

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Liliane Dailei Almeida Gruber

**Estudo de Ácidos Naftênicos em Petróleo Brasileiro:
Métodos de Extração e Análise Cromatográfica**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Elina Bastos Caramão
Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2009.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, cujo entusiasmo, alegria e fé na vida são incomparáveis.

Para meu grande amor, Rafael, por sua paciência, amor e amizade.

E também ao meu irmão, Leonardo, por saber conviver com uma mestranda estressada.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Elina Bastos Caramão pela orientação e confiança depositada, apoio profissional e pessoal e, principalmente, pelo exemplo de luta e trabalho incansáveis.

À professora Dra. Cláudia Zini, pela colaboração nos momentos necessários.

Ao CNPq, CTPetro e PETROBRAS pelo financiamento dos projetos deste trabalho.

Sinceros agradecimentos à prof^ª. Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba, prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos e prof. Dr. Edilson Benvenuti pelo apoio técnico em alguns momentos deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora Gisele Olímpio, Maria Regina Alves Rodrigues e João Henrique Zimnoch dos Santos por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições para a finalização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Instituto de Química pela convivência agradável durante este período.

Aos amigos e colegas do LAAO minha gratidão pelo imenso companheirismo, meu carinho em especial para Fernando, Suelen, Luiza, Maria Elisabete, Gisele (pena que não fomos juntas até o fim desta saga!).

Um tonel de gratidão para minha colega e, acima de tudo, amiga Ana Geller. Obrigada por ser incansavelmente criativa, inteligente e meticulosa quando tudo parecia dar errado. Nem toda minha gratidão é suficiente pelo companheirismo no trabalho árduo e doação de conhecimento técnico e experiência de vida – tu tens um dom verdadeiro para ensinar!

Obrigada mãe, por toda uma vida de amor e apoio, ninguém um dia recebeu mais amor e apoio incondicional do que eu tive de ti.

Muito amor e gratidão ao meu Rafael, por saber me dividir com tanta generosidade com livros, artigos e laboratório. Por estar sempre disposto a me acompanhar nas muitas idas e vindas ao Vale, nos dias e horários mais ingratos, sem nenhum vestígio de impaciência.

Minha gratidão especial ao meu irmão Leonardo, por saber me ouvir e dividir suas experiências de mestrando e pelas valiosas dicas informáticas/idiomáticas que me socorreram nos momentos mais importunos.

Meus sinceros agradecimentos ao sogros Adail e Sabina e a cunhada Raquel, pelo apoio, incentivo e por compreenderem os momentos de ausência.

Beijos e muito obrigada às minhas amigas de química Marina, Camila e Paula, em especial Carla, Débora e Diana, sempre leais e dispostas a ouvir meus lamentos e crises de insegurança – gurias, vocês fizeram deste período uma tarefa menos enfadonha!

TRABALHOS GERADOS POR ESTA DISSERTAÇÃO

Trabalhos apresentados em congressos sob as formas resumo e pôster

1. GRUBER, L. D. A.; MIOLO, L. M. F.; BOTTEGA, D. P.; GELLER, A. M.; GOMES, A. O.; GUIMARAES, R. C. L.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. **Avaliação da Retenção dos Ácidos Naftênicos na Sílica por GC/MS**. In: 15 Encontro Nacional de Química Analítica e 3 Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador. Abstract Book, 2009.
2. MORAES, M. S. A.; GRUBER, L. D. A.; MACHADO, M. E.; GELLER, A. M.; BORTOLUZZI, J. H., GOMES, A. O.; GUIMARÃES, R. C. L.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. **Análise de Ácidos Naftênicos em Petróleo Brasileiro usando SPE e Cromatografia Gasosa (Mono e Bidimensional)**. In: Sociedade Brasileira de Química, 32ª Reunião Anual, 2009, Fortaleza. Livro de Resumos, 2009.
3. CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A.; GELLER, A. M.; GRUBER, L. D. A.; BORTOLUZZI, J. H.; MORAES, M. S. A.; MACHADO, M. E.; GOMES, A. O.; GUIMARAES, R. C. L. **Aplicação da Cromatografia Bidimensional na Caracterização de Ácidos Naftênicos**. In: Encontro Petrobras e Universidades, 2009, Rio de Janeiro. Livro de Resumos - Programa. Rio de Janeiro, 2009
4. GRUBER, L. D. A.; MORAES, M. S. A.; SANTESTEVAN, V. A.; GELLER, A. M.; BORTOLUZZI, J. H.; DAMASCENO, F. C.; MACHADO, M. E.; GOMES, A. O.; GUIMARAES, R. C. L.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. **Caracterização de Ácidos Naftênicos em Frações Pesadas de Petróleo via Cromatografia Bidimensional Abrangente**. In: XII Colacro: Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2008, Florianópolis. Livro de Resumos, 2008.
5. SANTESTEVAN, V. A.; GRUBER, L. D. A.; MORAES, M. S. A.; GELLER, A. M.; BORTOLUZZI, J. H.; DAMASCENO, F. C.; MACHADO, M. E.; GOMES, A. O.; GUIMARAES, R. C. L.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. **Desenvolvimento de Metodologia para o fracionamento de Amostras Pesadas do Petróleo Brasileiro via HPLC para a Caracterização de Ácidos Naftênicos por Cromatografia Gasosa**. In: XII Colacro: Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2008, Florianópolis. Livro de Resumos, 2008.

Artigo completo submetido para publicação

GRUBER, L. D. A.; GELLER, A. M.; SANTESTEVAN, V. A.; GOMES, A. O;
GUIMARÃES, R. C. L.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B. **Isolation of Naphthenic Acids
from Brazilian Petroleum Fractions using Preparative HPLC and GC/MSD Analysis.**
Fuel Processing Technology, 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 PETRÓLEO.....	4
2.1.1. Origem.....	4
2.1.2. Composição.....	4
2.1.3. Óleos não convencionais.....	6
2.2. ÁCIDOS NAFTÊNICOS.....	7
2.2.1. Ocorrência.....	7
2.2.2. Estrutura dos ácidos naftênicos.....	8
2.2.3. Propriedades.....	10
2.2.4. Aplicações dos ácidos naftênicos.....	10
2.2.5. Problemas relacionados com os ácidos naftênicos.....	11
2.3. NÚMERO DE ACIDEZ TOTAL.....	12
2.4. CARACTERIZAÇÃO.....	13
2.4.1. Técnicas para isolamento dos ácidos naftênicos do petróleo.....	14

2.4.2. Técnicas de análise e caracterização dos ácidos naftênicos.....	15
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1. AMOSTRAS E REAGENTES.....	20
3.2. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES.....	21
3.3. DERIVATIZAÇÃO.....	21
3.4. LIMPEZA DA VIDRARIA.....	22
3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA (<i>prepHPLC</i>).....	22
3.5.1. Extração por <i>prepHPLC</i> com coluna de sílica tratada termicamente.....	22
3.5.2. Extração por <i>prepHPLC</i> com coluna de sílica modificada com KOH em isopropanol.....	24
3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM COLUNA ABERTA.....	25
3.6.1. Extração por cromatografia líquida preparativa com coluna aberta em fase sílica gel tratada termicamente.....	25
3.6.2. Extração por cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com fase terra diatomácea para a amostra A2.....	26
3.7. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	27
3.7.1. Tratamento dos extratos ácidos com terra diatomácea.....	27
3.7.2. Extração utilizando cartuchos do tipo SPE com fase SAX.....	28
3.7.3. Extração utilizando cartuchos do tipo SPE com fase amino.....	29
3.8. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	30
3.8.1. Cromatografia Gasosa Monodimensional.....	30
3.8.2. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente.....	30
3.9. ESPECTROCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	31
3.9.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	31
3.9.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Teste dos	

Hidrogênios Ligados.....	31
3.10. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1. EXTRAÇÃO POR <i>prep</i> HPLC COM FASE DE SÍLICA GEL TRATADA TERMICAMENTE.....	33
4.1.1. Resultados das amostras A1 e A2 por cromatografia gasosa monodimensional.....	33
4.1.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente.....	38
4.1.2.1. Metodologia de análise.....	38
4.1.2.2. Resultados da análise da amostra A2.....	41
4.1.3. Resultados da mistura de padrões de ácidos naftênicos por cromatografia gasosa monodimensional.....	42
4.2. EXTRAÇÃO POR <i>prep</i> HPLC COM FASE DE SÍLICA GEL MODIFICADA COM KOH EM ISOPROPANOL.....	43
4.2.1. Resultados da amostra A2 por cromatografia gasosa monodimensional.....	43
4.2.2. Resultados por cromatografia gasosa bidimensional abrangente.....	44
4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM COLUNA ABERTA COM FASE SÍLICA GEL TRATADA TERMICAMENTE.....	45
4.4. TRATAMENTO DOS EXTRATOS ÁCIDOS COM TERRA DIATOMÁCEA E EXTRAÇÃO DA AMOSTRA A2 POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM COLUNA ABERTA COM FASE TERRA DIATOMÁCEA.....	48
4.5. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS A1 E A2 USANDO SPE COM FASE SAX.....	48
4.5.1. Resultados da cromatografia gasosa monodimensional.....	48
4.5.2. Resultados da cromatografia gasosa bidimensional abrangente.....	51

4.6. Resultados da cromatografia gasosa monodimensional para a amostra A2 por SPE com cartucho amino.....	53
4.7. MISTURA TÉCNICA MIRACEMA-NUODEX.....	55
4.7.1. Resultados da cromatografia gasosa monodimensional.....	55
4.7.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente.....	57
4.7.3. Ressonância magnética nuclear.....	58
4.7.4. Espectroscopia no infravermelho.....	60
5. CONCLUSÕES.....	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estrutura geral dos ácidos naftênicos (adaptada de Kirk-Othmer) ²	8
Figura 2: Estruturas representativas para moléculas de AN nas famílias $Z = 0$, $Z = -2$, $Z = -4$ e $Z = -6$	9
Figura 3: Esquema de fragmentação para os íons predominantes dos derivados <i>t</i> -BDMS dos AN descrito por St. John et al. ⁴⁴	16
Figura 4: Espectro de massas para estruturas dos derivados <i>t</i> -BDMS de AN monocíclicas ($Z = -2$), com 9 átomos de carbono e massa do íon 213.....	17
Figura 5: Desenho esquemático de um sistema GC × GC: I – injetor; M – modulador; D – detector; ¹ D – coluna cromatográfica da primeira dimensão; ² D – coluna cromatográfica da segunda dimensão (adaptado de Mühlen ⁸¹).....	18
Figura 6: Esquema ilustrando os conceitos da GC × GC: (A) pico na primeira dimensão contendo co-eluentes; (B) amostras moduladas do pico da primeira dimensão e injetadas na segunda dimensão; (C) co-eluentes são separados na segunda dimensão; (D) diagrama GC × GC obtidos com detector FID nos dois seguimentos; (E) visualização do diagrama 3 D, de contorno e de cores 2 D (adaptado de Dallüge et al. ⁸⁴).....	19
Figura 7: Esquema geral para o procedimento dos AN por <i>prep</i> HPLC utilizando como fase estacionária a sílica gel tratada termicamente. <i>As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 6 da Tabela I</i>	24
Figura 8: Esquema geral para o procedimento de extração dos AN por <i>prep</i> HPLC com coluna de sílica gel modificada com KOH em isopropanol. <i>As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I</i>	25

Figura 9: Esquema geral para o procedimento de extração dos AN por cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com a fase estacionária sílica gel tratada termicamente. <i>As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.</i>	26
Figura 10: Esquema da cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com fase terra diatomácea para a amostra A2.....	27
Figura 11: Esquema do tratamento dos extratos obtidos por <i>prep</i> HPLC e fase sílica gel tratada termicamente com terra diatomácea.....	28
Figura 12: Esquema geral para o procedimento de SPE com fase SAX para extração dos AN. <i>As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.</i>	28
Figura 13: Esquema geral para o procedimento de SPE com fase amino para extração dos AN.....	29
Figura 14: Esquema geral dos métodos de extração, fases estacionárias e técnicas de análise propostos neste trabalho.....	33
Figura 15: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos DCM:MeOH (95:5 v/v) obtidos na <i>prep</i> HPLC com fase sílica gel tratada termicamente para amostras: (a) A1 e (b) A2 em comparação com a solução padrão (c) na concentração de 40 mg L ⁻¹ em DCM, F = ftalato. <i>Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela</i>	35
Figura 16: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos metanólicos obtidos na <i>prep</i> HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente para amostras: (a) A1 e (b) A2, F = ftalato. <i>Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III.</i>	36
Figura 17: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A1 pelo número de carbonos e família Z. A amostra foi extraída por <i>prep</i> HPLC com fase sílica gel tratada	

termicamente e estes dados são referentes a extração com MeOH.....	37
Figura 18: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A2 pelo número de carbonos e família Z. A amostra foi extraída por <i>prep</i> HPLC com fase sílica gel tratada termicamente e estes dados são referentes a extração com DCM:MeOH.....	38
Figura 19: Relação dos tempos de retenção da primeira e segunda dimensão para a caracterização da região de eluição dos hidrocarbonetos lineares, ácidos naftênicos cíclicos e acíclicos quando analisados por GC × GC/FID. <i>Condições cromatográficas descritas na Tabela IV</i>	39
Figura 20: Diagrama de cores obtido para a solução padrão de AN na concentração de 40 mg L ⁻¹ . <i>Compostos identificados na Tabela VIII. Condições cromatográficas apresentadas na Tabela IV</i>	40
Figura 21: Diagrama de cores do extrato DCM:MeOH da amostra A2 fortificada com padrões de ácidos e obtida por <i>prep</i> HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente obtido por GC × GC/TOFMS. Em destaque a série dos ácidos acíclicos (Z = 0). <i>Condições cromatográficas apresentadas na Tabela IV</i>	41
Figura 22: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos (a) DCM:MeOH 95:5 (v/v) e (b) MeOH obtidos na <i>prep</i> HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente com indicação da localização dos padrões conforme Tabela V. <i>Condições cromatográficas segundo Tabela III. As soluções foram preparadas com os padrões 1 a 6 da Tabela I</i>	42
Figura 23: Cromatogramas obtidos por GC/qMS da amostra A2 extraída com MeOH:ácido fórmico 98:2 (v/v) por <i>prep</i> HPLC com fase de sílica gel modificada com KOH (0,1 M) em isopropanol em comparação com a solução padrão de ácidos (40 µg mL ⁻¹ em DCM), D = resíduo do derivatizante. <i>Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III</i>	44
Figura 24: Diagrama de cores obtido por GC × GC/TOFMS para a amostra A2 extraída com MeOH:ácido fórmico 98:2 (v/v) por <i>prep</i> HPLC com fase de sílica gel	

modificada com KOH (0,1 M). <i>Condições cromatográficas apresentadas na Tabela IV</i>	45
Figura 25: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos: (a) DCM:MeOH (95:5 v/v) e (b) MeOH puro obtidos por cromatografia líquida em coluna aberta com fase sílica gel tratada termicamente para amostra A2 com a identificação dos padrões de AN segundo a Tabela V, F = ftalato. <i>Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III. A amostra foi fortificada com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I</i>	46
Figura 26: Distribuição percentual dos AN nos extratos obtidos por coluna aberta considerando o número de carbonos e família Z para os extratos DCM/MeOH (a) e MeOH puro (b).....	47
Figura 27: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos contendo compostos polares para as amostras A1 (a) e A2 (b) oriundos do cartucho SAX com a identificação dos padrões de AN segundo a Tabela V, F = ftalato. <i>Condições cromatográficas segundo Tabela III. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I</i>	49
Figura 29: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A2 extraída por SPE com cartucho SAX pelo número de carbonos e família Z.....	50
Figura 30: Diagrama 3D ampliado do extrato MTBE:ác.fórmico 98:2 (v/v) da amostra A1 obtido por GC × GC-FID com indicação da região de eluição dos AN acíclicos e monocíclicos e os 5 padrões de ácidos. Em detalhe, o diagrama de cores do espaço de separação bidimensional total. <i>Condições cromatográficas descritas na Tabela IV</i>	52
Figura 31: Diagrama 3D ampliado do extrato MTBE:ác.fórmico 98:2 (v/v) da amostra A2 obtido por GC × GC-FID com indicação da região de eluição dos AN acíclicos e monocíclicos e os 5 padrões de ácidos. Em detalhe, o diagrama de cores do espaço de separação bidimensional total. <i>Condições cromatográficas descritas na Tabela IV</i>	53
Figura 32: Cromatogramas obtidos por GC/qMS para as amostras: (a) A1 (20 mg) e (b) A2 (20 mg) e (c) A2 (100 mg), oriundos do cartucho amino. <i>Condições</i>	

<i>cromatográficas segundo Tabela III</i>	54
Figura 33: Cromatograma obtido por GC/qMS para a mistura técnica Miracema – Nuodex, com concentração 12 g L ⁻¹ injetada em modo <i>split</i> 1:50, demais condições cromatográficas segundo Tabela III, HC = hidrocarbonetos.....	55
Figura 34: Distribuição da intensidade dos AN da mistura técnica Miracema-Nuodex pelo número de carbonos e família Z.....	56
Figura 35: Proposta de estruturas para os AN identificados na amostra da mistura técnica Miracema-Nuodex.....	57
Figura 36: Diagrama 3D da mistura técnica da Miracema-Nuodex obtido por GC × GC-FID. No detalhe, o diagrama de cores do espaço de separação bidimensional total. <i>Condições cromatográficas descritas na Tabela IV</i>	58
Figura 37: Espectro de NMR ¹ H e deslocamento químico observado para as possíveis estruturas presentes na mistura técnica da Miracema-Nuodex.....	59
Figura 38: Espectro de NMR ¹³ C em APT e deslocamento químico observado para as possíveis estruturas presentes na mistura técnica da Miracema-Nuodex.....	60
Figura 39: Espectro de FTIR e valores das absorções da mistura técnica Miracema-Nuodex.....	61

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela I: Padrões de ácidos carboxílicos, marca do fabricante e a concentração da solução estoque.....	21
Tabela II: Informações sobre as condições (solventes utilizados e volumes) da extração por <i>prep</i> HPLC com coluna de sílica gel tratada termicamente, para um fluxo de 2 mL min ⁻¹	23
Tabela III: Condições utilizadas na cromatografia gasosa monodimensional.....	30
Tabela IV: Condições otimizadas utilizadas na cromatografia gasosa bidimensional abrangente.....	31
Tabela V: Número de carbonos e Z esperados para os AN derivatizados com o MTBDSTFA (adaptado de Clemene e Fedorak ⁴⁹).....	34
Tabela VI: Tempo de retenção no GC/qMS e os íons monitorados após a derivatização.....	36
Tabela VII: Relação da intensidade, em valores percentuais (%) dos AN nos extratos das amostras A1 e A2 utilizando <i>prep</i> HPLC e fase estacionária sílica gel tratada termicamente.....	38
Tabela VIII: Tempos de retenção dos padrões de ácidos utilizados no GC × GC-FID.....	41
Tabela IX: Relação da intensidade (%) dos AN nos extratos obtidos por cromatografia líquida em coluna aberta com fase sílica gel tratada termicamente para a amostra A2.....	48
Tabela X: Relação da intensidade, em valores percentuais (%) dos AN nos extratos polares das amostras A1 e A2 oriundas da extração por SPE com cartucho SAX.....	51
Tabela XI: Relação da intensidade em valores percentuais (%) dos AN na mistura técnica fornecida pela Miracema-Nuodex determinadas por GC/qMS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

PE: Ponto de Ebulição.

TAN: Número de Acidez Total (do inglês total acid number).

API: escala idealizada pelo *American Petroleum Institute* para medir a densidade relativa de líquidos. Esta escala varia inversamente com a densidade relativa, ou seja, quanto maior a densidade relativa menor o grau API.

AN: Ácidos Naftênicos.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês High Performance Liquid Chromatography).

SARA: Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos.

SPE: Extração em Fase Sólida (do inglês Solid Phase Microextraction).

SAX: Trocador Forte de Ânions (do inglês strong anion exchange).

MTBE: metil-terc-butil-éter.

NMR-H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (do inglês nuclear magnetic resonance hydrogen).

NMR-C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (do inglês nuclear magnetic resonance carbon).

FT-IR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês infrared spectroscopy Fourier transform).

MS: Espectrometria de Massas (do inglês mass spectrometry).

GC/MS: Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas (do inglês Gas Chromatography / Mass Spectrometry).

EI: Ionização por Impacto eletrônico.

***t*-BDMS:** *terc*-butildimetilsilil.

MTBDSTFA: N-metil-N-(*t*-butildimetilsilil) trifluoracetamida.

GC × GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente.

1D-GC: Cromatografia Gasosa Monodimensional.

***prep*HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Escala Preparativa (do inglês Preparative High Performance Liquid Chromatography).

DCM: Diclorometano.(retirar pela Regina)

MeOH: Metanol. (retirar pela Regina)

PTFE: Membrana de Politetrafluoretileno.

GC/qMS: Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectromêtro de Massas Quadrupolar.

GC×GC-FID: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Detector de Ionização por Chama (do inglês Gas Chromatography × Gas Chromatography/ Flame Ionization Detector)

GC×GC/TOFMS: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Detector de Espectroscopia de Massas por Tempo de Vôo (do inglês Gas Chromatography × Gas Chromatography / Time of Fly Mass Spectrometry)

RESUMO

Os ácidos naftênicos (AN) são considerados os principais responsáveis pela corrosão durante a fase líquida do refino de petróleo e, como os óleos crus nacionais apresentam altos índices de acidez, medidos pelo índice TAN (do inglês *total acid number*), têm recebido especial atenção em recentes pesquisas sobre seu conteúdo e natureza. Contudo, não existe um método de extração validado que permita extrair os AN do petróleo em quantidade suficiente para a caracterização e identificação estrutural. Neste trabalho foram testados vários métodos de extração dos AN (cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa, cromatografia líquida em coluna aberta e extração em fase sólida) para duas frações de petróleo brasileiro com elevada acidez. Foram avaliadas as diferentes fases estacionárias e o melhor procedimento foi a extração em fase sólida com fase SAX. Os extratos e uma amostra técnica de AN foram analisados por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com detectores de ionização por chama e espectrometria de massas. Para a mistura técnica de AN também se fez uso de técnicas espectroscópicas (ressonância magnética nuclear e infravermelho) que se mostraram eficientes para a sua caracterização, além das técnicas cromatográficas. Os resultados indicaram a presença majoritária de ácidos carboxílicos acíclicos com até C₂₀ e de alguns AN monocíclicos com até 18 átomos de carbono.

ABSTRACT

Naphthenic acids (NA) are considered primarily responsible for corrosion in the liquid phase of the petroleum refining, and as national crude oils presents high levels of acidity, measured by the TAN (Total Acid Number), they have receiving special attention in recent research about their content and nature. However, there is no validated extraction method that allows extracting the NA oil in sufficient quantity for characterization and structural identification. Several methods for extraction of NA were tested in this study (HPLC in preparative scale, open column liquid chromatography and solid phase extraction) for two fractions of Brazilian oil with high acidity. Different stationary phases were evaluated and the best procedure is the solid phase extraction with SAX phase. The extracts and a technique NA sample were analyzed by gas chromatography mono dimensional and comprehensive two-dimensional with detector flame ionization and mass spectrometry. For technical mixture of NA it was also carried out spectroscopic techniques (nuclear magnetic resonance and infrared) that have proven to be successful for this characterization, in addition to chromatographic techniques. The results indicated the predominant presence of carboxylic acids up to C₂₀ alcohols and some NA monocyclic up to 18 carbon atoms.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos crus provenientes de várias partes do mundo frequentemente apresentam ácidos orgânicos de ocorrência natural, em sua constituição. No âmbito nacional, o petróleo brasileiro e, conseqüentemente, todos os seus derivados obtidos por destilação são considerados ácidos, já que a Bacia de Campos – maior produtora – é responsável pela geração dos cinco óleos mais ácidos do país.

Os ácidos carboxílicos presentes no petróleo são encontrados principalmente nos óleos crus imaturos, biodegradados, frações e óleos pesados, bem como nas águas geradas na extração do óleo cru e betume. Tais ácidos são denominados naftênicos por apresentarem estruturas de anéis saturados, predominando os de cinco ou seis membros e uma única carboxila. Entretanto, no setor de produção e refino, o termo ácido naftênico corresponde a todos os tipos de ácidos orgânicos encontrados, tais como acíclicos e cíclicos saturados, além dos aromáticos.

Os ácidos naftênicos possuem propriedades químicas interessantes sob o ponto de vista científico e comercial. São muito úteis na Geoquímica, já que podem ser considerados uma classe de biomarcadores, os quais indicam os níveis de maturidade e biodegradação de um reservatório, além de identificar uma possível fonte geradora. No contexto industrial, alguns destes ácidos podem ser convertidos em sais metálicos, muito utilizados na indústria de tintas, resinas, fungicidas e polímeros.

A presença dos ácidos naftênicos no petróleo e derivados leva a uma série de problemas e desafios, destacando-se a corrosão nas unidades de refino, desenvolvimento de novas tecnologias na área de Exploração & Produção e depreciação no mercado do petróleo. Sabe-se que este grupo de ácidos são os principais responsáveis pela corrosão em fase líquida durante o refino. Embora a literatura registre o ataque ácido ao ferro, o mecanismo de corrosão nas superfícies metálicas ainda não é totalmente conhecido.

O aumento da demanda, aliado ao declínio das reservas de óleos leves, levaram à descoberta de novos campos de produção, muito dos quais fornecem óleos de características diferenciadas, como os óleos pesados, extrapesados e ácidos em ambiente *offshore* (extração em águas profundas). Estes óleos, por sua vez, necessitam de unidades de conversão e processamento de alta capacidade, para transformá-los em combustíveis mais nobres, implicando na geração de tecnologias custo/efetivas.

Os ácidos naftênicos integram um grupo complexo de ácidos carboxílicos, apresentando uma composição heterogênea, constituindo uma fração de milhares de compostos diferentes. Usualmente, a determinação do conteúdo de ácidos em óleos se dá através de titulação não aquosa com KOH, a partir da qual se obtém o número de acidez total. Entretanto, este não é o único parâmetro a ser considerado, visto que pesquisas mais recentes demonstraram pouca correlação linear entre a corrosão real a que as unidades estariam submetidas e o respectivo índice de acidez. Isto indica que o conteúdo total de ácidos não é o único fator envolvido e, portanto, são essenciais os esforços para desenvolver métodos efetivos de isolamento e caracterização dos ácidos naftênicos.

Por se apresentarem em concentrações baixas e pertencerem a uma matriz de elevada complexidade, a caracterização dos ácidos naftênicos tem sido um desafio para a área de Química Analítica. Dentre os métodos de extração aplicáveis, constam a extração líquido-líquido, a cromatografia líquida preparativa em coluna aberta e de alta eficiência e a extração em fase sólida.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é uma técnica analítica amplamente utilizada para amostras petroquímicas. Embora sejam necessárias, etapas de isolamento e derivatização dos compostos polares ainda. Contudo, nem sempre ocorre a separação individual dos componentes e, freqüentemente, os cromatogramas apresentam as chamadas misturas complexas não resolvidas, as quais tornam a análise muito difícil. Além disso, a extensa fragmentação dos interferentes ácidos acíclicos – comuns nas frações polares e em misturas técnicas – no espectrômetro de massas, fornece informações limitadas sobre estrutura e massa molecular dos ácidos naftênicos.

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente é uma ferramenta analítica que vem sendo aplicada com sucesso a amostras complexas, dentre as quais as petroquímicas. Algumas das vantagens dessa técnica são o aumento da capacidade de picos em função do espaço bidimensional de separação e a estruturação dos compostos de acordo com a classe química.

O estudo dos ácidos naftênicos se torna relevante, tanto do ponto de vista analítico como da tecnologia de refino do petróleo, pois além de se apresentarem em concentrações baixíssimas, pertencem a uma matriz complexa de grande interesse econômico.

O objetivo geral desse trabalho foi utilizar métodos de extração e de análise dos compostos ácidos, em especial, os ácidos naftênicos presentes em derivados pesados do petróleo brasileiro.

Para tanto, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o método de extração aplicando cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa com coluna de sílica gel tratada termicamente e sílica gel modificada com hidróxido de potássio em isopropanol;
- Avaliar método de extração utilizando cromatografia líquida em coluna aberta e as fases estacionárias sílica gel tratada termicamente e terra diatomácea;
- Avaliar o método de extração utilizando extração em fase sólida para as fases amino-propil-sílica e cloreto de trimetil-propil-amônio-sílica;
- Otimizar a metodologia de análise por cromatografia gasosa monodimensional acoplada à espectrometria de massas usando padrões de ácidos disponíveis;
- Aplicar a metodologia de análise por cromatografia gasosa monodimensional para os extratos obtidos;
- Usar a metodologia de análise por cromatografia bidimensional abrangente para os extratos obtidos;
- Comparar os resultados obtidos por cromatografia gasosa monodimensional com a cromatografia gasosa bidimensional abrangente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PETRÓLEO

2.1.1. Origem

A origem do petróleo está relacionada com a existência de rochas geradoras, que se formam a partir da produção, acumulação e preservação de uma determinada fração de matéria orgânica. Primeiramente, esta matéria é sintetizada por organismos vivos, e após, depositada e preservada nos sedimentos. Usualmente, pode-se identificá-la como derivados orgânicos de vida terrestre e vida marinha: plantas, fitoplâncton e zooplâncton¹.

A sucessão dos principais estágios de evolução da matéria orgânica - diagênese, catagênese e metagênese - é comum a todos os tipos de sedimento. Contudo, os parâmetros mais importantes no processo de geração do petróleo são a natureza da matéria orgânica, a temperatura e o tempo. A quantidade de hidrocarbonetos, sua composição e a profundidade da geração de óleo e gás podem mudar, conforme variem estes parâmetros^{1,2}.

A formação de uma jazida petrolífera depende de uma configuração geológica - arranjo espacial - de rochas selantes e rochas reservatórios, que possibilitam a acumulação do petróleo³. O petróleo é acumulado nas chamadas rochas reservatório, cujos valores de permeabilidade e porosidade permitem a produção de óleo e gás até à superfície. Por sua vez, estes são retidos em rochas selantes, que apresentam baixa permeabilidade associada à alta pressão capilar, de modo a impedir o escape do petróleo. Como as rochas reservatórios possuem matéria orgânica insuficiente para gerar uma quantidade comercialmente necessária de petróleo, o papel da migração é relevante para a formação dos reservatórios^{1,2}.

Na sua forma não refinada, o petróleo é conhecido como óleo cru⁴ e sua composição pode ser influenciada por eventos ocorridos na sua formação, como migrações, biodegradações e transformações químicas. Conseqüentemente, os constituintes do petróleo se encontram em proporções variadas, resultando em óleos de composição e características muito distintas, tais como cor, viscosidade, densidade, acidez e teor de enxofre^{2,5,6}.

2.1.2. Composição

Os compostos do petróleo e das suas frações podem ser classificados em dois grandes grupos: hidrocarbonetos e heterocompostos. Os hidrocarbonetos, compostos orgânicos

formados por carbono e hidrogênio, são um grupo majoritário, alcançando concentrações que variam de 50 até 90% em peso^{7,8,9} e podem ser subdivididos em:

- Alcanos ou parafinas, apresentando cadeia normal ou ramificada, também designados como alcanos normais e isoalcanos, respectivamente¹⁰.

- Alcanos cíclicos, também conhecidos por naftenos, que podem conter um, dois ou mais anéis saturados e, portanto, são classificados como mono-, di- e policíclicos, respectivamente. Os anéis naftênicos têm cinco ou seis átomos de carbono normalmente, podendo apresentar uma ou mais ramificações alquílicas no anel¹⁰.

- Alcenos ou olefinas, que podem ser ramificados, normais ou cíclicos. Óleos crus e seus derivados obtidos diretamente por destilação não apresentam olefinas, já que estes são compostos extremamente reativos que dificilmente se preservam. Os produtos processados, especialmente aqueles obtidos por craqueamento térmico ou catalítico podem conter quantidades significantes desses compostos^{1,2,10}.

- Aromáticos, contendo, pelo menos, um anel benzênico e podendo ter ramificações alquílicas e naftênicas. São classificados de acordo com o número de anéis presentes na estrutura, sendo denominados mono- di- ou poliaromáticos os que contêm um, dois ou mais anéis aromáticos¹⁰.

Os hidrocarbonetos são um grupo de interesse em estudos geoquímicos e ambientais - especialmente os alcanos normais e isoalcanos, naftenos e aromáticos - sendo conhecidos como fósseis moleculares ou biomarcadores. Tais compostos fornecem informações sobre ambientes deposicionais, podem ser indicadores de fonte de contaminação de águas e sedimentos, grau de maturação de matéria orgânica em rochas geradoras e nível de degradação, entre outras^{3,11-14}.

Os heterocompostos se apresentam em menor proporção, perfazendo um total de até 15% em peso do óleo bruto^{2,5-7}. Apresentam, além de carbono e hidrogênio, heteroátomo em suas estruturas e são classificados de acordo com a sua presença:

- compostos sulfurados: o enxofre é o terceiro elemento mais abundante, em média 0,65%, para uma faixa de 0,02 à 4%⁵. Os compostos sulfurados apresentam-se como alifáticos, aromáticos e, mais raramente, pode-se encontrar enxofre na forma elementar^{2,10}.

- compostos nitrogenados: suas concentrações variam de 0,2 até 2%. Cerca de 90% dos óleos crus contêm menos do que 0,2% em peso de nitrogênio⁵. Podem ser subdivididos em compostos nitrogenados neutros, básicos e ácidos^{2,10,15}.

- compostos oxigenados: o conteúdo de oxigenados para a maioria dos óleos crus é baixo - de 0,1 a 1,5%. Os ácidos carboxílicos são os compostos predominantes e uma grande

diversidade tem sido identificada, dentre eles fenóis, ácidos naftênicos, furanos e fenil-cetonas. Podem estar presentes na forma de sais ou de seus respectivos ácidos^{10,15,16}.

- compostos contendo metais: o petróleo contém uma variedade de metais, destacando-se vanádio, níquel e ferro. Apresentam-se em baixíssimas concentrações, que se estendem de 1000 ppm até cerca de 1 ppb, normalmente^{2,10}.

- resinas e asfaltenos: são moléculas com estruturas complexas que possuem alta relação C/H, além da presença de enxofre, nitrogênio e oxigênio. Asfaltenos são freqüentemente designados na literatura como a fração do óleo que é insolúvel em heptano ou pentano, permanecendo na forma coloidal no petróleo. As resinas, ao contrário, são facilmente solúveis nos mesmos solventes^{2,5,6}. Porfirinas de vanádio e níquel fazem parte dos asfaltenos. As estruturas moleculares exatas de asfaltenos e resinas não são bem conhecidas devido à complexidade química^{17,18}.

Dentro da indústria do petróleo, frações, produtos e componentes muitas vezes são designados pelo modo de obtenção ou pelos procedimentos operacionais envolvidos. Desse modo, frações de petróleo foram classificadas de acordo com suas respectivas densidades. Uma vez que densidade e faixa de ponto de ebulição (PE) freqüentemente se correlacionam, as frações leves são aquelas dentro da faixa 0 – 150 °C, as médias dentro de 150 – 370 °C, e as pesadas, apresentam PE superiores a 370 °C. Contudo, há frações leves e de alto conteúdo aromático que são mais densas quando comparadas a frações médias e altamente parafínicas¹⁰. As frações pesadas são conhecidas por serem enriquecidas em compostos polares, também denominados impurezas do petróleo, com moléculas de variável aromaticidade e diferentes heteroátomos e grupos funcionais^{6,8,19,20}.

2.1.3. Óleos não convencionais

Sob o contexto mundial da escassez de petróleo, as previsões sobre o fim das reservas há muito se repetem. Contudo, essas expectativas são inconsistentes, já que ainda ocorrem descobertas de novas jazidas petrolíferas, além de excluirmos as novas tecnologias que propiciam tais descobertas. As últimas décadas revelaram duas condições básicas que promovem a busca de novas concentrações de petróleo e gás: o preço do produto e o nível de desenvolvimento de tecnologia de exploração, produção e transporte, que reduzem os custos²¹. Como exemplo, podemos citar o descobrimento de novos campos de óleo pesados, extrapesados e ácidos em ambiente *offshore* (extração em águas profundas) que ganharam em viabilidade econômica quando comparados aos óleos leves normalmente comercializados^{20,22}.

Para os óleos não convencionais, a distinção é variável no tempo, em função das tecnologias de refino, exploração e produção de petróleo. Em linhas gerais, o óleo convencional é aquele cuja extração é tecnicamente acessível, custo/efetiva, sendo o óleo facilmente consumido em qualquer parque de refino. Os óleos não convencionais são aqueles com propriedades bem específicas, que tornam o seu consumo restrito às refinarias capazes de processá-los de forma economicamente viável⁵.

Dentre os óleos não convencionais, os óleos ácidos vêm ganhando força no mercado internacional. Estes óleos se caracterizam pelo seu teor de ácidos naftênicos e orgânicos leves, ou seu grau de acidez, medido pelo número de acidez total - TAN (do inglês *total acid number*). Os ácidos naftênicos são particularmente importantes devido aos seus efeitos corrosivos nas refinarias, o que implica investimentos em metalurgia, como o desenvolvimento e introdução de ligas avançadas resistentes à corrosão. Por outro lado, nos óleos ácidos, a relação usualmente linear de densidade API* e teor de enxofre entre diferentes petróleos não é necessariamente válida. Isto não apenas indica uma peculiaridade destes petróleos, que são em geral pesados, mas com baixos teores de enxofre, como indica um potencial de valorização dos mesmos no mercado internacional⁵.

No âmbito nacional, as conquistas tecnológicas, estão na origem do expressivo aumento da produção petrolífera e da recente auto-suficiência, conseqüências diretas da exploração do óleo em águas profundas e ultraprofundas, que demandam tecnologias avançadas²³. Conseqüentemente, o refino do petróleo no Brasil apresenta questões particulares, pois os óleos nacionais possuem características distintas dos óleos leves normalmente comercializados. As reservas brasileiras fornecem, em sua maior parte, petróleo pesado, e algumas vezes, ácido, sendo necessárias unidades de refino de tecnologia avançada com alta capacidade de conversão, a fim de transformá-lo em combustíveis mais nobres^{21,24}. Além disto, esses óleos apresentam alguns contaminantes, dentre eles os ácidos naftênicos, supostos causadores de corrosão durante a fase líquida do refino^{25,26}.

2.2. ÁCIDOS NAFTÊNICOS

2.2.1. Ocorrência

Os ácidos naftênicos (AN) ocorrem naturalmente no óleo cru, nas areias betuminosas^{16,27-29} e também em águas residuárias – resultantes do processo de extração de

petróleo e betume³⁰⁻³³. Eles compreendem parte dos compostos ácidos do petróleo, com teores variáveis que dependem da fonte do óleo.

Segundo a revisão feita por Clemente e Fedorak³⁴, a presença de ácidos carboxílicos no petróleo, que incluem os ácidos naftênicos, é resultado de processos de degradação térmica ou biodegradação bacteriana insuficientes durante a sua formação. Ácidos carboxílicos têm sido encontrados em reservatórios degradados naturalmente^{35,36} e em óleos crus biodegradados experimentalmente³⁷⁻³⁹.

Os extratos de AN obtidos do petróleo podem conter impurezas. Por exemplo, análises por espectrometria na região do ultravioleta e infravermelho mostraram a presença de pirróis, tiofenos e fenóis em ácidos naftênicos extraídos de um óleo cru da região da Califórnia¹⁶. Adicionalmente, Seifert e Teeter²⁷ publicaram que a fração de AN do mesmo óleo obtida por cromatografia em camada delgada continha compostos fenólicos, nitrogenados e sulfurados. Além dos heterocompostos contendo nitrogênio e enxofre, frações ácidas de petróleo muitas vezes apresentam uma variedade de compostos oxigenados, como polifenóis, ácidos graxos e outros compostos polifuncionais^{28,40,41}.

2.2.2. Estrutura dos ácidos naftênicos

Inicialmente, o termo ácido naftênico – ainda muito empregado na indústria do petróleo e refino - representava todo o conteúdo ácido do petróleo, que incluía desde estruturas com vários anéis saturados até ácidos graxos e aromáticos. Atualmente, os AN são uma mistura de ácidos saturados, predominando os monocarboxílicos^{29,30} com a carboxila ligada à parte alquílica e contendo um ou mais anéis saturados. A Figura 1 apresenta um esquema geral da estrutura dos AN, no qual **m** representa o número de unidades **-CH₂-**, **p** o número de anéis e **R** a cadeia alquílica^{2,42}.

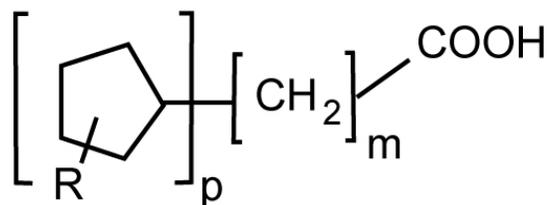


Figura 1. Estrutura geral dos ácidos naftênicos (adaptada de Kirk-Othmer - 1984)².

As estruturas contendo anéis de cinco e seis membros são mais abundantes, sendo raros os ácidos com anéis de quatro e sete membros. O número de anéis saturados fundidos geralmente varia de um a seis, dos quais os cicloexanos aparecem em menor proporção¹⁵.

Uma outra representação é através da fórmula geral $C_nH_{2n+Z}O_2$ ^{29,30,43,44,45}, na qual *n* indica o número de carbonos e *Z* especifica a deficiência de hidrogênio resultante da formação do anel (ciclização). O valor absoluto de *Z* dividido por 2 fornece o número de anéis nos compostos, os quais podem ser fundidos ou ligados à estrutura alquílica^{34,46}. Os componentes acíclicos são altamente ramificados, diferenciando-se dos ácidos graxos⁴⁶, embora também se ajustem à fórmula $C_nH_{2n+Z}O_2$, para $Z = 0$.

Estes ácidos carboxílicos constituem uma fração de milhares de compostos diferentes e a sua composição é complexa, apresentando variações na estrutura e peso molecular^{16,27-30,34,47-49}. Assim sendo, mais do que um isômero existirá para um determinado *Z*, e massas moleculares podem variar de 14 unidades de massa (CH_2) entre as *n*-séries e por 2 unidades (2H) entre as *Z*-séries. Headley e colaboradores⁵⁰ encontraram uma massa molecular média de aproximadamente 260 para os AN, que pode variar de *m/z* 180 a 300, presentes em areias betuminosas da região do Athabasca - Canadá. A Figura 2 exemplifica algumas estruturas moleculares dos ácidos naftênicos, para famílias de $Z = 0$ até $Z = -6$.

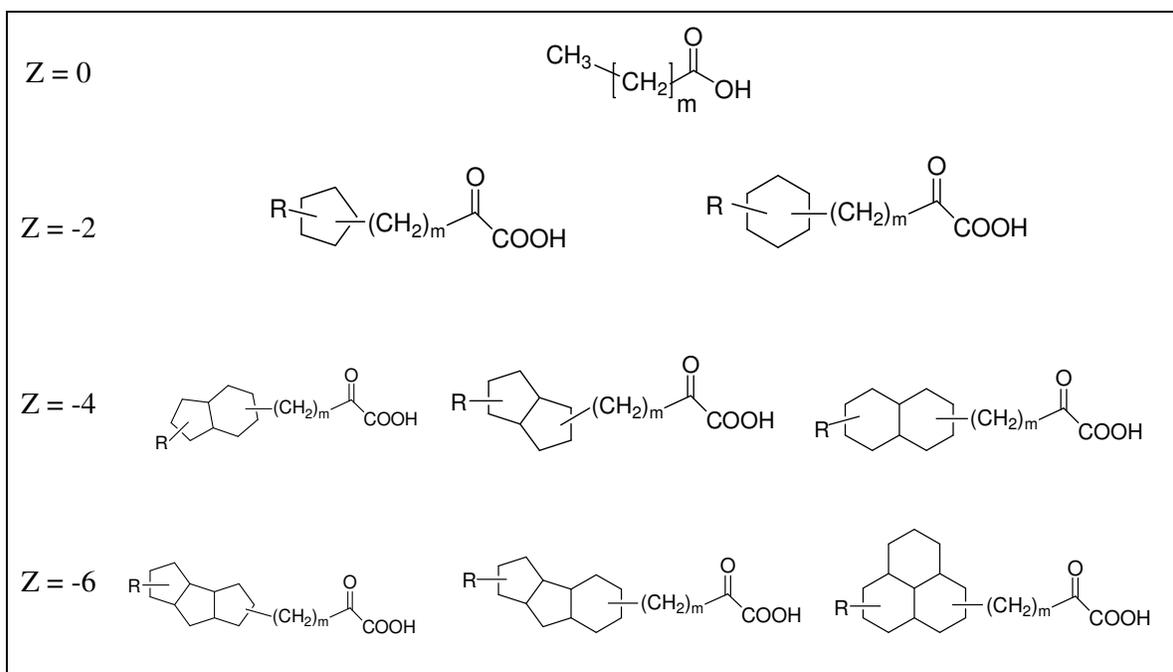


Figura 2. Estruturas representativas para moléculas de ácidos naftênicos nas famílias $Z = 0$, $Z = -2$, $Z = -4$ e $Z = -6$.

2.2.3. Propriedades

Ácidos naftênicos não destilados são escuros, mas os refinados são líquidos viscosos e transparentes. Possuem odor característico atribuído às impurezas fenólicas e sulfuradas que ainda permanecem após o procedimento de extração. O tipo e a quantidade de impurezas encontradas na mesma fração dos ácidos estão relacionados à rocha geradora^{2,51,52}.

Os AN apresentam baixa volatilidade, são estáveis quimicamente e atuam como surfactantes naturais. Possuem constante de dissociação variando de 10^{-5} a 10^{-6} , valores similares aos encontrados para ácidos carboxílicos, como por exemplo, os ácidos acético, propiônico e palmítico que apresentam constante de dissociação de $10^{-4,7}$, $10^{-4,9}$ e $10^{-8,7}$, respectivamente³⁴. Sais de sódio de ácidos naftênicos são solúveis em água.

2.2.4. Aplicações dos ácidos naftênicos

Ácidos naftênicos estão disponíveis comercialmente na forma de preparações e também nas denominadas misturas técnicas. Estas últimas são empregadas como padrões de AN em análises e caracterização de amostras, tanto na indústria como em pesquisa, pois constituem uma alternativa atraente à ausência de padrões certificados. As preparações de ácidos naftênicos são obtidas a partir do óleo cru ou de frações, sendo que a maioria dos ácidos comerciais é oriunda dos destilados como querosene e gasóleo. Dentre os vários processos comerciais de extração, o mais utilizado é a extração com soda cáustica, porém é possível citar também a destilação, extração por troca iônica e extração com solventes².

A pureza e composição das preparações comerciais dependem do método de refino e da fonte do petróleo utilizados. Suprimentos comerciais podem conter quantidades substanciais de compostos fenólicos e sulfurados, ácidos graxos e aromáticos. Até mesmo preparações obtidas pelo mesmo processo e matriz apresentam diferenças significantes na composição^{44,53}.

As diversas formulações de AN – misturas técnicas dos mesmos, ésteres de ácidos naftênicos e os sais metálicos destes ácidos - têm uma grande aplicabilidade na indústria. Os naftenatos (sais metálicos de ácidos naftênicos) são usados na fabricação de secantes de tintas, inibidores de corrosão, catalisadores de reações orgânicas e lubrificantes². Há um grande interesse na habilidade dos AN em complexar cobre, formando seus respectivos naftenatos, que atuam como preservantes de madeira ambientalmente corretos⁴⁴. Também, podem ser empregados como agentes emulsificantes na produção de inseticidas⁵³.

Freqüentemente, a degradação microbiana que ocorre nos reservatórios de petróleo tem sido associada ao aumento de acidez dos óleos^{40,54}. Experimentos de biodegradação de óleos podem ser realizados em laboratório com a produção de quantidades significantes de ácidos carboxílicos. O trabalho realizado por Watson et al.³⁸ demonstrou que ácidos de médio peso molecular (C₁₀ – C₂₀) foram rapidamente produzidos, fato que coincidiu com a remoção de n-alcenos das amostras estudadas. Entre outros exemplos, pode-se citar a pesquisa feita por Meredith et al.³⁶ que investigaram a influência dos ácidos carboxílicos na acidez de óleos crus. A comparação entre os valores de acidez e análise da fração ácida de 33 amostras de óleos diferentes indicou que a biodegradação é um dos principais processos responsáveis pelas altas concentrações de ácidos carboxílicos no petróleo.

Embora os compostos polares sejam, muitas vezes, uma fração significativa dos óleos, os biomarcadores obtidos de frações saturadas e aromáticas têm prioridade nos estudos geoquímicos, suprimindo indicações importantes sobre origem e maturação do petróleo. Os projetos desenvolvidos por Nascimento et al.³⁵ e Galimberti et al.⁵⁵ propõem a utilização de compostos polares, dentre eles os AN, como biomarcadores. Estes compostos podem ser uma fonte complementar de informações relevantes, pois suas propriedades dão indicações mais específicas, uma vez que os processos envolvidos recriam interações óleo/água e óleo/rocha, além de dados sobre migração secundária, origem e preservação.

Além disso, os AN podem ser úteis no caso de derramamentos de óleos combustíveis no meio ambiente. Eles são empregados na chamada análise de impressão digital, pois são mais resistentes ao intemperismo que os hidrocarbonetos alcanos não polares, isoalcenos e aquilcicloexano e com isto podem auxiliar na identificação da origem do óleo derramado⁵⁰. As investigações realizadas por Gaines et al.⁵⁶ e Rostad e Hostettler⁵⁷ no mesmo contexto não mencionam o termo “ácido naftênico”, mas os compostos polares discutidos por estes autores muito provavelmente continham esses ácidos.

2.2.5. Problemas relacionados com os ácidos naftênicos

Os danos causados pela corrosão nos equipamentos de refino foram observados pela primeira vez em 1920. Diversos estudos apontam os AN como os principais responsáveis pela corrosão em fase líquida durante o refino^{25,26,58,59}. A natureza deste tipo de corrosão ainda não é totalmente compreendida, pois é influenciada por vários fatores, entre estes, o tipo de conteúdo ácido, a presença de outros compostos com atividade corrosiva no cru e os parâmetros de processamento, como o fluxo e temperatura, entre outros. Aparentemente,

pode-se afirmar que o mecanismo da corrosão envolve a quelação do metal pelo ânion carboxilato com a formação de gás hidrogênio^{25,26,58}.

A corrosão naftênica é especialmente intensa nas temperaturas de operação que geralmente variam entre 220 e 400°C^{58,59}. Soma-se a isto, a corrosividade crescente de um óleo com o aumento da concentração de AN, embora a extensão da corrosão também envolva a disponibilidade do grupo carboxila para formar o complexo metálico e o tipo de compostos presentes. Desse modo é desejável determinar a distribuição do tipo de anel e número de carbonos, já que a corrosividade é dependente do tamanho e estrutura dos AN^{25,26}. O trabalho de Turnbull et al.²⁵ demonstrou que a corrosividade é crescente para estruturas com mais de três grupos -CH₂- na cadeia alquílica, sendo que os ácidos com longas cadeias alquílicas são menos corrosivos.

Embora os AN estejam presentes em óleos crus convencionais, há poucos trabalhos que discutem estes ácidos em efluentes das refinarias e sua presença no meio ambiente, devido às dificuldades analíticas na detecção destes compostos. Wong et al.⁴³ usaram uma unidade de carbono ativado em escala piloto para analisar efluentes pré-tratados de uma refinaria. Os AN extraídos comprovaram a presença destes ácidos nas águas residuárias do refino. Além disso, o tratamento com o adsorvente carbono ativado serviu para reduzir a toxicidade para a fauna aquática local.

Os usos industriais dos AN, seus ésteres e sais metálicos são um meio de introdução destes compostos no ambiente, através, principalmente do descarte de águas residuárias e derramamentos de óleo combustível. Por causa de sua solubilidade em água – como naftenatos – em pH neutro ou alcalino, estes ácidos podem ter mobilidade em águas superficiais contaminadas de petróleo³⁴.

A baixa solubilidade em água (0,06 – 4,52 mg mL⁻¹) e a moderada força de sorção em solos (Kow = 2,08 – 4,3) são fatores significantes que limitam a biodisponibilidade dos AN em ambientes aquáticos. Contudo, estes ácidos carboxílicos demonstraram ser tóxicos a muitos seres vivos³⁹, especialmente em ambientes aquáticos, pois a toxicidade aquática é associada à sua concentração e características surfactantes⁵⁰.

2.3. NÚMERO DE ACIDEZ TOTAL

A determinação dos ácidos totais no óleo cru é tradicionalmente realizada por titulação não-aquosa que fornece o “número de acidez total” (TAN), expresso pela quantidade de KOH necessária (em mg) para neutralizar o conteúdo ácido de 1 g de óleo. Historicamente, crus

com baixos TANs seriam seguro para as refinarias, enquanto aqueles com TANs acima de limites arbitrários seriam prejudiciais^{26,47,60,61}.

O ensaio de TAN é regulamentado por uma medida aceita internacionalmente (ASTM D664), baseada em métodos potenciométricos. Segundo Fuhr et al.⁶¹ o método não prioriza petróleo bruto, óleos pesados e betume. O escopo seria a determinação de compostos ácidos em produtos refinados e lubrificantes, os quais são solúveis na mistura tolueno/isopropanol 50:50 v/v. O método foi originalmente desenvolvido para indicar o resultado da oxidação de óleos e não como uma medida de corrosividade.

Na tentativa de esboçar uma correlação entre TAN, conteúdo sulfuroso e corrosividade de óleos crus e frações de gasóleo pesado, Laredo et al.⁴⁸ encontraram correlação entre compostos sulfurosos e corrosividade somente para a amostra de óleo cru desmineralizado. Os espectros de massas das amostras de óleo cru indicaram que composição de ácidos naftênicos não tem efeito direto sobre o TAN ou a corrosividade dos ácidos.

Slavcheva et al.²⁶ publicaram que óleos com mesmo TAN diferem substancialmente em corrosividade e, assim, a corrosão em termos de número de acidez é insuficiente. Portanto, este valor não é o único parâmetro a ser considerado, uma vez que correlações entre TAN, estrutura dos AN e taxas de corrosão geralmente são pobres^{24,26,28}. Assim, análises mais detalhadas, visando uma especificação dos AN são necessárias para correlacionar estruturas com o efeito ácido.

2.4. CARACTERIZAÇÃO

As tentativas de caracterizar os componentes ácidos no petróleo são anteriores ao ano de 1955 e, neste período, resultaram na identificação de somente dois ácidos com até dez átomos de carbono, exceto para os ácidos graxos¹⁵.

Estudos anteriores indicaram a presença de até 5%^{16,27,62} de ácidos naftênicos em amostras de petróleo bruto de várias partes do mundo. As concentrações e composições dos ácidos naftênicos são muito dependentes da origem do óleo. A baixa concentração destes ácidos nas amostras petroquímicas torna necessário o uso de etapas de pré-concentração ou sucessivas extrações para prover quantidades suficientes para análises futuras. Atualmente, não há um método que identifique ou quantifique ácidos individuais, sendo que os métodos analíticos utilizados tratam tais ácidos como um grupo, ou sub-grupos baseados na distribuição de n e Z (número de carbonos e anéis)³⁴.

2.4.1. Técnicas para isolamento dos ácidos naftênicos do petróleo

Extração com soluções alcalinas^{16,27,30,40,63}, cromatografia em coluna aberta⁴⁷, cromatografia líquida de alta eficiência com sílica modificada^{41,64-66} e cromatografia de troca iônica^{42,48,67,68} são técnicas usuais para obtenção de frações ácidas de petróleo. Estes procedimentos podem envolver várias etapas de separação e grandes volumes de solventes cujos resultados são misturas complexas de compostos polares.

A obtenção de extratos ácidos por extração líquido-líquido utilizando soluções alcalinas e amoniacais é um método amplamente registrado na literatura. Os trabalhos de Seifert e Teeter²⁷, Seifert et al.¹⁶, Dzidic et al.³⁰ e Wang et al.⁶³ registram esquemas de extração exaustivos e com grande volume de solventes. A eficiência no isolamento pode ser prejudicada devido à formação de emulsões e co-extração de impurezas ácidas como fenóis e carbazóis.

A cromatografia em coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase normal, empregando a sílica como fase estacionária, são os métodos preparativos de amostras petroquímicas mais difundidos na literatura. Denomina-se análise SARA o isolamento que fornece frações de compostos saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos, eluídos conforme sua solubilidade em solventes de polaridade crescente^{61,69,70}. Para o isolamento de compostos ácidos, o uso de sílica é limitado. Os grupos silanóis presentes na superfície da sílica podem promover a adsorção irreversível dos compostos polares^{19,71,72}. Como alternativa para aumentar os teores de recuperação dos compostos ácidos, há estudos que utilizaram a sílica impregnada com KOH^{35,73,74} ou modificada com grupos aminopropílicos e cianopropílicos^{41,47,66,75}.

Os trabalhos desenvolvidos por Bourgund et al.^{41,66} aplicaram a separação HPLC preparativa em fase normal com colunas ciano para obtenção de frações ácidas de petróleo. O fracionamento realizado com coluna ciano semi-preparativa obteve uma melhor resolução na fração de ácidos carboxílicos saturados e recuperação em torno de 70% em peso. Estas frações foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho e cromatografia por permeação em gel, cujos resultados forneceram análises do tipo de grupo de compostos para as frações não polares, ácidos carboxílicos saturados, fenóis e ácidos polifuncionais.

Em Green et al.⁷⁶ e Green⁷⁷ foram desenvolvidas metodologias por HPLC em fase normal, específica para ácidos carboxílicos, cujos objetivos foram rapidez de análise (menos de uma hora) e seletividade de separação com a respectiva força ácida. Foi possível separar os compostos heteroatômicos do petróleo segundo o seu caráter ácido. A complexidade da fração

de ácidos carboxílicos permitiu a identificação e quantificação de apenas quatro ácidos tricíclicos com valores de m/z 320, 334 e 376.

A extração em fase sólida (SPE) é um método que pode trazer recuperações eficientes de AN. Diversos estudos são encontrados na literatura utilizando SPE no isolamento de AN em amostras de petróleo^{19,24,45,47,68}. As principais características desta técnica são a uniformidade da fase estacionária, baixo consumo de solventes e capacidade de separar compostos polares dos não polares.

Jones e colaboradores⁶⁸ extraíram AN do petróleo empregando SPE e fase de amina quaternária, um trocador aniônico forte também denominado SAX, seguida de eluição com hexano para extrair os hidrocarbonetos apolares. Os compostos ácidos foram eluídos com a mistura MTBE: ácido fórmico (98:2 v/v). O ácido naftênico tetracíclico 5β colânico (C_{28}) foi o que obteve maior recuperação (aproximadamente 90%). Para os ácidos de cadeia linear a recuperação variou entre os valores de 98% para o ácido C_{14} e 37% para o C_{30} .

2.4.2. Técnicas de análise e caracterização dos ácidos naftênicos

Tradicionalmente, a área da química do petróleo, emprega como técnicas de análise para as frações ácidas, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (NMR-H e NMR-C), de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)^{77,78} e a espectrometria de massas (MS)^{27,30,28,29,47}.

O trabalho publicado por Tomczyk et al.²⁸ relata o tipo de distribuição de ácidos em amostras de óleo cru biodegradado (TAN = 5,19 mg KOH/g óleo). Os ácidos foram obtidos por extração líquido-líquido alcalina. Como resultado foi encontrado 40% de compostos com caráter ácido, sendo que destes somente 10% continham dois átomos de oxigênio na estrutura (ácidos carboxílicos típicos). Os autores explicaram a presença dos componentes ácidos no óleo como decorrentes da biodegradação por microorganismos.

Qian e colaboradores⁴⁷ empregaram a espectrometria de massas de alta resolução para avaliar a fração ácida obtida por SPE de óleos crus. Foi determinada a presença de ácidos com n variando de 15 até 55 e Z entre -2 e -12 (um e seis anéis naftênicos), além de ácidos aromáticos com até 3 anéis e estruturas contendo mais de dois átomos de oxigênio. Estes resultados revelam a complexidade da fração ácida de óleos crus e sugerem a presença majoritária de fenóis e outros ácidos carboxílicos.

Até o presente momento, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)^{42,44,49,50} é a técnica responsável pelo maior número de informações para caracterizar

as estruturas dos ácidos naftênicos. Contudo, a ionização por impacto eletrônico (EI) apresenta como desvantagem a fragmentação excessiva dos compostos, gerando espectros complexos que fornecem informações limitadas sobre estrutura e massa molecular destes ácidos.

St. John et al.⁴⁴ desenvolveram um método simples para derivatizar AN em seus respectivos ésteres (*tert*-butildimetilsilil ou *t*-BDMS) para analisá-los por GC/MS com ionização por EI, obtendo espectros de massas de mais fácil interpretação. Os ésteres de *t*-BDMS são obtidos pela reação do derivatizante N-metil-N-(*t*-butildimetilsilil) trifluoroacetamida, abreviado por MTBDSTFA, com o hidrogênio ácido dos AN. A Figura 3 descreve o caminho de fragmentação dos ésteres de *t*-BDMS.

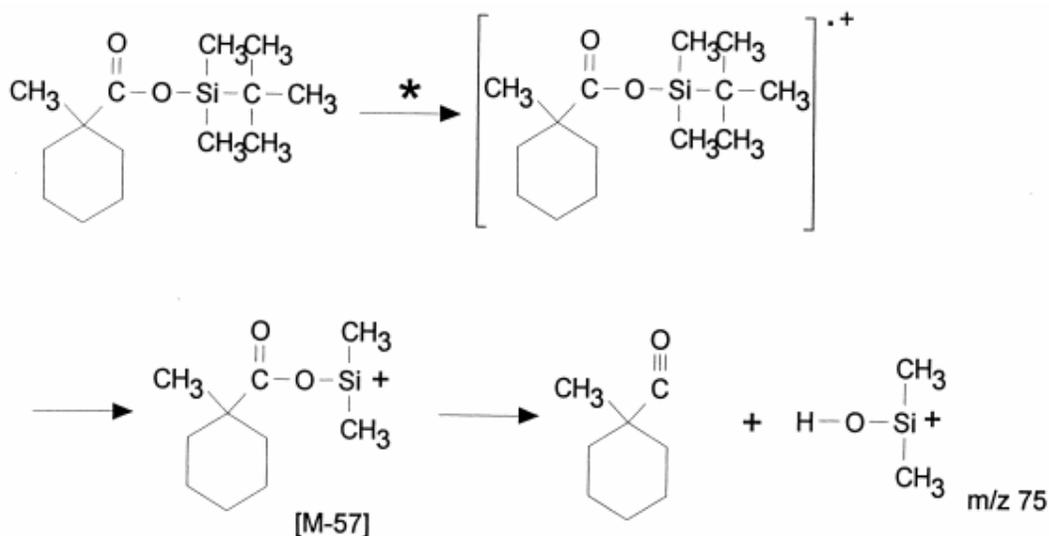


Figura 3. Esquema de fragmentação para os íons predominantes dos derivados *t*-BDMS dos AN descrito por St. John et al.⁴⁴

Esta estratégia de derivatização é ainda hoje muito empregada, pois diminui a extensa fragmentação, quando comparada a outros ésteres de ácidos. O MTBDSTFA produz fragmentos característicos, onde o pico base predominante é o $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_9]^+$, ou seja, $[\text{M} - 57]^+$ e o íon m/z 75. Estes íons são muito estáveis e permitem identificar a família de AN, através de Z e fórmula molecular. A Figura 4 ilustra o espectro de massa típico para um AN derivatizado com MTBDSTFA.

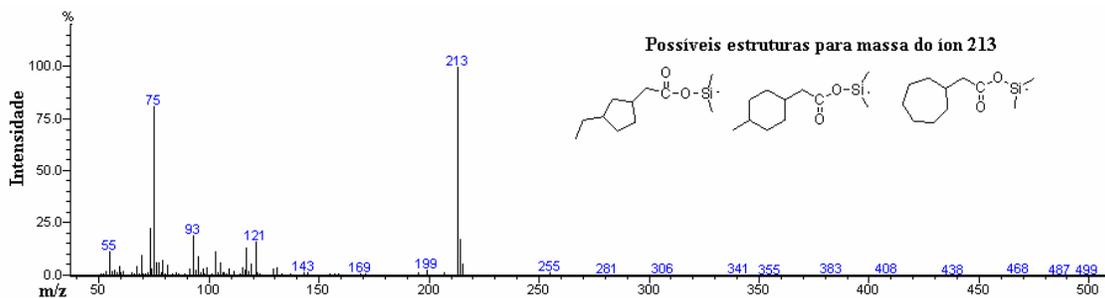


Figura 4. Espectro de massas para estruturas dos derivados *t*-BDMS de AN monocíclicas ($Z = -2$), com 9 átomos de carbono e massa do íon 213.

Após a análise via GC/MS, St. John et al.⁴⁴ encontraram que o perfil dos íons obtidos era similar ao encontrado por Dzidic et al.³⁰ que empregou o método de ionização branda (ionização química com fluoreto).

Clemente e Fedorak⁴⁹ avaliaram o método de St. John et al.⁴⁴ detalhadamente, usando seis ácidos monocarboxílicos puros e cinco extratos de AN provenientes de amostras de águas e areias betuminosas. Os autores consideraram os efeitos dos isótopos naturais (C^{13} , Si^{29} , e Si^{30}) e forneceram uma expressão para corrigir os dados de massa espectral para estes isótopos. Além disto, salientaram na tabela de correlação de n , Z e fórmula $C_nH_{2n+Z}O_2$ proposta por St. John e colaboradores⁴⁴ algumas massas que representavam estruturas meramente teóricas.

Da mesma forma, Vaz de Campos et al.⁴² empregaram a extração líquido-líquido, seguida de SPE com resina de troca iônica (Amberlyst A-27) e dessorção em ultra-som para isolar a fração ácida do gasóleo pesado de petróleo Marlim (Bacia de Campos, Rio de Janeiro, Brasil). Os resultados indicaram a presença de ácidos alifáticos e AN que continham até quatro anéis saturados na estrutura molecular.

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC \times GC) é uma técnica analítica adequada para o estudo de amostras complexas ou de difícil caracterização por cromatografia gasosa convencional. É relativamente recente, existindo a aproximadamente 18 anos, sendo introduzida por Liu e Phillips⁷⁸.

A GC \times GC emprega duas colunas capilares seqüencialmente, uma convencional e outra rápida (mais curta), de forma que todo efluente da primeira coluna – ou parte significativa dele – passe à segunda através de um sistema de modulação^{79,80}. A Figura 5 apresenta um esquema generalizado de um sistema GC \times GC.

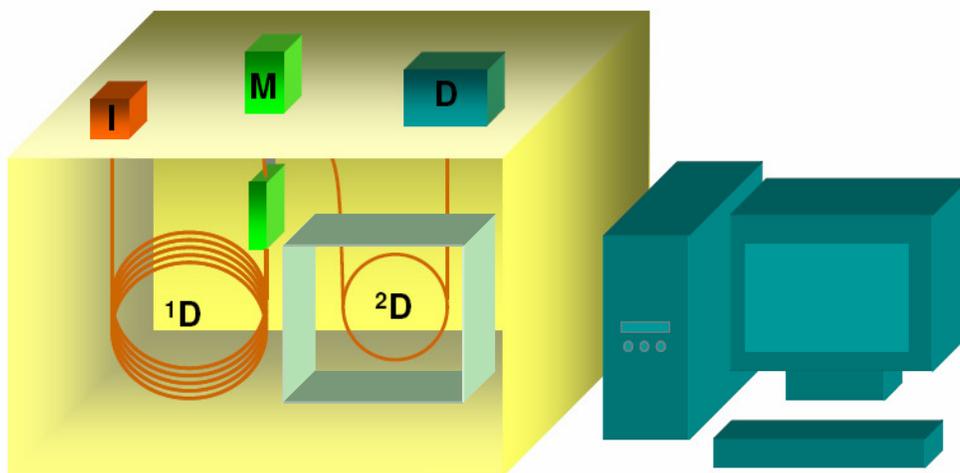


Figura 5. Desenho esquemático de um sistema GC \times GC: I – injetor; M – modulador; D – detector; 1D – coluna cromatográfica da primeira dimensão; 2D – coluna cromatográfica da segunda dimensão (adaptado de Mühlen⁸¹).

O sistema de modulação tem um papel significativo em uma análise via GC \times GC. O modulador⁸²⁻⁸⁴ causa uma compressão nas bandas cromatográficas eluídas da primeira coluna, que seguem para a segunda, o que resulta numa separação extremamente rápida. Dessa maneira os picos da segunda dimensão serão extremamente estreitos, tendo de 50 a 600 milissegundos de largura na linha base. A compressão das bandas causa um incremento significativo na sensibilidade, bem como na resolução, quando comparadas à cromatografia gasosa monodimensional (1D-GC). Além disso, os detectores empregados devem ser rápidos, acompanhando a alta taxa de aquisição dos dados, possuindo velocidades de aproximadamente 100 hertz⁸².

A Figura 6 ilustra a capacidade de separação da GC \times GC através da comparação de um cromatograma monodimensional com co-eluição de três compostos e os diagramas de representação gráfica do espaço de separação bidimensional: de cores 2D, de contorno e 3D⁸⁴.

Primeiramente, ocorre a modulação do efluente da primeira coluna, onde é obtida uma série de cromatogramas rápidos. Na segunda etapa, estes cromatogramas rápidos são empilhados através de programas computacionais específicos e transformados em um diagrama bidimensional. Os eixos deste diagrama representam, respectivamente, o tempo de retenção da primeira coluna e o tempo de retenção da segunda coluna. Na terceira etapa é feita a visualização dos compostos presentes.

A utilização de um conjunto de colunas com mecanismo de separação ortogonal, ou seja, colunas com fases estacionárias de diferentes polaridades, resulta em aumento de sensibilidade^{84,85}. Normalmente, emprega-se na primeira coluna uma fase estacionária apolar,

ou menos polar, ocorrendo separação dos compostos por diferença de volatilidade. Na segunda coluna, utiliza-se uma fase polar, ocorrendo separação por polaridade⁸⁰. Embora a ortogonalidade não seja o objetivo específico, através dela é possível ordenar e agrupar as estruturas dos compostos em um cromatograma bidimensional de GC × GC, que é decorrente das similaridades das propriedades físico-químicas destes compostos⁸².

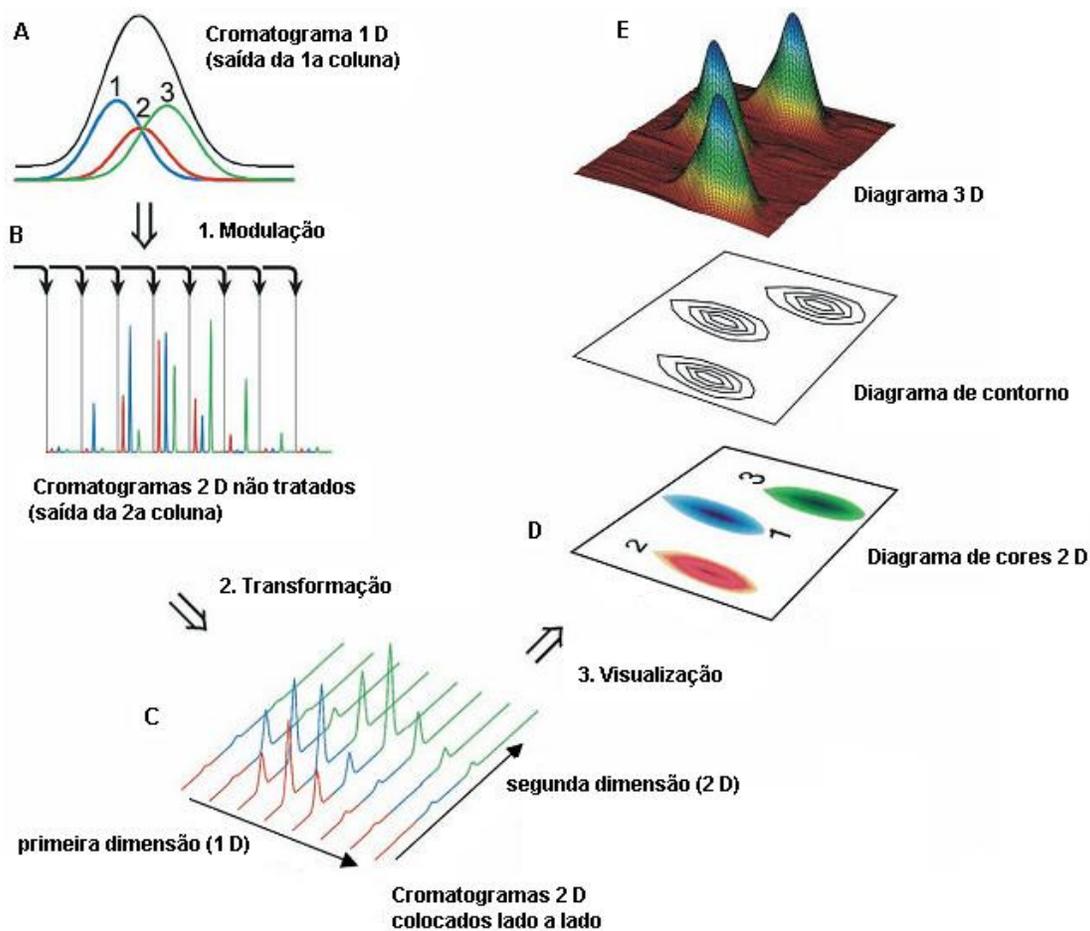


Figura 6. Esquema ilustrando os conceitos da GC × GC: (A) pico na primeira dimensão contendo co-eluentes; (B) amostras moduladas do pico da primeira dimensão e injetadas na segunda dimensão; (C) co-eluentes são separados na segunda dimensão; (D) diagrama GC × GC obtidos com detector FID nos dois seguimentos; (E) visualização do diagrama 3 D, de contorno e de cores 2 D (adaptado de Dallüge et al.⁸⁴).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. AMOSTRAS E REAGENTES

As amostras estudadas foram fornecidas pela PETROBRAS e constam de derivados pesados de petróleo obtidos por destilação, denominadas A1 (PE de 325 a 350°C) e A2 (PE de 450 a 500°C). Estas amostras apresentam TAN de 6,80 e 13,94 mg KOH g⁻¹, respectivamente, os quais foram previamente determinados nos laboratórios do CENPES/PETROBRAS.

Os solventes empregados nas extrações via cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (*prep*HPLC), bem como aqueles utilizados para o preparo de soluções padrão, foram todos grau HPLC: hexano e metanol (Grupo Química), tolueno e diclorometano (Tedia), isopropanol (J. T. Baker), éter etílico (Ecibra) e ácido fórmico (Reagen). Para SPE, cromatografia líquida preparativa em coluna aberta e preparo de soluções de padrões, foram utilizados os solventes hexano, tolueno, diclorometano, acetona, clorofórmio, metanol e *tert*-butil éter (MTBE), todos destilados e da marca Vetec.

Para as extrações via *prep*HPLC utilizou-se como recheio da coluna sílica gel (Merck 20GF₂₅₄) com diâmetro de partícula <55 µm. Cartuchos comerciais foram utilizados para SPE, da marca Waters e modelo Sep-Pak Vac Accell Plus QMA, recheados com as fases amino-propil-sílica e cloreto de trimetil-propil-amônio-sílica, respectivamente. Além destes, utilizou-se sílica gel (sílica gel 60 Merck) com tamanho de partícula 0,063 – 0,200 mm e terra diatomácea (Celite 545, Merck) para cromatografia em coluna aberta.

Cloreto de cálcio (Merck) e sulfato de sódio (Quimex), ambos anidros, foram empregados como agentes secantes. Antes do uso, estes secantes foram aquecidos durante 4 horas na temperatura de 150 °C e armazenados em dessecadores de vidro.

Anterior à etapa de análise cromatográfica, os extratos contendo compostos ácidos foram derivatizados com o agente derivatizante N-metil-n(*tert*-butildimetilsilil) trifluoroacetamida, abreviado por MTBDSTFA (Fluka).

O gás hélio (grau 99,99 %) empregado nas análises cromatográficas foi fornecido pela empresa Linde. Os gases nitrogênio (N₂) e argônio (Ar), ambos grau analítico 5.0, utilizados durante o procedimento de derivatização e na redução do volume dos extratos foram fornecidos pela White Martins.

3.2. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

Para os estudos dos métodos de extração utilizaram-se cinco padrões individuais de ácidos naftênicos. As soluções estoque destes padrões foram preparadas em diclorometano (DCM) e conservadas sob refrigeração. A partir destas soluções foram preparadas soluções de trabalho na concentração de 1000, 100 e 40 mg L⁻¹.

Também foram preparadas soluções estoque dos padrões de ácidos carboxílicos acíclicos em DCM, e a partir destas, preparou-se as soluções de trabalho individuais dos ácidos C₈, C₁₀, C₁₂ e C₁₄ na concentração de 40 mg L⁻¹. Uma solução de trabalho, na concentração de 20 mg L⁻¹ de hidrocarbonetos lineares de C₂₁ até C₄₀, foi preparada a partir da mistura padrão de 40 mg L⁻¹. Os ácidos carboxílicos cíclicos e acíclicos, a mistura dos hidrocarbonetos, a marca do fabricante e a concentração das soluções estoque estão listados na Tabela I.

Uma mistura técnica comercialmente disponível de AN foi cedida pela empresa Miracema-Nuodex (Liovac ® 255, Campinas, São Paulo, Brasil). Para a preparação da solução estoque, uma alíquota de aproximadamente 89,0 mg foi transferida com DCM para um balão volumétrico (5 mL) perfazendo uma concentração de 17,8 g L⁻¹. A partir desta solução foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de 12 e 5 g L⁻¹.

Tabela I: Padrões de ácidos carboxílicos, marca do fabricante e a concentração da solução estoque.

Composto	Marca	Concentração (mg L ⁻¹)
1- ácido ciclopentanocarboxílico	EGA-Chemie	1330
2- ácido 1-metil-cicloexanocarboxílico	Aldrich	1200
3- ácido cicloexanocarboxílico	Aldrich	1150
4- ácido cicloheptanocarboxílico	Aldrich	4780
5- ácido trans-4-pentilcicloexanocarboxílico	Aldrich	10800
6- ácido siríngico	Aldrich	10400
7- C ₈ - ácido octanóico	Aldrich	12800
8- C ₁₀ - ácido decanóico	Aldrich	1400
9- C ₁₂ - ácido dodecanóico	Aldrich	1600
10- C ₁₄ - ácido tetradecanóico	Aldrich	1500
Hidrocarbonetos lineares de C ₂₁ até C ₄₀	Aldrich	40

3.3. DERIVATIZAÇÃO

Todos os extratos com os compostos polares e as soluções padrão (40 mg L⁻¹) foram derivatizadas com MTBDSTFA, antes da análise cromatográfica. Com o auxílio de uma

micro-seringa, aproximadamente 20 μL do agente derivatizante e 50 μL de DCM foram adicionados aos frascos que continham os extratos secos ou à solução padrão. Esta adição foi realizada sob atmosfera de argônio ou nitrogênio, para evitar a exposição do MTBDSTFA ao ar, o que levaria a uma possível formação de dímeros. Em seguida, os frascos foram retirados da câmara de gás inerte e transferidos para um banho de água mantido a 60 °C durante 15 min, a fim de garantir a formação dos terc-butildimetilsilil (*t*-BDMS) ésteres dos ácidos. Após o banho, as tampas dos frascos foram abertas para eliminar os vapores formados e o excesso do derivatizante. Uma vez seco, 50 ou 250 μL de DCM bidestilado eram adicionados aos frascos e encaminhados para análise cromatográfica. O agente derivatizante foi armazenado em frasco hermeticamente fechado para evitar o contato com o ar e mantido sob refrigeração.

3.4. LIMPEZA DA VIDRARIA

Considerada etapa relevante para análise de compostos em níveis de traço, o procedimento consistiu na lavagem da vidraria com detergente líquido diluído em água, seguida de enxágüe com água da torneira em abundância e, posteriormente, com água destilada. Em seguida, fez-se o enxágüe com acetona (Vetec), e após com heptano (Vetec), ambos de grau p.a.. Após evaporação destes solventes em capela, a vidraria foi levada ao forno, na temperatura de 300°C durante 30 minutos. A fim de evitar possíveis contaminações, a vidraria foi embalada em papel alumínio e reservada para os futuros trabalhos.

Para a vidraria volumétrica, seguiu-se a mesma seqüência de lavagem: detergente líquido diluído em água; enxágüe com água da torneira; enxágüe com água destilada; enxágüe com acetona e com heptano. Após evaporação destes solventes em capela, as vidrarias também foram embaladas em papel alumínio e reservadas para uso posterior.

3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA (*prep*HPLC)

3.5.1. Extração por *prep*HPLC com coluna de sílica tratada termicamente

A extração empregou um sistema de bombas de duplo pistão (Shimadzu, modelo LC-20AT) e válvula injetora manual (Shimadzu, modelo 7725i), com alça de amostragem de 20 μL . A coluna consistiu de cartucho de aço inox com dimensões 250 mm x 4,6 mm d.i. e recheio de sílica gel, previamente ativada por 4 horas a uma temperatura de 150°C.

Para o empacotamento, a coluna foi acoplada a um kitasato através de uma rolha de borracha, sendo submetida ao vácuo por meio de uma bomba (GE Motors, modelo 5KC36PN435GX). Para o recheio utilizou-se aproximadamente 2 g de sílica gel em quantidade suficiente de hexano que possibilitasse sua transferência com pipeta Pasteur. Este procedimento durava em média duas horas, tendo-se o cuidado para que a transferência do recheio ocorresse sem a evaporação do solvente. Por fim, fechou-se a coluna em ambas as extremidades e a mesma foi conectada ao HPLC para uso imediato. O desenvolvimento do método de extração utilizando prep HPLC e coluna de sílica gel foi baseado nos diversos trabalhos citados na literatura que abrangem tanto o fracionamento SARA como HPLC.^{14,38,41,46,64,66,71,76}

A qualidade do empacotamento da coluna e as condições do sistema foram monitoradas pelo controle da pressão, o qual serviu para indicar possíveis problemas, tais como entupimentos ou vazamentos. Durante a extração, manteve-se um programa de vazão de fluxo constante de 2 mL min⁻¹ cuja seqüência de solventes, tempo de extração, classificação por grupo de compostos são apresentados na Tabela II. Destacam-se aqui os volumes reduzidos para extração da solução de padrões, quando comparados aos volumes para extração das amostras, já que aquela não tinha a presença de interferentes da matriz. O esquema da extração otimizada é visualizado através da Figura 7.

Tabela II: Informações sobre as condições (solventes utilizados e volumes) da extração por *prep*HPLC com coluna de sílica gel tratada termicamente, para um fluxo de 2 mL min⁻¹.

Solvente	Volumes usados na eluição			Compostos
	1,25 g amostra		(*)S.P. 40 µg mL ⁻¹	
	(#)1ª tentativa	(##)otimizado	(##)otimizado	
Hexano	140 mL	140 mL	50 mL	Saturados
Tolueno	140 mL	180 mL	60 mL	Aromáticos
DCM/MeOH(**) (95:5 v:v)	140 mL	60 mL	30 mL	Polares
MeOH	140 mL	60 mL	30 mL	Polares

* SP = solução padrão

**DCM = diclorometano; MeOH = metanol.

volume inicial, escolhido por tentativa antes da otimização do procedimento;

volume final otimizado

Aproximadamente 1,25 g das amostras A1 e A2 e 10 µg dos padrões – para a fortificação das amostras - foram dissolvidos em 25 mL de DCM grau HPLC. Antes da injeção, a amostra foi filtrada, usando-se membrana de PTFE (membrana de politetrafluoretileno), com poros de 0,45 µm (Minisart-RC/SRP) e foi mantida em frasco de

vidro âmbar para evitar possível degradação fotolítica. Cabe destacar que, para cada amostra, foi realizado um número mínimo de três replicatas deste procedimento de extração.

Para a análise da solução padrão (mistura dos padrões 1 a 5 da Tabela I) na coluna de sílica gel, a concentração empregada foi cerca de 6 mg mL^{-1} , utilizando-se o mesmo volume de alça de amostragem ($20 \text{ }\mu\text{L}$). A ordem de eluição dos solventes foi a mesma aplicada às amostras, contudo os volumes foram reduzidos em decorrência da ausência de compostos interferentes. Os solventes e volumes utilizados estão indicados na Tabela II.

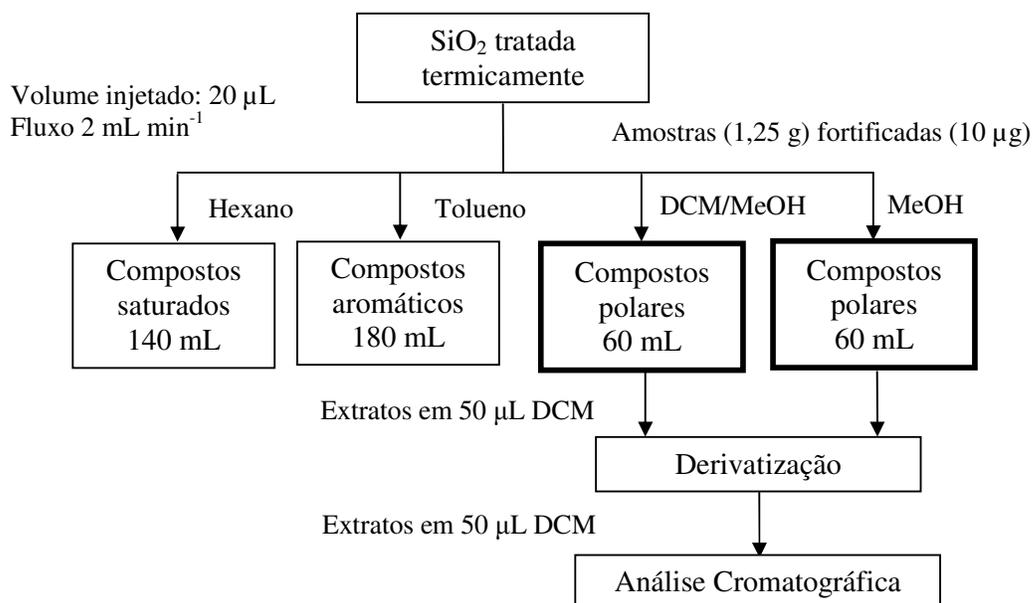


Figura 7: Esquema geral para o procedimento de extração dos ANs por *prepHPLC* utilizando como fase estacionária a sílica gel tratada termicamente. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 6 da Tabela I.

As frações obtidas foram secas pela primeira vez com fluxo de N_2 , com exceção da fração toluênica, seca em evaporador rotatório (RV 05-ST IP-H Ika-Werke), acoplado a uma bomba de vácuo com diafragma (Vacuumbrand) e “trap” de N_2 líquido. Estes extratos secos foram transferidos com DCM para frascos com capacidade de 1,5 mL e secas pela segunda vez com fluxo de N_2 , em decorrência do procedimento de derivatização conforme item 3.3.

3.5.2. Extração por *prepHPLC* com coluna de sílica modificada com KOH em isopropanol

A modificação da sílica gel com KOH em isopropanol foi baseada no procedimento descrito por Caramão et al.⁷³ e Lanças et al.⁷⁴. Para o empacotamento, utilizou-se

aproximadamente 2 g de sílica gel previamente ativada a 150°C por 4 horas, que foi tratada com uma solução de KOH (Grupo Química) 0,1 M em 20 mL de isopropanol e 16 mL de éter etílico. A mistura foi submetida à agitação magnética por 10 min e deixada em repouso por mais 10 min. O empacotamento da coluna e a forma de injeção da amostra seguiram o procedimento descrito no item 3.5.1. Os compostos ácidos foram extraídos com 60 mL da mistura ácido fórmico em MeOH com diferentes concentrações de ácido: 0,5, 2 e 5%. A Figura 8 ilustra o esquema geral utilizado no procedimento de extração dos AN por *prep*HPLC com coluna de sílica modificada com KOH.

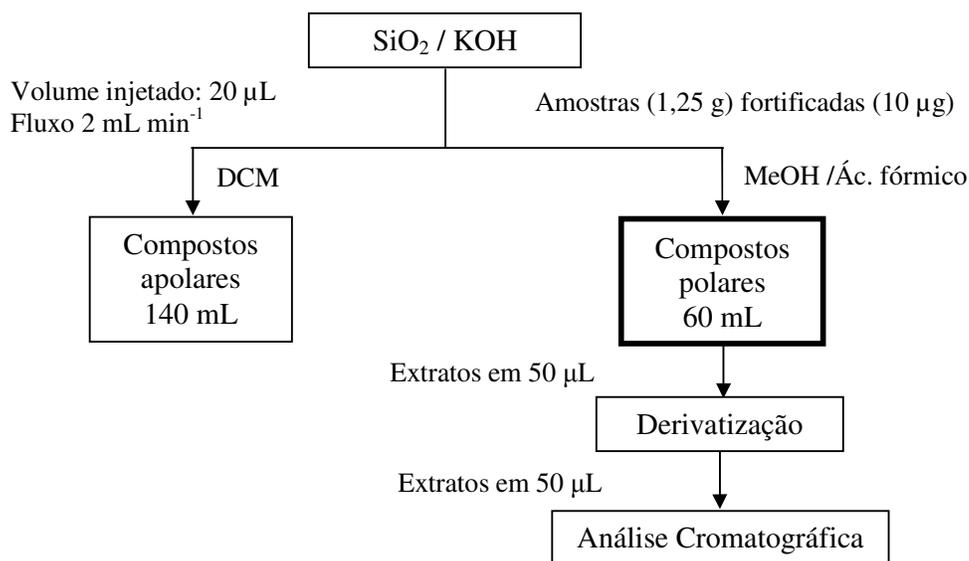


Figura 8: Esquema geral para o procedimento de extração dos AN por *prep*HPLC com coluna de sílica modificada com KOH em isopropanol. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.

Os extratos obtidos foram levados à secura em banho de areia e temperatura controlada de 50°C, sob fluxo de N₂. Foi observada a formação de emulsão para a maioria dos extratos, o que dificultou a análise cromatográfica. Na tentativa de eliminar esta “emulsão/umidade”, foram adicionados aos extratos agentes secantes, como sulfato de sódio e cloreto de cálcio. Os extratos foram recolhidos em um novo frasco, levados à secura com N₂ e redissolvidos em DCM.

3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM COLUNA ABERTA

3.6.1 Extração por cromatografia líquida preparativa com coluna aberta em fase sílica gel tratada termicamente

Utilizou-se uma coluna de vidro com dimensões 300 mm x 20 mm d.i. A sílica gel foi previamente ativada por 4 horas a uma temperatura de 150°C. O recheio consistiu de aproximadamente 2 g da sílica em quantidade suficiente de hexano que possibilitasse sua transferência para a coluna.

Aproximadamente 0,15 g da amostra A2 e 120 µg dos padrões de ácidos carboxílicos – para fortificação da amostra - foram dissolvidos em quantidade suficiente de DCM para sua transferência para a coluna. A ordem de eluição foi a mesma aplicada no item 3.5.1 e pode ser melhor visualizada através da Figura 9, que ilustra o esquema geral deste procedimento de extração.

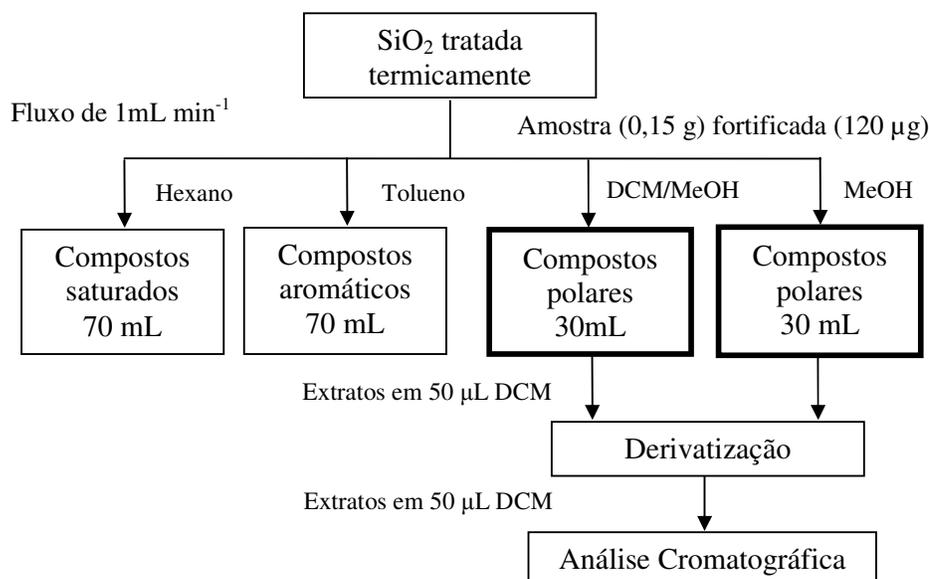


Figura 9: Esquema geral para o procedimento de extração dos AN por cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com a fase estacionária sílica gel tratada termicamente. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.

3.6.2. Extração por cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com fase terra diatomácea para a amostra A2

Aproximadamente 2 g de Celite (com o mesmo tratamento do item 3.6.1) foram transferidos a seco para uma coluna de vidro com diâmetro interno de 1 cm. Em seguida, percolou-se pela coluna 20 mL de KOH aquoso 0,1 M e aproximadamente 5 mL de

clorofórmio. No topo da coluna foram adicionados 20 μL de solução 25,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra A2. Para a eluição, duas seqüências diferentes de solventes foram testadas:

a) 20 mL de clorofórmio, 10 mL de acetona, 5 mL da mistura acetona e MeOH (50:50 v:v) e 5 mL de MeOH. Os extratos obtidos com acetona, com a mistura acetona/MeOH e com MeOH foram reunidos, pois poderiam potencialmente conter os compostos ácidos, e levados à secura, derivatizados (item 3.3) e analisados por cromatografia gasosa.

b) 50 mL de hexano, 60 mL de tolueno, 10 mL da mistura diclorometano e MeOH (95:5 v:v) e 10 mL de MeOH. Os extratos contendo os compostos ácidos foram reunidos, levados à secura, derivatizados (item 3.3) para posterior análise cromatográfica.

Cabe ressaltar que este procedimento foi adaptado de um trabalho de pesquisa enviado pela PETROBRAS, cujo objetivo era determinar o teor de AN de amostras de petróleo. O esquema desta extração é melhor visualizado através da Figura 10.

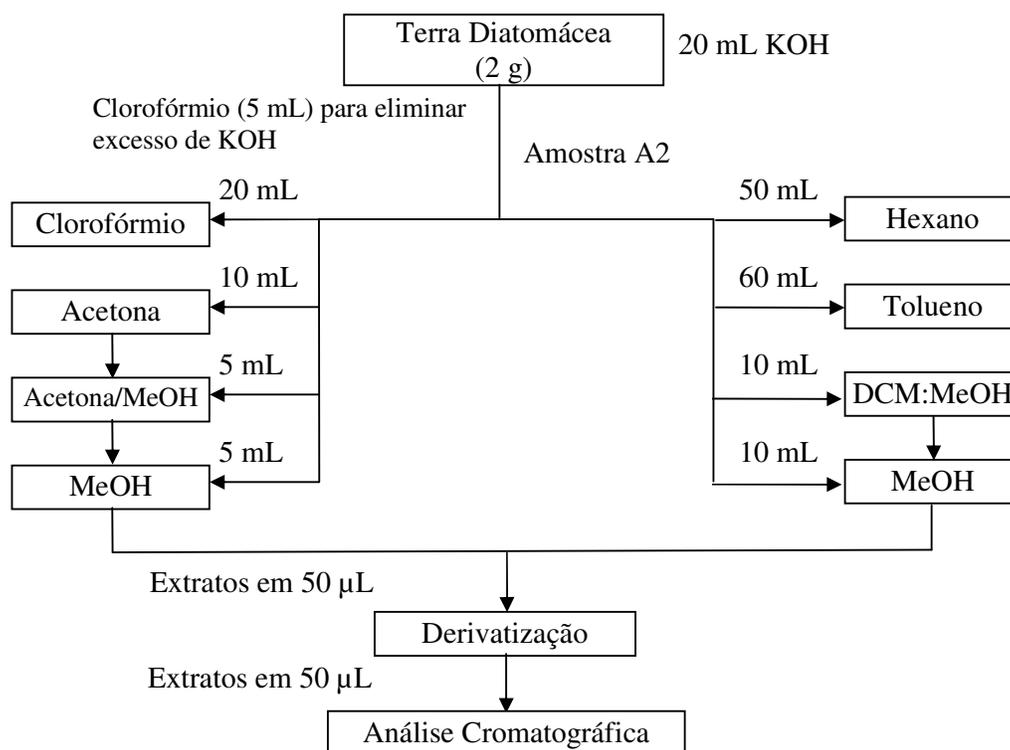


Figura 10: Esquema da cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com fase terra diatomácea para a amostra A2.

3.7. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

3.7.1. Tratamento dos extratos ácidos com terra diatomácea

Os extratos ácidos obtidos por *prep*HPLC com coluna de sílica tratada termicamente foram submetidos a um novo tratamento com terra diatomácea a fim de eliminar os hidrocarbonetos saturados que ainda se faziam presentes no extrato. Aproximadamente 0,25 g de Celite previamente ativada a 400 °C por 4 horas foram transferidas para uma coluna de vidro com diâmetro interno de 7 mm. Em seguida, percolou-se 5 mL de KOH aquoso 0,1 M e aproximadamente 3 mL de clorofórmio para retirar o excesso da base. No topo da coluna foi adicionado o extrato dissolvido em 200 µL de clorofórmio cuja eluição foi realizada com a seguinte seqüência de solventes: 5 mL de acetona, 3 mL da mistura acetona e metanol (50:50 v:v) e 3 mL de metanol. Este extrato foi reunido, levado a *secura* e transferido para um frasco para posterior derivatização e análise cromatográfica. O esquema deste tratamento é visualizado através da Figura 11.

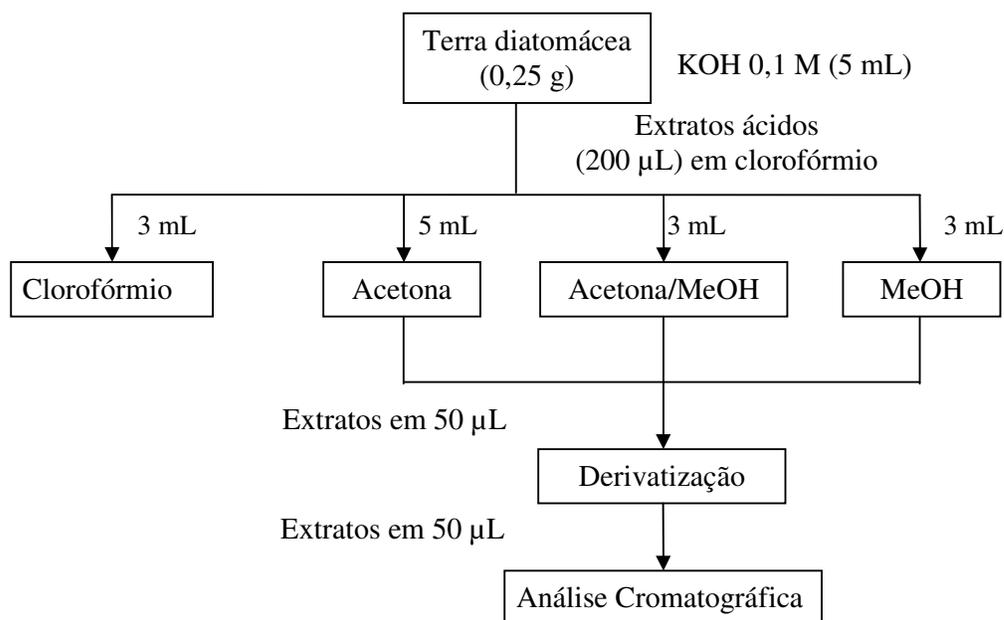


Figura 11: Esquema do tratamento dos extratos obtidos por *prep*HPLC e fase sílica gel tratada termicamente com terra diatomácea.

3.7.2. Extração utilizando cartuchos do tipo SPE com fase SAX

A extração empregando SPE com cartuchos de fase SAX foi seguido conforme o método descrito por Jones et al.⁶⁸ Este procedimento de extração está apresentado na Figura 12.

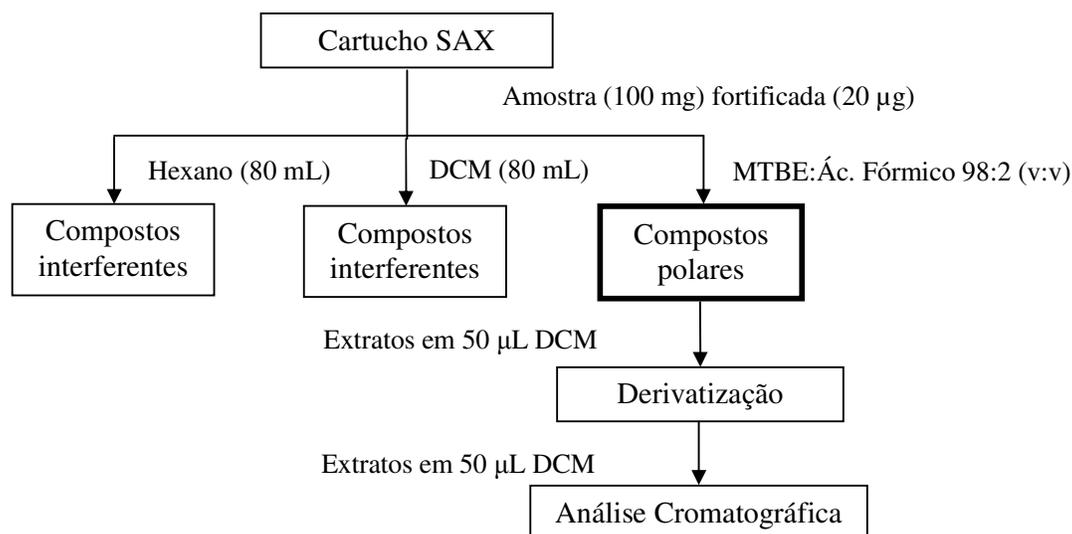


Figura 12: Esquema geral para o procedimento de SPE com fase SAX para extração dos AN. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.

Cartuchos com fase de trocador de ânions forte trimetil-propil-amônio-sílica (Sep-Pack Waters), denominados doravante SAX foram ativados com percolação de 40 mL de hexano. O processo de extração implica na adição de aproximadamente 100 mg das amostras A1 ou A2 e dos padrões dissolvidos em tolueno. Na seqüência eluiu-se 80 mL de hexano e 80 mL de DCM, com o objetivo de retirar hidrocarbonetos e compostos não-ácidos da amostra. Em seguida, percolou-se sobre o cartucho a mistura de MTBE:ácido fórmico (98:2 v/v) para remover os compostos ácidos. Os extratos foram levados à secura em banho de areia e temperatura controlada de 50°C e transferidos para frascos de 1,5 mL, onde foram secos sob fluxo de N₂ e redissolvidos em DCM.

3.7.3. Extração utilizando cartuchos do tipo SPE com fase amino

A fase estacionária amino-propil-sílica já foi empregada pela PETROBRAS em ensaios de determinação de AN por infravermelho. O uso desta fase estacionária também é citado por alguns autores, Pasadakis et al.⁶⁴ e Islas-Flores et al.⁸⁹, para fracionamentos de

amostras de petróleo via HPLC. O procedimento realizado neste trabalho pode ser visualizado na Figura 13.

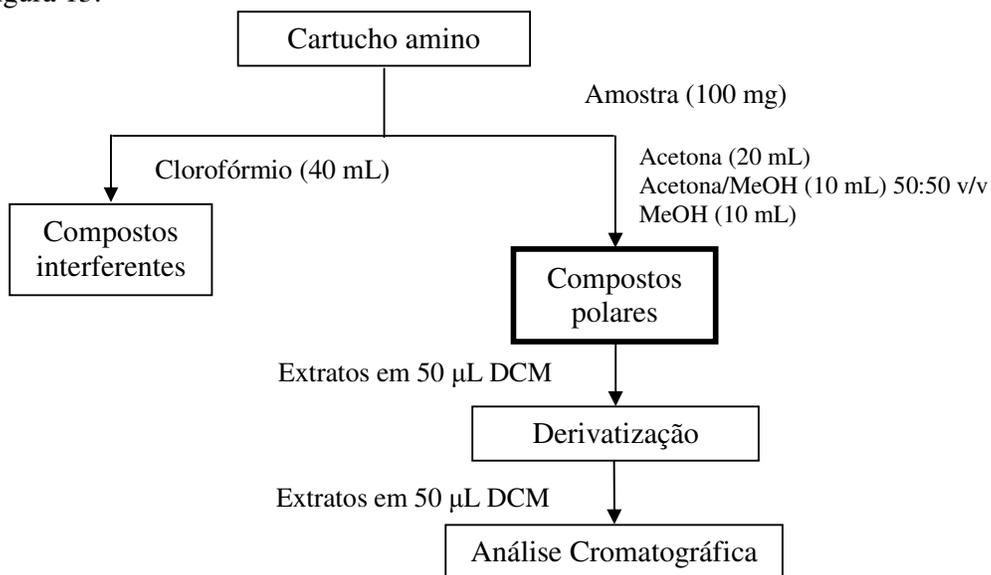


Figura 13: Esquema geral para o procedimento de SPE com fase amino para extração dos AN.

Primeiramente, fez-se a ativação dos cartuchos para SPE com fase amino-propil-sílica (Sep-Pack Waters) com 15 mL de clorofórmio. Após, adicionou-se cerca de 100 mg da amostra A2. Na seqüência, eluiu-se 40 mL de clorofórmio (para retirada de compostos interferentes), 20 mL de acetona, 10 mL da mistura acetona/MeOH 50:50 v/v e 10 mL de MeOH. Os últimos três eluatos contêm os compostos ácidos, e por isso, ao final da extração, foram reunidos em um único extrato. Os extratos foram levados à secura em banho de areia e temperatura controlada de 50°C e transferidos para frascos de 1,5 mL, onde foram secos sob fluxo de N₂ e redissolvidos em DCM.

3.8. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

3.8.1. Cromatografia Gasosa Monodimensional

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo gasoso com detector de espectrometria de massas GC/qMS modelo Shimadzu QP-2010, com injetor split/splitless. Utilizou-se o método de ionização por impacto eletrônico (EI) com energia de ionização de 70 eV. A coluna capilar empregada foi uma OV-5 (metil silicone com 5% de grupos fenila) com 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme de fase estacionária e 30 m de comprimento. As condições cromatográficas estão apresentadas na Tabela III.

Tabela III: Condições utilizadas na cromatografia gasosa monodimensional.

Parâmetros	GC/qMS
Injetor/modo de injeção	<i>split/splitless</i> - operando no modo <i>splitless</i>
Temperatura do injetor	280 °C
Volume injetado	1 µL
Fase móvel/fluxo	Hélio/1 mL min ⁻¹
Rampa de temperatura do forno	40°C (2 min) – 10°C/min – 300°C (25 min)
Temperatura da interface	280 °C

3.8.2. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente

As análises foram realizadas em um sistema GC × GC-FID (LECO) e GC × GC/TOFMS (LECO Pegasus) constituído de um GC Agilent 6890N, com injetor *split/splitless*, um modulador criogênico com quatro jatos (*quadjet*), resfriado por nitrogênio líquido e um amostrador automático 7683B Agilent Technologies. O conjunto de colunas empregado para ambos os detectores foi do tipo convencional, constituído de uma coluna apolar na primeira dimensão, DB-5 (5% fenil metil silicone), e uma coluna polar na segunda dimensão DB-17 (50% fenil metil silicone), fornecidas por Agilent Technologies (J&W Scientific, EUA), as especificações das colunas e as condições cromatográficas para ambos os detectores estão descritas na Tabela IV.

Tabela IV: Condições otimizadas utilizadas na cromatografia gasosa bidimensional abrangente.

Parâmetros	GC × GC-FID	GC × GC/TOFMS
Temperatura do injetor	280 °C	280 °C
Fase móvel / vazão	Hidrogênio / 1 mL min ⁻¹	Hélio / 1 mL min ⁻¹
Razão de <i>split</i>	<i>split</i> 1:10	<i>split</i> 1:10
Coluna 1	DB-5HT (30m × 0,25mm × 0,10 µm)	DB-5 (30m × 0,25mm × 0,10µm)
Coluna 2	DB-17ms (1,39m × 0,18mm × 0,18µm)	
Rampa de temperatura do forno 1	40°C (2 min) – 10°C/min – 120°C – 2°C/min – 180°C – 10°C/min - 290°C (1 min)	
ΔT entre os fornos	30 °C	5 °C
Temperatura do modulador	45 °C	20 °C
Período de modulação	12 s	12 s
Pulso quente	4,8 s	4,8 s
Pulso frio	1,2 s	1,2 s
Temperatura do detector	320 °C	Transfer line: 250 °C Fonte de íons: 250 °C
Taxa de aquisição de dados	100 Hz	100 Hz
Corte do solvente	180 s	300 s

3.9. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

3.9.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Uma quantidade aproximada de 60 mg da mistura técnica Miracema-Nuodex, sem qualquer tratamento prévio, foi colocada em um tubo de quartzo apropriado e dissolvida em 0,5 mL de CDCl_3 com 1% de TMS. O espectro de NMR ^1H , foi obtido em espectrômetro VARIAN – VNMRS – 300 MHz, operado na frequência de 300 MHz e com uma média de 64 aquisições. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS (padrão interno). O número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz).

3.9.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no Teste dos Hidrogênios Ligados

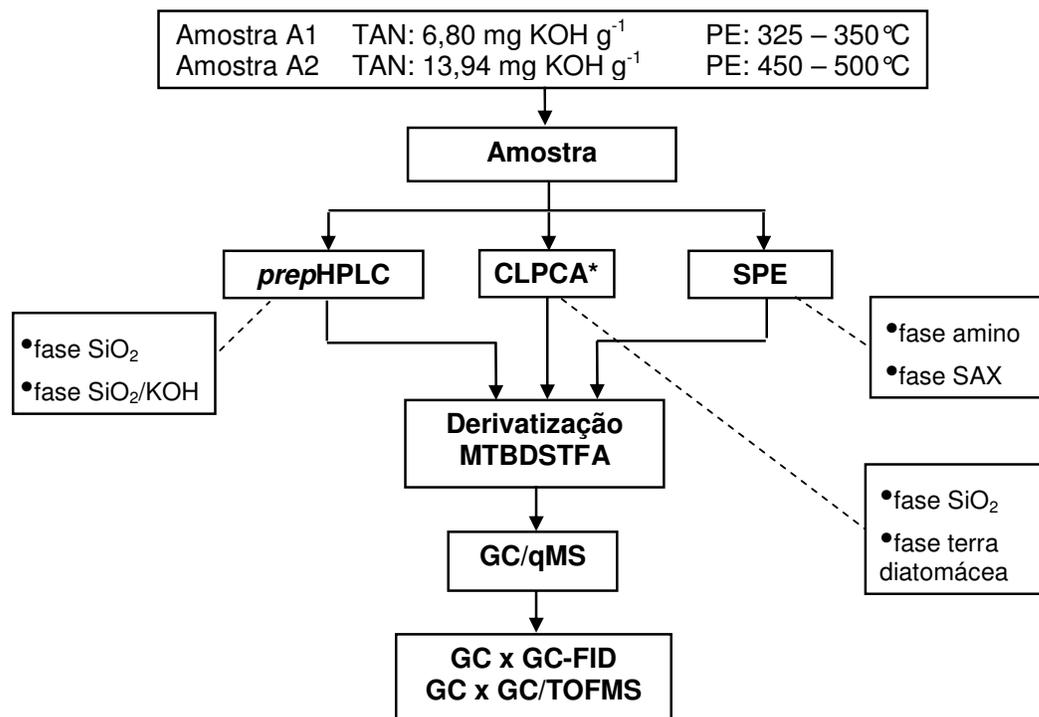
Para a análise de NMR ^{13}C foi utilizada a mesma amostra preparada para a análise de RMN ^1H e o mesmo espectrômetro VARIAN – VNMRS – 300 MHz. Contudo, neste procedimento o número de aquisições foi em média 2624. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao TMS (padrão interno). O número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz (Hz).

3.10. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

O espectro na região do infravermelho foi obtido em um espectrofotômetro VARIAN modelo 640 - IR, de janela espectral de 4000 a 200 cm^{-1} , registrados na forma de filme líquido em cristal de brometo de potássio (KBr). A amostra da mistura técnica foi analisada diretamente com utilização de uma pequena gota no cristal de KBr.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com o exposto na Parte Experimental, a Figura 14 mostra um esquema geral da proposta de estudo realizada neste trabalho, visando facilitar a compreensão de todas as etapas desenvolvidas e dos resultados a seguir discutidos:



* Cromatografia líquida preparativa em coluna aberta

Figura 14: Esquema geral dos métodos de extração, fases estacionárias e técnicas de análise propostos neste trabalho.

4.1. EXTRAÇÃO POR *prepHPLC* COM FASE DE SÍLICA GEL TRATADA TERMICAMENTE

4.1.1. Resultados das amostras A1 e A2 por cromatografia gasosa monodimensional

A Tabela V apresenta o número de carbonos e o Z esperados seguindo a fórmula $C_nH_{2n+Z}O_2$ para os AN derivatizados com o MTBDSTFA. Esta tabela foi desenvolvida por St. John et al.⁴⁴, revisada por Clemente e Fedorak⁴⁹ e utilizada neste trabalho para a identificação dos AN em termos de número de carbonos e de anéis na estrutura.

Tabela V: Número de carbonos e Z esperados para os AN derivatizados com o MTBDSTFA (adaptado de Clemene e Fedorak⁴⁹).

N° Carbonos	Z = deficiência de elétrons		
	0	- 2	- 4
6	173	171	169
7	187	185	183
8	201	199	197
9	215	213	211
10	229	227	225
11	243	241	239
12	257	255	253
13	271	269	267
14	285	283	281
15	299	297	295
16	313	311	309
17	327	325	323
18	341	339	337
19	355	353	351
20	369	367	365
21	383	381	379
22	397	395	393
23	411	409	407
24	425	423	421
25	439	437	435

*As células marcadas indicam compostos que existem somente em teoria, pois não são encontradas estruturas com 6 e 7 carbonos sendo monocíclicos e/ou bicíclicos.

A Figura 15 apresenta os cromatogramas obtidos via GC/qMS para as amostras A1 e A2 extraídas com a mistura DCM:MeOH por *prep*HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente. Os ácidos identificados estão representados como CXX indicando o número de átomos de carbono na cadeia (por exemplo, C15 corresponde a um ácido com 15 átomos de carbono) e ao lado o índice Z, lembrando que o mesmo representa a deficiência de hidrogênio, conforme foi discutido na revisão bibliográfica deste trabalho. As letras F e D foram usadas para indicar a presença de impurezas como ftalato (F) e resíduo de derivatizante (D).

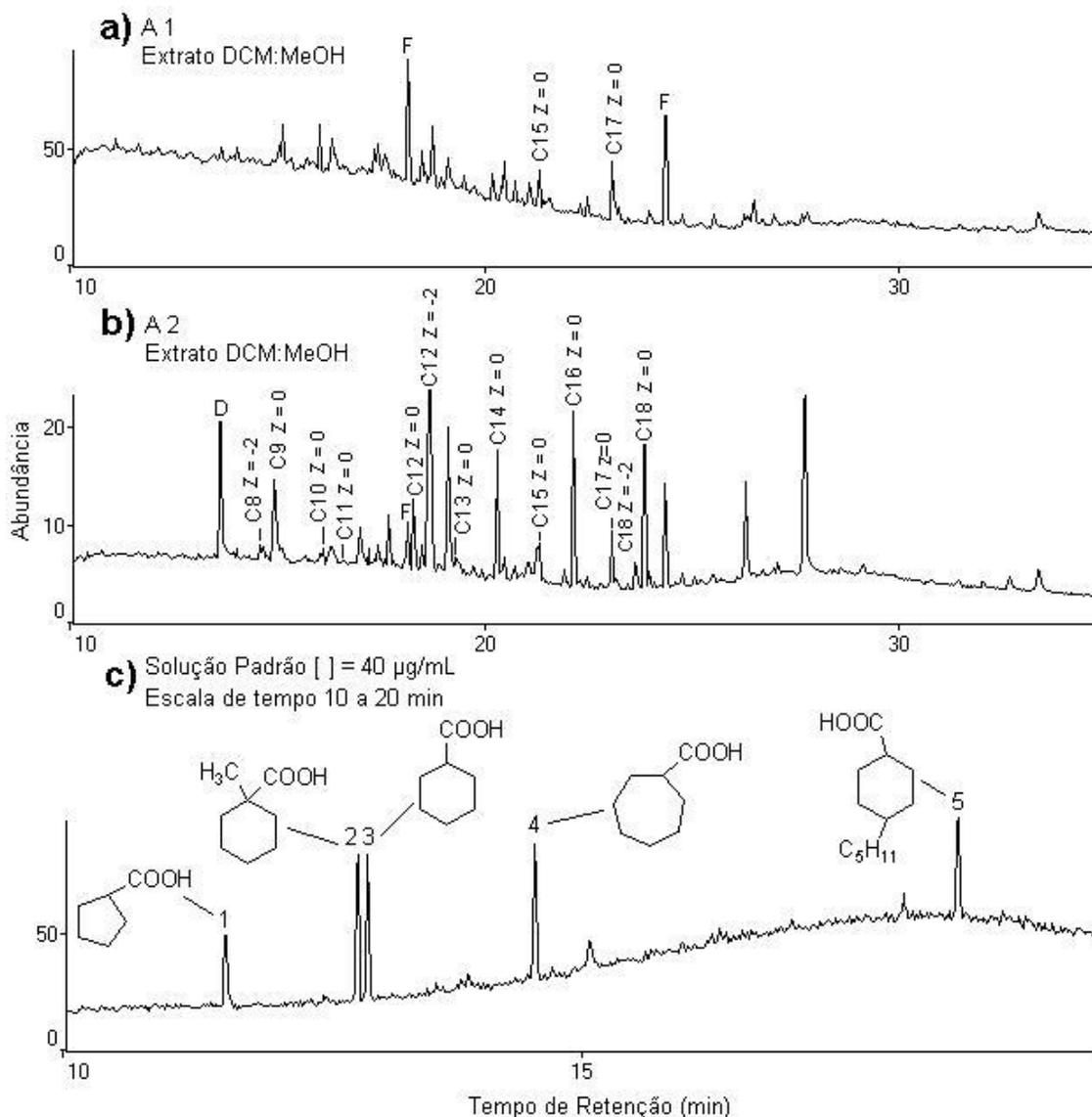


Figura 15: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos DCM:MeOH (95:5 v/v) obtidos na *prepHPLC* com fase sílica gel tratada termicamente para amostras: (a) A1e (b) A2 em comparação com a solução padrão (c) na concentração de 40 mg L⁻¹ em DCM, F = fthalato. Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.

A análise desta figura permite observar os picos cromatográficos dos AN presentes nas amostras. Contudo, pode ser notada a ausência dos padrões adicionados às mesmas, conforme comparação com cromatograma da solução padrão, sugerindo uma possível retenção dos padrões dos ácidos na sílica gel. Ainda sob este ponto de vista, parte dos AN originais das amostras também poderiam ter sido retidos na coluna, o que poderia explicar a presença majoritária de ácidos acíclicos em detrimento dos AN. Os tempos de retenção no GC/qMS e

os íons monitorados na espectrometria de massas após a derivatização com MTBDSTFA, estão apresentados na Tabela VI.

Tabela VI: Tempo de retenção no GC/qMS e os íons monitorados após a derivatização.

Ácido	t_R (min)	Íons (T-BDMS éster do ácido)
1- ácido ciclopentanocarboxílico	11,67	171,115,75
2- ácido 1-metil-ciclohexanocarboxílico	12,96	199,117,97,75,55
3- ácido ciclohexanocarboxílico	13,07	185,129,75
4- ácido cicloheptanocarboxílico	14,69	199,75,55
5- ácido <i>trans</i> -4-pentilciclohexanocarboxílico	18,30	255,105,93,75,55
6- ácido siríngico	18,80	255, 105, 75, 55

Os cromatogramas obtidos da análise por GC/qMS do extrato metanólico por *prep*HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente, para A1 e A2 estão apresentados na Figura 16.

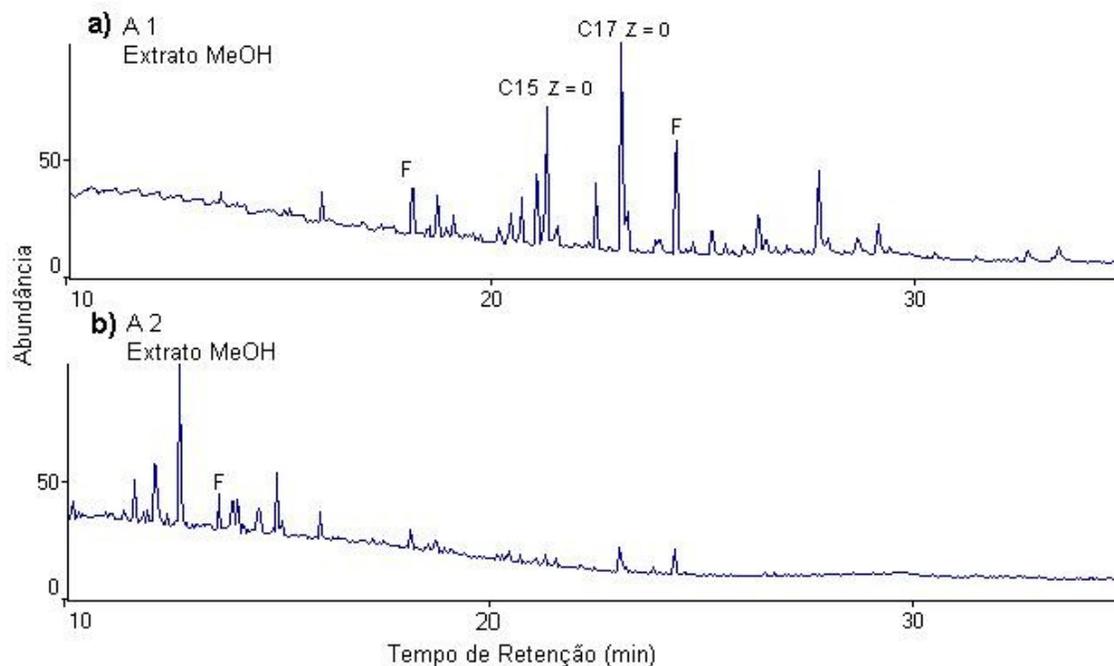


Figura 16: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos metanólicos obtidos na *prep*HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente para amostras: (a) A1 e (b) A2, F = ftalato. Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III.

A observação destes cromatogramas permitiu deduzir que a eluição de compostos polares do extrato metanólico não apresentou resultado satisfatório para as amostras. Aparentemente, a concentração dos compostos é muito baixa para uma análise via

cromatografia gasosa monodimensional. Para a amostra menos ácida (A1), tem-se somente a eluição dos compostos acíclicos C_{15} e C_{17} para ambos os solventes extratores.

No extrato DCM:MeOH da amostra A2 foram identificados os ácidos acíclicos da série homóloga C_9 a C_{18} e os compostos monocíclicos pares C_8 , C_{12} , C_{14} , C_{16} e C_{18} , dentre os quais C_8 , C_{12} e C_{18} apresentam maior intensidade de pico. É possível perceber que para esta amostra, a mistura extratora DCM:MeOH (Figura 15-b) foi mais eficiente na eluição dos componentes polares com relação ao MeOH puro (Figura 16-b).

As intensidades dos íons referentes aos AN derivatizados com MTBDSTFA obtidos por GC/qMS foram organizados de forma percentual segundo o método proposto por Holowenko et al.⁸⁶ utilizando o programa Excel® versão 2003. Para isto, considerou-se a intensidade do íon $[M-57]^+$ de cada composto ácido identificado, relacionando-o à intensidade total dos AN presentes na amostra (100%), produzindo valores normalizados para cada número de carbono e Z. Estes dados estão apresentados nas Figuras 17 e 18 para as amostras A1 e A2, respectivamente de acordo com o solvente extrator mais eficiente (MeOH para A1 e DCM:MeOH para A2) e sumarizados nas Tabela VII.

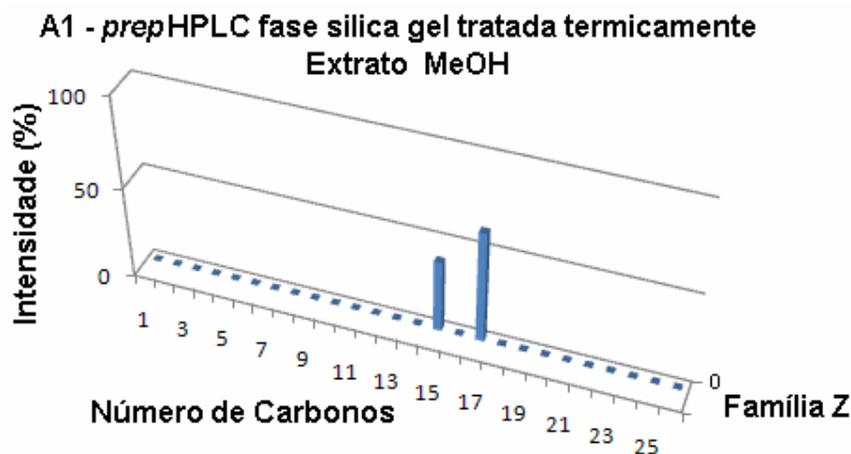


Figura 17: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A1 pelo número de carbonos e família Z. A amostra foi extraída por *prep*HPLC com fase sílica gel tratada termicamente e estes dados são referentes a extração com MeOH.

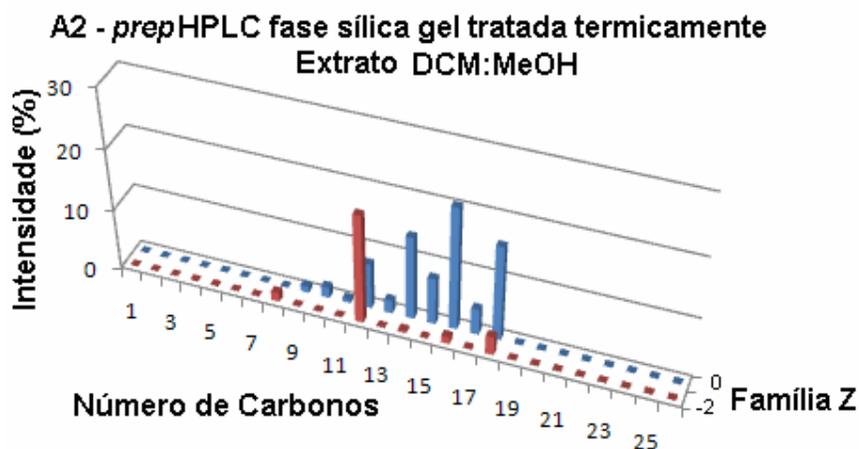


Figura 18: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A2 pelo número de carbonos e família Z. A amostra foi extraída por *prep*HPLC com fase sílica gel tratada termicamente e estes dados são referentes a extração com DCM:MeOH.

Tabela VII: Relação da intensidade, em valores percentuais (%) dos AN nos extratos das amostras A1 e A2 utilizando *prep*HPLC e fase estacionária sílica gel tratada termicamente.

Nº de C	Amostra A1 (MeOH)	Amostra A2 (DCM:MeOH)	
	Z = 0 ^(a)	Z = 0 ^(a)	Z = -2 ^(a)
8	0	0	1,52 (1)
9	0	1,07 (1)	0
10	0	1,80 (1)	0
11	0	0,58 (1)	0
12	0	7,62 (1)	18,17 (2)
13	0	2,19 (2)	0
14	0	13,88 (2)	0,40 (1)
15	39,12 (1)	7,75 (5)	0
16	0	20,46 (2)	1,19 (2)
17	60,88 (1)	4,36 (4)	0
18	0	15,81 (1)	3,08 (2)
Total parcial (%)		75,52	24,36
Total geral (%)	100	99,88	

^a Número de AN encontrados com o mesmo número de C e agrupados para a indicação percentual.

4.1.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente

4.1.2.1. Metodologia de análise

Normalmente, em GC × GC faz-se a otimização de metodologia de análise empregando cromatógrafo com detector FID. Assim, com o objetivo de identificar a região de eluição dos compostos ácidos foram analisadas no GC × GC-FID soluções de padrões

correspondendo às classes químicas: hidrocarbonetos lineares de C₂₁ até C₄₀, ácidos carboxílicos lineares C₈, C₁₀, C₁₂ e C₁₄ e os ácidos monocíclicos (ciclopentanocarboxílico, 1-metil-ciclohexancarboxílico, ciclohexancarboxílico, cicloheptancarboxílico e *trans*-4-pentil-ciclopentanocarboxílico). A Figura 19 apresenta os dados obtidos destas análises relacionando os tempos de retenção da primeira e segunda dimensão.

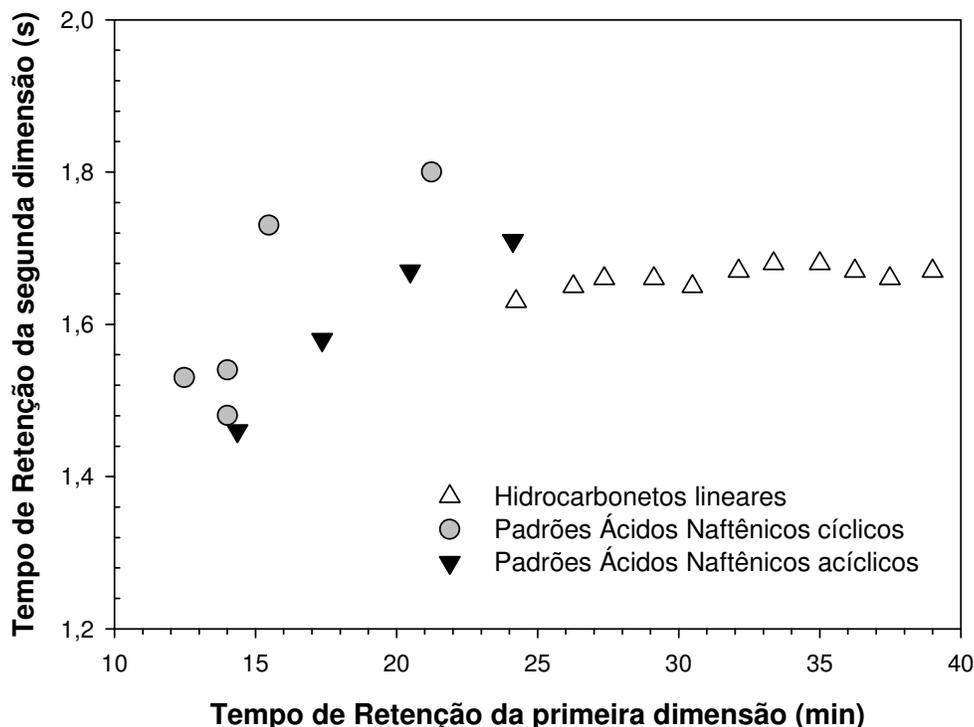


Figura 19: Relação dos tempos de retenção da primeira e segunda dimensão para a caracterização da região de eluição dos hidrocarbonetos lineares, ácidos naftênicos cíclicos e acíclicos quando analisados por GC × GC/FID. Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.

Na primeira dimensão (eixo x) a separação dos compostos ocorre em função do PE, e na segunda dimensão (eixo y) se dá por diferença de polaridade, gerando o espaço bidimensional de separação. Assim, no diagrama da GC × GC tem-se ao longo do eixo x os compostos agrupados por número de carbonos e ao longo do eixo y, por classes químicas como alcanos, cicloalcanos, aromáticos de um, dois ou multi anéis com agrupamentos adicionais mostrando séries homólogas entre cada classe^{87,88}. A menor polaridade dos ácidos acíclicos faz com que estes compostos tenham menor retenção em relação aos ácidos cíclicos na segunda coluna, conseqüentemente sua localização é na parte inferior do diagrama. Os hidrocarbonetos lineares analisados apresentam número de carbonos superior a 21 átomos e são maiores que os compostos polares. Portanto, apresentam eluição com maior tempo de

retenção na primeira dimensão. Contudo, por serem apolares, ficam pouco retidos na segunda dimensão.

Para a identificação dos padrões de ácidos nas amostras foi desenvolvido um método de classificação através da análise da solução padrão no programa de tratamento de dados ChromaTOF® Leco (versão 3.25) no sistema GC × GC. Este tratamento consiste em gerar uma tabela com os compostos sugeridos, os quais atendem aos parâmetros inseridos como: menor relação sinal ruído, área mínima, largura do pico na primeira dimensão e dos picos modulados.

Na Figura 20 está representado o diagrama de cores obtido para a análise da mistura de padrões de ácidos naftênicos, e na Tabela VIII, estão os tempos de retenção relacionados aos padrões. Verifica-se que os ácidos ciclohexanocarboxílico e metil-ciclohexanocarboxílico co-eluem na primeira dimensão e são separados na segunda dimensão. No diagrama de cores o azul representa sinal baixo, verde está representado sinal intermediário e o vermelho indica sinal de alta intensidade.

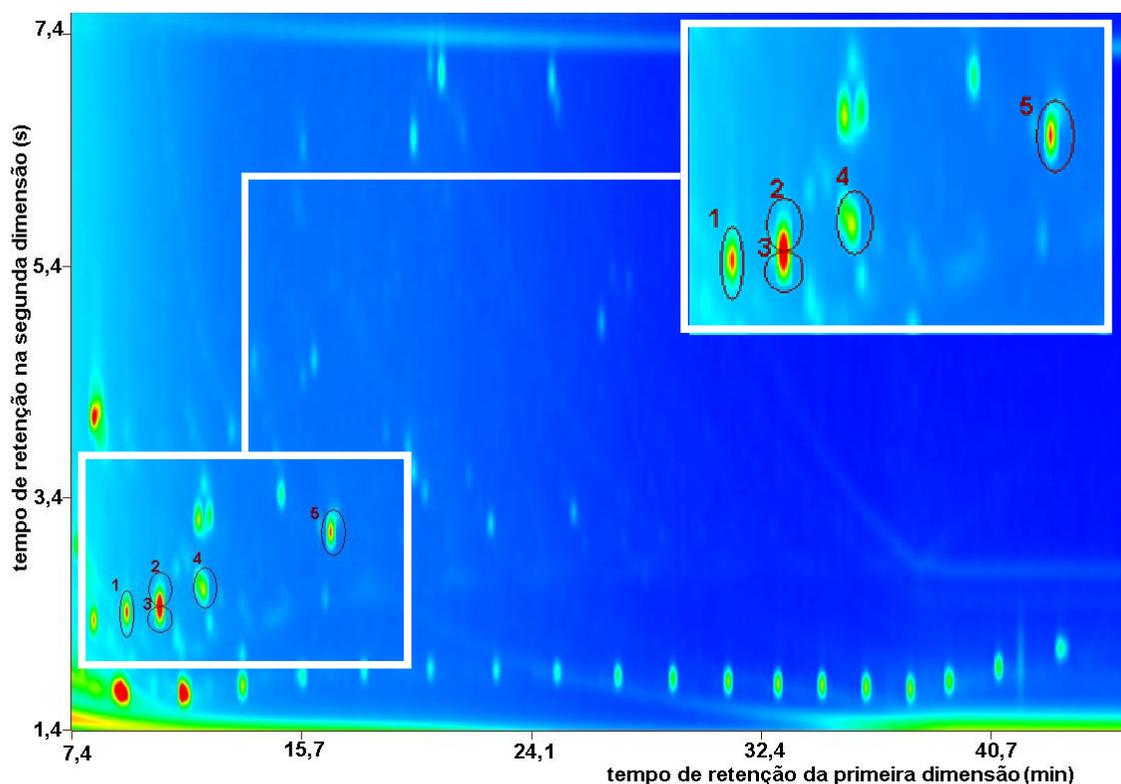


Figura 20: Diagrama de cores obtido para a solução padrão de AN na concentração de 40 mg L^{-1} . Compostos identificados na Tabela VIII. Condições cromatográficas apresentadas na Tabela IV.

Tabela VIII: Tempos de retenção dos padrões de ácidos utilizados no GC × GC-FID.

Ácido	¹ t _R (min)	² t _R (s)
1- ácido ciclopentanocarboxílico	9,4	2,48
2- ácido 1-metil-ciclohexanocarboxílico	10,6	2,40
3- ácido ciclohexanocarboxílico	10,6	2,59
4- ácido cicloheptanocarboxílico	12,2	2,65
5- ácido <i>trans</i> -4-pentilciclohexanocarboxílico	16,8	3,13

4.1.2.2. Resultados da análise da amostra A2

Para comprovar a ausência dos padrões de ácidos nas amostras, o extrato eluído com DCM:MeOH da amostra A2 foi analisado por GC × GC/TOFMS. A Figura 21 apresenta o diagrama de cores obtido.

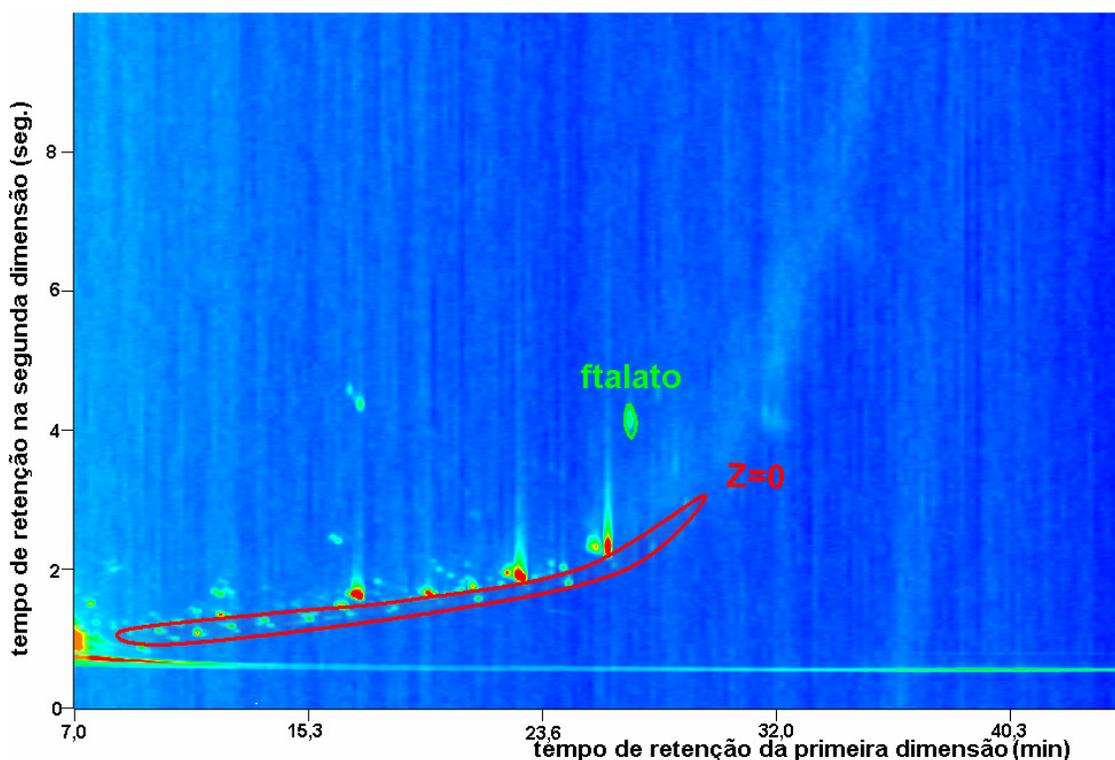


Figura 21: Diagrama de cores do extrato DCM:MeOH da amostra A2 fortificada com padrões de ácidos e obtida por *prep*HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente obtido por GC × GC/TOFMS. Em destaque a série dos ácidos acíclicos ($Z = 0$). Condições cromatográficas apresentadas na Tabela IV.

Promovendo o monitoramento dos íons característicos dos AN foi possível identificar os ácidos acíclicos C₆ a C₂₀. Observou-se um aumento significativo da sensibilidade, pois um

número maior de compostos foi identificado quando comparados aos resultados fornecidos pela cromatografia monodimensional (GC/qMS). Contudo, os padrões de ácidos adicionados não foram identificados.

4.1.3. Resultados da mistura de padrões de ácidos naftênicos por cromatografia gasosa monodimensional

A observação da baixa intensidade dos picos dos padrões nas análises por GC/qMS para as duas amostras e a ausência dos padrões no diagrama de cores obtido por GC × GC/TOFMS para a amostra A2, sugeriu uma possível adsorção irreversível dos compostos ácidos na fase estacionária sílica gel tratada termicamente. A fim de confirmar este resultado, uma solução padrão com alta concentração de ácidos naftênicos ($6,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi extraída por *prep*HPLC conforme item 3.5.1. A Figura 22 (a) e (b) apresenta os cromatogramas obtidos por GC/qMS para os extratos: mistura DCM:MeOH (95:5 v/v) e MeOH puro.

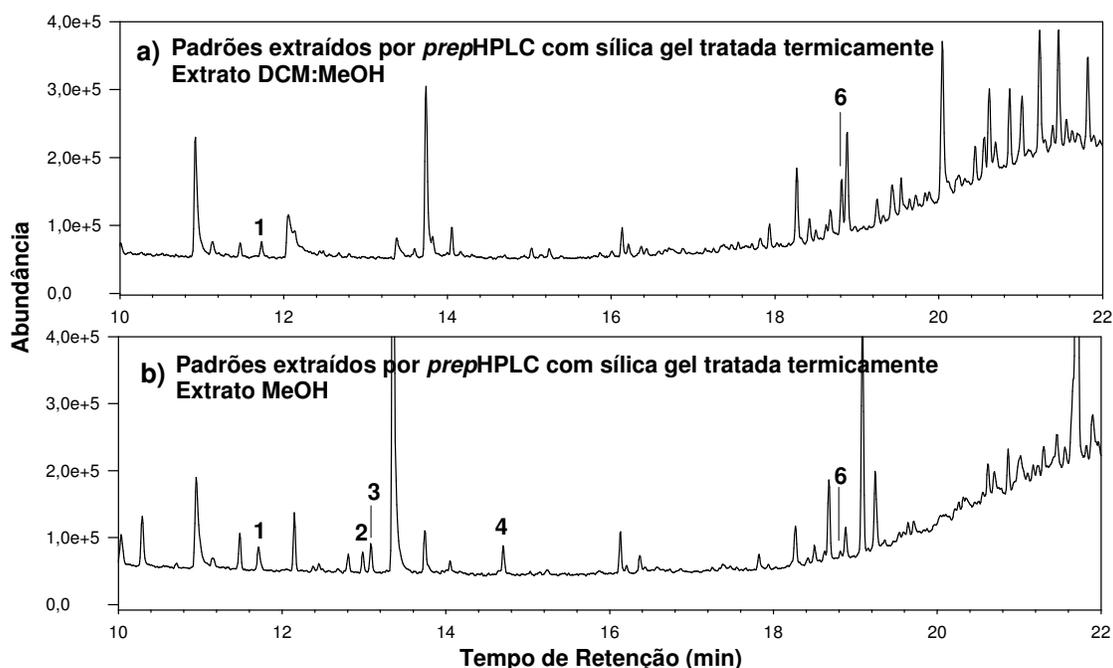


Figura 22: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos (a) DCM:MeOH 95:5 (v/v) e (b) MeOH obtidos na *prep*HPLC com fase de sílica gel tratada termicamente com indicação da localização dos padrões conforme Tabela VI. Condições cromatográficas segundo Tabela III. As soluções foram preparadas com os padrões 1 a 6 da Tabela I.

Através dos cromatogramas verificou-se, apesar da alta concentração dos padrões, a baixa intensidade dos sinais para ambos os extratos (DCM:MeOH e MeOH puro). Cabe

salientar, que os extratos oriundos da percolação com hexano e tolueno também foram analisados sendo que não foram observados sinais dos padrões. Tais extratos foram investigados com o intuito de excluir um possível efeito de lixiviação dos ácidos pela coluna de sílica gel tratada termicamente usada na *prepHPLC*.

Segundo Borgund et al.⁴¹ os AN podem ficar retidos irreversivelmente na sílica, resultando na baixa recuperação destes compostos nesta fase. Acrescentam ainda, que a fase estacionária octadecil-sílica (C₁₈), comumente utilizada, seria uma opção interessante para ácidos. Contudo, seria preciso considerar a problemática da forte interação dos hidrocarbonetos, o que levaria a necessidade de freqüentes trocas de coluna, aumentando o custo desta análise. Os autores comentam que a sílica com caráter mais básico promove o isolamento – baseado em interações de troca iônica – dos ácidos naftênicos. Com este intuito, partiu-se para uma modificação da sílica com KOH em isopropanol.

4.2. EXTRAÇÃO POR *prepHPLC* COM FASE DE SÍLICA GEL MODIFICADA COM KOH EM ISOPROPANOL

4.2.1. Resultados da amostra A2 por cromatografia gasosa monodimensional

A Figura 23 apresenta o cromatograma da análise por GC/qMS obtido do extrato MeOH: ácido fórmico 98:2 (v/v) proveniente da extração por *prepHPLC* da amostra A2 com a fase de sílica gel modificada com KOH (0,1 M) em isopropanol.

Foi possível observar no cromatograma o insucesso do método de extração, pois não se percebe a presença dos compostos ácidos oriundos da amostra e, nem mesmo, os padrões adicionados. Este resultado foi observado para todas as condições de eluição testadas. Com isso, conclui-se que a metodologia proposta de modificação da sílica gel com KOH para o empacotamento de coluna de *prepHPLC* e eluição com mistura MeOH e ácido fórmico não pode ser aplicada para a análise dos AN desta amostra.

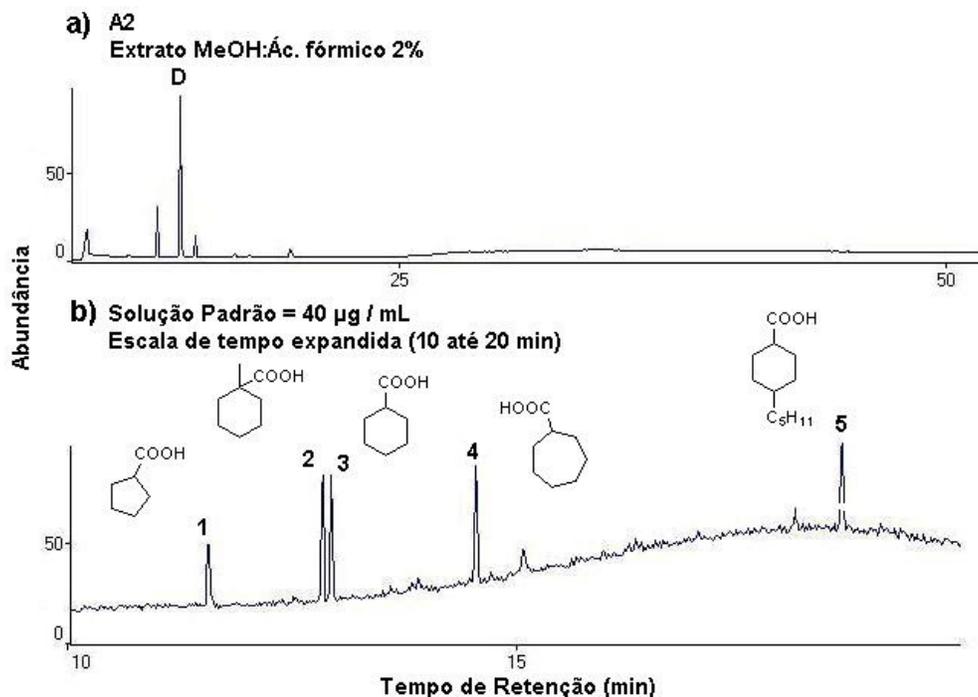


Figura 23: Cromatogramas obtidos por GC/qMS da amostra A2 extraída com MeOH:ácido fórmico 98:2 (v/v) por *prep*HPLC com fase de sílica gel modificada com KOH (0,1 M) em isopropanol em comparação com a solução padrão de ácidos (40 µg mL⁻¹ em DCM), D = resíduo do derivatizante. Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III.

4.2.2. Resultados por cromatografia gasosa bidimensional abrangente

A fim de confirmar o resultado da cromatografia monodimensional, o extrato MeOH:ácido fórmico 98:2 (v/v) proveniente da extração por *prep*HPLC da amostra A2 com a fase de sílica gel modificada com KOH (0,1 M) em isopropanol foi analisado por GC × GC/TOFMS, cujo diagrama de cores é apresentado na Figura 24.

A análise do diagrama de cores demonstra a presença de três ácidos, dos quais dois são acíclicos, C₁₄ e C₁₆, e um ácido monocíclico C₈. Contudo, apesar da maior sensibilidade da cromatografia bidimensional abrangente em relação à GC/qMS, este resultado reforça ineficiência do método de extração proposto.

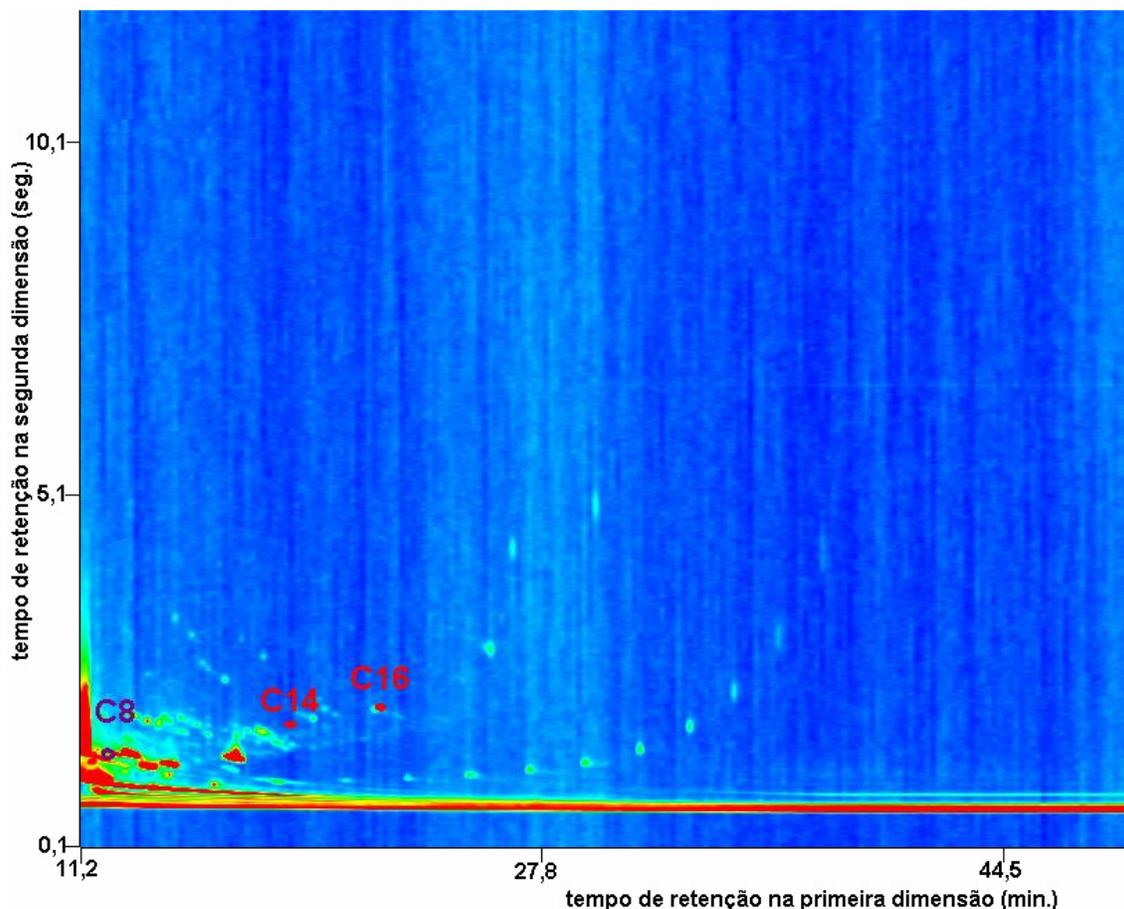


Figura 24: Diagrama de cores obtido por GC \times GC/TOFMS para a amostra A2 extraída com MeOH:ácido fórmico 98:2 (v/v) por *prep*HPLC com fase de sílica gel modificada com KOH (0,1 M). Condições cromatográficas apresentadas na Tabela IV.

4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM COLUNA ABERTA COM FASE SÍLICA GEL TRATADA TERMICAMENTE

Os extratos obtidos via cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com fase sílica gel tratada termicamente para a amostra A2, contendo os compostos polares, foram derivatizados e após analisados via GC/qMS. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 25 (a) e (b).

Aparentemente, a mistura de solventes DCM:MeOH foi mais eficiente, observou-se a maior intensidade dos picos referentes aos padrões adicionados e a série homóloga de ácidos de C₈ até C₁₈, com exceção do acíclico C₁₇. Apesar da menor intensidade de picos para todos os padrões e ácidos, o solvente MeOH se mostrou mais eficiente na extração de C₁₆, C₁₇ e C₁₈. Os picos dos ácidos acíclicos de C₅ até C₇ e monocíclicos não foram identificados no cromatograma representado pela Figura 25 (a) devido às baixas intensidades observadas.

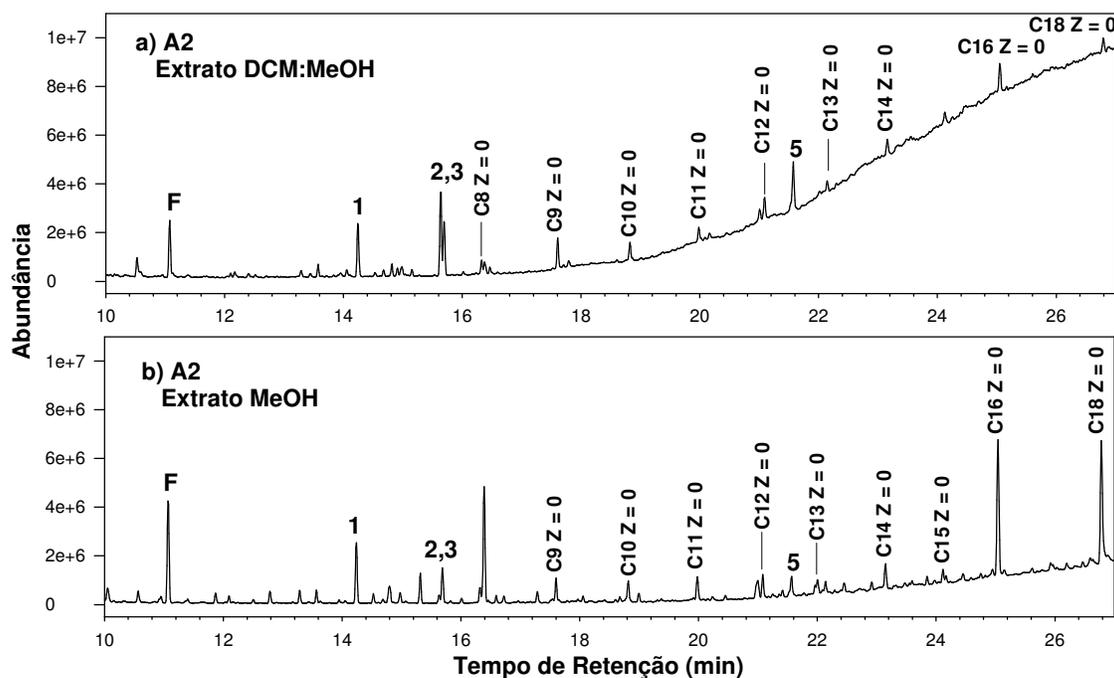


Figura 25: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos: (a) DCM:MeOH (95:5 v/v) e (b) MeOH puro obtidos por cromatografia líquida em coluna aberta com fase sílica gel tratada termicamente para amostra A2 com a identificação dos padrões de AN segundo a Tabela V, F = ftalato. Condições cromatográficas apresentadas na Tabela III. A amostra foi fortificada com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.

Para uma melhor compreensão, as intensidades dos íons referentes aos AN foram organizadas de forma percentual considerando a razão da intensidade individual de cada ácido identificado pela intensidade total dos AN presentes na amostra. Estes dados estão apresentados na Figura 26 (a) e (b) e sumarizados na Tabela IX.

A comparação destes resultados com os obtidos por *prepHPLC*, indicou que a extração via cromatografia líquida preparativa em coluna aberta seria mais eficiente, pois se observou intensidades de pico até 3 vezes maiores para os ácidos majoritários C₁₆ e C₁₈. Tal fato poderia ser explicado pela granulometria da sílica gel empregada na coluna aberta, que é maior que a utilizada na *prepHPLC*. Partículas com diâmetros maiores poderiam limitar a sorção irreversível dos AN na sílica gel.

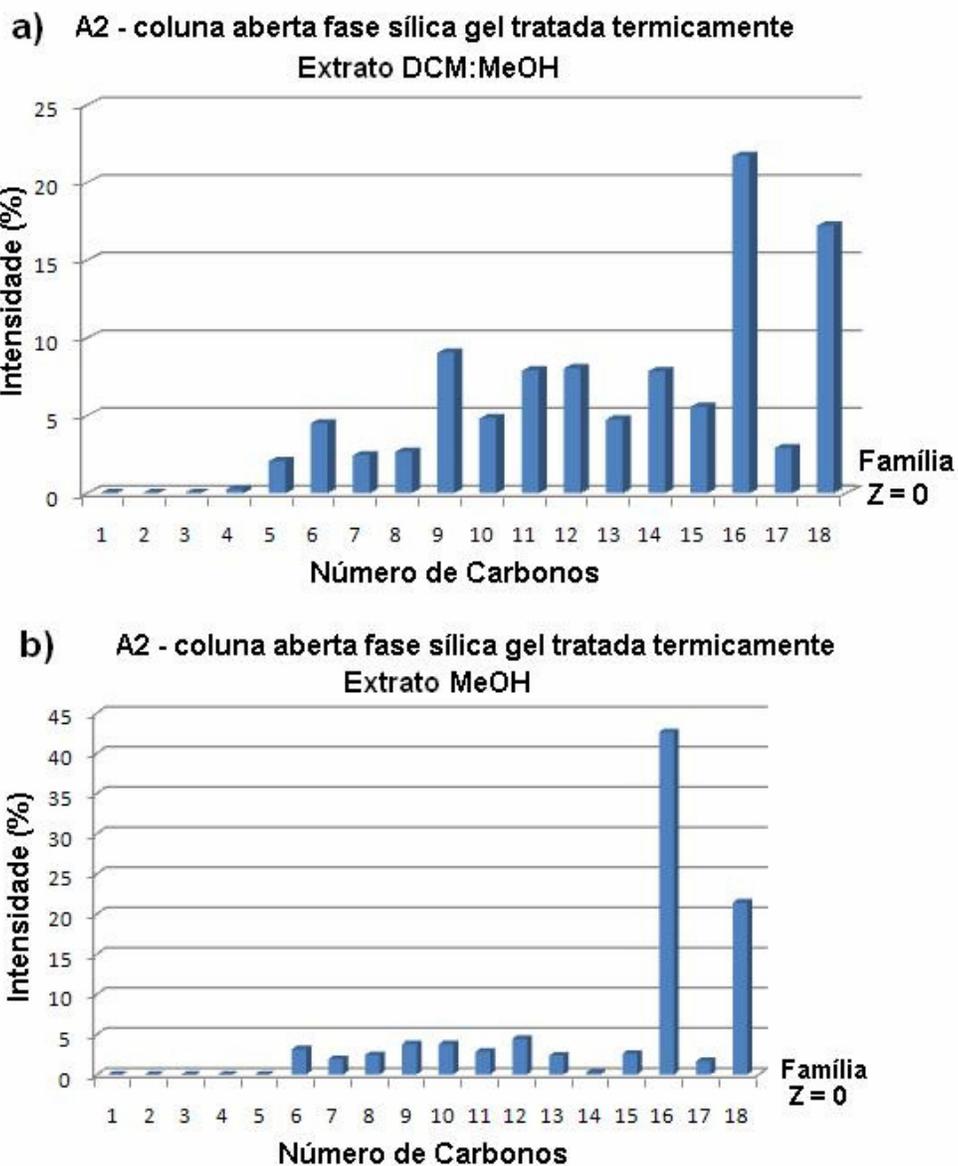


Figura 26: Distribuição percentual dos AN nos extratos obtidos por coluna aberta considerando o número de carbonos e família Z para os extratos DCM/MeOH (a) e MeOH puro (b).

Tabela IX: Relação da intensidade (%) dos AN nos extratos obtidos por cromatografia líquida em coluna aberta com fase sílica gel tratada termicamente para a amostra A2.

N°de C	DCM:MeOH		MeOH puro	
	Z = 0 ^(a)	Z = -2 ^(a)	Z = 0 ^(a)	Z = -2 ^(a)
5	1,45 (3)	0	0	0
6	4,49 (4)	0	3,16 (4)	0
7	2,45 (3)	0	1,94 (4)	0
8	2,66 (3)	0	2,43 (3)	0
9	9,05 (1)	0	3,81 (3)	0
10	4,83(1)	0,25 (1)	3,78 (3)	0
11	7,90 (2)	0,20 (1)	2,86 (3)	0
12	8,05 (3)	0	4,45 (3)	0
13	4,75 (1)	0	2,36 (2)	0
14	7,86 (1)	0	0,22 (2)	0
15	5,56 (1)	0	2,58 (2)	0
16	21,72 (1)	0	42,62 (1)	0
17	2,90 (1)	0	1,69 (1)	0
18	17,22 (2)	0	21,42 (1)	0
Total parcial (%)	100,89	0,45	93,32	0
Total geral (%)	101,34		93,32	

^a Número de AN encontrados com o mesmo número de C e agrupados para a indicação percentual.

4.4. TRATAMENTO DOS EXTRATOS ÁCIDOS COM TERRA DIATOMÁCEA E EXTRAÇÃO DA AMOSTRA A2 POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA PREPARATIVA EM COLUNA ABERTA COM FASE TERRA DIATOMÁCEA

Os extratos obtidos empregando como fase estacionária terra diatomácea, descritos nos itens 3.6.2. e 3.7.1., não foram analisados por apresentarem problemas de umidade. Várias tentativas com agentes secantes não apresentaram resultados satisfatórios, já que no momento do extrato ser levado à secura para a adição do derivatizante, os traços de umidade novamente se faziam presentes.

4.5. EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS A1 E A2 USANDO SPE COM FASE SAX

4.5.1. Resultados da cromatografia gasosa monodimensional

Seguindo o método proposto por Jones et al.⁶⁸ no estudo dos AN, foram realizadas extrações das amostras A1 e A2 fortificadas com padrões, utilizando cartuchos com a fase trocadora de ânions forte (trimetil-propil-amônio-sílica - SAX), eluídos com a mistura MTBE

(éter-metil-*terc*-butílico) e ácido fórmico (98:2 v/v) conforme o item 3.7.2. A quantidade de amostra utilizada nestes experimentos, com cartucho SAX de 10 g, seguiu a regra:

$$m_{\text{amostra}} = 1,683 / \text{TAN}$$

onde TAN é o número de acidez total da amostra determinado pelo método ASTM D664.

A Figura 27 apresenta os cromatogramas obtidos por GC/qMS das amostras A1 e A2 fortificadas com a mistura de padrões e extraídas em cartuchos de SPE com a fase estacionária SAX.

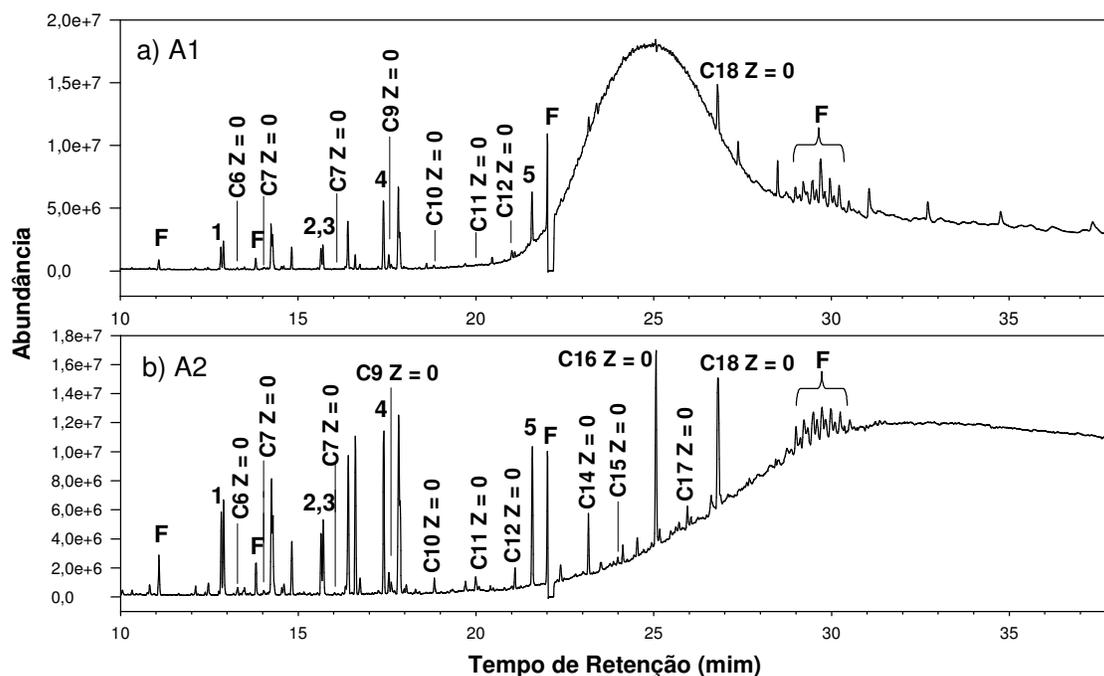


Figura 27: Cromatogramas obtidos por GC/qMS dos extratos contendo compostos polares para as amostras A1 (a) e A2 (b) oriundos do cartucho SAX com a identificação dos padrões de AN segundo a Tabela V, F = ftalato. Condições cromatográficas segundo Tabela III. As amostras foram fortificadas com solução dos padrões 1 a 5 da Tabela I.

A análise desta figura permite dizer que os padrões adicionados foram identificados nos extratos, indicando que o mecanismo de troca iônica destes com a fase SAX e os eluentes foi mais eficiente em relação aos outros métodos de extração testados. Na amostra A1 foi identificada a série homóloga de ácidos acíclicos C₆ até C₁₂ e o C₁₈. Já para a amostra A2 foi identificada a série homóloga de AN acíclicos de C₆ até C₁₈. Os picos encontrados sob a forma de “franjas” ao final dos cromatogramas foram identificados através do espectro de massas como ftalatos. Provavelmente, estes contaminantes foram lixiviados do material

plástico que constitui o cartucho. Os picos dos ácidos monocíclicos não foram indicados nos cromatogramas devido às baixas intensidades observadas.

O cromatograma da amostra A1 (Figura 27 a) apresenta uma elevação acentuada da linha de base entre 22 e 27 min, com espectro de massas característico de AN, sendo impossível determinar o número de carbonos e de anéis saturados das estruturas. Esta co-eluição de compostos é denominada como mistura complexa não resolvida - UCM - sendo bastante comum em amostras petroquímicas.

As intensidades dos íons referentes aos AN derivatizados dos extratos polares para as amostras A1 e A2 oriundos da extração SPE com cartucho SAX também foram organizadas de forma percentual. Estes dados estão apresentados nas Figuras 28 e 29 e sumarizados na Tabela X.

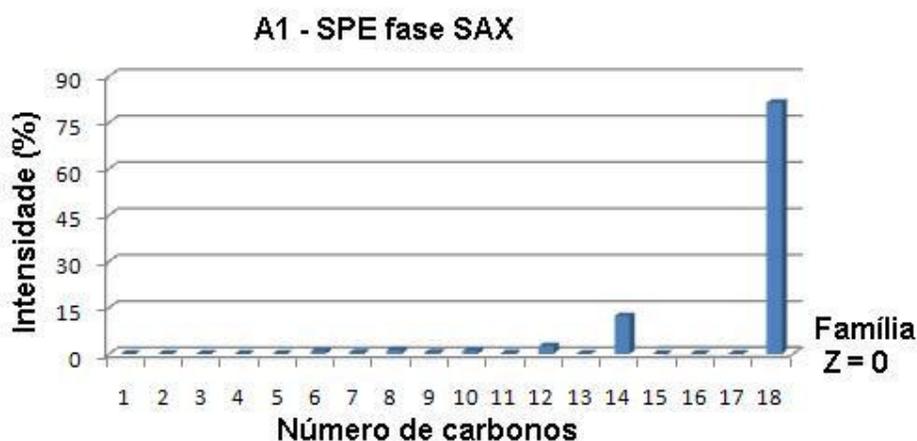


Figura 28: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A1 extraída por SPE com cartucho SAX pelo número de carbonos e família Z.

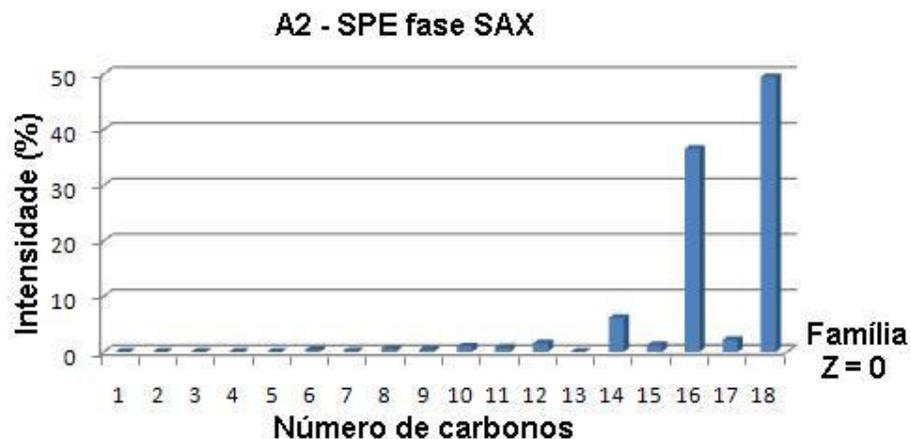


Figura 29: Distribuição da intensidade dos AN da amostra A2 extraída por SPE com cartucho SAX pelo número de carbonos e família Z.

Tabela X: Relação da intensidade, em valores percentuais (%) dos AN nos extratos polares das amostras A1 e A2 oriundas da extração por SPE com cartucho SAX

Nº de C	Amostra A1	Amostra A2
	Z = 0 ^(a)	Z = 0 ^(a)
6	0,81 (2)	0,33 (2)
7	0,27 (3)	0,10 (3)
8	1,19 (2)	0,53 (2)
9	0,40 (1)	0,42 (1)
10	0,98 (1)	0,98 (1)
11	0,16 (1)	0,74 (1)
12	2,47 (1)	1,50 (1)
13	0	0
14	12,21 (1)	6,10 (1)
15	0	1,17 (1)
16	0	36,52 (1)
17	0	2,15 (1)
18	81,41 (1)	49,42 (1)
Total geral (%)	99,91	99,96

^a Número de AN encontrados com o mesmo número de C e agrupados para a indicação percentual.

A comparação destes resultados, com os obtidos por *prep*HPLC e cromatografia líquida preparativa em coluna aberta utilizando a fase sílica gel tratada termicamente, confirmam a maior intensidade dos ácidos acíclicos C₁₆ e C₁₈ na amostra A2. Os resultados são discordantes para a amostra A1, pois com a fase SAX foram identificados a série homóloga de C₆ até C₁₂ e os ácidos C₁₄ e C₁₈, enquanto que por *prep*HPLC, somente foram detectados os ácidos acíclicos C₁₅ e C₁₇. A seletividade das fases frente aos AN está relacionada não somente com o mecanismo de interação analito/fase estacionária, mas também com o efeito da matriz no processo de extração. Aparentemente, tem-se um efeito de matriz mais acentuado para a amostra A1 com relação à amostra A2 na comparação destas fases.

4.5.2. Resultados da cromatografia gasosa bidimensional abrangente

As Figuras 30 e 31 apresentam os diagramas em 3D das amostras A1 e A2, respectivamente, caracterizando a região de eluição dos compostos ácidos a partir do conhecimento gerado no estudo das soluções padrões demonstradas na Figura 19 (página 40).

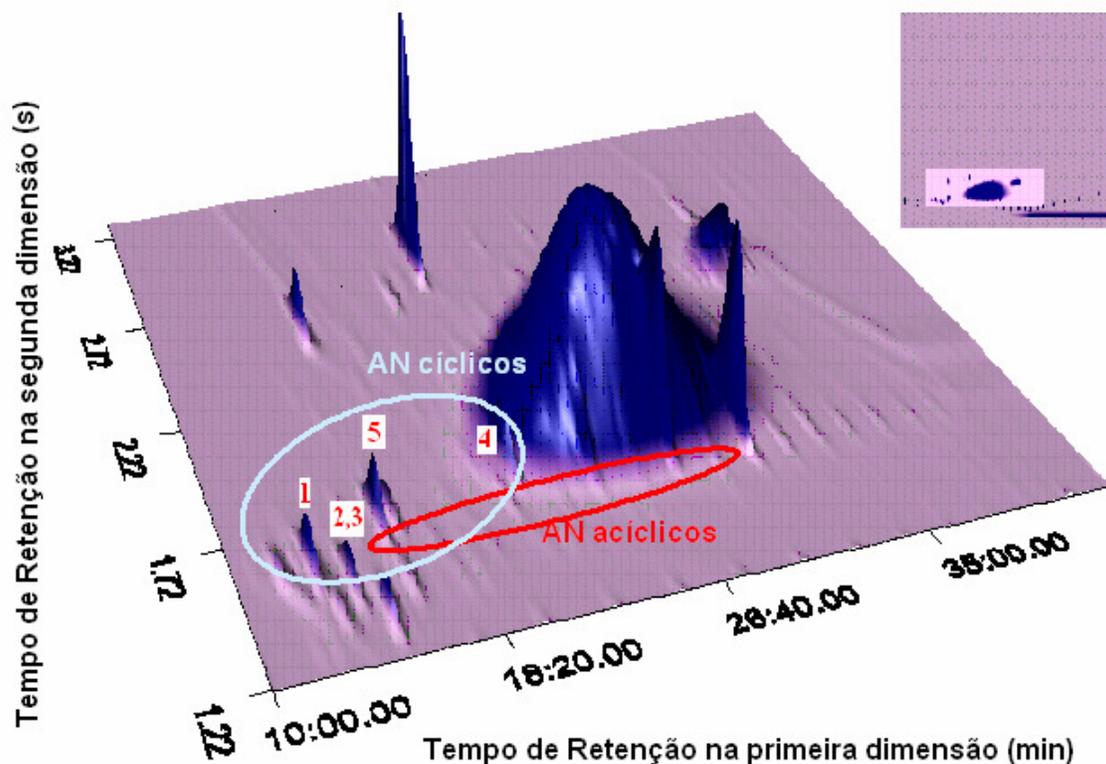


Figura 30: Diagrama 3D ampliado do extrato MTBE:ác.fórmico 98:2 (v/v) da amostra A1 obtido por GC × GC-FID com indicação da região de eluição dos AN acíclicos e monocíclicos e os 5 padrões de ácidos. Em detalhe, o diagrama de cores do espaço de separação bidimensional total. *Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.*

Pela análise da solução padrão dos hidrocarbonetos lineares foi possível constatar a presença de alguns destes compostos no extrato da amostra A1. Foram identificados os compostos C₂₉, C₃₀, C₃₃, C₃₇ e C₃₈, os quais não foram identificados por GC/qMS. Na amostra A2 não foram identificados hidrocarbonetos lineares com número de átomos de carbono entre 21 e 40.

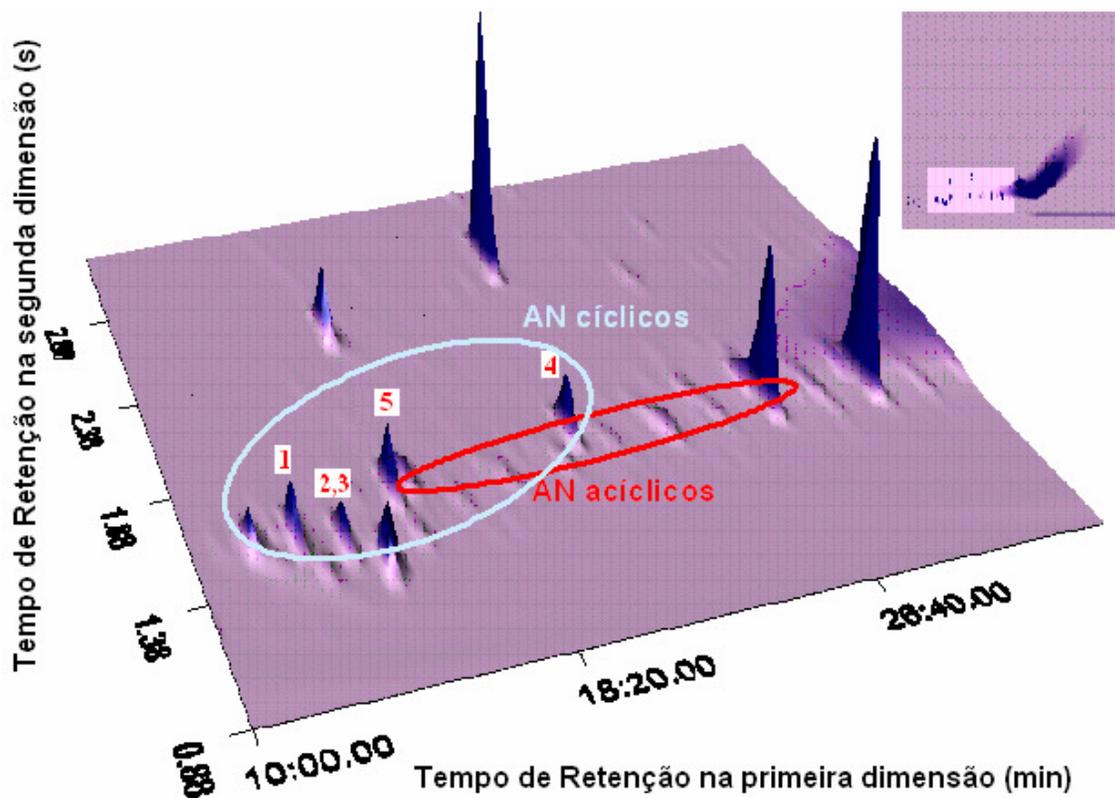


Figura 31: Diagrama 3D ampliado do extrato MTBE:ác.fórmico 98:2 (v/v) da amostra A2 obtido por GC × GC-FID com indicação da região de eluição dos AN acíclicos e monocíclicos e os 5 padrões de ácidos. Em detalhe, o diagrama de cores do espaço de separação bidimensional total. *Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.*

4.6. RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA GASOSA MONODIMENSIONAL PARA A AMOSTRA A2 POR SPE COM CARTUCHO AMINO

Neste trabalho, foram utilizados os cartuchos SPE com esta fase para a obtenção de extratos analisáveis por cromatografia gasosa. Para tanto, fez-se um estudo preliminar da quantidade de massa a ser percolada pelo cartucho que continha 500 mg.

A Figura 32 (a), (b) e (c) apresenta os cromatogramas obtidos por GC/qMS para A1 e A2 extraídas em cartuchos de SPE com a fase amino conforme o item 3.7.3. O extrato corresponde à seqüência de eluição envolvendo os solventes polares: acetona, a mistura acetona:MeOH (50:50 v/v) e MeOH.

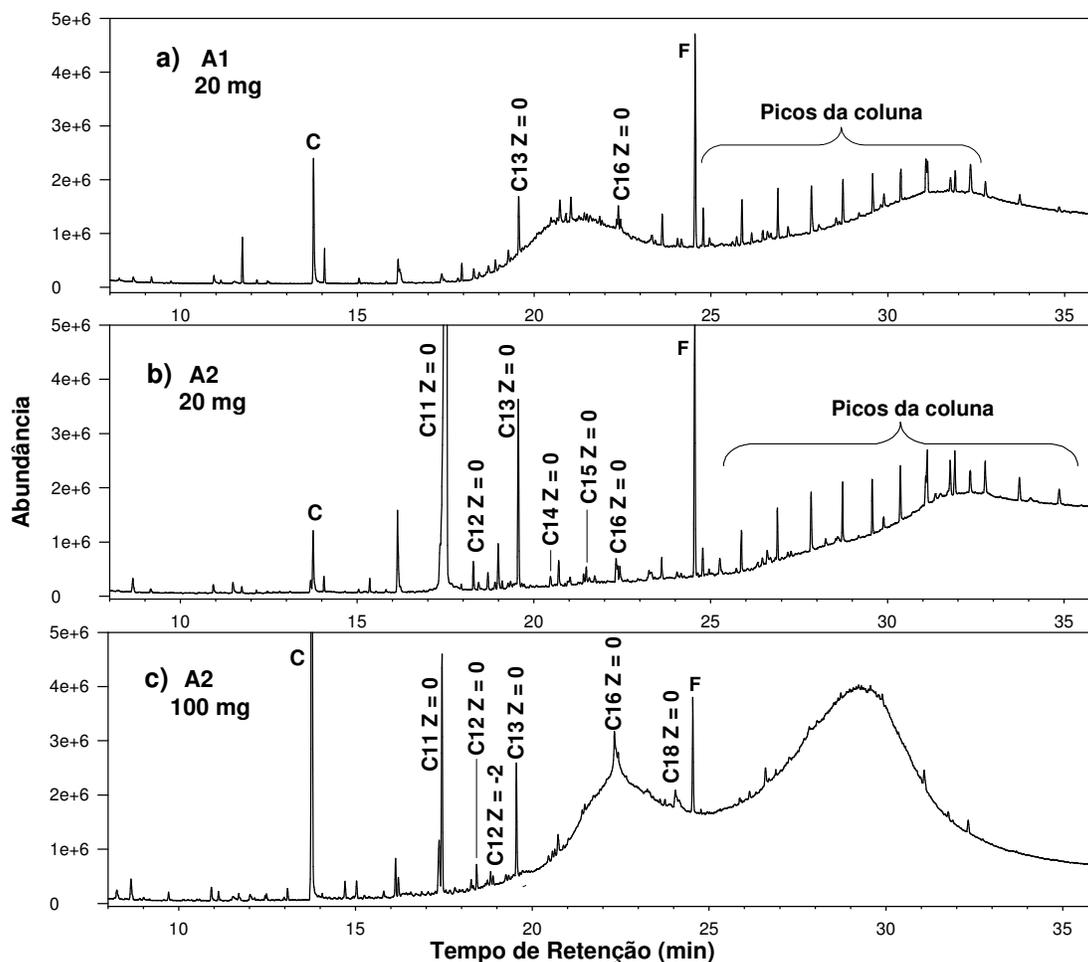


Figura 32: Cromatogramas obtidos por GC/qMS para as amostras: (a) A1 (20 mg) e (b) A2 (20 mg) e (c) A2 (100 mg), oriundos do cartucho amino. *Condições cromatográficas segundo Tabela III.*

A análise desta Figura revela novamente a presença de uma UCM formada por AN no cromatograma da amostra A1. O mesmo só foi observado para A2 utilizando-se 5 vezes mais amostra. Estes resultados preliminares não permitem qualquer correlação em termos de capacidade de extração dos AN com as outras fases, já que as diferenças de matriz entre as amostras implicam em estudos individuais de otimização relacionando o TAN com a massa a ser percolada pelo cartucho, semelhante aos estudos que foram realizados para a fase SAX. Contudo, é possível dizer que a percolação do clorofórmio como agente de *clean up* foi eficiente, não sendo observados nos cromatogramas os interferentes saturados e aromáticos

4.7. MISTURA TÉCNICA MIRACEMA-NUODEX

4.7.1. Resultados da cromatografia gasosa monodimensional

A Figura 33 apresenta o cromatograma obtido por GC/qMS para a mistura técnica Miracema-Nuodex com concentração 12 g L^{-1} injetada no modo *split* 1:50.

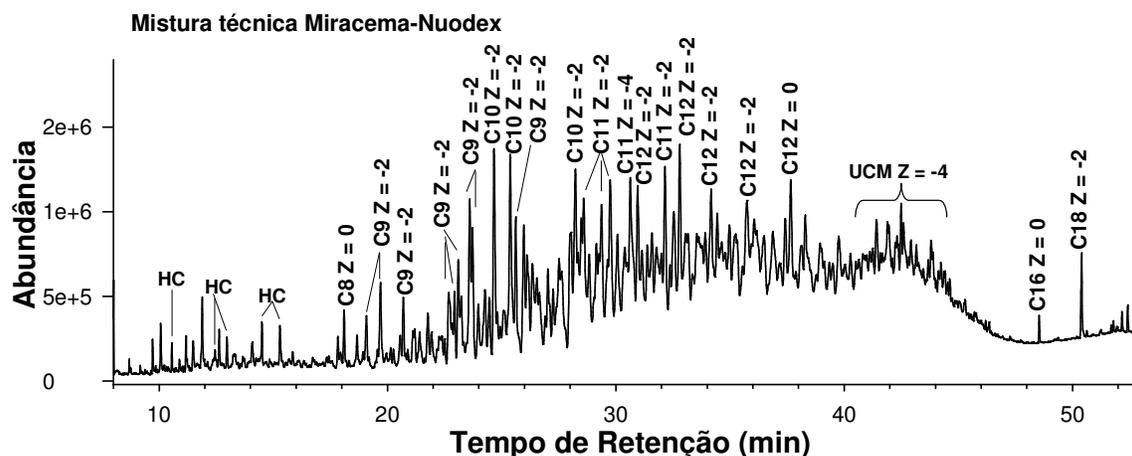


Figura 33: Cromatograma obtido por GC/qMS para a mistura técnica Miracema – Nuodex, com concentração 12 g L^{-1} injetada em modo *split* 1:50, demais condições cromatográficas segundo Tabela III, HC = hidrocarbonetos.

No início do cromatograma foi possível identificar a presença de alguns hidrocarbonetos. Além disto, há uma elevação da linha de base ao longo de todo o tempo, caracterizando uma UCM de AN. Entre 40 e 46 min, a UCM tem espectro de massas com valores de m/z típicos para compostos com dois anéis, porém com a co-eluição dos compostos não foi possível especificar o número de carbonos na estrutura. Somente os compostos com sinal mais intenso tiveram a identificação no cromatograma. Pela grande complexidade da mistura, sugere-se a presença de um número muito grande de isômeros nesta mistura.

Para uma melhor visualização, as intensidades dos íons referentes aos AN derivatizados da mistura Miracema-Nuodex em forma de percentuais, estão apresentados na Figura 34 e sumarizados na Tabela XI.

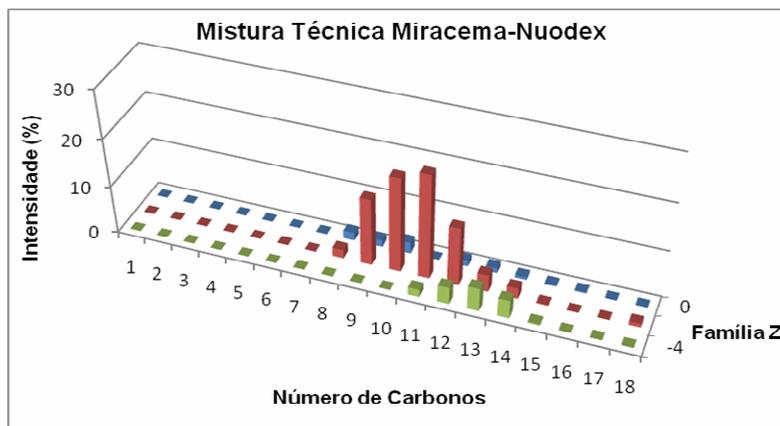


Figura 34: Distribuição da intensidade dos AN da mistura técnica Miracema-Nuodex pelo número de carbonos e família Z.

A análise da Figura 34 revela que todos os íons referentes aos AN derivatizados, identificados na mistura técnica Miracema-Nuodex, apresentam valores m/z característicos de ácidos de cadeia aberta (acíclicos), ácidos monocíclicos ($Z = -2$) e bicíclicos ($Z = -4$), com apenas um grupo carboxílico. Na mistura foram identificados aproximadamente 258 ácidos, muitos dos quais apresentam o mesmo número de átomos de carbono, mas com diferentes tempos de retenção, indicando a ocorrência de uma grande variedade de isômeros.

Tabela XI: Relação da intensidade em valores percentuais (%) dos AN na mistura técnica fornecida pela Miracema-Nuodex determinadas por GC/qMS.

Nº de Carbonos	Família Z		
	Z = 0 ^(a)	Z = -2 ^(a)	Z = -4 ^(a)
7	0,1 (2)	0,02 (1)	0
8	1,7 (9)	1,82 (7)	0
9	1,4 (15)	14,13 (26)	0
10	2,35 (4)	19,95 (26)	0
11	0	21,96 (31)	1,57 (2)
12	1,15 (2)	12,28 (34)	3,55 (8)
13	1,04 (2)	3,61 (14)	4,88 (16)
14	0,56 (3)	2,23 (12)	3,83 (28)
15	0,3 (2)	0,23 (3)	0,3 (9)
16	0,25 (1)	0	0
18	0	0,76 (1)	0
Total geral (%)	8,88	76,99	14,13

^a Número de AN encontrados com o mesmo número de C e agrupados para a indicação percentual.

Os AN acíclicos compreendem 40 compostos, com intensidade total de 8,88% e predominância para estruturas contendo 10, 12 e 13 átomos de carbono, com razão m/z 229,

257 e 271. Contudo, observa-se a maior ocorrência de AN cíclicos das séries homólogas $Z = -2$ e $Z = -4$. Os ácidos monocíclicos representam 77% da intensidade total, distribuídos entre 155 compostos e apresentando estruturas predominantes C_9 , C_{10} , C_{11} e C_{18} . Os íons que representam estes compostos possuem razão m/z 213, 227, 241 e 339, respectivamente. As estruturas bicíclicas correspondem a 14,13% da intensidade total dos ácidos identificados e estão distribuídas em 63 compostos com até 15 átomos de carbono. Dentre estes, o mais abundante apresenta estrutura com 11 átomos de carbono, com o íon característico m/z 239. Algumas propostas de estruturas dos AN identificados na amostra da mistura técnica Miracema-Nuodex estão apresentadas na Figura 35.

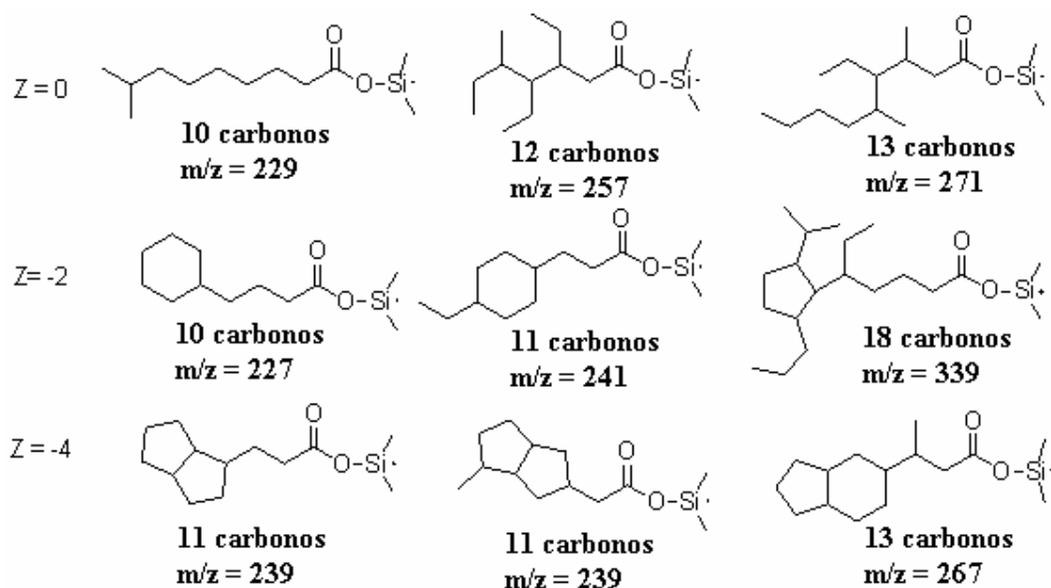


Figura 35: Proposta de estruturas para os AN identificados na amostra da mistura técnica Miracema-Nuodex.

4.7.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente

A análise preliminar da distribuição dos compostos da mistura técnica Miracema-Nuodex na cromatografia bidimensional foi realizada utilizando o sistema GC \times GC-FID. A Figura 36 apresenta o diagrama 3D obtido, onde é possível verificar a presença de um grande número de picos em todo o espaço bidimensional de separação. Na avaliação dos compostos presentes na amostra, foram considerados também os resultados obtidos por GC/qMS que indicam a ocorrência de AN acíclicos e cíclicos com $Z = -2$ e -4 , bem como de pequenas

quantidades HC. Com base nestes dados, foram destacadas no diagrama 3D as possíveis regiões de identificação dos AN e das demais classes químicas.

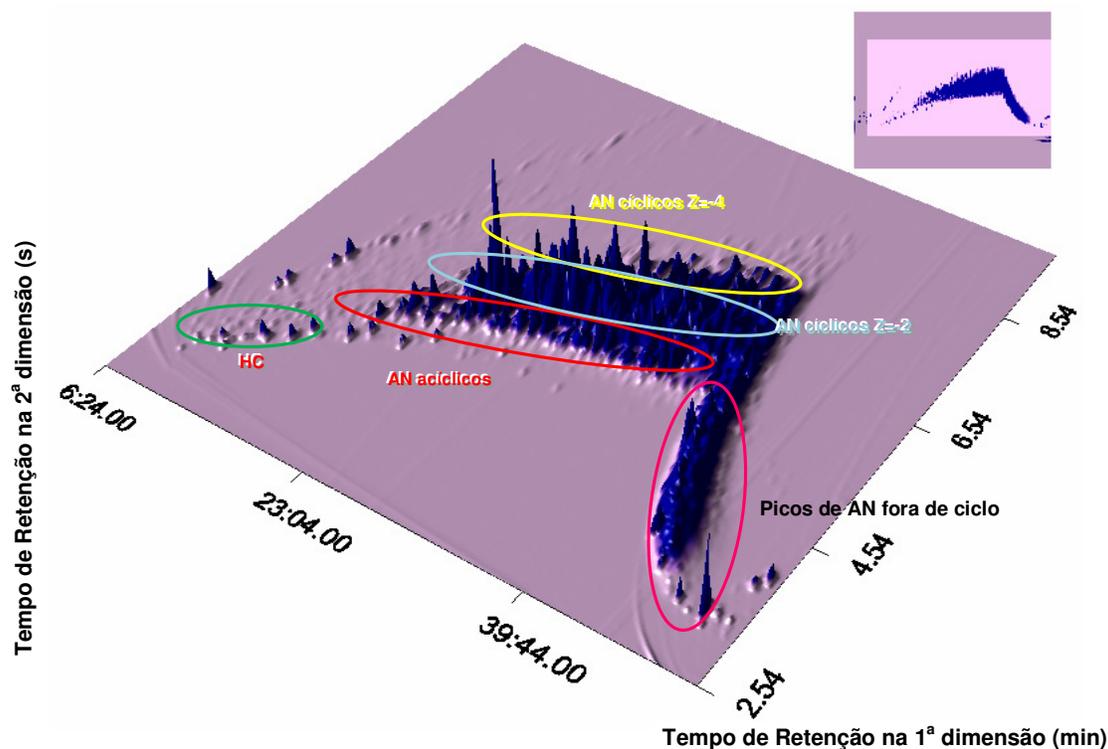


Figura 36: Diagrama 3D da mistura técnica da Miracema-Nuodex obtido por GC x GC-FID. No detalhe, o diagrama de cores do espaço de separação bidimensional total. *Condições cromatográficas descritas na Tabela IV.*

Para esta mistura técnica, existe uma ampla distribuição de picos na primeira dimensão, indicando a presença de compostos com grande variação do número de átomos carbono. Além disto, foi destacada no diagrama 3D uma região onde os picos dos AN estão fora de ciclo, ou seja, foram detectados em um tempo de eluição na segunda coluna superior ao período de modulação utilizado no método cromatográfico. Isto decorre, provavelmente, de um grande número de compostos com elevado peso molecular presentes nesta amostra.

4.7.3. Ressonância magnética nuclear

O espectro de NMR ^1H (Figura 37) apresenta sinais de ressonância característicos de ácidos acíclicos e cíclicos saturados⁶⁷. Os hidrogênios pertencentes às ramificações alquílicas dos AN possuem sinais de ressonância entre 0,7 a 2 ppm. A região entre 2 e 2,8 ppm está associada aos hidrogênios metilênicos vizinhos às carbonilas, e entre 11 e 13 ppm pode-se

observar o sinal de ressonância do hidrogênio carboxílico na forma de um singlete largo. Além disto, a ausência de sinais entre 6,0 a 8,0 ppm comprova que grupos aromáticos não estão presentes de forma significativa nesta mistura técnica.

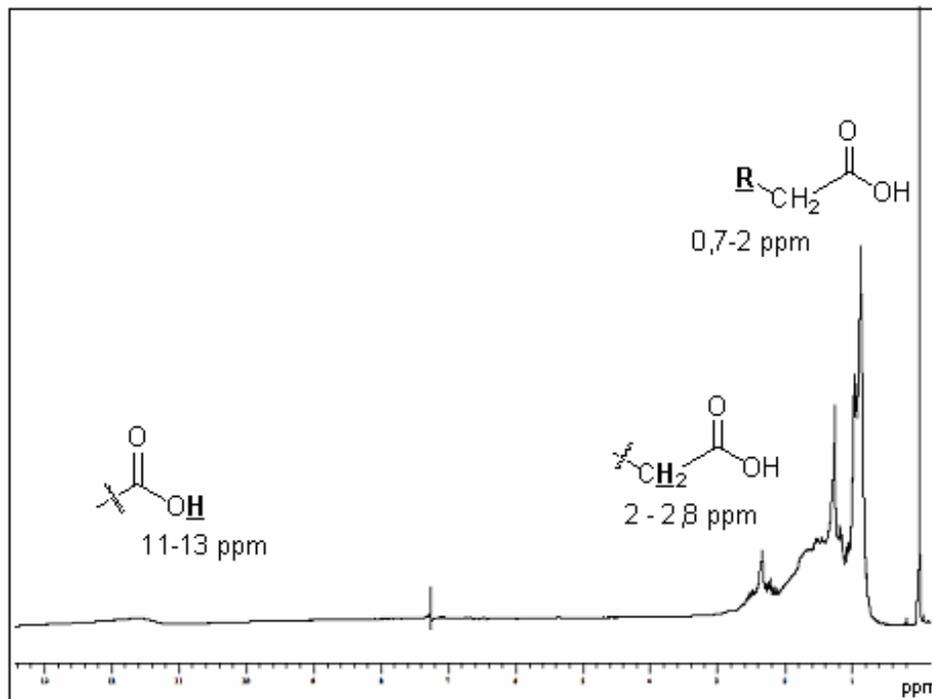


Figura 37: Espectro de NMR ^1H e deslocamento químico observado para as possíveis estruturas presentes na mistura técnica da Miracema-Nuodex.

O espectro de NMR ^{13}C em APT (Teste dos Hidrogênios Ligados) ilustrado na Figura 38 mostra os sinais dos carbonos secundários e quaternários acima da linha de base, e primários e terciários para baixo. Não é possível distinguir com precisão qual o tipo de carbono para cada sinal, mas pelo deslocamento químico pode-se confirmar que os sinais dos carbonos do grupo $-\text{COOH}$ estão distribuídos entre 179 e 185 ppm. Os sinais de carbonos metilênicos $-\text{CH}_2-$ e quaternários se encontram na região entre 26 e 43 ppm. Provavelmente, entre 11 e 23 ppm estão os sinais referentes aos carbonos pertencentes aos grupos CH_3 terminais, e entre 42 a 52 ppm, encontram-se os sinais dos carbonos ligados somente a um hidrogênio. Assim, por este espectro, pode-se verificar a presença de grande quantidade de carbonos terminais e primários, indicando ainda uma possibilidade de inúmeras ramificações nas cadeias dos ácidos.

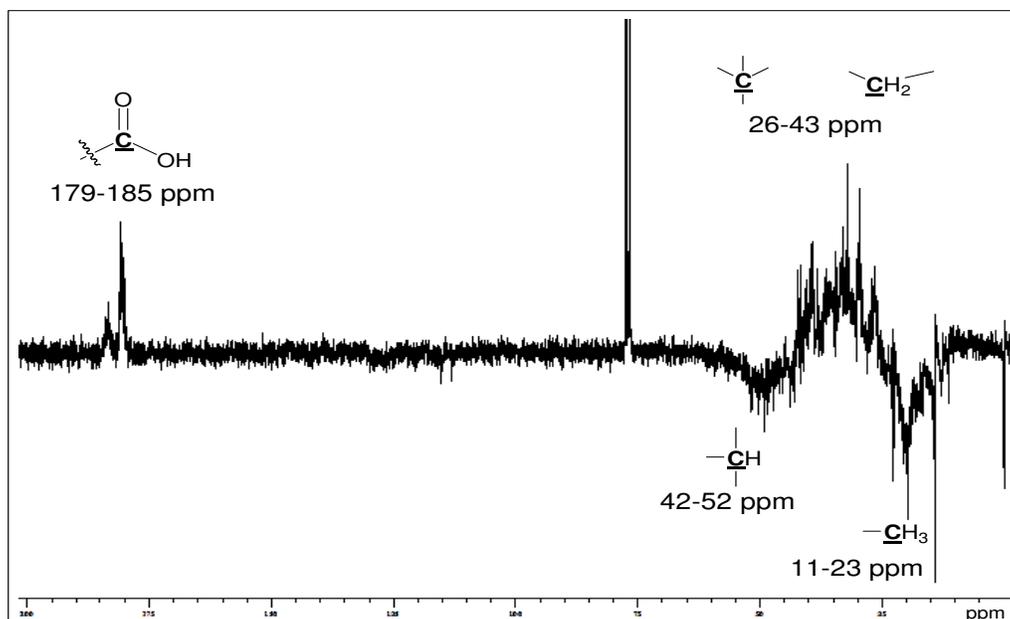


Figura 38: Espectro de NMR ^{13}C em APT e deslocamento químico observado para as possíveis estruturas presentes na mistura técnica da Miracema-Nuodex.

4.7.4. Espectroscopia no infravermelho

A Figura 39 apresenta o espectro no infravermelho da mistura técnica Miracema-Nuodex. A indicação das bandas características de ácidos orgânicos foi determinada através da presença de ácidos carboxílicos pela deformação axial de O-H em torno de 3080 cm^{-1} . Além disto, a absorção intensa em 1706 cm^{-1} se refere à deformação axial do C=O de dímero entre os ácidos carboxílicos devido à formação de ligações de hidrogênios fortes. As absorções de alcanos acíclicos e cíclicos são muito parecidas, sendo difícil a completa caracterização dos AN nas amostras. Contudo, uma informação importante é a ocorrência das bandas distintas dos grupos metil e metilênicos observadas em 1377 e 1414 cm^{-1} , que podem corresponder às estruturas cíclicas de AN⁶⁷. A ausência de absorções de aromáticos e outros interferentes confirmam as informações obtidas por NMR, o que confere certa pureza a essa mistura de AN.

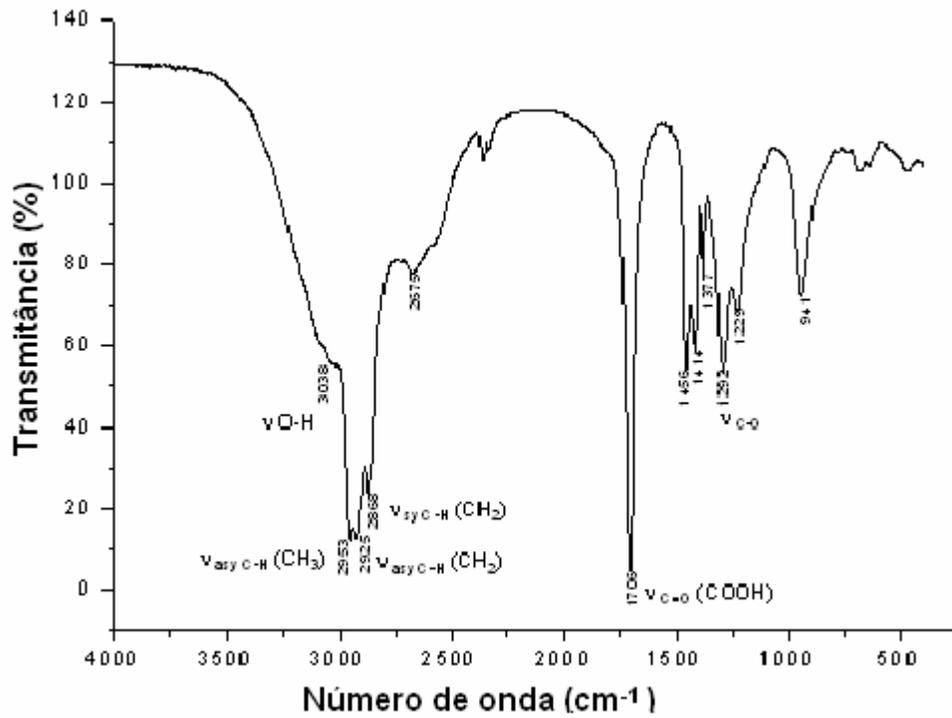


Figura 39: Espectro de FTIR e valores das absorções da mistura técnica Miracema-Nuodex.

5. CONCLUSÕES

Com o trabalho desenvolvido, pode-se estabelecer as seguintes conclusões principais:

O método de empacotamento da coluna de sílica tratada termicamente utilizada na *prepHPLC* é trabalhoso e não mostrou boa reprodutibilidade.

Nas condições de eluição propostas para a *prepHPLC* com a fase sílica gel tratada termicamente, foram identificados por GC/qMS os ácidos acíclicos da série homóloga C₉ a C₁₈ e os compostos monocíclicos pares C₈, C₁₂, C₁₄, C₁₆ e C₁₈ no extrato DCM:MeOH da amostra A2 (TAN 13,94 mg KOH g⁻¹). Na amostra A1 (TAN 6,80 mg KOH g⁻¹), extrato metanólico, foram identificados somente os ácidos acíclicos C₁₅ e C₁₇.

Através da GC × GC/TOFMS foi possível identificar a série homóloga dos ácidos acíclicos C₆ a C₂₀ na amostra A2, comprovando a melhor sensibilidade da técnica.

A ausência dos padrões adicionados nos extratos oriundos da *prepHPLC* com a fase sílica gel tratada termicamente, tanto nas análises por GC/qMS como na GC × GC, sugeriu uma adsorção muito forte na sílica, provavelmente relacionada à fina granulometria, uma vez que os padrões foram percebidos quando a mesma fase foi utilizada em cromatografia preparativa em coluna aberta.

A metodologia de modificação da sílica com KOH em isopropanol para o uso em *prepHPLC* não mostrou resultados satisfatórios para a extração de AN, pois não se percebeu a presença dos compostos ácidos oriundos da amostra A2.

Utilizando a cromatografia preparativa em coluna aberta para a amostra A2 foram identificados os padrões e a série homóloga de ácidos acíclicos de C₈ até C₁₈, com exceção C₁₇ no extrato da mistura DCM:MeOH. Contudo o solvente metanol se mostrou mais eficiente na extração de C₁₆, C₁₇ e C₁₈.

A fase SAX, quando comparada aos outros métodos propostos, mostrou-se mais eficiente para a análise de compostos ácidos de amostras de frações pesadas de petróleo, pois apresentou maior seletividade, possibilitando a pré-concentração dos AN para a análise cromatográfica.

Outra conclusão importante é que a amostra mais ácida (A2) apresentou, como esperado, a maior variedade de compostos ácidos (cíclicos e acíclicos) para todos os métodos de extração nos quais ambas as amostras foram testadas.

A mistura técnica Miracema-Nuodex é constituída em sua maioria de ácidos naftênicos com pequena quantidade de alcanos. Foram identificados por GC/qMS aproximadamente 258 ácidos distribuídos entre compostos de cadeia aberta (acíclicos), ácidos

monocíclicos ($Z = -2$) e bicíclicos ($Z = -4$), com apenas um grupo carboxílico, mas com a possibilidade de inúmeras ramificações nas cadeias dos ácidos. Como destaque das informações obtidas pelo FTIR está à diferenciação das bandas dos grupos metil e metilênicos os quais comprovam a existência de AN cíclicos.

Em relação ao procedimento analítico como um todo, concluiu-se que a derivatização empregando MTBDSTFA foi importante para a análise cromatográfica dos AN, seja pela diminuição da polaridade ou mesmo pela fragmentação diferenciada obtida no sistema de detecção por espectrometria de massas.

A extração com pré-concentração dos AN em amostra petroquímicas ainda constitui um desafio a ser vencido.

ATIVIDADES FUTURAS

Os seguintes estudos são sugeridos para continuidade deste trabalho:

- Repetir a extração utilizando SPE com a fase estacionária SAX na tentativa de estudos quantitativos;
- Utilizar a mistura técnica para testes de recuperação do método de extração com fase SAX;
- Avaliar os extratos obtidos para A1 e A2 por SPE com a fase SAX por GC × GC/TOFMS;
- Otimizar a quantidade de massa das amostras para a SPE com cartuchos amino-propil-sílica;
- Realizar a cromatografia líquida preparativa em coluna aberta com sílica termicamente tratada para a amostra A1, afim de verificar o efeito da matriz no processo de extração através da formação da UCM;
- Aprofundar a avaliação dos espectros de massas para a caracterização estrutural dos AN, através da espectrometria de massas (MS/MS);
- Confirmar as classes químicas encontradas na amostra Miracema-Nuodex através de análise por GC × GC/TOFMS;
- Avaliar a extração dos AN com *prep*HPLC utilizando colunas comerciais, tais como amino-propil-sílica e ciano-propil-sílica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tissot, B. P.; Welta, D. H.; *Petroleum Formation and Occurrence*; Heidelberg: Springer Verlag, 1984.
2. Kirk-Othmer; *Concise Encyclopedia of Chemical Technology*; V.15, 17; Interscience: New York 1984.
3. Silva, C. G. A.; Caracterização Geoquímica Orgânica das Rochas Geradoras de Petróleo das Formações Irati e Ponta Grossa da Bacia do Paraná. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Dissertação de Mestrado, 2007.
4. Oxford Dictionary of Science; Oxford University Press Inc.: New York, 2003.
5. Sklo, S. A.; *Fundamentos do refino do petróleo*; Interciência: Rio de Janeiro, 2005.
6. Thomas, J. E.; *Fundamentos de Engenharia do Petróleo*; Interciência: Rio de Janeiro, 2004.
7. Speight, J. G.; *The Chemistry and Technology of Petroleum*; Marcel Dekker: New York, 1999. Acessado no site <http://books.google.com.br/books?uid=15392598367185253451>, em agosto de 2009.
8. Jewell, D. M.; Albaugh, E. W.; Davis, B. E.; Ruberto, R. G.; *Ind. Eng. Chem.* **1974**, *13*, 278.
9. Kumar, K.; Dao, E.; Mohanty, K. K.; *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289*, 206.
10. Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 260.
11. Richardson, J. S.; Miller, D.E.; *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 765.
12. Zamora, J. V. M.; *Environ. Pollut.* **1996**, *92*, 45.
13. Zanardi, E.; Bicego, M. C.; Miranda, L. B.; Weber, L. R.; *Mar. Pollut. Bull.* **1999**, *38*, 261.
14. Sutton, P. A.; Lewis, C. A.; Rowland, S. J.; *Org. Geochem.* **2005**, *36*, 963.
15. Lochte, H. L.; *Ind. Eng. Chem.*, **1952**, *44*, 2597.
16. Seifert, W. K.; Teeter, R. M.; Howells, W. G.; Cantow, M. J. R.; *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 554.

17. Speight, J. G.; *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. IFP* **2004**, *59*, 467.
18. Ancheyta, J.; Centeno, G.; Trejo, F.; Speight, J. G.; *Catalysis Today* **2005**, *109*, 162.
19. Jewell, D. M.; Weber, J. H.; Bunger, J. W.; Plancher, H.; Latham, D. R. *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 1391.
20. Merdrignac, I.; Espinat, D.; *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. IFP* **2007**, *62*, 7.
21. Lima, H.; *Petróleo no Brasil: a situação, o modelo e a política atual*. Synergia: Rio de Janeiro, 2008.
22. Encontro Petrobras e Universidades de Novas Tecnologias para Avaliação de Petróleo; 03 de abril de **2009**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
23. Áreas de atuação: Tecnologias de refino e óleos pesados. Acessado no site http://www2.Petrobras.com.br_portugues_ads_ads_Tecnologia_html,_em agosto de 2009.
24. Albuquerque, F. C.; Cintra, R. H.; Silva, M. T.; Braga, C. M. S.; Silva, A. P. O.; Andrade, G. H.; Moura, B. R.; Pereira, R. C. L.; Guimarães, R. C. L.; Silva, P. N.; *Anais do 3º Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo e Gás*, 02 a 05 de outubro de **2005**, Salvador, Bahia, Brasil.
25. Turnbull, A.; Slavcheva, E.; Shone, B.; *Corrosion* **1998**, *54*, 922.
26. Slavcheva, E.; Shone, B.; Turnbull, A.; *Br. Corros. J.* **1999**, *34*, 125.
27. Seifert, W. K.; Teeter, R. M.; *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 786.
28. Tomczyk, N. A.; Winans, R. E.; Shinn, J. H.; Robinson, R. C. *Energy Fuels* **2001**, *15*, 1498.
29. Fan, T.; Buckley, J. S.; *Energy Fuels* **2002**, *16*, 1571.
30. Dzidic, I.; Somerville, A. C.; Raia, J. C.; Hart, H. V.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1323.
31. Yen, T.-W.; Marsh, W. P.; MacKinnon, M. D.; Fedorak, P. M.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1033*, 83.
32. Merlin, M.; Guigard, S. E.; Fedorak, P. M.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 225.
33. Scott, A. C.; Young, R. F.; Fedorak, P. M.; *Chemosphere* **2008**, *73*, 1258.
34. Clemente, J. S.; Fedorak, P. M.; *Chemosphere* **2005**, *60*, 585.
35. Nascimento, L. R.; Rebouças, L. M. C.; Koike, L.; Reis, F. de A. M.; Soldan, A. L.;

- Cerqueira, J. R.; Marsaioli, A. J.; *Org. Geochem.* **1999**, *30*, 1175.
36. Meredith, W.; Kelland, S. -J.; Jones, D. M.; *Org. Geochem.* **2000**, *31*, 1059.
37. Roques, D. E.; Overton, E. B.; Henry, C. B.; *J. Environ. Qual.* **1994**, *23*, 851.
38. Watson, J. S.; Jones, D. M.; Swannell, R. P. J.; van Duin, A. C. T.; *Org. Geochem.* **2002**, *33*, 1153.
39. Clemente, J. S.; Mackinnon, M. D.; Fedorak, P. M.; *Envir. Sci.Technol.* **2004**, *38*, 1009.
40. Barth, T.; Høiland, S.; Fotland, P.; Askvik, K. M.; Pedersen, B. S.; Borgund, A. E.; *Org. Geochem.* **2004**, *35*, 1513.
41. Borgund, A. E.; Erstad, K.; Barth, T.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149*, 189.
42. Vaz de Campos, M. C.; Oliveira, E. C.; Sanches Filho, P. J.; Piatnicki, C. M. S.; Caramão, E. B.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1105*, 95.
43. Wong, D. C. L.; van Compernelle, R.; Nowlin, J. G.; O'Neal, D. L.; Johnson, G. M.; *Chemosphere* **1996**, *32*, 1669.
44. St. John, W. P.; Righani, J.; Green, S. A.; McGinnis, G. D.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *807*, 241.
45. Hsu, C. S.; Dechert, G. J.; Robbins, W. K.; Fukuda, E. K.; *Energy Fuels* **2000**, *14*, 217.
46. Rudzinski, W. E.; Oehlers, L.; Zhang, Y.; *Energy Fuels* **2002**, *16*, 1178.
47. Qian, K.; Robbins, W. K.; Hughey, C. A.; Cooper, H. J.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; *Energy Fuels* **2001**, *15*, 1505.
48. Laredo, G. C.; Lopez, C. R.; Alvarez, R. E.; Cano, J. L.; *Fuel* **2004**, *83*, 1689.
49. Clemente, J. S.; Fedorak, P.M.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047*, 117.
50. Headley, J. V.; Peru, K. M., Barrow; M. P.; *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 121.
51. Gallegos, E. J.; Green, J. W.; Lindeman, L. P.; LeTourneau, R. L.; Teeter, R. M.; *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 1833.
52. Shen, J.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 475.
53. Holowenko, F. M.; MacKinnon, M. D.; Fedorak, P. M.; *Water Res.* **2001**, *35*, 2595.
54. Behar, F. H.; Albrecht, P.; *Org. Geochem.* **1984**, *6*, 597.

55. Galimberti, R.; Ghiselli, C.; Chiaramonte, M. A.; *Org. Geochem.* **2000**, *31*, 1375.
56. Gaines, R. B., Frysinger, G. S.; Hendrick-Smith, M., S.; Stuart, J. D.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2106.
57. Rostad, C. E.; Hostettler, F. D.; *Environ. Forensics* **2007**, *8*, 129.
58. Yu, J.; Jiang, L.; Gan, F.; *Anti-Corrosion Methods and Materials* **2008**, *5*, 257.
59. Zeinalov, E. B.; Abbasov, V. M.; Alieva, L. I.; *Pet.Chem.* **2009**, *49*, 185.
60. Qian, K.; Edwards, K. E.; Decherty, G. J.; Jaffe, S. B.; Green, L. A.; Olmstead, W. N.; *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 849.
61. Fuhr, B.; Bajac, B.; Blackmore, T.; Rahimi, P.; *Energy Fuels* **2007**, *21*, 1322.
62. Seifert, W. K.; Teeter, R. M.; *Anal. Chem.* **1970**, *42*, 180.
63. Wang, Y.; Chu, Z.; Qiu B.; Liu, C.; Zhang, Y.; *Fuel* **2006**, *85*, 2489.
64. Pasadakis, N.; Gaganis, V.; Varotsis, N.; *Fuel* **2001**, *80*, 147.
65. Kaminski, M.; Kartanowicz, R.; Gilgenast, E.; Namiesnik, J.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2005**, *35*, 193.
66. Borgund, A. E.; Erstad, K.; Barth, T.; *Energy Fuels* **2007**, *21*, 2816.
67. Saab, J.; Mokbel, I.; Razzouk, A. C.; Ainous, N.; Zydowicz, N.; Jose, J.; *Energy Fuels* **2005**, *19*, 525.
68. Jones, D. M.; Watson, J. S.; Meredith, W.; Chen, M.; Bennett, B.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 703.
69. Kharrat, A. M.; Zacharia, J.; Cherian, V. J.; Anyatonwu, A.; *Energy Fuels* **2007**, *21*, 3618.
70. Fan, T.; Buckley, J. S.; *Energy Fuels* **2002**, *16*, 1571.
71. Radke, M.; Willsch, H.; Welte, D. H.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 406.
72. Wilsch, H.; Clegg, H.; Horsfield, B.; Radke, M.; Wilkes, H.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4203.
73. Caramão, E. B.; Gomes, L. M. F.; Oliveira, M. D.; Bristoti, A.; Lanças, F. M.; *Fuel Sci. Technol.* **1990**, *8*, 881.
74. Lanças, F. M.; Caramão, E. B.; *Fuel Sci. Technol.* **1996**, *14*, 417.
75. Miller, R.; *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1742.

76. Green, J. B.; Stierwalt, B. K.; Thomson, J. S.; Treese, C. A.; *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2207.
77. Green, J. B.; *J. Chromatogr. A* **1986**, *358*, 53.
78. Liu, Z. Y.; Phillips, J. B.; *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 227.
79. Mühlen, C. V.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1005*, 39.
80. Mühlen, C. V.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 682.
81. Mühlen, C. V.; Caracterização química de compostos nitrogenados do petróleo brasileiro e de óleos voláteis de plantas brasileiras usando cromatografia gasosa bidimensional abrangente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Tese de Doutorado, 2007.
82. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 438.
83. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 540.
84. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U.A.Th.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 69.
85. Marriott, P. J.; Shellie, R.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 573.
86. Holowenko, F. M.; MacKinnon, M. D.; Fedorak, P. M.; *Water Res.* **2002**, *36*, 2843.
87. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 331.
88. van Deursen, M.; Beens, J.; Reijenga, J.; Lipman, P.; Cramers, C.; Blomberg, J.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **2002**, *23*, 507.
89. Islas-Flores, C. A.; Buenrostro-Gonzalez, E.; Lira-Galeana, C. *Energy Fuels* **2005**, *19*, 2080.