharelado da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Física.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M884m Moura, Afonso Luiz Dantas.
Métodos de aplicação de fluorescência no estudo de petróleo / Afonso Luiz Dantas Moura. – 2019.
50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Física, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar.

1. Fotônica. 2. Espectroscopia. 3. Fluorescência. 4. Microscopia. 5. FLIM. I. Título.

CDD 530

AFONSO LUIZ DANTAS MOURA

MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NO ESTUDO DE PETRÓLEOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Graduação em Física Bacharelado da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Física.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra Rosemayre Souza Freire
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Filipe Xavier Feitosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha irmã, Isabel Dantas Moura. Aos meus pais, Carmen Lucia Dantas Moura, Jean Carlos de Castro Moura e aos meus lindos gatinhos.

AGRADECIMENTOS

À CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Calos Lenz Cesar, pela orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra Rosemayre Souza Freire e Prof. Dr. Filipe Xavier Feitosa pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus professores de todas as cadeiras pelos ensinamentos e pela paciência.

Novamente, à minha colega de laboratório, tutora e grande amiga Rosemayre Freire, principalmente pela paciência comigo.

À minha família pelos empurrões quando eu estagnava e pelo apoio quando eu tropeçava, sem eles eu não teria terminado meu curso. Minha irmã Isabel Dantas Moura, minha mãe Carmen Lúcia Dantas Moura, meu pai Jean Carlos de Castro Moura e aos meus gatinhos Léo e Paolo.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração necessários para manter minha sanidade durante os períodos estressantes do curso. (Nomeados em ordem alfabética) Agnaldo Brito, Eduardo Austregésilo, Hélio Parente, Ingrid Pedrosa, Lara Ponciano, Mauricio Xavier e Thaís Urano.... Agradeço também a seus animais de estimação: Pucca, Pepe, Pituca, Thor e Francisco.

A todos os colegas feitos nesse período de faculdade pela ajuda em assuntos acadêmicos e pessoais, ou pelos momentos de empatia em momentos difíceis. E claro, pela amizade: Luan Luiz, Vi(c)tor Hugo, João Henrique, William Valentim, Higor Monteiro, Kaique Billotta, Felipe Torres, Pablo Motta, Leticia Oliver, Cássio César, Jessé Rodrigues, Pedro Uchoa (Dentre outros que não vou conseguir lembrar agora).

“Always Double Check”

RESUMO

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de petróleo, mas ainda carece de tecnologias e métodos de caracterização imediata de óleos crus extraídos de plataformas brasileiras com relativa rapidez e baixo custo. Com essa visão em mente, o objetivo deste trabalho foi aplicar três técnicas de óptica linear e não linear para determinar sua eficiência na diferenciação e caracterização de amostras homogêneas de petróleo, e seus respectivos asfaltenos, retiradas de diversos poços profundos do território brasileiro enquanto utiliza-se um procedimento simplificado de separação. Para a análise das amostras, foram utilizadas três técnicas de fotônica: *Photoluminescence Excitation (PLE)*, *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)* e *Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)*. Pelos resultados obtidos tivemos que o procedimento adotado para diluição e separação das amostras de óleo cru e seus asfaltenos constituintes não foi ideal para obtenção resultados conclusivos nas técnicas de FLIM e FCS, mas foi capaz de traçar perfis diferenciáveis nos resultados da técnica de PLE. A partir da análise dos resultados obtidos e da discussão dos dados, foi possível concluir que os procedimentos empregados para o estudo das amostras não levaram em conta a complexidade das mesmas e muito ainda se tem a aprender sobre os perfis fluorescentes de óleos crus e suas frações constituintes.

Palavras-chave: Fotônica, Espectroscopia, Fluorescência, Microscopia, FLIM, Tempo de vida, PLE, FCS, Correlação.

ABSTRACT

Brazil is one of the world's largest oil producers, but still lacks technologies and low cost methods for the immediate characterization of crude oils extracted from Brazilian rigs. With this in mind, the objective of this work was to apply three techniques of linear and nonlinear optics and their efficiency in the differentiation and characterization of non-homogeneous oil samples, and their respective asphaltenes. The samples were taken from four Brazilian rigs and a simplified cold separation procedure was used. For the samples analysis, three photonic techniques were used: Photoluminescence Excitation (PLE), Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) and Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). The obtained results, from the procedure adopted for dilution and separation of the crude oil samples and their constituent asphaltenes were not reliable results in the FLIM and FCS techniques, but we were able to draw differentiable profiles in the results of the PLE technique.

From the obtained results analysis and the discussion of the data, it was possible to conclude that the samples study used procedures did not take into account their complexity and there is much to be learned about the fluorescent profiles of crude oils and their fractions constituents.

Keywords: Spectroscopy, photonics, Fluorescence, Microscopy, FLIM, Lifetime, PLE, FCS, Correlation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM das amostras de óleos crus cedidas pela Petrobras.....	37
Tabela 2 - A tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM dos asfaltenos das amostras de cedidas pela Petrobras.....	39
Tabela 3 - Tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FCS de asfaltenos das amostras cedidas pela Petrobras.....	40
Tabela 4 - Tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM dos asfaltenos da amostra	44
Tabela 5 - Tabela das as curvas de autocorrelação obtidas utilizando o procedimento de FCS na amostra C.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Stokes	15
Figura 2 - Poço Infinito.....	16
Figura 3 - Potencial de Lennard para molécula de Argônio.....	17
Figura 4 - Potencial de Morse.....	18
Figura 5 - Diagrama de Stokes.....	19
Figura 6 - Curva de Decaimento.....	20
Figura 7 - Modo de imagens de FLIM TCSPC.....	21
Figura 8 - Esquema gráfico do confocal.....	22
Figura 9 - Caminho óptico de um microscópio confocal.....	23
Figura 10 - Microscópio Confocal atual.....	23
Figura 11 - Número de partículas fluorescentes no volume focal.....	24
Figura 12 - Esquema gráfico do caminho óptico do microscópio confocal.....	27
Figura 13 - Caminho óptico do Fluorímetro RF6000.....	29
Figura 14 - Representação esquemática da separação pelo método SARA.....	30
Figura 15 - Câmara improvisada para evitar separação do solvente.....	31
Figura 16 -Etapa de separação e diluição das amostras estudadas	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - PLE das amostras de óleo cru cedidas pela Petrobras.....	35
Gráfico 2 - Os gráficos do PLE das amostras de asfaltenos extraídos das amostras cedidas pela Petrobras.....	38
Gráfico 3 - PLE das frações da amostra FB dos componentes extraídos das amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões.....	41
Gráfico 4 - PLE das frações da amostra C dos componentes extraídos das amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	TEORIA.....	15
2.1	FLUORESCÊNCIA.....	15
2.1.1	PHOTOLUMINESCENCE EXCITATION (PLE).....	19
2.1.2	FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING MICROSCOPY (FLIM).....	20
2.2	MICROSCOPIA CONFOCAL	21
2.2.1	FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY (FCS)	24
3	EQUIPAMENTOS	26
3.1	CONFOCAL UPRIGHT ZEISS LSM 780.....	26
3.1.1	MÓDULO FLIM BECKER –HICKL.....	27
3.1.2	MÓDULO DE FCS.....	28
3.2	FLUORIMETRO RF – 6000.....	29
4	AMOSTRAS.....	29
5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
5.1	SEPARAÇÃO DOS ASFALTENOS.....	31
5.2	PLE.....	31
5.3	FLIM.....	32
5.4	FCS.....	33
6	RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	35
6.1	AMOSTRAS CEDIDAS PELA PETROBRAS.....	35
6.1.1	OLEOS CRUS.....	35
6.1.1.1.	PLE.....	35
6.1.1.2	FLIM.....	37
6.1.2	ASFALTENOS.....	37
6.1.2.1	PLE.....	37
6.1.2.2	FLIM.....	39
6.1.2.3	FCS	40
6.2	AMOSTRAS CEDIDAS PELO LAB. ALTAS PRESSÕES.....	40
6.2.1	AMOSTRA FB.....	40
6.2.1.1	PLE	41
6.2.2	AMOSTRA C.....	42

6.2.2.1	PLE.....	43
6.2.2.2	FLIM.....	44
6.2.2.3	FCS.....	44
7	DISCUSSÃO.....	45
7.1	FLIM.....	46
7.2	FCS.....	46
7.3	PLE.....	47
7.3.1	AMOSTRAS CEDIDAS PELO LAB. ALTAS PRESSÕES.....	47
7.3.2	AMOSTRAS CEDIDAS PELA PETROBRAS.....	48
7.3.2.1.	ÓLEOS CRUS.....	48
7.3.2.2	ASFALTENOS.....	48
8	CONCLUSÃO.....	49
9	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é uma das principais potências no ramo de extração de petróleo, tendo 5964 poços de petróleo ativos, terrestres e marítimos, distribuídos em dez bacias espalhadas pelo território brasileiro [1]. Essa pluralidade de fontes de petróleo cru pode ser traduzida em uma gama de tipos distintos de óleos crus com composições químicas e propriedades diferentes. Com isso, se cria o interesse pelo desenvolvimento de procedimentos cada vez mais simples e eficazes para o estudo comparativo e identificação desses materiais.

Para o estudo de amostras orgânicas que possuem autofluorescência, como o petróleo, traçar um perfil fluorescente se torna vantajoso para tais estudos comparativos por esse ser o sinal mais forte, não destrutivo e com menor interferência da fonte de excitação dentre outras técnicas de fotoluminescência.

Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um procedimento simples de diluição e separação de óleos crus e de seus asfaltenos constituintes com o intuito de testar se essas soluções proporcionam perfis fluorescentes diferenciáveis entre amostras distintas, utilizando três técnicas de análise da autofluorescência dos óleos crus e seus componentes para traçar esse perfil.

As técnicas utilizadas para o estudo das amostras foram a técnica de Photoluminescence Excitation (PLE), a Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) e a técnica de Fluorescence Correlation Spectrography (FCS). Estas foram escolhidas pela sua relativa simplicidade em utilização, no preparo de objetos de estudo e, principalmente, por renderem um perfil único para cada amostra analisada.

2 TEORIA

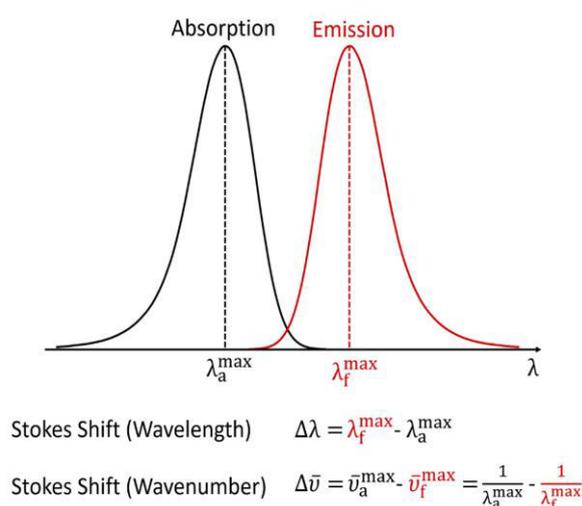
Nessa sessão, será feita uma revisão teórica do fenômeno da fluorescência e da microscopia confocal para servir de base para a explicação das técnicas de fotônica estudadas neste trabalho.

2.1 FLUORESCÊNCIA

O fenômeno da fluorescência pode ser descrito como a emissão de luz por uma substância que havia absorvido alguma radiação eletromagnética, onde os comprimentos de onda da luz absorvida e emitida são específicos e dependentes da estrutura molecular dos componentes da substância em questão. A fluorescência é um processo rápido, durando tempos da ordem de 10^{-9} s.

A fluorescência, como observado por George Stokes em 1852 [2], tem uma propriedade de deslocamento, essa propriedade sempre tornava a luz emitida pela molécula a comprimentos de onda sempre maiores do que o da luz utilizada como fonte de excitação, esse deslocamento é chamado de *Stokes shift*, e pode ser explicada pelo princípio de Franck – Condon [3] [Fig. 1 Diagrama de Stokes]

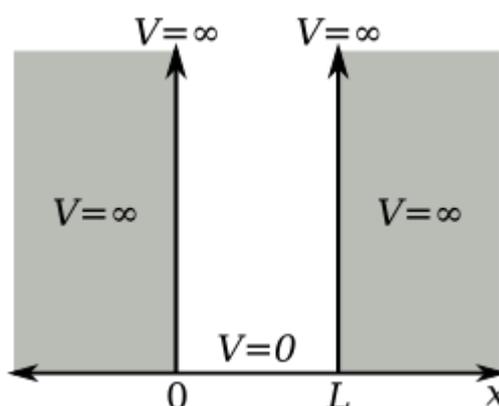
Figura 1 - Diagrama de Stokes



Tendo a definição de fluorescência, vale ressaltar que, em compostos orgânicos, é um fenômeno principalmente observado em moléculas dotadas de longas cadeias de carbono com ligações alternadas simples e duplas, onde, o comprimento dessa cadeia de carbonos, dita os espectros de emissão e excitação da molécula em questão [4].

A melhor maneira de visualizar o comportamento de um elétron em uma molécula é fazer uma comparação com um caso específico estudado na mecânica quântica, o caso de uma partícula presa em um poço de potencial infinito, onde uma partícula é posta em movimento unidimensional em uma região com barreiras de potencial infinitas espaçadas por uma distância **a** [Fig. 2]. Agora considerando que um elétron em uma cadeia de carbonos com ligações conjugadas pode mover-se livremente por essa cadeia, mas não além, podemos aproximar esse movimento para o caso da partícula presa em um poço infinito, onde a partícula em questão seria o elétron e a largura do poço **a** seria o comprimento da cadeia de carbonos.

Figura 2 - Poço Infinito



Essa aproximação nos mostra uma importante propriedade do fenômeno da fluorescência: o tamanho da molécula influencia no comprimento de onda do fóton emitido no decaimento energético do elétron excitado. Para isso analisemos a equação da energia obtida no caso da partícula presa em um poço infinito:

$$E_n = \frac{n^2 h^2}{8ma^2}$$

Onde, **n** é o nível energético do sistema, **E_n** é a energia desse nível, **h** é a constante de Planck, **m** é a massa da partícula enclausurada e **a** é a largura do poço.

A absorção e emissão de fótons é realizada entre o nível ocupado mais energético, ou HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e o nível desocupado menos energético, ou LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Considerando uma cadeia de **N** átomos de carbono, essa cadeia terá **N** elétrons livres, e, pelo princípio de exclusão de Pauli, esses elétrons serão distribuídos seguindo a regra de dois elétrons por nível, nesse caso, o último nível ocupado será para:

$$n = \text{int}\left(\frac{N + 1}{2}\right)$$

Onde a função $\text{int}(x)$ retorna a parte inteira de x .

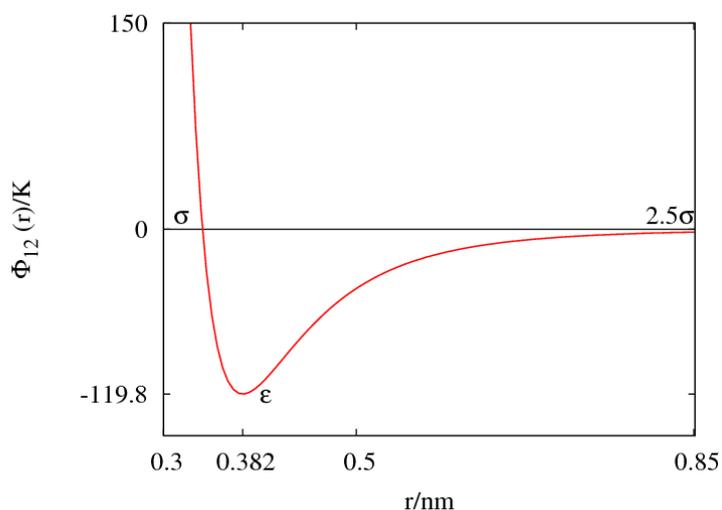
Podemos então usar essa expressão de n para calcular a diferença de energia entre o HOMO e o LUMO:

$$E_{LUMO} - E_{HOMO} = \frac{2\text{int}\left(N + \frac{1}{2}\right) + 1}{N^2} \left(\frac{h^2}{8ma^2}\right)$$

Com essa equação, notamos que a diferença de energia do salto quântico é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia, ou seja, quanto maior a molécula, menor a energia do fóton emitido por fluorescência.

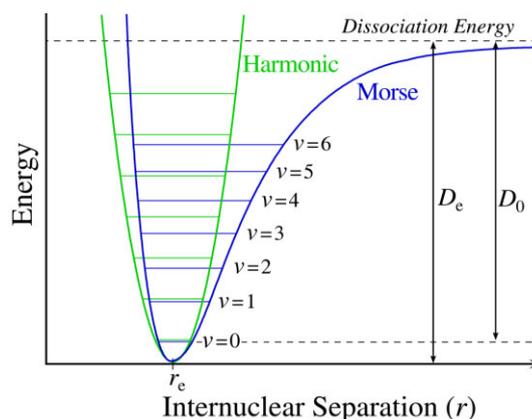
Para entender a propriedade do deslocamento de Stokes, é preciso entender como as forças elétricas atuam entre dois átomos próximos o suficiente. O potencial experienciado por um átomo isolado à aproximação de outro átomo vindo do infinito é dado pelo potencial de Lennard – Jones (O modelo de dois átomos será utilizado para a explicação pela sua simplicidade (Fig.3) [5].

Figura 3 - Potencial de Lennard para a molécula de Argônio



O potencial de Lennard – Jones, próximo, ao ponto mínimo, pode ser aproximado para uma parábola, tendendo ao caso também conhecido da mecânica quântica do potencial tipo oscilador harmônico, que também tem seus níveis de energia quantizados. O potencial Lennard – Jones quantizado para descrição do movimento vibracional de núcleos de uma molécula é conhecido como potencial de Morse e a *quanta* desse potencial é chamado de nível vibracional (Fig 4).

Figura 4 - Potencial de Morse

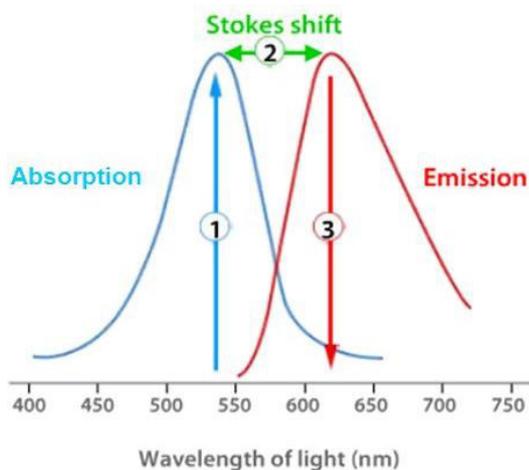


Os átomos sujeitos ao potencial de Morse tenderão a manter-se na posição interatômica correspondente à menor energia potencial, ou, posição de equilíbrio. Essa posição de equilíbrio depende das forças eletromagnéticas entre os átomos da molécula, caso ocorra alguma perturbação que altere essas forças, a posição de equilíbrio também sofrerá uma perturbação, influenciando os níveis vibracionais da molécula [6].

A excitação de um elétron por um fóton caracteriza uma dessas perturbações, esse processo transforma a geometria da nuvem eletrônica de um átomo, mudando o potencial elétrico e perturbando a posição de equilíbrio entre os núcleos de uma molécula. O que ocorre com os núcleos após a excitação de um elétron é uma tendência ao rearranjo posicional dos mesmos para voltar ao equilíbrio, onde esse processo consiste em uma dissipação de energia por vibrações. O princípio de Franck – Condon afirma que a transição entre níveis eletrônicos de um elétron em uma molécula não afeta imediatamente na posição dos núcleos, então, no caso, o processo de retornar a uma posição de equilíbrio só se iniciaria exclusivamente após o processo de excitação de um elétron, nunca durante. [3] E o que a restauração da posição de equilíbrio faz para o elétron no estado excitado é trazê-lo para o nível vibracional de menor energia, sem decaimento de fótons. A defasagem de Stokes está exatamente nesse decaimento sem emissão para níveis vibracionais mais baixos, pois, agora, o decaimento energético para o estado fundamental será menor, resultando no fóton emitido por fluorescência ser menos energético que o utilizado para excitação.

O fenômeno da defasagem de Stokes dá origem ao diagrama de Stokes (Fig.5) que relaciona o espectro de excitação de uma molécula com seu espectro de emissão, onde os picos de cada curva representam, respectivamente, o comprimento de excitação com maior intensidade de emissão, sendo essa emissão captada em todos os comprimentos de onda, e o comprimento de onda de emissão mais intenso para uma molécula excitada com todos os comprimentos de onda.

Figura 5 - Diagrama de Stokes



2.1.1 Photoluminescence Excitation (PLE)

A técnica de *photoluminescence excitation* PLE é uma simples aplicação da teoria da fluorescência que pode ser utilizada para análises qualitativas e quantitativas da composição química de compostos homogêneos [7].

Esta consiste em incidir uma amostra com uma fonte luminosa de comprimento de onda conhecido e estudar seu perfil de fluorescência. Com uma fonte luminosa de comprimento de onda variável, é possível obter todo o espectro de emissão da amostra, pois, nesse processo, se obtém gráficos tridimensionais, relacionando o comprimento de onda de excitação e emissão como eixos x e y, e tendo a intensidade de emissão como eixo z.

Como discutido no tópico de fluorescência, os comprimentos de onda de excitação e emissão de uma molécula são regidos pelo tamanho da cadeia de carbonos com ligações alternadas que compõe a molécula e pelos seus modos vibracionais. Com isso podemos inferir que em um gráfico de comprimento de onda de excitação por comprimento de onda de emissão por intensidade de emissão, cada pico nesse gráfico corresponde a uma molécula diferente, logo, a técnica de PLE tem o potencial de nos dar uma análise quantitativa do número de compostos de uma amostra homogênea [8].

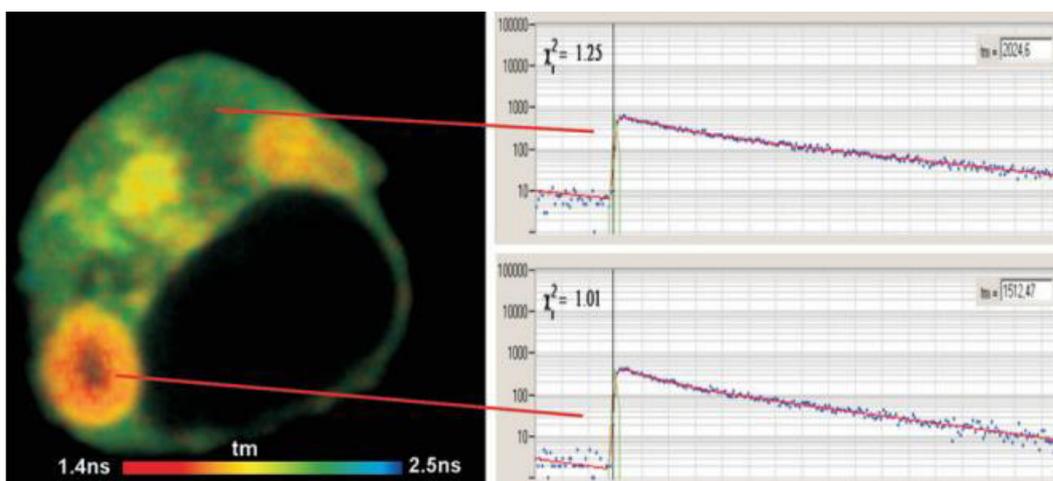
Apesar de simples e de baixo custo, PLE apresenta limitações. Duas moléculas com estruturas similares podem ter espectros de emissão que se sobrepõem, dificultando sua diferenciação em um gráfico de intensidades [9].

2.1.2 Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)

No processo de fluorescência, o tempo que um elétron passa no estado excitado antes de decair emitindo um fóton é chamado de tempo de vida de fluorescência, esse tempo geralmente varia da ordem de picossegundos a nanossegundos. Este parâmetro depende intrinsecamente da estrutura da molécula fluorescente e do ambiente que a mesma se encontra. [10]. Essa técnica, a princípio, não depende de outros parâmetros usuais, como a concentração da amostra, da intensidade de excitação, do caminho ótico etc. Isso pode ser apresentado como fatores facilitadores ao se conduzir experimentos utilizando diferenciação de substâncias por tempo de vida.

A técnica de FLIM, se baseia na contagem de tempo entre a absorção de um fóton por uma molécula fluorescente, e seu decaimento pela emissão de outro fóton, onde a resposta fluorescente fundamental a uma excitação pulsada é um decaimento exponencial [4]. Como a escala de tempo é muito curta, equipamentos mais sofisticados devem ser utilizados para a realização de tais medidas, mais especificamente, fontes de excitação e sistemas de captação de sinal, ambas correlacionadas no tempo (Fig 6).

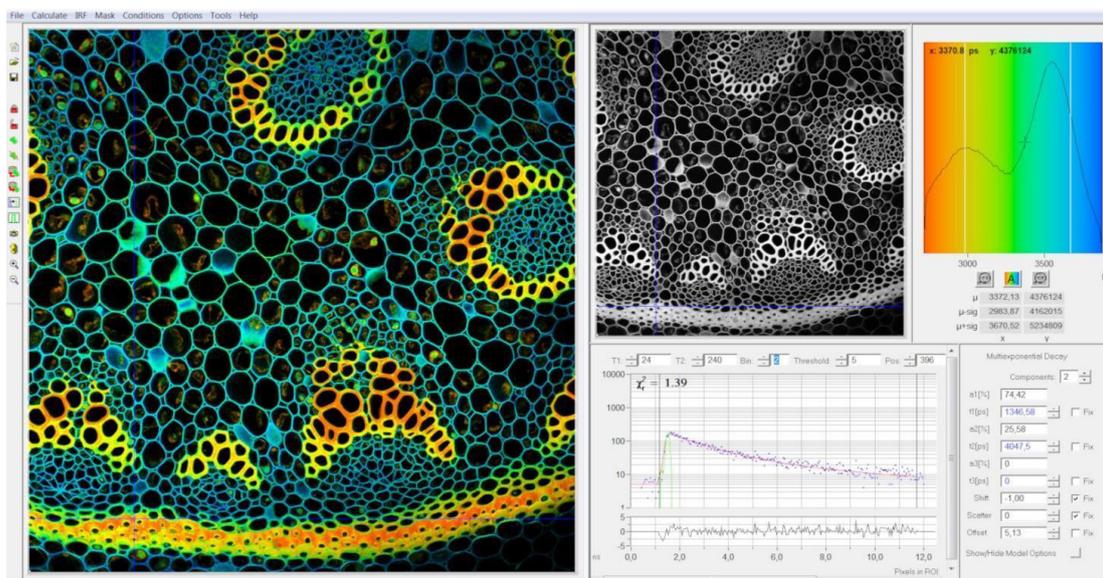
Figura 6 - Curva de Decaimento



Existem dois métodos para obtenção de uma medida de tempo de vida de fluorescência quando se trata de fontes de excitação: fonte de excitação com pulsos frequentes resolvidos no tempo (Time Correlated Single Photon Counting, TCSPC), ou com uma fonte de excitação modulada com a intensidade variando no tempo com uma frequência pré-determinada. Nesse trabalho, foi utilizada apenas a técnica TCSPC 9 (Fig. 7).

Na microscopia, a técnica de FLIM pode ser utilizada para obter uma imagem de tempo de vida, onde cada pixel da imagem corresponde a uma curva de decaimento de fluorescência da(s) substância(s) excitada(s). [11]

Figura 7 - Modos de imagens de FLIM TCSPC



Para obtenção de uma imagem na técnica de FLIM TCSPC, é preciso de um equipamento sensível a ponto de detectar um único fóton, que pode ser feito através de sensíveis fotomultiplicadoras, porém, essa sensibilidade é efetivamente traduzida em longos tempos de aquisição para se obter uma imagem de alta qualidade [12].

Pelo tempo de vida de fluorescência de uma molécula ser única à mesma, dado que esteja em um ambiente intermolecular conhecido, é possível utilizar a técnica de FLIM para distinguir compostos com fluorescência próxima, tornando-a mais efetiva que a previamente discutida técnica de PLE. Mas, como a medida de FLIM também depende do ambiente que a molécula está inserida, a condição para um estudo comparativo é que todas as amostras analisadas estejam inseridas em meios idênticos.

2.2 Microscopia Confocal

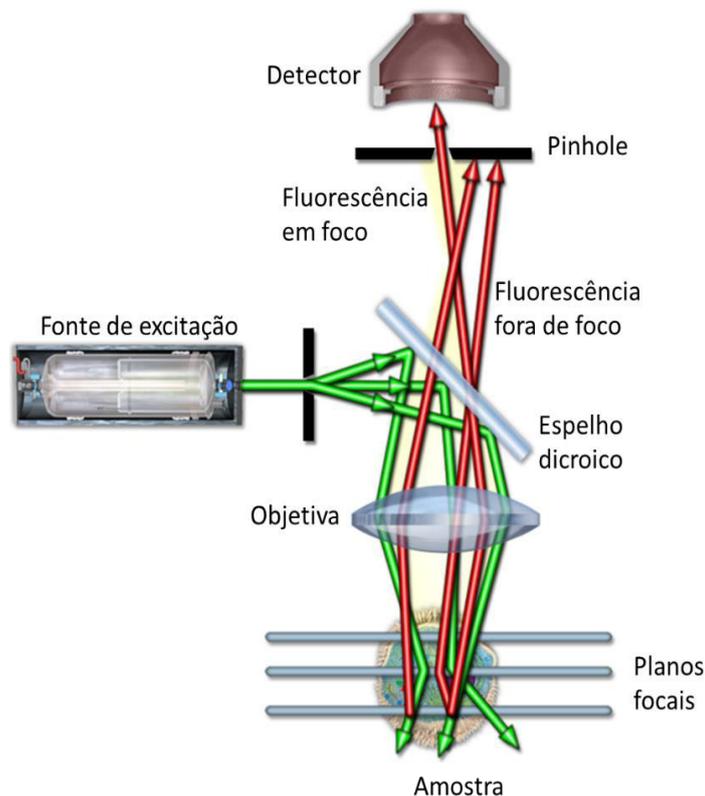
Na microscopia de fluorescência convencional, ou de campo amplo, é comum o tratamento de amostras para que as mesmas tenham pequena profundidade, pois uma amostra muito espessa influenciará na imagem sendo captada, vindo que as fluorescências de diferentes profundidades da amostra também serão captadas pelo microscópio, interferindo

na medida captada.

A microscopia confocal foi criada para facilitar a análise de amostras espessas ou de estruturas onde a tridimensionalidade se faz necessária, já que a mesma tem, em sua essência, um aparato próprio para o tratamento de amostras em qualquer profundidade.

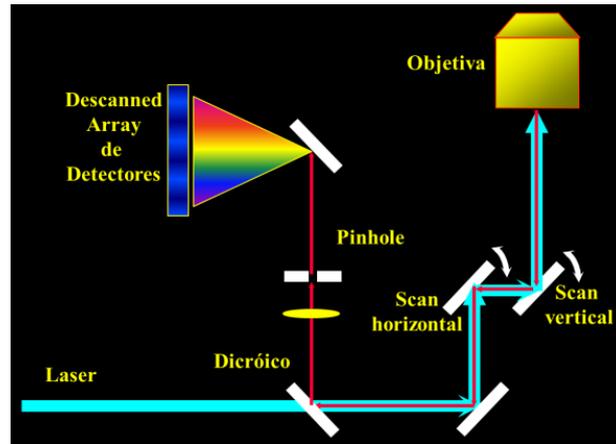
O microscópio confocal difere do microscópio de campo amplo convencional pela simples adição de uma abertura variável, ou, do inglês *pinhole*, onde o propósito dessa abertura é barrar a luz proveniente de profundidades indesejadas, efetivamente criando um plano focal dentro da amostra. Esse plano focal é definido pela abertura numérica da objetiva, o tamanho do *pinhole* e a altura da objetiva. [13] [14]

Figura 8 - Esquema Gráfico Confocal



Para a formação de imagens, o microscópio confocal deve varrer a amostra com um laser focalizado pela objetiva, onde o foco deste é mantido durante a varredura por dois espelhos chamado de espelhos de escaneamento. A seguir um esquema do caminho ótico de um microscópio confocal [15]

Figura 9 - Caminho óptico de um microscópio confocal



Fonte: Prof. Carlos Lenz

Onde o espelho dicróico reflete apenas a fluorescência da amostra, para que qualquer luminescência do laser não interfira na captação da imagem. A fluorescência que passa por esse processo de escaneamento é chamada *descanned*, e qualquer sinal obtido que não passe por esse processo é chamado de *non-descanned*, essa última mais comumente utilizada em microscopia de multi-fóton.

Com este aparato a disposição, os microscópios confocais conseguem não só obter imagens mais nítidas e sem interferência de outras profundidades da amostra como podem também obter imagens tridimensionais das mesmas. Onde essas imagens tridimensionais consistem em imagens confocais de alturas próximas e diferentes renderizadas em uma só.

[14]

Figura 10: microscópio confocal atual



Fonte: Central Analítica UFC

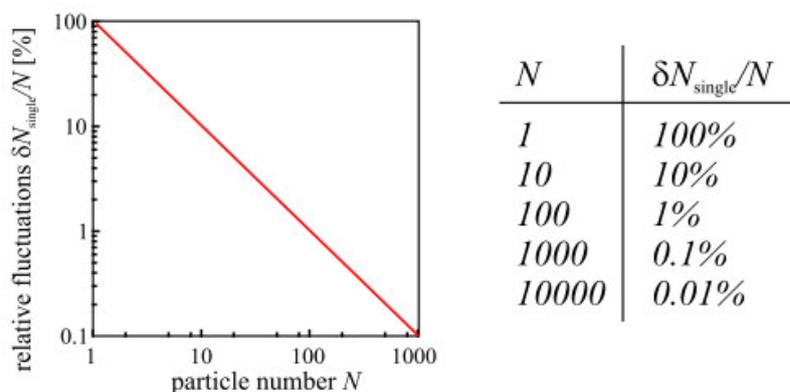
2.2.1 Fluorescent Correlation Spectroscopy (FCS)

A técnica do FCS consiste em obter informações estruturais de uma molécula a partir da análise por autocorrelação de seu movimento em difusão, utilizando a fluorescência da molécula para seguir sua trajetória. Essa técnica difere das técnicas de PLE e FLIM pois usa a fluorescência da molécula apenas como um marcador para definir características da mesma e para criar um espectro que a diferencia de outras [16].

A análise do movimento das moléculas na técnica do FCS se dá pela captação do sinal de fluorescência dentro de uma região chamada volume focal, esse volume é determinado pelo arranjo experimental, como a objetiva utilizada, o comprimento de onda da fonte de excitação e o *pinhole*, ou seja, a técnica de FCS só pode ser utilizada com a microscopia confocal. O sinal da fluorescência é captado por um contador de fótons, para que as flutuações da intensidade da fluorescência proveniente do volume focal sejam utilizadas em uma função de autocorrelação. Essas flutuações de intensidade de fluorescência ocorrem quando uma, ou mais moléculas fluorescentes entram ou saem do volume focal.

Para se obter informações da molécula em estudo, é preciso poder observar a flutuação de apenas uma molécula difundindo pelo volume focal. Essas flutuações são fáceis de se observar se existem poucas moléculas no volume focal, e difíceis de se observar caso existam muitas partículas no volume focal. A figura a seguir mostra como o número de partículas fluorescentes no volume focal influencia na flutuação de sinal para uma medida de FCS. [17].

Figura 11 - Número de partículas fluorescentes no volume focal



Uma forma intuitiva de entender como essas flutuações podem ser traduzidas para informações sobre o tamanho da molécula é imaginar que: uma molécula com coeficiente de difusão grande demora mais tempo para percorrer o volume focal inteiro do que uma molécula com coeficiente de difusão menor.

O movimento de uma molécula difusa é chamado Movimento Browniano, e o mesmo é tido como um movimento aleatório, mas, aplicando uma técnica de análise por autocorrelação no movimento de uma molécula, é possível obter o tempo de difusão [17] e o raio hidrodinâmico da mesma [18]. Essa função de autocorrelação é a seguinte [15]:

$$g(t) = \frac{1}{\langle N \rangle * \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right) * \sqrt{1 + \frac{t}{k^2 * \tau_D}}}$$

Onde N é a concentração da amostra, τ_D é o tempo de difusão da molécula e k é um parâmetro geométrico definido pela fonte de excitação utilizada. O tempo de difusão da molécula pode agora ser facilmente obtido aplicando um fit da curva obtida pela microscopia para a função de autocorrelação apresentada.

A função de autocorrelação é facilmente afetada por qualquer tipo de flutuações na fluorescência, mas desde que essas flutuações não ocorram na mesma escala de tempo da difusão, essa flutuação pode ser incorporada na função original. Um exemplo dessas flutuações é a transição para o estado tripleto, que modifica a função autocorrelação para ficar da forma: [15]

$$g(t) = \left(\frac{1 - T + T e^{-\frac{1}{\tau_{tripleto}}}}{1 - T} \right) * \frac{1}{\langle N \rangle} * \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} * \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{k^2 * \tau_D}}}$$

Utilizando o resultado dessa função na equação de Stokes – Einstein, enquanto aproximamos a molécula para uma esfera, podemos obter o raio hidrodinâmico da molécula em questão.

$$R = \frac{4kT\tau_D}{6\pi\eta\omega_x^2}$$

Onde T é a temperatura, η é a viscosidade do meio, e ωx é a “cintura” do feixe de excitação.

A precisa obtenção dos novos parâmetros mostrados na última equação, como a temperatura local e a viscosidade do fluido pode ser trabalhoso e suscetível a erros, mas os únicos dois parâmetros da equação que são específicos da molécula em questão são o raio hidrodinâmico e o tempo de difusão, com todos os outros parâmetros dependendo do arranjo experimental, logo, o raio da molécula desconhecida pode ser obtido com o tempo de difusão previamente obtido pelo ajuste da curva de autocorrelação e pelo tempo de difusão de uma molécula de raio hidrodinâmico conhecido, onde esse segundo seja obtido pela técnica de FCS utilizando o mesmo solvente e nas mesmas condições do procedimento da molécula desconhecida.

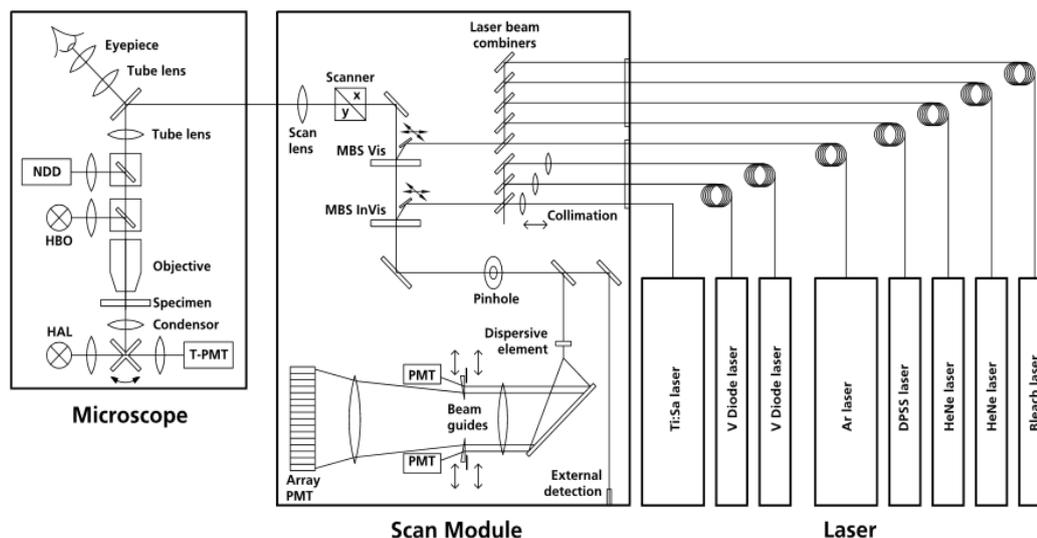
3. EQUIPAMENTOS

Os procedimentos que compõe esse trabalho, apesar de todos terem sua teoria fortemente atrelada ao fenômeno da fluorescência, são distintos a ponto de serem necessário diversos equipamentos específicos para obtenção de medidas, essa seção tem como objetivo dar uma descrição dos equipamentos utilizados.

3.1 MICROSCÓPIO CONFOCAL ZEISS LSM 780 UPRIGHT

O sistema é composto pelo Microscópio Zeiss Axio Observer Z1 e pelo scanner de varredura 780. A figura a seguir ilustra o caminho óptico do microscópio assim como o scanner 780:

Figura 12 - Esquema gráfico do caminho óptico do Microscópio confocal



HAL Halogen Lamp
HBO Mercury Vapor Short-Arc Lamp
MBS Main Beam Splitter
NDD Non-Descanned Detector
PMT Photomultiplier
T-PMT Transmission-Photomultiplier

Fonte : Zeiss

As objetivas disponíveis são Plan-Apochromat 10x/0.30 Dry (WD: 2mm), PlanApochromat 20x/1.0 Water DIC (WD: 1.8mm), Plan-Apochromat 40x/1.0 Water DIC (WD:2.5mm), C-Apochromat 63x/1.2 Water Korr (WD: 0.28mm) e Plan-Apochromat 20x/0.8 (WD=0.55mm). Os lasers disponíveis para excitação de um fóton são de 405nm, 488nm e 514nm de Argônio, um laser de 561nm e um de 633nm, de He:Ne. Foi também acoplado ao microscópio o laser pulsado 405nm, com 66ps de duração de pulso (BDL-405-SMC, BECKER&HICKL).

Este microscópio está localizado no Instituto de Física Aplicada a Biologia Intracelular (INFABIC) na universidade estadual de campinas (UNICAMP), no estado de São Paulo, e as medidas feitas neste equipamento e, conseqüentemente em seus módulos adicionais, foram obtidas em outubro de 2019.

3.1.1 MÓDULO BECKER-HICKL

O equipamento utilizado para realizar as medidas de tempo de vida das amostras foi o módulo Becker – Hickl, composto de uma fotomultiplicadora no modo contagem de fótons (Becker & Hickl, PMH-100) e um card eletrônico para correlação no tempo de contagem de fótons (Becker & Hickl, SPC-830). O módulo foi acoplado na porta NDD (non-descanned) do microscópio Zeiss.

Esse equipamento capta o tempo de vida utilizando a técnica TCSPC, ou seja, o tempo de vida é medido pelo tempo de resposta entre o fóton emitido da fonte de excitação e o fóton captado pelo detector do microscópio.

O módulo Becker & Hickl, juntamente ao seu software pode funcionar em dois modos específicos, o modo imagem e o modo osciloscópio. O modo imagem consiste em obter a curva de decaimento de cada pixel de uma imagem de até 512 x 512 de tamanho, onde o software converte esses pixels em uma matriz de decaimento de acordo com seus tempos de vida, onde pixels mais avermelhados têm tempos de vida mais curtos, e pixel mais azulados tem tempos de vida mais longos. O modo osciloscópio simplesmente pega a média de tempo de vida de toda a região do plano focal iluminado, retornando apenas uma curva de decaimento [11].

3.1.2 MÓDULO DE FCS

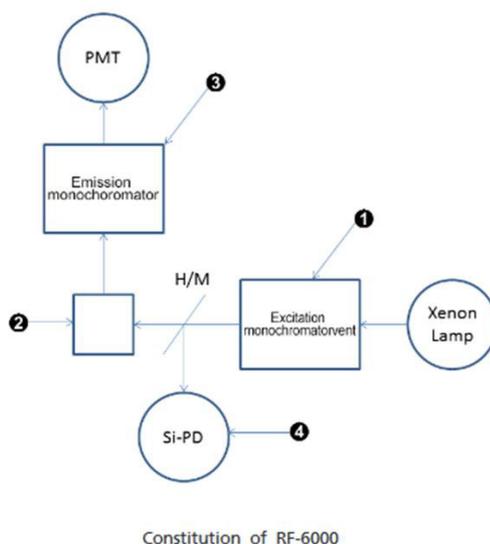
As medidas de FCS foram obtidas em um módulo da Zeiss que consiste em um fotodiodo avalanche (APD) acoplado na saída *descanned* do microscópio Zeiss. Por esse módulo ser fabricado pela Zeiss, o controle do equipamento pode ser realizado no mesmo software do microscópio.

O software utilizado para analisar as curvas de correlação foi o Zen 2010 já embutido no microscópio Zeiss LSM 780. Esse software é capaz de fazer o ajuste de uma curva de autocorrelação em uma curva construída com parâmetros adicionais, como o movimento de translação da molécula, a variação de fluorescência pela transição para o estado tripleto, a rotação da molécula, se existe um fluxo da amostra entre outros parâmetros, todos seguindo a condição apresentada no capítulo teórico, onde os termos de correção podem ser acoplados por multiplicação à equação de autocorrelação desde que essas flutuações não ocorram na mesma escala de tempo da difusão.

3.2 ESPECTROFLUORIMETRO SHIMADZU RF – 6000

O esquema a seguir mostra o caminho óptico dentro do espectrofluorímetro [20].

Figura 13 - Caminho óptico do equipamento RF-6000



O sistema é composto por uma única câmara onde se encontra a lâmpada de xenônio, o porta amostras que comporta cubetas de quartzo de 3ml e com as quatro faces polidas (2), uma fotomultiplicadora para detecção de fluorescência (PMT), um fotodiodo de silicone para detectar a intensidade da fonte de excitação (4) e duas grades de difração, uma para a excitação (1) e uma para a captação de sinal (3).

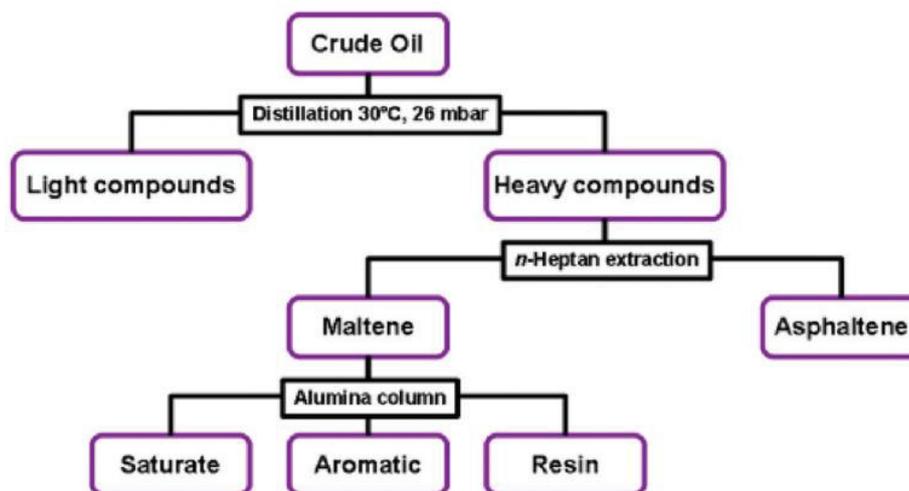
Este equipamento está localizado na central analítica do departamento de química da Universidade Federal do Ceará, e este foi utilizado para obtenção de medidas nos meses de junho, julho e agosto de 2019.

4 AMOSTRAS

As amostras exploradas por essas técnicas são quatro amostras de petróleo cru cedidas pela Petrobras, estas nomeadas de **amostra 01-2**, **amostra 02**, **amostra 622** e **amostra 646** onde cada amostra é proveniente de um poço profundo específico do território brasileiro. Por questões de sigilo, as localizações específicas desses poços de petróleo não foram divulgadas aos pesquisadores desse projeto, mas nos foram garantidos que estas foram retiradas de poços distintos.

O petróleo cru é composto de maltenos e asfaltenos, esses são diferenciáveis principalmente pela sua polaridade, a figura a seguir ilustra o procedimento SARA (Fig.13) (*Saturates, Aromatics, Resins, Asphaltentes*) [21] de separação de amostras de óleo cru[22].

Figura 14 - Representação esquemática da separação pelo método SARA



Por diferença de polaridade, os maltenos podem ser separados dos asfaltenos, onde um estudo completo de cada componente tanto dos asfaltenos como de cada subclasse de malteno específico nos retornaria o perfil químico completo da amostra de óleo cru. Este trabalho escolheu utilizar apenas amostras de óleo cru e de seus asfaltenos constituintes, estes separados com um procedimento simples e de baixo custo, para obter perfis de fluorescência capazes de diferenciar tais amostras. Os maltenos devem ser separados entre si para um estudo completo, o que resulta procedimentos de separação mais complexos e caro, logo, estes serão analisados em outro momento.

Essas amostras de petróleo cru podem diferenciar não só no perfil molecular de sua composição, mas também na proporção que cada componente tem em relação ao todo. Esse fato pode ser observado viscosidade da amostra, onde amostras mais densas e graxosas tem pouco asfalteno e mais maltenos em sua composição, mais especificamente resinas [23]. Dentre as amostras analisadas, a amostra 02 possui alta viscosidade, enquanto as outras três eram mais líquidas.

Paralelamente às amostras cedidas pela Petrobras, foram feitas medidas de PLE em amostras de todos os seus componentes (asfaltenos, resinas, saturados e aromáticos) de duas amostras de óleo cru, separados utilizando a técnica de coluna cromatográfica de alumina,

onde essas amostras foram nomeadas como **Amostra C** e **Amostra FB**. Estes serviram de comparação para com as amostras cedidas pela Petrobras. Estas amostras foram cedidas pelo grupo de pesquisa em termodinâmica aplicada, no departamento de engenharia química da Universidade Federal do Ceará.

5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Essa seção tratará de descrever os procedimentos utilizados para separação dos óleos crus em seus asfaltenos constituintes, e o tratamento de cada amostra para análise pelas técnicas de fluorescência previamente apresentadas.

5.1 SEPARAÇÃO DE ASFALTENOS

Para todas as técnicas de microscopia aplicada nos asfaltenos, foi empregado o mesmo procedimento de separação dos outros componentes dos óleos crus.

Alíquotas de 0,5g de óleo cru das amostras 01-2, 622 e 646, e uma alíquota de 2g da amostra 02 foram pesadas e diluídas em 15ml de n-heptano em tubos de falcon, onde mais da amostra 02 foi retirada pois esta possui menos asfaleno em sua composição. Cada amostra diluída foi sonicada por 30 minutos e depois centrifugada a 3000rpm por 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram feitas três lavagens do decantado, onde a lavagem consiste em diluir o decantado em 10ml de n-heptano, repetir a sonicação por 30 minutos e a centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, e o descarte do sobrenadante. O decantado final foi então diluído em 5ml de tolueno, essa solução foi denominada como solução mãe de asfaltenos.

5.2 PLE

As análises de PLE foram conduzidas no espectrofluorímetro Shimadzu RF-6000, que tem uma cubeta de quartzo de 3ml.

Amostras de 0,5g de óleo cru foram diluídas em uma solução de solventes, 50% tolueno e 50% n-heptano, até que a solução total completasse 3ml.

Para análise dos asfaltenos, a solução mãe de asfaltenos das amostras mais líquidas, 01-2, 622 e 646, foram diluídas de um para cento e cinquenta partes em tolueno, a amostra

02, por ter menos asfalteno em sua composição, foi diluída de um para quinze partes em tolueno, afim de melhorar o sinal de captação pelo aumento da concentração.

O equipamento dispõe de um sistema automatizado para captura espectral da fluorescência com o comprimento de excitação variando. O espectro escolhido de excitação foi de 380nm a 500nm em intervalos de 2nm, e o espectro de captação de emissão escolhido foi de 350nm a 700nm em intervalos de 0,5nm. Todas as amostras foram analisadas sobre esses parâmetros.

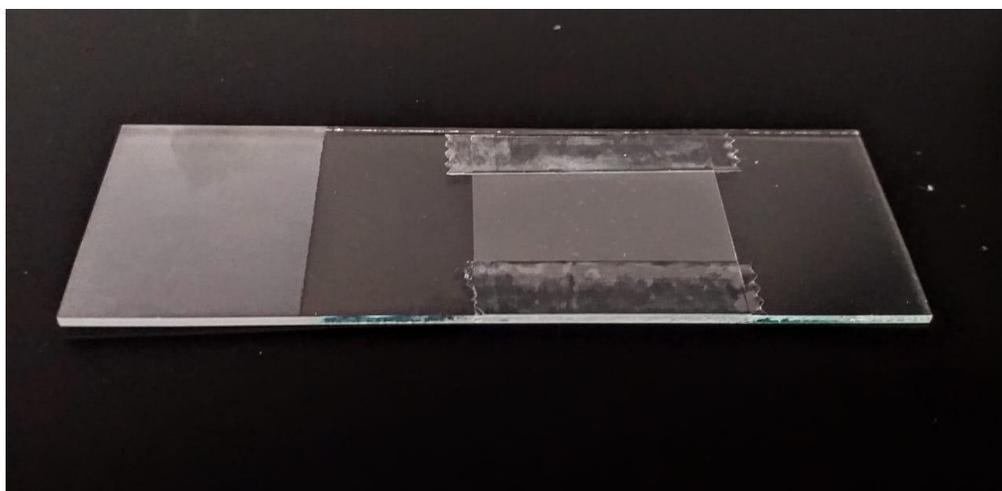
Esta técnica foi aplicada também nas amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões nas amostras nomeadas C e FB.

5.3 FLIM

O tempo de vida de fluorescência das amostras de óleo cru e asfaltenos foram obtidas utilizando um módulo de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) Becker&Hickl acoplado na saída *non-descanned* do microscópio confocal Zeiss LSM 780.

O microscópio confocal utilizado para esse procedimento comportava apenas lâminas de vidro, o que tornou necessário a construção de uma câmara improvisada, visando minimizar a perda de solvente por evaporação. Essa câmara improvisada foi montada com uma lamínula de vidro, uma lâmina de vidro e duas pequenas tiras de fita dupla face fina, onde as duas fitas foram colocadas paralelamente na longitudinal da lâmina de vidro de tal forma que as fitas não se encostassem, e a lamínula foi colada na face exposta das fitas. O resultado final será mostrado na figura abaixo.

Figura 15 - Câmara improvisada para evitar a evaporação do solvente



A câmara improvisada (Fig.14) foi feita dessa forma para que fosse possível um reabastecimento de solvente à amostra em estudo quando o tolueno e n-heptano utilizados para diluir as amostras fosse perdido por evaporação, onde esse reabastecimento foi feito aplicando solvente a uma das extremidades sem fitas da lamínula, de tal forma que a câmara seria preenchida por capilaridade.

A fonte de excitação utilizada foi um laser diodo de 405nm com pulsos de 66ps (BDL-405-SMC, Becker&Hickl) e a objetiva utilizada foi uma Plan-Apochromat 20x/0.8 (WD=0.55mm).

As amostras de asfaltenos foram diluídas de 1:15 da solução mãe dos asfaltenos, e dos óleos crus foram separados 0,5g de cada e diluídos de 1:10 em soluções 50% tolueno e 50% n-heptano, mas, com a necessidade de injetar a câmara com solvente, essas concentrações podem não estar precisas, que pouco deve importar, já que estamos lidando com tempo de vida de fluorescência. As medidas obtidas de tempo de vida foram feitas medidas no modo osciloscópio, com 30s de tempo de coleta.

Esse procedimento foi feito para as amostras 01-2, 622 e 646 e óleos crus e seus asfaltenos constituintes, cedidos pela Petrobras, assim como para o asfalteno da amostra C, cedida pelo laboratório de altas pressões. Por questões de disponibilidade de amostras, não foram feitas medidas de FLIM na amostra 02.

O software Becker&Hickl já embutido no equipamento é capaz de fazer o ajuste da curva de decaimento para até três componentes, retornando três tempos de decaimento e a proporção que cada componente apresenta na solução.

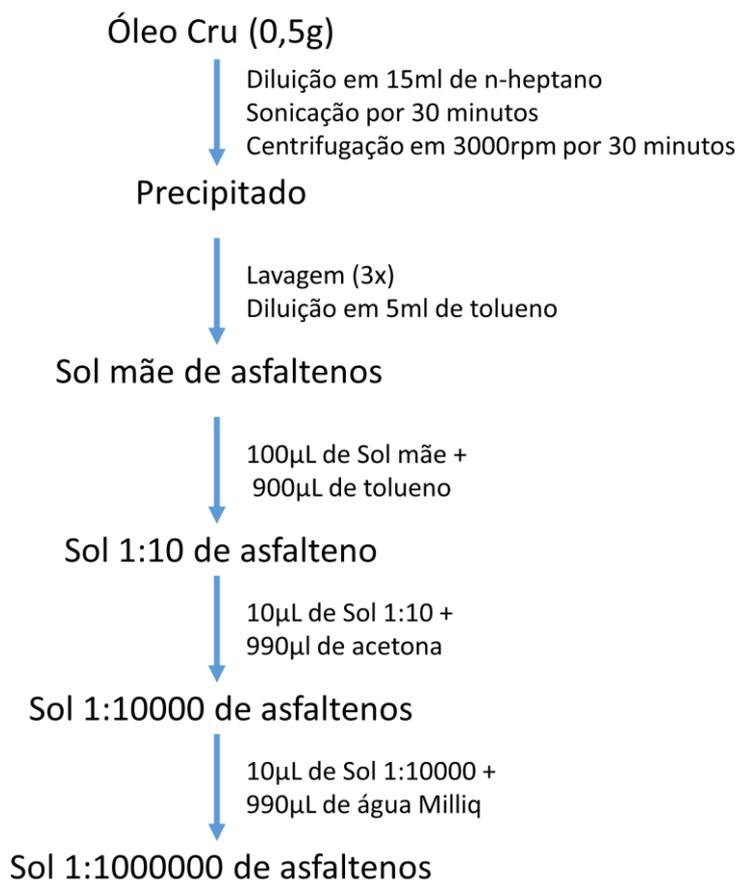
Uma tabela com os três tempos de decaimento de fluorescência e o tempo médio de cada amostra serão apresentados no capítulo 6, de resultados experimentais.

5.4 FCS

Pela pluralidade de componentes fluorescentes em uma amostra de petróleo, foi considerado inviável a análise por FCS de uma alíquota de óleo cru.

O processo de separação de asfaltenos para a técnica de FCS foi a mesma utilizada para a técnica de FLIM, mas, como a técnica de FCS depende de baixas concentrações, as soluções mãe de asfaltenos diluídas em uma mistura de solventes até atingir a proporção de um para um milhão, onde todo o procedimento de diluição a partir do óleo cru, assim como os solventes utilizados estão ilustrados no fluxograma a seguir:

Figura 16 - Etapas da separação, diluição das amostras estudadas



Foi utilizado um laser contínuo de 488nm como fonte de excitação, a emissão foi captada entre 488nm e 678nm, e a objetiva utilizada foi de imersão Plan-Apochromat 40x/1.0 Water DIC (WD:2.5mm), de imersão em água. Foram feitas no total dez medidas de dez segundos de exposição para cada amostra. Essas amostras são muito suscetíveis a dimerização [21], então a curva escolhida para representar a amostra analisada foi tal que nenhum dímero passou pelo volume focal durante o tempo de exposição.

Para obtenção do raio hidrodinâmico das moléculas de asfalto fluorescentes, o mesmo procedimento de diluição e medição foi feito para a Rhodamina B, cujo raio molecular já é conhecido.

6 RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Por este ser um estudo comparativo entre o perfil fluorescente, tempo de vida e tamanho molecular de amostras, para melhor visualização, os resultados dessas medidas serão separados por amostras.

6.1 AMOSTRAS CEDIDAS PELA PETROBRAS

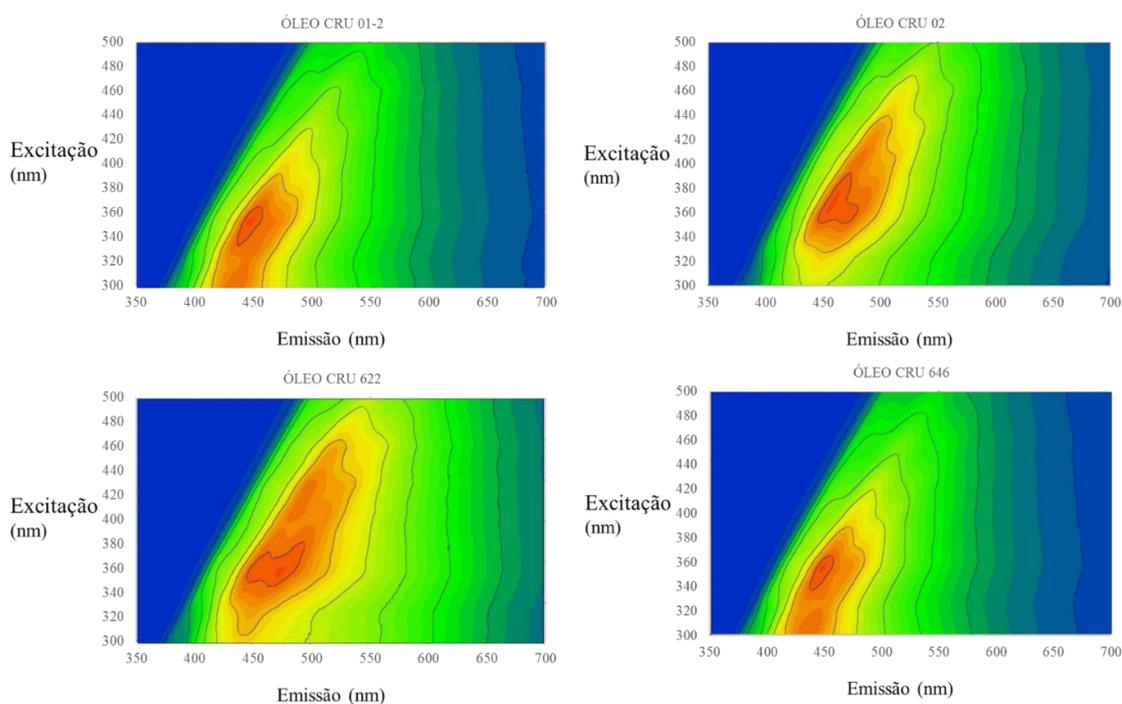
6.1.1 OLEOS CRUS

A seguir, todos os gráficos obtidos das medidas feitas sobre as amostras de óleos crus nas técnicas apresentadas.

6.1.1.1 PLE

Os gráficos a seguir demonstram as medidas feitas nas amostras de óleo cru cedidas pela Petrobras, seguindo o procedimento apresentado no capítulo anterior. (Seção 5.2)

Gráfico 1 - PLE das amostras de óleo cru cedidas pela Petrobras



O gráfico da amostra 01-2 apresenta um pico alto e estreito entre 340nm e 370nm de excitação e próximo de 450nm de emissão. A amostra sofre um decaimento na fluorescência relativa ao seu máximo na região de emissão próxima a 600nm. As regiões alaranjadas próximas ao maior pico indicam a presença de múltiplas moléculas fluorescentes com espectros similares, essa região se encontra próxima ao ponto de excitação 300nm e emissão 440nm.

O gráfico da amostra 02 apresenta um pico irregular na região entre 340nm e 400nm de excitação e entre 440nm e 480nm de emissão. Esta apresenta o mesmo tipo de decaimento de fluorescência relativa que a amostra 01-2, contudo isso acontece na região de emissão próxima a 620nm. Existem picos de maior intensidade (regiões alaranjadas), numa região de maiores comprimentos de onda de excitação entre 340nm até 420nm e emissão entre 460nm até 500nm, indicando a presença de outras moléculas fluorescentes com espectros similares, no entanto o gráfico da amostra 622 apresenta picos disformes, o mais alongado no eixo de emissão das amostras, com sua região de maior fluorescência entre 340nm e 380nm de excitação e entre 440nm e 500nm de emissão.

Assim como as amostras anteriores a amostra 622 apresenta diminuição da fluorescência relativa à sua região de maior fluorescência próximo aos 700nm de emissão. Os padrões alaranjados próximos à região de maior fluorescência se alastram para regiões de comprimentos de onda de excitação entre 370nm até 440nm e nos mesmos comprimentos de onda de emissão.

Por último, a amostra 646 apresenta pico alto e estreito entre 340nm e 370nm de excitação e próximo de 450nm de emissão. A amostra cessa de apresentar fluorescência relativa ao seu máximo na região de emissão próxima a 600nm. As regiões alaranjadas próximas ao maior pico indicam a presença de múltiplas moléculas fluorescentes com espectros similares, essa região próxima ao ponto de excitação 300nm e emissão 440nm.

Podemos observar a partir dos gráficos apresentados e de suas descrições que apesar de todas as amostras apresentarem múltiplos picos de intensidade, o maior (ou os maiores) ocorrem entre 340nm e 360nm de excitação e ao redor de 450 de emissão em todas as amostras. Também podemos ver que os perfis de fluorescência das amostras 01-2 e 646 são praticamente idênticos, com um pico estreito na emissão de 450nm e excitação em 360nm, e um mais baixo na emissão de 430nm e excitação 300nm.

6.1.1.2 FLIM

A tabela a seguir demonstra os dados obtidos a partir da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM apresentado no capítulo anterior (seção 5.3).

Tabela 1 - Tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM

AMOSTRA	a1(%)	a2(%)	a3(%)	τ 1(ps)	τ 2(ps)	τ 3 (ps)	τ m(ps)
01-2	13,94	27,93	58,14	546,47	2991,41	2994,66	2652,52
622	38,29	20,89	40,82	42,53	1564,35	3523,57	1781,48
646	15,33	27,25	57,42	729,21	2916,03	2989,39	2622,89

Os dados obtidos da amostra 01-2 mostram um componente com tempo de fluorescência curto relativo aos outros compondo aproximadamente 14% da amostra, e dois componentes com tempos de fluorescência praticamente iguais, próximos a 3ns, compondo aproximadamente 28% e 58% da amostra de óleo cru.

Os percentuais obtidos da amostra 622 se mostram melhor distribuídos, onde nenhum componente compõe menos de 20% da amostra. Os tempos de vida são bem distantes entre si, com os tempos de 42,5ps com 38% e 3,5ns com 40% sendo respectivamente o menor e o maior tempo de vida observados nesse experimento.

A amostra 646 apresentou tempos de decaimento virtualmente idênticos aos da amostra 01-2, incluindo as porcentagens dos componentes na amostra total, com exceção do primeiro componente, onde os tempos de vida defasaram por aproximadamente 200ps.

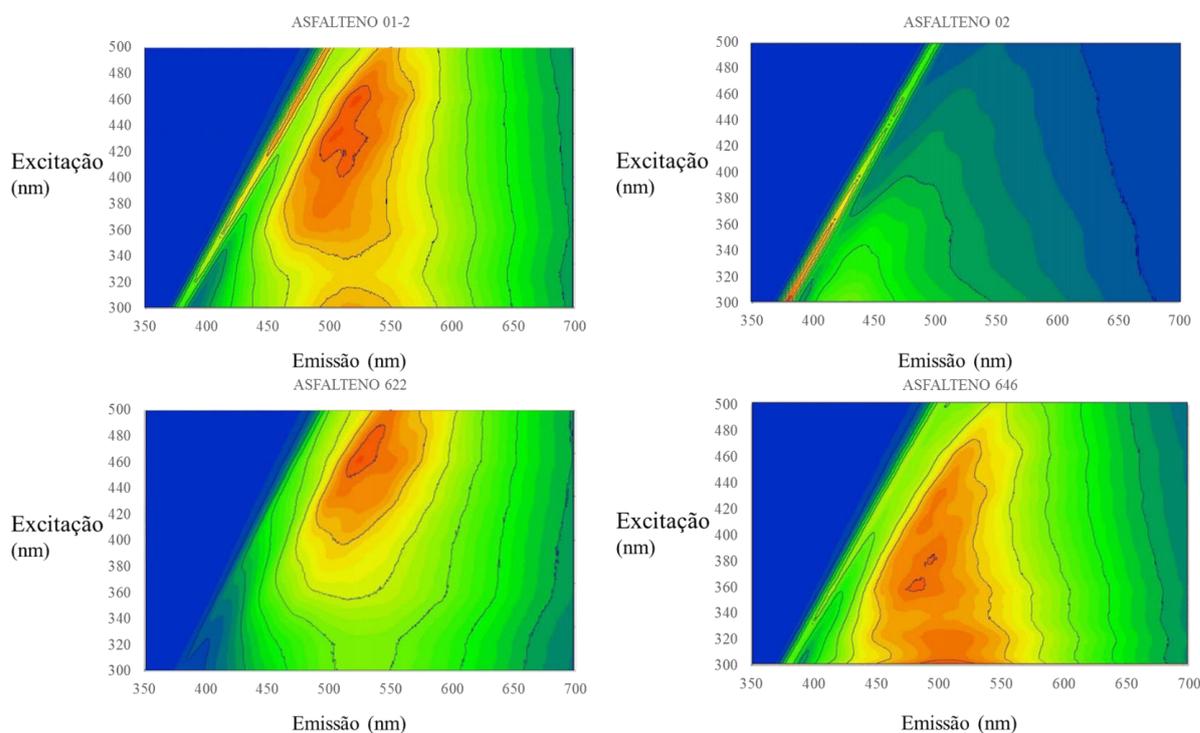
6.1.2 ASFALTENOS

A seguir, todos os gráficos e tabelas obtidas pelas análises feitas nas amostras de asfaltenos extraídas dos óleos crus cedidos pela Petrobras.

6.1.2.1 PLE

Os gráficos a seguir remetem às medidas feitas nas amostras de asfaltenos extraídos das amostras cedidas pela Petrobras, seguindo o procedimento apresentado no capítulo anterior (seção 5.2)

Gráfico 2 - Os gráficos do PLE das amostras de asfaltos extraídos das amostras cedidas pela Petrobras



O gráfico da amostra 01-2 apresenta duas regiões com alta intensidade de emissão, um com pico disforme na região de 470nm até 550nm de emissão e 400nm até 460nm na excitação, e uma região centrada em 520nm de emissão e 300nm de excitação, evidenciado pelo não fechamento da curva de nível. A região alaranjada e o formato disforme do maior pico de fluorescência indicam a presença de múltiplas moléculas fluorescentes. A intensidade de fluorescência mostra um decaimento relativo ao seu pico no comprimento de onda de emissão próximo a 700nm.

A amostra 02 apresentou baixa fluorescência, onde o maior pico de intensidade de emissão foi menos intenso que a luminosidade obtida pelo vazamento da grade do equipamento. A região mais fluorescente está entre 420nm e 450nm de emissão e centrada em 300nm de excitação. A partir de 550nm de emissão e 400nm de excitação, praticamente nenhuma fluorescência é observada.

O gráfico da amostra 622 tem um único pico de intensidade, este com formato aproximado de um elipsoide na região de 500nm até 550nm de emissão e 450nm até 480nm de excitação. A região alaranjada ao redor do pico indica a presença de múltiplas moléculas com espectros fluorescentes similares. Assim como na amostra 01-2, a intensidade da fluorescência relativa ao pico de maior emissão começa a decair no comprimento de onda de emissão próximo de 700nm.

Por último, o gráfico da amostra 646 apresenta dois picos finos na região entre 460nm e 510nm de emissão e 360nm e 400nm de excitação. O espectro PLE observado é largo e disforme, evidenciado pela região alaranjada ocupando grande parte do gráfico, isso indica a presença de múltiplas moléculas fluorescentes em concentrações similares. Ao contrário das outras três amostras, a intensidade de fluorescência não apresenta decaimento significativo no espectro analisado.

6.1.2.2 FLIM

A tabela a seguir demonstra os dados obtidos a partir da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM apresentado no capítulo anterior (seção 5.3).

Tabela 2 - A tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM das amostras cedidas pela Petrobras

AMOSTRA	a1 (%)	a2 (%)	a3 (%)	τ 1 (ps)	τ 2 (ps)	τ 3 (ps)	τ m
01-2	62,84	6,99	30,17	21,29	803,45	3178,98	1028,66
622	31,05	21,14	47,81	50,57	1585,53	3530,58	2023,06
646	21,33	24,53	54,13	776,30	2936,02	3239,53	2639,56

Os dados obtidos da amostra 01-2 apresentam uma predominância do primeiro componente, este compondo aproximadamente 63% da amostra total, este com o tempo de vida mais curto observado nesse experimento, de 21,3ps. Os outros dois componentes da amostra apresentam porcentagens de aproximadamente 7% e 30% e tempos de vida respectivos de 803,5ns e 3179ns.

A amostra 622 apresentou concentrações mais niveladas em relação às duas outras amostras, 31%, 21% e 48% com os respectivos tempos de vida de 50,6ps, 1,6ns e 3,5ns.

E por último a amostra 646 apresenta um componente compondo 50% a amostra total, esse com tempo de vida de 3,2ns, e os outros dois componentes com concentrações similares de 21% e 24,5%, com tempos de vida respectivos de 776,3ps e 2,9ns. A amostra 646 é a única observada que apresenta todos tempos de vida acima de 0,1ns.

6.1.2.3 FCS

A tabela a seguir demonstra os dados obtidos a partir das curvas de autocorrelação obtidas utilizando o procedimento de FCS apresentado no capítulo anterior (seção 5.4).

Tabela 3 - Tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FCS das amostras cedidas pela Petrobras

AMOSTRA	a1(%)	a2(%)	a3(%)	t1(μs)	t2(μs)	t3(μs)	R1(nm)	R2(nm)	R3(nm)
RHODAMINA	100,00	-----	-----	32,60	-----	-----	77,60	-----	-----
01-2	28,18	49,61	22,21	75,91	2237,34	52767,22	180,69	5325,69	125605,40
622	23,46	25,07	51,47	25,29	578,08	30151,49	60,20	1376,03	71771,64
646	69,45	24,17	6,38	19,82	954,19	35348,85	47,19	2271,32	84143,27

Onde os termos R são os raios calculados a partir do tempo de difusão das amostras e os dados da Rhodamina. [22]

A amostra 01-2 apresenta dois componentes com concentrações similares, de 28% e 22% e raios hidrodinâmicos respectivos e 180,7nm e 125605,4nm. O componente mais presente na amostra é de raio intermediário, 5325,7nm, compondo aproximadamente 50% da amostra.

Os dados obtidos da amostra 622 mostram uma similar distribuição de concentrações em relação à amostra 01-2, com um componente concentrado a 50%, este com raio hidrodinâmico 71771,7nm, e os outros dois com mesmas proporções, um com 23,5% e raio de 60,2nm e o outro com 25% e raio de 1376nm.

A amostra 646 apresentou um componente compondo quase 70% da amostra, esse com o raio hidrodinâmico de 47,2nm e, ao contrário das outras amostras, apresentou concentrações diferentes para os componentes restantes, um com 24% e raio de 2271,3nm e o último com apenas 6% e raio de 84143,3nm.

6.2 AMOSTRAS CEDIDAS PELO LABORATÓRIO DE ALTAS PRESSÕES

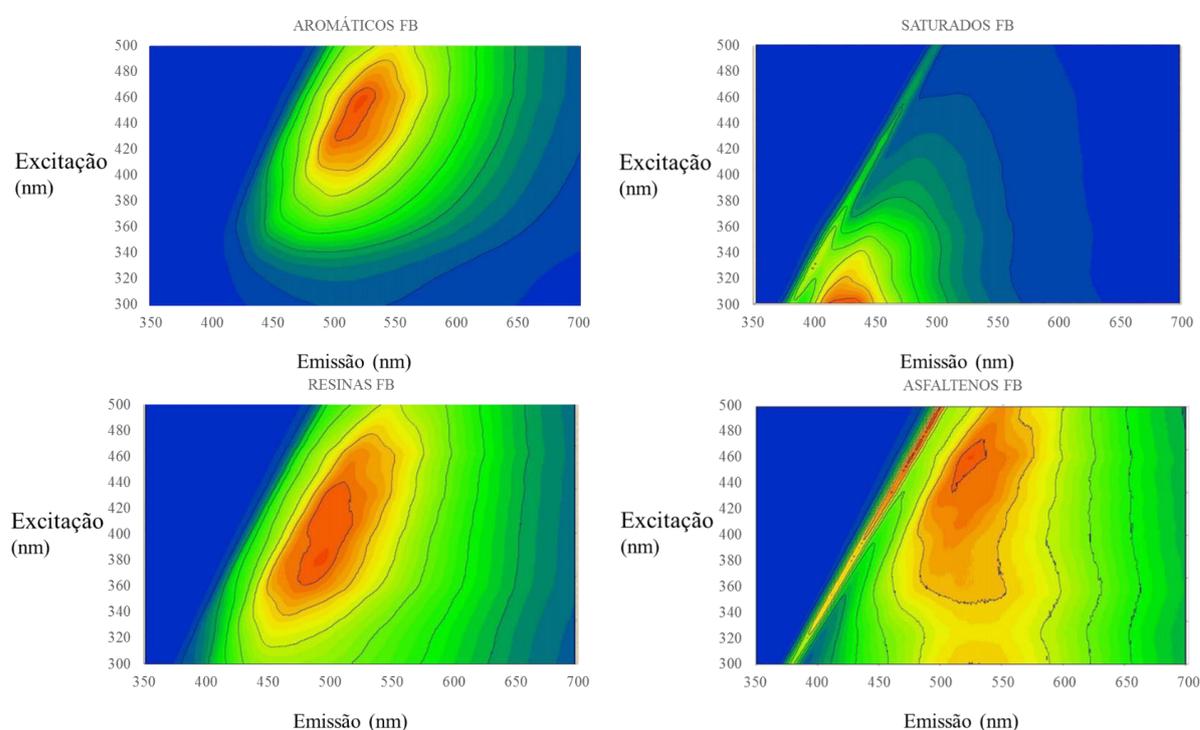
6.2.1 AMOSTRA FB

A seguir, serão apresentados os gráficos obtidos das medidas de PLE feitas dos componentes da amostra de óleo cru FB, cedidas pelo laboratório de altas pressões.

6.2.1.1 PLE

Os gráficos a seguir remetem às medidas feitas nas amostras dos componentes extraídos das amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões, seguindo o procedimento apresentado no capítulo anterior. (Seção 5.2).

Gráfico 3 - PLE das frações da amostra FB dos componentes extraídos das amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões



O gráfico de PLE dos componentes aromáticos da amostra FB apresenta um único pico estreito em forma aproximada de elipsoide na região de 500nm até 540nm e emissão e 420nm até 460nm e excitação. O formato uniforme das regiões alaranjadas ao redor do pico sugerem uma homogeneidade de moléculas na amostra. A intensidade da fluorescência relativa ao pico cai rapidamente ao se afastar dessa região de maior intensidade, apresentando nenhuma fluorescência para comprimentos de onda de emissão acima de 650nm e abaixo de 340nm de excitação.

A fração de saturados da amostra FB apresenta pouca fluorescência em relação aos outros componentes do óleo. Com um único pico centrado em 300nm de excitação e 420nm de emissão. A intensidade de fluorescência em relação ao pico cai rapidamente, chegando a

níveis irrelevantes na região acima de 500nm de emissão e 380nm de excitação.

O gráfico de resinas da amostra FB tem um único pico largo e disforme na região de 460nm e 520nm de emissão e 360nm até 440nm de excitação. A largura do pico e as regiões alaranjadas próximas à essa região de maior intensidade sugerem a presença de múltiplas moléculas fluorescentes na amostra. O espectro PLE dessas resinas é largo, sua fluorescência enfraquece na região acima de 650nm de emissão.

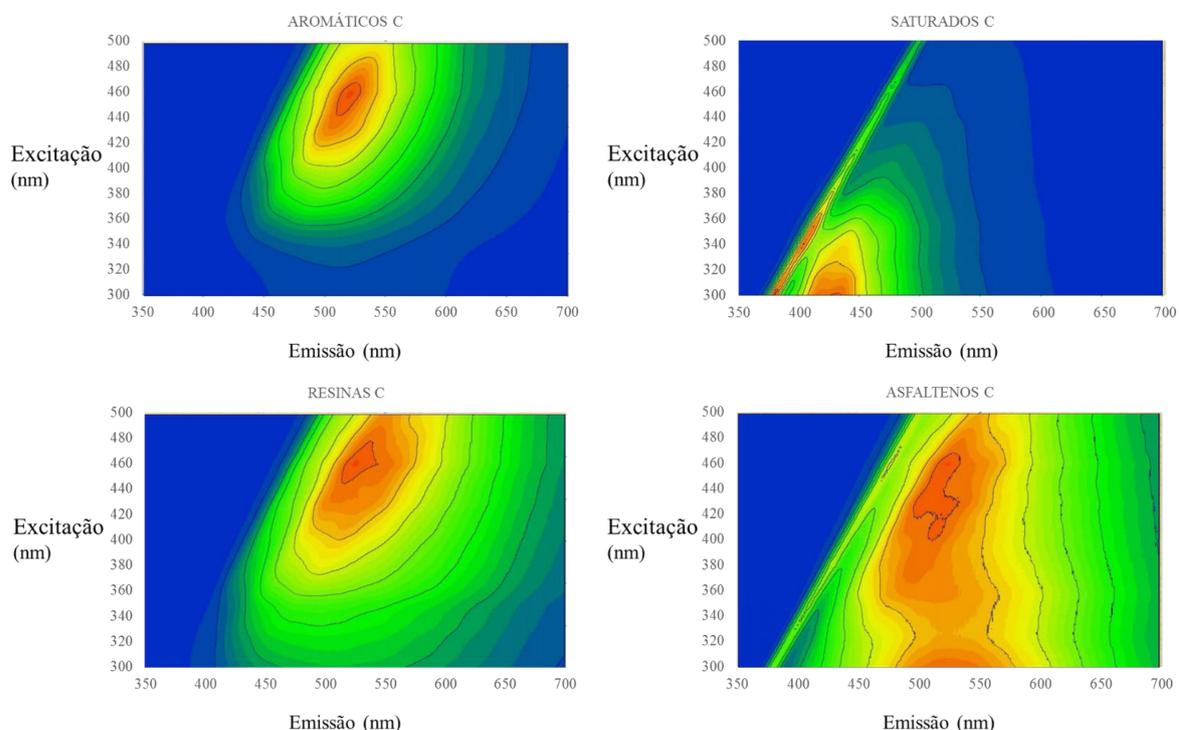
O espectro PLE dos asfaltenos da amostra FB é largo, com um único pico desforme e largo na região de 500nm até 550nm de emissão e 430nm até 470nm de excitação. O gráfico também apresenta o que pode ser outro pico para regiões abaixo de 300nm de excitação e na faixa de 520nm de emissão. A presença das regiões alaranjadas sugere que a amostra é composta por mais de uma molécula. O largo espectro observado não apresenta diminuição significativa na intensidade de fluorescência para as faixas de comprimentos de onda de emissão e excitação estudados.

6.2.2 AMOSTRA C

A seguir, serão apresentados os gráficos e tabelas obtidas nas medidas feitas nos componentes especificados da amostra e óleo cru C nas técnicas de PLE, FLIM e FCS. Amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões.

6.2.2.1 PLE

Gráfico 4 - PLE das frações da amostra C dos componentes extraídos das amostras cedidas pelo laboratório de altas pressões



O gráfico da fração de aromáticos da amostra de óleo cru C apresenta um único pico estreito e elipsoidal na região entre 500nm e 540nm de emissão e 440nm até 460nm de excitação. A uniformidade do formato do pico e a falta de outras regiões de altas intensidades refletem um caráter homogêneo na amostra. A intensidade de fluorescência com relação ao pico cai rapidamente, se tornando quase inexistente para regiões de emissão acima de 600nm e regiões de excitação abaixo de 350nm.

O espectro obtido dos saturados da amostra C é o mais fraco das frações dessa amostra, com um único pico centrado em 300nm de excitação e 430nm de emissão, com um decaimento rápido de fluorescência relativa ao pico e intensidade, onde quase não se observa fluorescência para regiões de emissão acima de 500nm e regiões de excitação acima de 380nm.

O gráfico das resinas da amostra de óleo C mostra um único pico desforme e estreito na região de 500nm até 550nm e emissão e 450nm até 480nm de excitação. O espectro observado é mais largo que o dos aromáticos de C, mas ainda sofre um decaimento de intensidade para regiões de 700nm de emissão.

Por último, o gráfico dos asfaltenos de C apresenta um espectro largo com um pico disforme, provavelmente composto por superposições de espectros na região entre 480nm e 520nm de emissão e 390nm até 470nm de excitação. Nesse gráfico é possível observar a presença de um provável segundo pico na região abaixo de 300nm de excitação, e 420nm de emissão. Assim como no asfalteno FB, o espectro os asfaltenos da amostra C não apresenta uma região e baixa fluorescência dentro os comprimentos de excitação e emissão estudados.

6.2.2.2 FLIM

A tabela a seguir demonstra os dados obtidos a partir da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM apresentado no capítulo anterior (seção 5.3).

Tabela 4 - Tabela da curva de decaimento obtida no procedimento de FLIM dos asfaltenos da amostra C

AMOSTRA	a1 (%)	a2 (%)	a3 (%)	τ 1 (ps)	τ 2 (ps)	τ 3 (ps)	τ m (ps)
ASFALTENO C	18,45	25,68	55,87	694,33	2984,53	3320,32	2749,65

A fração de asfaltenos isolados da amostra e óleo cru C apresenta um componente e maior concentração, tomando aproximadamente 56% da amostra, com tempo de decaimento de 3,3 microssegundos. Os outros dois componentes têm concentrações de aproximadamente 19% e 25%, com tempos de decaimento respectivos iguais a 695 picossegundos e 2,9 microssegundos.

6.2.2.3 FCS

A tabela a seguir demonstra os dados obtidos a partir das curvas de autocorrelação obtidas utilizando o procedimento de FCS apresentado no capítulo anterior (seção 5.4).

Tabela 5 - Tabela das as curvas de autocorrelação obtidas utilizando o procedimento de FCS na amostra C

AMOSTRA	a1(%)	a2(%)	a3(%)	t1(μs)	t2(μs)	t3(μs)	R1(nm)	R2(nm)	R3(nm)
RHODAMINA	100,00	0,00	0,00	32,60	0,00	0,00	77,60	0,00	0,00
C	18,95	42,34	38,72	33,04	1961,66	23578,53	78,64	4669,46	56125,59

Novamente, R são os raios obtidos e os dados da Rhodamina obtidos no experimento foram utilizados, juntamente com o raio hidrodinâmico da molécula já conhecido para a obtenção do tamanho molecular do asfalto.

A fração de asfaltenos da amostra de óleo cru C apresenta dois componentes próximos em concentração, estes com 42,34% e 38,72% de concentração, e 4669,5nm e 56125,6nm de raio. O outro componente tem aproximadamente a metade da concentração dos outros, com 19%, e um raio hidrodinâmico próximo ao da Rhodamina, 78,64nm.

7. DISCUSSÃO

A partir dos dados coletados, podemos observar que existem discrepâncias entre as medidas observadas e os resultados esperados para as técnicas de FLIM e de FCS.

As medidas de FLIM apresentam caráter inconclusivo pelas ordens de grandeza dos tempos de vida observado. O IRF (Instrument Response Function) do módulo Becker & Hickl é de 200ps [11], e, nas amostras de óleo cru 622, asfalto 622 e asfalto 01-2, os tempos de vida mais curtos estão abaixo do tempo de resposta do equipamento.

Os resultados obtidos pelo método de FCS se mostram problemáticos pelo raio hidrodinâmico calculado da estrutura fluorescente ser grande demais para que o objeto estudado seja uma molécula. Todas as amostras analisadas no FCS apresentam essa peculiaridade, com destaque para a amostra de asfalto 01-2, que apresentou um raio hidrodinâmico de aproximadamente 0,1 milímetros.

Essas inconsistências podem ser atribuídas ao método de extração e separação utilizado nas amostras analisadas. Tais discrepâncias podem ter sido ocasionadas devido aos procedimentos experimentais com o tratamento de amostras empregado para cada técnica. Por essa razão, o item de discussão de resultados será separado pelas técnicas utilizadas.

7.1 FLIM

A natureza duvidosa das medidas obtidas no método de FLIM pode ser atribuída à natureza das amostras analisadas em conjunto com um método de extração e diluição impróprios para esse tipo de medida.

A medida de tempo de vida de fluorescência, como explicado no capítulo teórico deste trabalho (Seção 2.1.2), em princípio, independe da concentração da amostra, mas, medidas feitas com essa técnica em amostras de óleos crus e suas frações são influenciadas pela concentração, onde o tempo de vida de uma mesma amostra é inversamente proporcional à concentração desta [24].

Apesar das concentrações das amostras de óleos crus e asfaltenos terem sido padronizadas, essas ainda sofreram efeito de deslocamento de tempo vida devido a rápida evaporação em temperatura ambiente dos solventes utilizados para diluição. A câmara improvisada descrita no capítulo de procedimento experimentais deste trabalho (Seção 5.3) não foi capaz de impedir a evaporação de uma quantidade considerável de solventes durante o tempo de coleta, resultando na variação de concentração da amostra em análise.

Outro fator válido a se mencionar é o fato de que o software do módulo Becker & Hickl só é capaz de realizar um ajuste de curva de decaimento para até três componentes, e, como não é conhecido o número de moléculas que compõe cada amostra, o ajuste de curva utilizado provavelmente foi inadequado.

7.2 FCS

A fração de asfaltenos, como demonstrado no método de separação SARA, descrito no capítulo de amostras deste trabalho (Seção 4), é melhor diluído em tolueno, que, pela teoria descrita da técnica do FCS (Seção 2.2.1), é o solvente ideal para medidas de autocorrelação.

O tolueno é um solvente volátil à temperatura ambiente, o que causa problemas para medidas de FCS, já que o aumento em concentração influencia no sinal de flutuações obtido do volume focal. No procedimento dessa técnica, foi criada uma diluição fracionada (Tolueno – Acetona – Água) na tentativa de contornar a volatilidade do solvente consequentemente o aumento de concentração da amostra. Pelos dados encontrados, a diluição fracionada não gerou os resultados esperados, provavelmente ocasionado pelo aumento da polaridade do solvente, o que pode ter contribuído para a formação de

aglomerados asfálticos passando pelo volume focal, fato esse, evidenciado pelos altos raios hidrodinâmicos obtidos [17].

O software utilizado para o ajuste de todas as curvas de autocorrelação foi o Zen 2010. Esse software, assim como o do módulo Becker & Hickl, só é capaz de fazer ajustes de curva para até três componentes. Como o número de compostos das amostras de asfaltenos é desconhecido, o ajuste feito utilizando o software pode não ter sido exato.

7.3 PLE

O equipamento utilizado para a aquisição dos gráficos PLE sofre de um vazamento de grade, isso é evidenciado nos gráficos obtidos como uma linha com intensidade de fluorescência passando na diagonal do espectro. Este vazamento de grade será desconsiderado de qualquer discussões e conclusões a serem feitas nesse trabalho pois este não representa fluorescência emitida pela amostra.

7.3.1 AMOSTRAS CEDIDAS PELO LABORATÓRIO DE ALTAS PRESSÕES

As frações SARA dos óleos crus FB e C analisados pelo PLE mostram algumas similaridades entre seus perfis, principalmente as frações aromáticas e saturadas. Pelos espectros obtidos, os compostos saturados são altamente alifáticos, com cadeias carbônicas dotadas de poucas ligações duplas, isso evidenciado pelo espectro de fluorescência apresentar maior intensidade em regiões de baixos comprimentos de onda de excitação. O espectro da fração aromática possui sua região de maior intensidade em comprimentos de onda de excitação maiores, isso acontece devido a estrutura desses compostos serem dotada de múltiplos anéis aromáticos, criando longas cadeias carbônicas de ligações duplas alternadas.

A partir dos espectros obtidos da fração de asfaltenos retirados dos óleos crus FB e C, é possível observar a presença de estruturas variadas, podendo estas apresentar longas cadeias carbônicas alifáticas e múltiplos anéis aromáticos. A concentração relativa das cadeias aromáticas e alifáticas nas estruturas desses asfaltenos foi o parâmetro escolhido para diferenciar amostras de óleos crus e asfaltenos entre si.

7.3.2 AMOSTRAS CEDIDAS PELA PETROBRAS

7.3.2.1 ÓLEOS CRUS

Pelos gráficos obtidos, podemos notar que as amostras 01-2 e 622 apresentam frações alifáticas mais predominantes que os óleos 02 e 646, onde estes já apresentam altas concentrações de compostos intermediários entre aromáticos e alifáticos, como por exemplo as resinas.

Os espectros obtidos não apresentam diferenças marcantes entre si, isso se deve à presença dos maltenos que, por não mostrarem uma variedade estrutural em suas moléculas como os asfaltenos apresentam, tendem os espectros à apresentarem áreas de maior intensidade de fluorescência localizados em faixas de baixas emissão e excitação. Tendo isso em mente, podemos ver que os óleos crus apresentam uma concentração maior de compostos predominantemente alifáticos do que aromáticos.

7.3.2.2 ASFALTENOS

Os espectros obtidos dos asfaltenos são visualmente distintos, onde todos os espectros variam entre si em número de picos de intensidade e localização desses picos.

O pico disforme da amostra 01-2 e sua localização indicam alta concentração de compostos predominantemente aromáticos e resinosos. Mas a existência de uma curva de nível com pico provavelmente baixo do espectro de excitação escolhido para estudo das amostras indica a uma presença considerável de compostos alifáticos também.

A amostra 02, como discutido no capítulo de procedimentos experimentais (Seção 5.1), apresentou fração de asfaltenos menor que a dos outros óleos. Esse fato é evidenciado pelo fraco espectro obtido nesta amostra, onde a fluorescência da amostra em si é menor que o sinal captado pelo vazamento da grade do equipamento. Contudo, a emissão que foi obtida mostra que a fração de asfaltenos obtida é quase que exclusivamente alifática.

A região de maior fluorescência da amostra de asfaltenos 622 mostra uma predominância de compostos aromáticos em sua composição. A escassez de picos em outras regiões indica uma baixa concentração relativa de compostos alifáticos na amostra, mas, a forma como a fluorescência não perde intensidade até os limites do espectro estudado, mostra uma presença de compostos intermediários.

Por último, o gráfico obtido da amostra 646 é o mais diversificado em termos de composição alifática e aromática, esta apresentando regiões quase uniformes em intensidade passando pelo espectro de excitação estudado. Vale ressaltar que em comparação com a amostra 622, a amostra 646 não possui os compostos mais aromáticos, mas apresenta uma maior concentração de compostos intermediários.

8. CONCLUSÃO

Dentre as técnicas analisadas neste trabalho, a técnica de PLE apresentou resultados mais confiáveis com respeito a distinção de amostras. Apesar das medidas de PLE de óleos crus não apresentarem distinções tão marcantes, os gráficos dos asfaltenos e suas definições em alifáticos e aromáticos são capazes de proporcionar espectros diferenciáveis entre amostras diferentes.

A partir dos dados obtidos e pela discussão sobre estes das técnicas de FLIM e FCS, podemos concluir que o método de diluição de óleos crus e asfaltenos empregado para esses procedimentos apresenta limitações operacionais suficiente para obtermos resultados inconclusivos sobre a composição química de amostras de óleo cru. Essas técnicas aplicadas em óleos crus e suas frações dependem da concentração da amostra, e, como as amostras são solúveis em solventes voláteis, é necessário a elaboração de novos procedimentos que tomem esse fator em consideração, como o uso de recipientes vedados para minimizar a perda de solventes para o ambiente e utilização de softwares terceirizados para melhor tratamento de dados.

9 REFERÊNCIAS

O CBIE – CENTRO BRASILEIRO DE INFRA ESTRUTURA,
<https://cbie.com.br/artigos/quantos-pocos-de-petroleo-e-gas-temos-no-brasil/>

[2] Stokes, G., On the change in Refrangibility of Light, Philosophical Transactions of the Royal Society of London 142 463-562 (1852)

[3] CONDON, E.U., Nuclear Motions Associated with Electron Transitions in Diatomic Molecules, Phys. Rev. n. 32, p. 858, 1928.

[4] LENZ, C. Introdução a microscopia confocal, Unicamp Press Inc., Sao Paulo (2008)

[5] LENNARD-JONES, J.E., On the determination of molecular fields, Proc. R. Soc. London A. v. 106, n. 738, p. 463-477, 1924.

[6] MORSE, P. M., Diatomic molecules according to wave mechanics II, Vibrational levels. Phys. Rev. n. 34, p. 57-64, 1929.

[7] BENNY, Y., KODRIANO, Y., POEM, E., KHATSEVITCH, S., GERSHONI, D., PETROFF, P. M., two-photon photoluminescence excitation spectroscopy of single quantum dots. **Phys. Rev. B**, n.84, p.075473, 2011

[8] GUIMET, F., FERRE, J., BOQUE, R., VIDAL, M., Josep Garcia **Excitation–Emission Fluorescence Spectroscopy Combined with Three–Way Methods of Analysis as a Complementary Technique for Olive Oil Characterization. J. Agric. Food Chem**, n.53, v.24, p.9319-9328, 2005

[9] WHITE, A.M. . "Applications of photoluminescence excitation spectroscopy to the study of indium gallium phosphide alloys". **J. Phys. D: Appl. Phys.** **3** (9): 1322–1328, 1970.

[10] BECKER, W. Fluorescence lifetime imaging--techniques and applications. **J Microsc.** n.247, v.2, p.119-36, 2012

[11] BECKER, W, “beautiful-FLIM: <https://www.becker-hickl.com/wp-content/uploads/2019/01/beautiful-FLIM-05.pdf>.

[12] W. Becker A. Bergmann M.A. Hink K. König K. Benndorf C. Biskup Fluorescence lifetime imaging by time- correlated single- photon counting. **Microsc. Res. Tech.** 63:58–66, 2004.

[13] MINSKY M, "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope," **Published in Scanning**, vol.10 p128-138, 1988

[14] NIKON <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts>

- [15] THOMAZ, A.A., Plataforma fotonica integrada e suas aplicacoes em estudos de *quantum dots* e processos biologicos, T368p, UNICAMP, Campinas, 2013
- [16] RIGLET, R., ELSON S **Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications**, Ed. Springer., 2012
- [17] KRIEGER, J., TÓTH, K., LANGOWSKI, J. Practical Course Biophysics: Fluorescence Correlation Spectroscopy, ed. DFKZ German Cancer Research. Berlin, 2012.
- [18] EINSTEIN, A., On the Motion of Small Particles Suspended in Liquids at Rest Required by the Molecular-Kinetic Theory of Heat, **Annalen der Physik**, n.17, p. 549-560, 1905
- [19] ZEISS <http://www.user-manual.info/418635/microscope-magnifier/carl-zeiss/lsm-710/>
- [20] SHIMADZU <https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Products/literature/Spectroscopy/C125-E009C.pdf>
- [21] MUHAMMAD, I., TIJJANI, N., DIOHA, I.J., MUSA, A., SALE, H. SARA Separation and Determination of Concentration Levels of Some Heavy Metals in Organic Fractions of Nigerian Crude Oil **Chemistry and Materials Research**, n.4, v.3 p. 7-11 2013
- [22] GASPAR, A., ZELLERMANN, E., LAMBABIDI, S., REECE, J., SCHRADER, W., Characterization of saturades, aromatics, resins and asphaltenes heavy crude oils fraction by atmospheric pressure laser ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectroscopy. **Energy and Fuel**, n.26, p. 3481-3487, 2012
- [23] GROENZIN, H., MULLINS, O.C., Molecular size and structur of asphaltenes from various sources. **Energy and Fuel**, n.14, p. 677-684, 2000
- [24] WANG, X., MULLINS, O.C. Fluorescent lifetime studies of crude oil, **Applied spectroscopy**, n.8, v. 48, 977-984, 1994.