



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA MATEMÁTICA E DA TERRA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA**

PAULA LOPES DE AZEVEDO

**PTV-GC×GC-TOFMS: UMA PROMISSORA TÉCNICA PARA ANÁLISE
DE BIOMARCADORES PESADOS EM ÓLEOS BRASILEIROS**

RIO DE JANEIRO

2014


PTV-GC×GC-TOFMS: UMA PROMISSORA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES PESADOS EM ÓLEOS BRASILEIROS

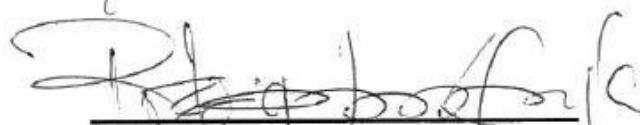
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Química com Atribuições Tecnológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Campo de conhecimento: Química Orgânica

Data da aprovação: 18 / 12 / 2014

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Débora A. Azevedo


Prof. Dr. Rodrigo José Correa


Dra. Bárbara M. Fernandez Avila

ORIENTADORA: DÉBORA DE ALMEIDA AZEVEDO

CO-ORIENTADOR: ALESSANDRO CASILLI

RIO DE JANEIRO

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e de meu curso. Em especial:

À minha orientadora, Débora de Almeida Azevedo, e à meu co-orientador, Alessandro Casilli, pelo apoio e oportunidade ao longo desse ano e, principalmente, por acreditarem e confiarem em mim e no meu potencial de conclusão deste trabalho.

À banca avaliadora, Rodrigo José Correa e Bárbara Ávila, em ter aceitado o meu convite e por dividir comigo suas sugestões e conhecimento, contribuindo assim para melhora deste trabalho.

A todos os professores cujo apoio permitiu que eu chegasse até aqui, em especial, aos professores Maria da Conceição Klaus Vanderley Ramos, Márcio Contrucci Saraiva Mattos e Marcello Barbosa da Silva Neto.

Aos meus pais, Sandra Elena do Espírito Santo e Paulo Lopes de Azevedo Filho, pelo apoio e carinho incessantes, que mesmo nos momentos mais difíceis não desistiram de mim e de me ajudar concedendo conselhos valiosos.

Ao meu padrasto, Carlos Magno Cardoso, que desde os meus 6 anos me acolheu como filha me dando todo o ensinamento e apoio sentimental, mental e financeiro necessário para que eu crescesse e chegasse aonde estou hoje.

Ao meu namorado, Tiago Leite Rittmeyer, por estar todos os dias desta luta acreditando tanto em meu potencial, mas acima de tudo, pelo carinho, compreensão e enorme paciência nesses anos de faculdade. E, também, à sua família, por todo apoio e incentivo dados durante este período.

Aos meus amigos do IQ e do trabalho, Viviane Azevedo, Ana Clara Bauerfeldt, Nathália Spalenza, Elaine Marotta, Raquel Vieira, Karen Trevizani, Daniella Fernandes, Vinícius Pereira, Carlos Bulchi, Bruno Quirino e muitos outros que não cabem nessa folha, pelos momentos que me fizeram passar nesses últimos anos.

RESUMO

TÍTULO: PTV-GC×GC-TOFMS: UMA PROMISSORA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES PESADOS EM ÓLEOS BRASILEIROS

ALUNO: Paula Lopes de Azevedo

ORIENTADOR: Débora de Almeida Azevedo, DQO- Instituto de Química- UFRJ

CO-ORIENTADOR: Alessandro Casilli, LADETEC- UFRJ

Os biomarcadores estão entre os componentes mais importantes da geoquímica de petróleo. São utilizados como indicadores de origem de óleos e rochas geradoras, na determinação da maturação térmica de óleos e em estudos sobre biodegradação do petróleo.

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) é uma técnica multidimensional que tem mostrado grande potencial na investigação de misturas complexas, como o petróleo. Para a detecção, normalmente, é acoplado um espectrômetro de massas (MS), onde o espectro de massas nos fornece informações a respeito da estrutura química, tornando a técnica uma poderosa ferramenta na identificação individual dos compostos.

A GC×GC-TOFMS é empregada na detecção e identificação de biomarcadores combinada com injeções do tipo *split/splitless*. Neste modo de injeção há um efeito de discriminação dos compostos de alto ponto de ebulição, pois na análise de uma mistura com múltiplos analitos dentro de um injetor aquecido, os compostos passam para a fase gás em diferentes taxas. Isso significa que uma quantidade elevada de amostra será eliminada pela divisão de fluxo. Na tentativa de solucionar este efeito pode-se utilizar injeções na coluna à frio (*on column*) ou por vaporização com temperatura programada (PTV).

O objetivo deste trabalho foi investigar a utilização do injetor PTV na análise da fração de hidrocarbonetos saturados de petróleos brasileiros por GC×GC-TOFMS, na tentativa de detectar e identificar biomarcadores de petróleo com mais de 35 átomos de carbono.

As frações foram analisadas por um sistema Pegasus 4D (Leco) em configuração PTV-GC×GC-TOFMS. Na ¹D foi utilizada uma coluna apolar (DB-5HT) e na ²D uma coluna relativamente polar (MEGA-17HT FAST). Os analitos foram analisados através de cromatogramas de íons extraídos.

Portanto, com o sistema PTV-GC×GC-TOFMS, foram detectados e identificados os alcanos lineares até C₄₅, a série homóloga dos hopanos de C₂₇ a C₃₈ e terpanos tricíclicos até C₄₅. Normalmente os hopanos são detectados até o C₃₅ e os terpanos tricíclicos até C₄₁, sendo os C₃₆, C₃₇ e C₃₈, e os terpanos tricíclicos C₄₃, C₄₄ e C₄₅, raramente detectados em óleos. A informação fornecida pelo espectrômetro de massas, junto com a posição relativa na série homóloga, possibilitou uma identificação confiável dos hopanos C₃₆ e C₃₇. A investigação destes biomarcadores por PTV, associada a separação por GC×GC e a detecção por TOFMS permitiram a elucidação de biomarcadores de alta massa molecular. O sistema PTV gerou picos com uma maior razão sinal/ruído, mesmo utilizando o *split* 1:10, com relação ao *splitless*. Este fato permitiu uma maior sensibilidade e conseqüentemente a detecção de analitos em concentrações mais baixas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biomarcadores e seus precursores biológicos (Adaptado de PETERS *et al.*, 2005a).

Figura 2. Estrutura geral do terpano tricíclico até C₄₅, ressaltando a presença de carbonos assimétricos nas posições C-13, C-14, C-22, C-27, C-32, C-37 e C-42 e a fragmentação que dá origem ao íon diagnóstico *m/z* 191 (Adaptado de AQUINO NETO *et al.*, 1983).

Figura 3. Estrutura do terpano tetracíclico C₂₄ (Adaptado de PETERS *et al.*, 2005b).

Figura 4. Estrutura do 17 α (H),21 β (H)-hopano C₃₀ (H30) (Adaptado de PETERS e MOLDOWAN, 1991).

Figura 5. Esquema representativo de um sistema GC \times GC, onde: I, injetor; M, modulador; D, detector; ¹D, coluna cromatográfica da primeira dimensão e ²D, coluna cromatográfica da segunda dimensão (Adaptado de DALLÜGUE *et al.* 2003).

Figura 6. Exemplo de cromatograma estruturado (Adaptado de VENTURA *et al.*, 2008).

Figura 7. Exemplo de cromatograma estruturado (Adaptado de TRAN *et al.*, 2010).

Figura 8. Comparação entre a capacidade de pico de sistemas GC convencionais (GC), multidimensionais *heart-cut* (GC-GC) e multidimensionais abrangentes (GC \times GC) (Adaptado de GIDDINGS, 1987).

Figura 9. Geração e visualização do cromatograma bidimensional em GC \times GC (PEDROSO *et al.*, 2009).

Figura 10. Esquema de vaporizador (injetor) típico para injeções com divisão de fluxo (*split*) (Adaptado DEL GRANDE, 2012).

Figura 11. Esquema de vaporizador (injetor) típico para injeções sem divisão de fluxo (*splitless*) (Adaptado DEL GRANDE, 2012).

Figura 12. Esquema do injetor a frio na coluna (*cold on column*). (Adaptado de DEL GRANDE, 2012).

Figura 13. Esquema do injetor de vaporização com temperatura programada (PTV) (Adaptado de DEL GRANDE, 2012).

Figura 14. Corpo externo (1) e interno (2) do injetor PTV, destacando a serpentina controladora de temperatura (www.gopixpic.com, acesso em 05/12/2014).

Figura 15. Esquema de análises utilizado neste trabalho.

Figura 16. Comparação entre os cromatogramas dos padrões de parafinas (C_{14} - C_{40}) a $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, utilizando os modos de injeção PTV – *Split* 1:10 e *Split/splitless* – *Splitless*.

Figura 17. Cromatograma do íon extraído m/z 85 da solução de padrões de parafinas (C_{14} - C_{40}) a $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ em *n*-hexano. Modo de injeção: (a) PTV – *Split* 1:10 e (b) *Split/Splitless* – *Splitless*.

Figura 18. Cromatograma bidimensional do íon extraído m/z 85 da fração de *n*-alcanos do óleo 1 no modo de injeção PTV-*Split* 1:10.

Figura 19. Espectro de massas dos alcanos tridecano (C_{13}) e do henicossano (C_{21}), que são mostrados no cromatograma bidimensional na **Figura 18**.

Figura 20. Espectro de massas do hentriacontano (C_{31}) com ampliação da região onde se encontra seu íon molecular ($M^{+•}436$).

Figura 21. Espectro de massas do dotetracontano, *n*-alcano C_{42} .

Figura 22. Cromatograma modulado do íon extraído m/z 85 da fração de *n*-alcanos referente ao óleo A.

Figura 23. Fragmentos característicos dos hopanos estendidos na fração de hidrocarbonetos saturados (Retirado de WANG *et al.*, 1996).

Figura 24. Cromatograma do íon extraído m/z 191 do óleo Y1900 (Retirado de LI *et al.*, 2014).

Figura 25. Cromatograma do íon extraído m/z 191 dos terpanos tricíclicos (Retirado de MOLDOWAN *et al.*, 1983).

Figura 26. Cromatograma do íon extraído m/z 191 dos terpanos tricíclicos (Retirado de DE GRANDE *et al.*, 1993).

Figura 27. Cromatograma do íon extraído m/z 191 da fração de saturados da amostra E.

Figura 28. Espectros de massas do Hopano 36 (22*S*-17 α (H), 21 β (H)-30-hexakishomopano e 22*R*-17 α (H), 21 β (H)-30-hexakishomopano) e do Hopano 37 (22*S*-17 α (H), 21 β (H)-30-heptakishomopano e 22*R*-17 α (H), 21 β (H)-30-heptakishomopano).

Figura 29. Espectro de massas do terpano tricíclico Tr₃₄.

Figura 30. Espectro de massas do terpano tricíclico Tr₃₉.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos principais injetores e sua classificação.

Tabela 2. Massa (g) da amostra e das frações de hidrocarbonetos saturados, compostos aromáticos e compostos polares.

Tabela 3. Massa (g) da amostra e das frações de hidrocarbonetos saturados, *n*-alcanos e hidrocarbonetos cíclicos e ramificados.

ABREVIATURAS E SIGLAS

¹D – Primeira Dimensão

²D – Segunda Dimensão

³D – Terceira dimensão

GC – Cromatógrafo a Gás

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

GC×GC – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente

GC×GC-TOFMS – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo

HT-GC×GC-FID – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente de Alta Temperatura acoplada à Espectrometria de Massas com Detector de Ionização por Chama.

PTV-GC×GC-TOFMS – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo com injetor de vaporização com temperatura programada

CIE – Cromatograma de Íons Extraídos

MS – Espectro de Massas

TOFMS – Espectrometria de Massas por Tempo de Voo

SARA – Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Petróleo.....	11
1.2 Biomarcadores.....	11
1.2.1 Terpanos tricíclicos.....	12
1.2.2 Terpanos tetracíclicos.....	13
1.2.3 Terpanos pentacíclicos.....	14
1.3 Técnicas cromatográficas.....	15
1.4 Princípios básicos da GC×GC.....	16
1.5 Injetores.....	21
1.5.1 Técnica de injeção à quente.....	21
1.5.2 Técnicas de injeção à frio.....	23
1.5.2.1 Injetor à frio na coluna (<i>on column</i>).....	24
1.5.2.1 Injetor PTV.....	25
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVO.....	30
4. EXPERIMENTAL.....	31
4.1 Amostras.....	31
4.2 Reagentes e Vidrarias.....	31
4.3 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna.....	31
4.4 Separação por aduto de uréia.....	32
4.5 Avaliação do tipo de injeção.....	34
4.6 Instrumentação e Condições Cromatográficas.....	34
4.6.2 Métodos de injeção.....	34
4.6.1.1 PTV (modo <i>split</i> 1:10) com programação de temperatura do injetor de 50 °C a 350 °C.....	34
4.6.1.2 <i>Split/splitless</i> (modo <i>splitless</i>) com temperatura do injetor a 350 °C.....	34
4.6.2 GC×GC-TOFMS.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna.....	36
5.2 Separação por aduto de uréia.....	37
5.3 Análises no GC×GC-TOFMS.....	37
6. CONCLUSÃO.....	47

7. REFERÊNCIAS.....	48
8. APÊNDICE.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de diversas classes de substâncias, predominantemente de hidrocarbonetos (saturados e aromáticos), além de compostos que contêm quantidades variáveis de nitrogênio, enxofre e oxigênio, de pequenas quantidades de metais como níquel, vanádio e outros elementos. O petróleo é originado a partir da transformação da matéria orgânica depositada nas bacias sedimentares. Com o progressivo soterramento, a matéria orgânica passa por uma série de transformações físico-químicas que podem ser agrupadas de acordo com os seguintes estágios evolutivos: diagênese, catagênese e metagênese (SPEIGHT, 2006; TISSOT e WELTE, 1984; PETERS e MOLDOWAN, 1993).

A diagênese é o processo inicial de alteração da matéria orgânica sob condições de soterramento incipiente e baixas temperaturas (geralmente menores que 50°C). Na diagênese, as alterações ocorrem principalmente devido à atividade microbiana. Ao final desta etapa é formado o querogênio, constituinte da matéria orgânica das rochas sedimentares insolúvel em solventes orgânicos. A catagênese ocorre em uma faixa de temperatura de 50 a 150°C e uma pressão de 300 a 1000/1500 bars. Nesta etapa, o querogênio gera principalmente hidrocarbonetos líquidos. A metagênese, última fase da evolução da matéria orgânica sedimentar, ocorre em uma faixa de temperatura de 150 a 200°C e pressões mais elevadas. Neste estágio são formados os hidrocarbonetos líquidos e gasosos de massa molecular progressivamente menor. Uma vez formado, devido a um aumento da pressão na rocha geradora, o petróleo é expulso para rochas mais porosas e permeáveis (rochas reservatório), até ser trapeado por uma rocha “selante” de baixa permeabilidade, formando assim as acumulações de óleo e gás. O óleo que migrou herda as características geoquímicas de sua rocha de origem (TISSOT e WELTE, 1984; PETERS *et al.*, 2005a).

1.2 Biomarcadores

Na fração dos hidrocarbonetos saturados do petróleo encontram-se os principais biomarcadores, que são compostos que sofreram pouca ou nenhuma alteração em relação às estruturas hidrocarbônicas das moléculas orgânicas que lhes deram origem (**Figura 1**). Dessa forma, apresentam uma relação inequívoca com os compostos naturais presentes nos organismos vivos (TISSOT e WELTE, 1984; PETERS *et al.*, 2005a).

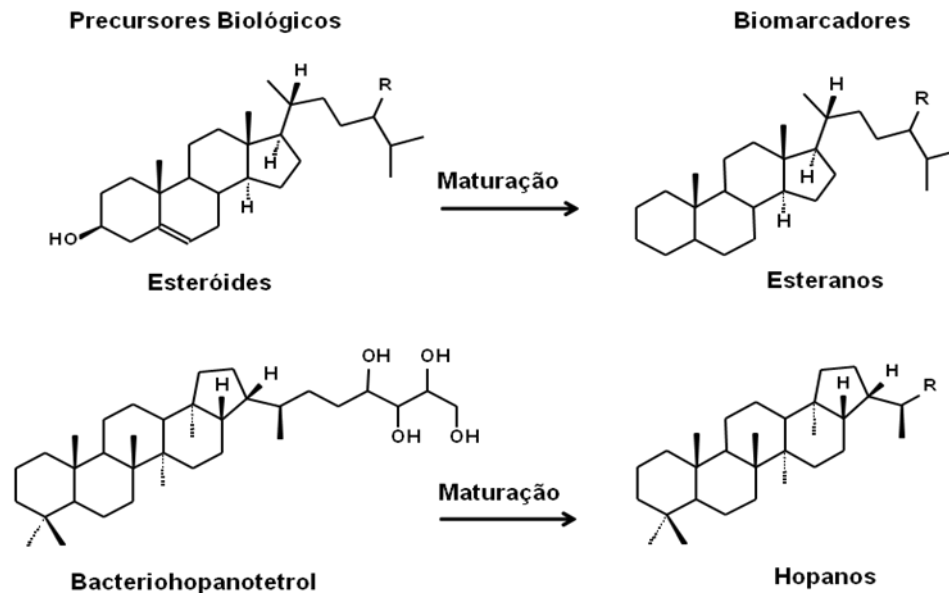


Figura 1. Biomarcadores e seus precursores biológicos. (Adaptado de PETERS *et al.*, 2005a).

Os biomarcadores estão entre os componentes mais importantes da geoquímica de petróleo. Sua distribuição diferenciada em rochas e óleos forma uma espécie de “impressão digital”, amplamente utilizada em correlações óleo-óleo e óleo-rocha geradora. A análise química de biomarcadores em óleos gera informações importantes sobre o paleoambiente deposicional (lacustre, terrestre, marinho), origem da matéria orgânica na rocha geradora, tipos de organismos vivos presentes naquele ambiente (bactérias, algas e plantas superiores), condições ambientais durante a deposição e soterramento, maturação térmica da rocha ou óleo, idade geológica aproximada da rocha geradora e o grau de biodegradação do óleo. Combinadas com outras ferramentas, essas informações são utilizadas para fornecer interpretações geológicas mais confiáveis que ajudam na resolução de problemas de exploração, desenvolvimento e produção de petróleo, além de problemas ambientais. Dentre as classes de biomarcadores se destacam os terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos (KILLOPS e KILLOPS, 2005; PETERS *et al.*, 2005a).

1.2.1 Terpanos tricíclicos

Os terpanos tricíclicos (**Figura 2**) são geralmente utilizados para correlacionar óleos crus e extratos de rochas geradoras, prever as características dos ambientes deposicionais e avaliar o grau de evolução térmica e biodegradação de óleos (PETERS, 2000). MOLDOWAN e colaboradores (1983) mostraram que as séries homólogas de terpanos tricíclicos têm início em C₁₉ e podem se estender até C₄₅ em amostras de óleos crus. Posteriormente, em um

estudo realizado em óleos e extratos de rochas geradoras brasileiras, em um sistema de cromatografia gasosa de alta temperatura, DE GRANDE e colaboradores (1993) verificaram que as séries de terpanos tricíclicos podem alcançar até C₅₄. No entanto, estas séries são geralmente observadas, em cromatografia gasosa unidimensional, até C₂₉ nas amostras de petróleo, pois os compostos de maior massa molecular estão em coeluição com os terpanos pentacíclicos, no cromatograma do íon extraído m/z 191.

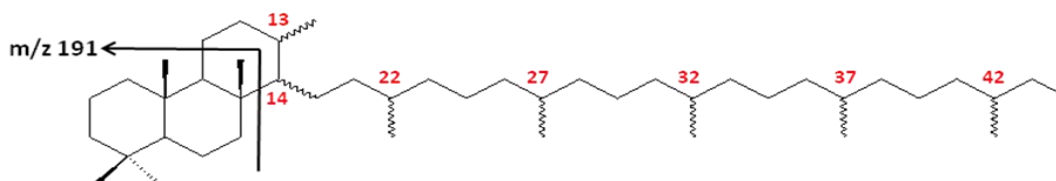


Figura 2. Estrutura geral do terpano tricíclico até C₄₅, ressaltando a presença de carbonos assimétricos nas posições C-13, C-14, C-22, C-27, C-32, C-37 e C-42 e a fragmentação que dá origem ao íon diagnóstico m/z 191. (Adaptado de AQUINO NETO *et al.*, 1983).

Não há uma origem inequívoca estabelecida, ou uma condição de deposição específica para explicar a presença da série de terpanos tricíclicos no petróleo. Apesar disso, estes compostos têm sido utilizados com sucesso na caracterização de extratos de rochas geradoras e óleos brutos, bem como na avaliação do grau de biodegradação devido à sua relativa resistência a este processo (PETERS, 2000; OLUKAYODE *et al.*, 2010).

1.2.2 Terpanos tetracíclicos

Os terpanos tetracíclicos estão relacionados com precursores hopanoides pentacíclicos de origem microbiana, e podem ter sido originados a partir da clivagem da ligação entre C-17 e C-21 durante a diagênese precoce ou durante o processo de maturação (AQUINO NETO *et al.*, 1983).

A abundância do terpano tetracíclico C₂₄ (**Figura 3**) ou, alternativamente, a proporção de terpano tetracíclico C₂₄ em relação aos terpanos tricíclicos ou hopanos pode ser relacionada à origem da matéria orgânica da rocha geradora. Portanto, as diferenças na distribuição destes compostos podem ser utilizadas para classificação do ambiente deposicional de óleos (FARRIMOND *et al.*, 1999; GRICE *et al.*, 2001; ZHANG e HUANG, 2005).

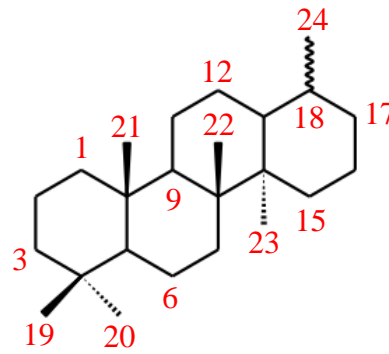


Figura 3. Estrutura do terpano tetracíclico C₂₄. (Adaptado de PETERS *et al.*, 2005b).

1.2.3 Terpanos pentacíclicos

Os terpanos pentacíclicos (**Figura 4**) são uma classe de biomarcadores onipresente em sedimentos e óleos, amplamente utilizado em estudos geoquímicos. Seus precursores biossintéticos, os biohopanoides tais como o bacteriohopanotetrol, são sintetizados como constituintes da membrana por várias de bactérias, incluindo cianobactérias e bactérias metanotróficas. Estes compostos são capazes de fornecer informações relacionadas à contribuição da biomassa bacteriana aos sedimentos, além de permitir inferir as condições paleoambientais e a idade de deposição da matéria orgânica na rocha geradora. Os hopanos têm sido vastamente empregados em estudos de exploração de petróleo como biomarcadores de origem e indicadores de maturação térmica, em correlações entre óleos crus e entre óleos e extratos de rochas geradoras (PETERS *et al.*, 2005b; SINNINGHE DAMSTÉ *et al.*, 1995; WATSON e FARRIMOND, 2000; INNES *et al.*, 1997).

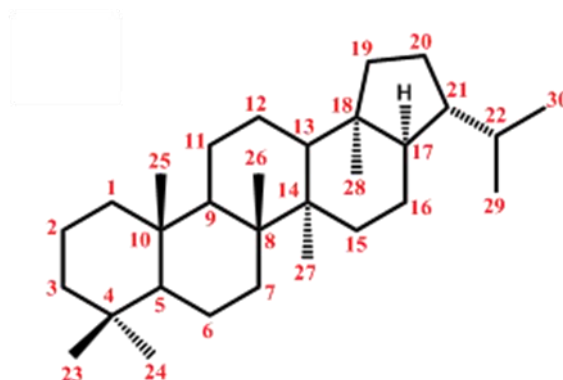


Figura 4. Estrutura do 17 α (H),21 β (H)-hopano C₃₀ (H₃₀) (Adaptado de PETERS e MOLDOWAN, 1993).

1.3 Técnicas cromatográficas

A identificação das substâncias individuais, contidas em misturas complexas como o petróleo, é normalmente alcançada por uma série de separações físico-químicas e cromatográficas. A cromatografia gasosa unidimensional (GC) é amplamente utilizada na análise deste tipo de amostras, porém não possui o poder de separação necessária, nem a resolução cromatográfica adequada, para uma caracterização química completa dos componentes individuais, pois muitas coeluições são observadas (ÁVILA, 2010; KIEPPER, 2013).

Buscando melhores resoluções para estas matrizes complexas, nas últimas décadas grandes esforços foram direcionados para o desenvolvimento de sistemas cromatográficos de análise mais eficientes. Nos anos 60, a abordagem cromatográfica multidimensional foi introduzida. A análise multidimensional em cromatografia pode ser considerada como qualquer técnica que combine duas ou mais separações distintas (ou etapas analíticas), onde pelo menos um dos passos envolve uma separação cromatográfica. Dessa forma, LC-GC (cromatografia líquida acoplada à cromatografia gasosa), GC-GC (cromatografia gasosa bidimensional do tipo *heart-cut*) e GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) são técnicas tipicamente multidimensionais. Ao direcionarmos a atenção para os métodos que envolvam duas dimensões de separação, notamos que a LC-GC é uma técnica que busca simplificar uma mistura de substâncias que será separada por GC, através da redução da sobreposição de diferentes classes. Cada fração eluída do sistema de LC é direcionada para o GC, onde é analisada individualmente. Da mesma forma, a GC-GC é capaz de isolar pequenas regiões de uma separação primária da amostra e transferi-las para uma segunda coluna com seletividade diferenciada, que irá promover um aumento da separação dos picos cromatográficos da região de *heart-cut* selecionada. Entretanto, nenhuma destas técnicas é capaz de fornecer a resolução necessária para todos os componentes individuais da amostra (MARRIOTT e SHELLIE, 2002; ADAHCHOUR *et al.*, 2006a).

Dentre as técnicas multidimensionais, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) tem mostrado um grande potencial na investigação de amostras complexas ou de difícil resolução cromatográfica, surgindo como uma poderosa alternativa para a solução dos problemas e limitações observados em análises por GC unidimensional. Na GC×GC, uma única corrida cromatográfica gera um aumento significativo da capacidade de

separação, e o objetivo de uma resolução detalhada dos componentes da amostra pode ser efetivamente alcançado (AGUIAR *et al.*, 2010; MARRIOTT e SHELLIE, 2002).

1.4 Princípios básicos da GC×GC

A GC×GC, desenvolvida por John Phillips e colaboradores em 1991, é caracterizada pela utilização sequencial de duas colunas cromatográficas, uma convencional e outra mais curta e estreita (do tipo *fast*), conectadas em série através de um modulador (**Figura 5**). O sistema de modulação entre as duas colunas tem como funções principais “fatiar” e refocalizar as frações que eluem da primeira coluna, causando assim uma compressão das bandas cromatográficas, e direcioná-las para segunda coluna, onde a eluição é muito rápida. Toda a amostra injetada na primeira coluna ou uma parte representativa da mesma é transferida para a segunda coluna e para o detector – por isso o uso do adjetivo abrangente, do inglês *Comprehensive* (ADAHCHOUR *et al.*, 2006a; SCHOENMAKERS *et al.*, 2000).

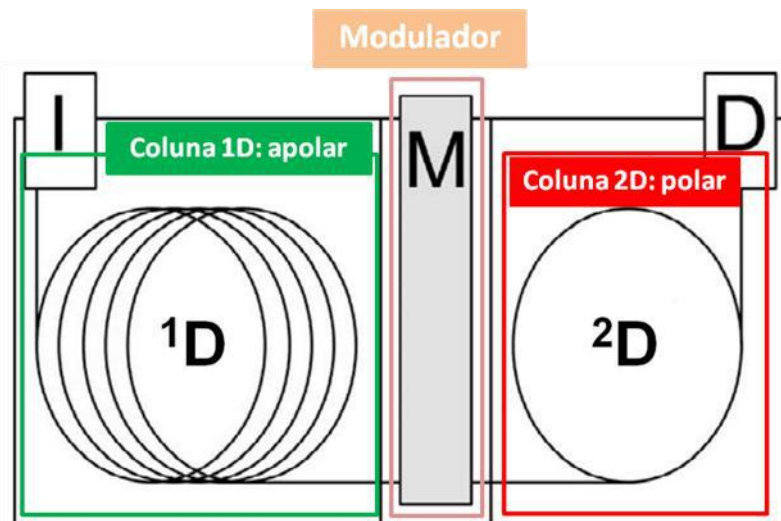


Figura 5. Esquema representativo de um sistema GC×GC, onde: I, injetor; M, modulador; D, detector; ¹D, coluna cromatográfica da primeira dimensão e ²D, coluna cromatográfica da segunda dimensão (Adaptado de DALLÜGE *et al.*, 2003).

Os sistemas de GC×GC podem possuir apenas um forno, apresentando assim condições idênticas de programação de temperatura para ambas as colunas, ou com dois fornos diferentes, permitindo que a programação de temperatura da segunda coluna seja mais flexível e independente. A programação de temperatura do segundo forno é sempre mais elevado que o do primeiro forno.

Os períodos de modulação devem ser ajustados a fim de que sejam compatíveis com o tempo de separação na segunda coluna, minimizando o alargamento da banda. Desta maneira, a sensibilidade e a resolução são significativamente aumentadas quando comparada às da GC unidimensional.

Idealmente, para atender ao princípio da ortogonalidade, as duas colunas utilizadas em GC×GC devem apresentar fases estacionárias com mecanismos de retenção diferentes e independentes um do outro. A combinação de duas colunas cromatográficas com mecanismos de separação ortogonais (ou quase ortogonais) entre si leva a um significativo aumento da seletividade. A forma mais tradicional de separação ortogonal em GC×GC é a chamada “fase normal”, que ocorre quando uma primeira coluna com uma fase estacionária apolar (ou de baixa polaridade) é associada a uma segunda coluna com uma fase estacionária polar (ou relativamente polar). Neste caso, a separação dos analitos na primeira dimensão (¹D) se baseia na volatilidade, enquanto na segunda dimensão (²D) a separação é baseada na polaridade ou estrutura molecular. A utilização de uma coluna polar na ¹D e uma coluna apolar na ²D caracteriza a chamada “fase inversa” (DALLÜGUE *et al.*, 2003; TRAN *et al.*, 2010; VAN DEURSEN *et al.*, 2000; VON MÜHLEN *et al.*, 2006; VENDEUVRE *et al.*, 2007; ÁVILA, 2010).

Os dois mecanismos de separação da GC×GC leva à obtenção de cromatogramas estruturados (**Figura 6 e Figura 7**), onde os compostos são distinguidos no plano cromatográfico por suas classes e estruturas químicas específicas. Picos de substâncias relacionadas estruturalmente – séries homólogas, isômeros de cadeia ou de posição – aparecem agrupados em regiões claramente definidas no cromatograma bidimensional (PEDROSO *et al.*, 2009).

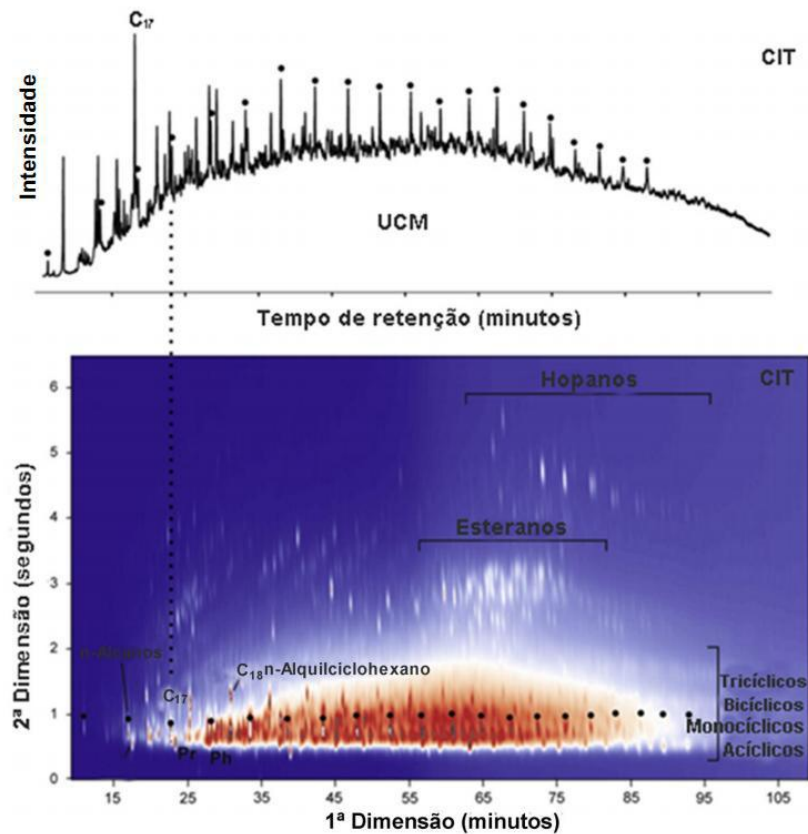


Figura 6. Exemplo de cromatograma estruturado (Adaptado de VENTURA *et al.* 2008).

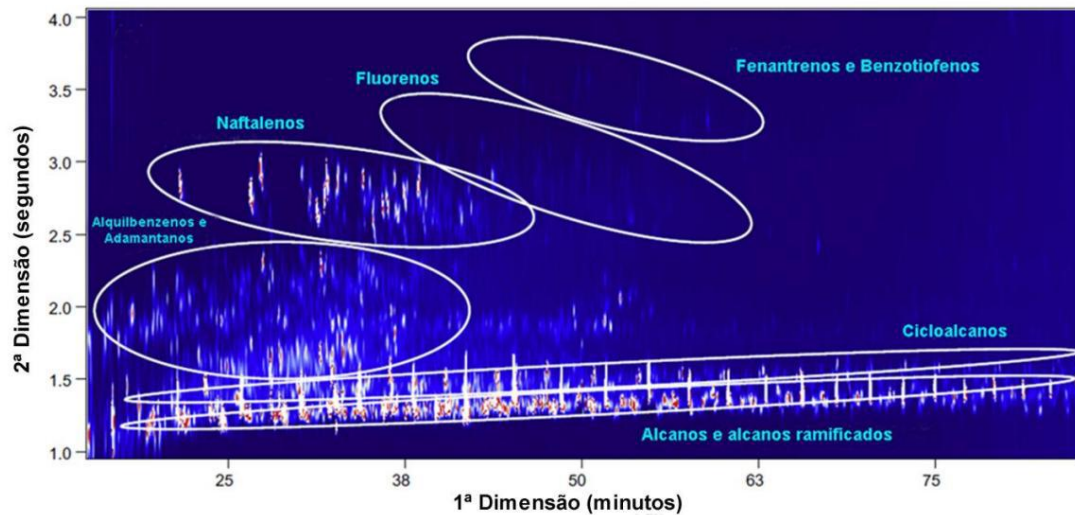


Figura 7. Exemplo de cromatograma estruturado (Adaptado de TRAN *et al.*, 2010).

A capacidade de pico (n) é definida como a capacidade de separação de um sistema cromatográfico. Em sistemas multidimensionais, a capacidade de pico pode ser representada pela capacidade de pico da ¹D somada à capacidade de pico da ²D multiplicada pelo número

de cortes (m). Na GC×GC, a capacidade de pico (**Figura 8**) é igual ao produto das capacidades de picos individuais de cada dimensão $n_1 \times n_2$ (VENDEUVRE *et al.*, 2007).

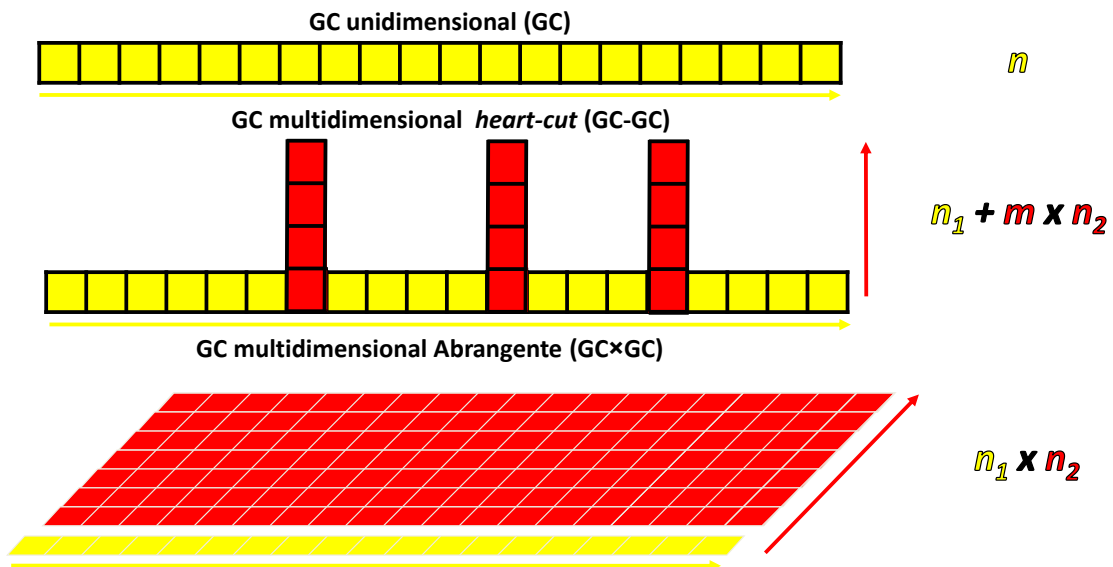


Figura 8. Comparação entre a capacidade de pico de sistemas GC convencionais (GC), multidimensionais *heart-cut* (GC-GC) e multidimensionais abrangentes (GC×GC) (Adaptado de GIDDINGS, 1987).

Na **Figura 9**, uma banda cromatográfica larga, consistindo de três analitos não separados na 1D , (Figura 9A) é fracionada e eluída na 2D , gerando um cromatograma bruto (Figura 9B). Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser destacado do cromatograma bruto (Figura 9C) e a partir deles pode-se gerar gráficos $\text{signal} \times {}^1t_R \times {}^2t_R$ como diagrama tridimensional (3D Plot, Figura 9D), como uma série de curvas de nível monocromáticas chamadas de diagrama de contorno (*Contour Plot*, Figura 9E) ou usando uma representação topográfica (escalas cromáticas de intensidade de sinal), ou diagrama de cores (*Colour Plot*, Figura 9F). Outro aspecto fundamental da GC×GC destacável nessa figura é a compressão das bandas cromatográficas, decorrente do efeito de modulação, que ocasiona um aumento significativo da detectabilidade: ao invés de eluir como um pico largo e pouco intenso, cada analito elui como uma série de picos estreitos e intensos (aumento na relação sinal/ruído), sendo mais facilmente detectados (PEDROSO *et al.*, 2009).

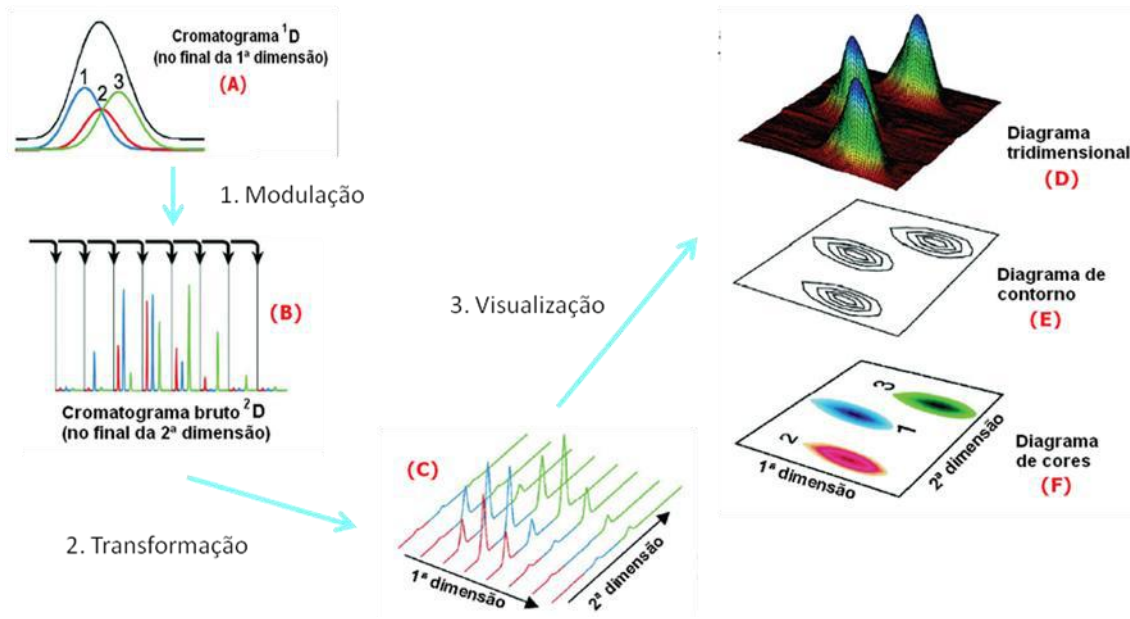


Figura 9. Geração e visualização do cromatograma bidimensional em GC×GC (PEDROSO *et al.*, 2009).

A hifenação da GC×GC com a espectrometria de massas possibilita uma melhor caracterização individual dos compostos, pois além das separações obtidas, temos uma terceira dimensão de separação que é a espectrometria de massas. Os detectores acoplados a GC×GC devem ter a capacidade de medir precisamente picos extremamente rápidos e estreitos. Dessa forma, um espectrômetro de massas de rápida aquisição é requerido. Neste contexto, o espectrômetro de massas com analisador de massas do tipo tempo de voo (TOFMS) é o mais adequado para ser acoplado a um sistema GC×GC. Outra vantagem da utilização do TOFMS é que o espectro de massas não varia ao longo do pico cromatográfico, possibilitando a realização da deconvolução espectral, um tratamento de dados realizado pelo *software* (programa ChromaTOF) que permite a separação de compostos diferentes que coeluem cromatograficamente tanto na 1ªD quanto na 2ªD, por diferenças nos perfis dos espectros de massas. (ADAHCHOUR *et al.*, 2006b; VON MÜHLEN *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, a GC×GC tem se tornado uma técnica popular para a análise de amostras complexas em diversas áreas: alimentos, ambiental, forense, petróleo e derivados, e metabolômica, entre outras (MARRIOTT *et al.*, 2003; VON MÜHLEN *et al.*, 2006; WELDEGERGIS *et al.*, 2011; BRASSEUR *et al.*, 2012; EISERBECK *et al.*, 2012; FITZ *et al.*, 2012). Esses exemplos demonstram as principais vantagens da utilização da GC×GC em relação à GC unidimensional, como o aumento da resolução cromatográfica, sensibilidade, poder de separação e seletividade.

1.5 Injetores

O principais injetores utilizados na GC×GC são destacados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Resumo dos principais injetores e sua classificação.

Injetor	Tipo
Com e sem divisão de fluxo (<i>split/splitless</i>)	Vaporização/ injeção à quente
À frio na coluna (<i>cold on column</i>)	Injeção à frio
Vaporização com temperatura programável (PTV)	Injeção à frio com aumento progressivo de temperatura

1.5.1 Técnica de injeção a quente

Derivam diretamente das técnicas de injeção tradicionais (através de septos) em blocos de injeção aquecidos (vaporizadores), envolvendo duas etapas distintas: injeção da amostra por meio de uma seringa, seguida de transferência da amostra vaporizada para o interior da coluna pelo fluxo de gás carreador. Portanto, este tipo de técnica exige que a amostra analisada seja estável na temperatura de vaporização (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989).

A técnica de injeção com divisão de fluxo (*split*) é uma técnica de injeção à quente e a mais antiga forma de introdução de amostras em colunas capilares, pois estas colunas possuem uma quantidade de fase estacionária que é de 100 a 1000 vezes menor do que as antigas colunas recheadas, tornando-se assim rapidamente sobrecarregadas com a amostra, com severo comprometimento do formato dos picos e da resolução cromatográfica, na ausência de um processo de diluição prévio. Isto levou ao desenvolvimento de um sistema, reprodutivo e regulável, de descarte da maior parte da amostra após a vaporização (divisor de fluxo), antes da transferência para a coluna. Portanto, esta é uma das vantagens desse modo de injeção; pode-se trabalhar com soluções concentradas sem sobrecarregar a coluna, além de prevenir a introdução de substâncias da amostra que não são volatilizadas para o interior da coluna. Através de um procedimento de limpeza mediante a saída do gás carreador pela purga do septo, estas substâncias são expulsas do injetor. A **Figura 10** ilustra o esquema do injetor com divisão de fluxo, onde se destaca a saída da vazão da purga do septo, que serve para

limpeza dos analitos que ficam retidos no septo, pois não foram volatilizados. A entrada da vazão do gás de arraste é por onde o gás é introduzido para carrear os analitos volatilizados, no vaporizador, para dentro da coluna. A saída da vazão do *split* é onde se divide o fluxo total introduzido no sistema; esta divisão pode ser selecionada através de razões como 1:5, 1:20, 1:100, dependendo da concentração da amostra. (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989; AQUINO NETO, F. R.; NUNES D. S.S., 2003).

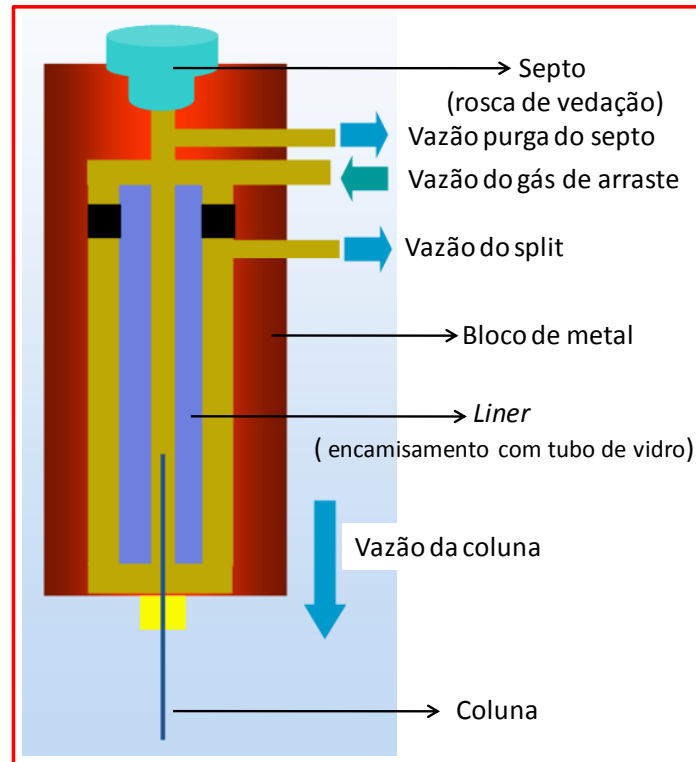


Figura 10. Esquema de vaporizador (injetor) típico para injeções com divisão de fluxo (*split*) (Adaptado DEL GRANDE, 2012).

A injeção de amostra em vaporizadores com a saída de fluxo temporariamente fechada se constitui na chamada técnica de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*) e resulta na transferência da maior parte da amostra vaporizada contida no injetor, para o interior da coluna. Essa é, portanto, a técnica de escolha para análises de amostras diluídas e apresenta uma maior sensibilidade analítica frente à injeção com divisor de fluxo, podendo assim ser utilizada para compostos de interesse na amostra em quantidade a nível traço. Porém, com a saída do divisor fechada, o fluxo de gás dentro do injetor é acentuadamente diminuído devido à resistência oferecida pela coluna capilar, tornando o tempo de transferência da amostra vaporizada para o interior da coluna muito longo. Com isso esta técnica precisa de um

mecanismo de reconcentração da amostra (focalização) (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989).

A **Figura 11** ilustra o esquema do injetor sem divisão de fluxo, onde a saída da vazão do *split* está inicialmente fechada, para garantir a transferência da maior parte da amostra volatilizada para o interior da coluna. Após certo tempo programável, as saídas são novamente abertas para a limpeza do septo e para diminuir a pressão dentro da coluna, dividindo assim o fluxo total dentro do vaporizador (AQUINO NETO, F. R.; NUNES D. S.S., 2003).

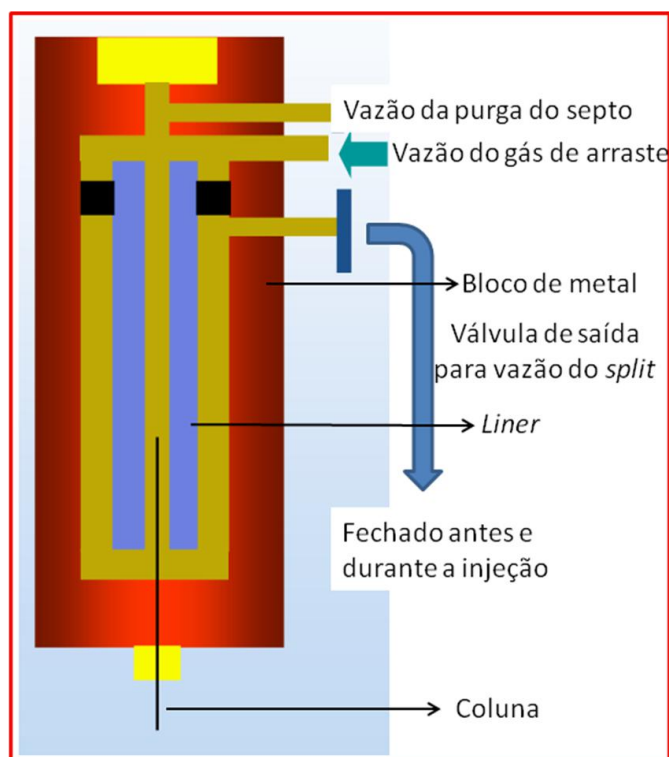


Figura 11. Esquema de vaporizador (injetor) típico para injeções sem divisão de fluxo (*splitless*) (Adaptado DEL GRANDE, 2012).

1.5.2 Técnicas de injeção a frio

São consideradas técnicas de injeção à frio apenas as modalidades de introdução da amostra, com seringas, no interior da própria coluna capilar (injeção na coluna) ou em um vaporizador de temperatura programável (PTV). Nos dois casos, o que se pretende evitar é a segregação de componentes pesados (elevado ponto de ebulição) observada durante uma injeção com agulha quente, o que leva à transferência incompleta (e, geralmente não reprodutiva) dos vários componentes da amostra para o interior da coluna. Além disso, o

choque térmico produzido por vaporizadores convencionais (quentes) causa fácil degradação de substratos termolábeis, o que pode ser evitado pela deposição da amostra dentro de superfícies frias, especialmente desativadas, como no interior das próprias colunas capilares. (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989).

1.5.2.1 Injetor a frio na coluna (*on column*)

O sistema de injeção na coluna atende plenamente aos requisitos de um sistema reprodutível de injeção à frio, não tem controladores de temperatura, sem componentes elétricos ou eletrônicos, pois a amostra é depositada, na forma líquida, diretamente na própria coluna capilar, em seu segmento inicial, já dentro do forno cromatográfico, que assim passa a comandar a temperatura de injeção. Exige, portanto, o resfriamento do forno cromatográfico a temperaturas relativamente baixas, não apenas para evitar efeito de discriminação na agulha ou degradação das substâncias, mas também devido à necessidade de evitar uma súbita vaporização e conseqüentemente ejeção de amostra para fora da coluna. Torna-se necessário aqui, o uso de septos e seringas especiais, capazes de penetrar no interior das colunas capilares, o uso de lacunas de retenção para evitar a rápida contaminação da coluna capilar. Porém com a utilização desses materiais a técnica tem como desvantagem o alto custo destes. (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989).

A **Figura 12** ilustra o esquema do injetor à frio na coluna, onde há a entrada do gás de arraste como nos outros injetores. O *insert* tem a função de direcionar a agulha para dentro da coluna, garantindo o encaixe agulha-coluna perfeito, pois assim exclui a possibilidade de vazamentos na injeção da amostra. A entrada e a saída do ar de resfriamento são utilizadas para injeções onde se deseja introduzir a amostra abaixo da temperatura ambiente e após a transferência da amostra, a temperatura da análise acompanha a temperatura de programação do forno. (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989; AQUINO NETO, F. R.; NUNES D. S.S., 2003).

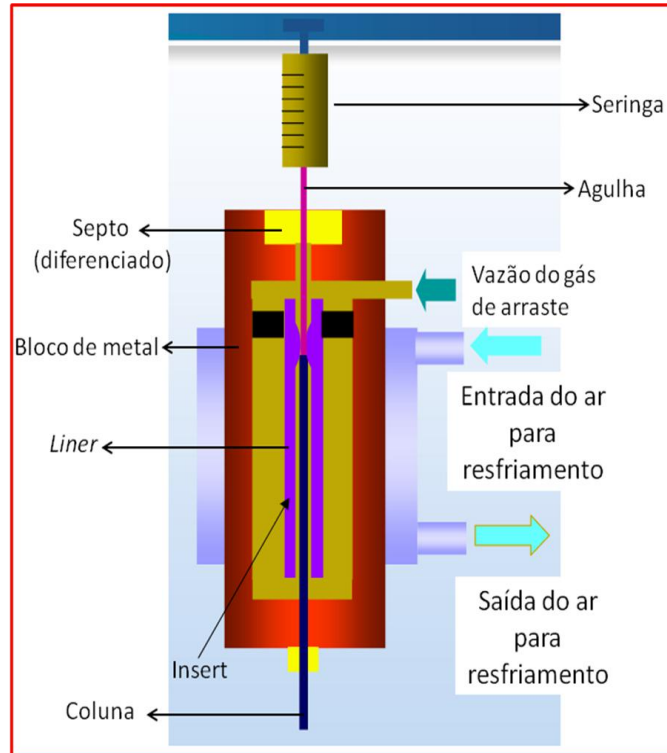


Figura 12. Esquema do injetor à frio na coluna (*cold on column*) (Adaptado de DEL GRANDE, 2012).

1.5.2.2 Injetor de vaporização com temperatura programável (PTV)

A introdução de amostras com temperatura programável foi utilizada pela primeira vez por Vogt em 1979. Inicialmente ele desenvolveu a técnica como um método para a introdução de grandes volumes de amostra em cromatografia gasosa capilar. Vogt introduziu a amostra no injetor a uma taxa de injeção controlada. A temperatura escolhida foi ligeiramente abaixo do ponto de ebulição do solvente. Assim, o solvente de baixa ebulição foi continuamente evaporado e carregado para a saída da divisão de fluxo. (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989).

Com base nesta idéia, Poy desenvolveu o injetor de vaporização com temperatura programável (PTV). Ao introduzir uma amostra no injetor com uma temperatura inicial muito baixa, muitas das desvantagens das técnicas clássicas de injeção à quente podem ser contornadas. Hoje em dia o injetor PTV é considerado a técnica de injeção mais universal disponível (Disponível em <http://www.glsciences.eu>, acesso em 03/12/2014).

O PTV é uma combinação do injetor clássico, com e sem divisão de fluxo (*split/splitless*), com o injetor na coluna à frio, onde a amostra é introduzida no sistema

cromatográfico a baixas temperaturas, mas em um injetor especialmente projetado, e não diretamente na coluna. Este cumpre em larga escala as suas finalidades, sendo aplicável à maioria dos casos onde se faz necessária uma injeção a frio. Suas principais desvantagens são o custo elevado de manutenção e a complexidade do sistema de precisão para variação de temperatura. No entanto, suas vantagens são a possibilidade da injeção em grande volume, sendo possível retirar, através da saída da divisão de fluxo, o excesso de solvente, concentrando assim a amostra dentro do vaporizador. Além disso, existe a opção de trabalhar tanto no modo com ou sem divisão de fluxo dependendo das características da amostra, com pouca discriminação dos compostos de alta massa molecular e minimiza a decomposição dos compostos instáveis termicamente (AQUINO NETO e CARDOSO, 1989).

A **Figura 13** ilustra o esquema do injetor PTV, onde a saída da vazão da purga do septo e a entrada da vazão do gás de arraste tem as mesmas funções do que para os outros injetores. A saída da vazão do *split* pode estar fechada se o injetor estiver operando no modo sem divisão de fluxo ou aberto se estiver no modo com divisão de fluxo. A entrada e a saída do ar de resfriamento são utilizadas para injeções onde se deseja introduzir a amostra abaixo da temperatura ambiente, como no injetor *on column*. O controle de temperatura é feito por uma serpentina (**Figura 14**), que esta envolvida no corpo do vaporizador. (AQUINO NETO, F. R.; NUNES D. S.S., 2003)

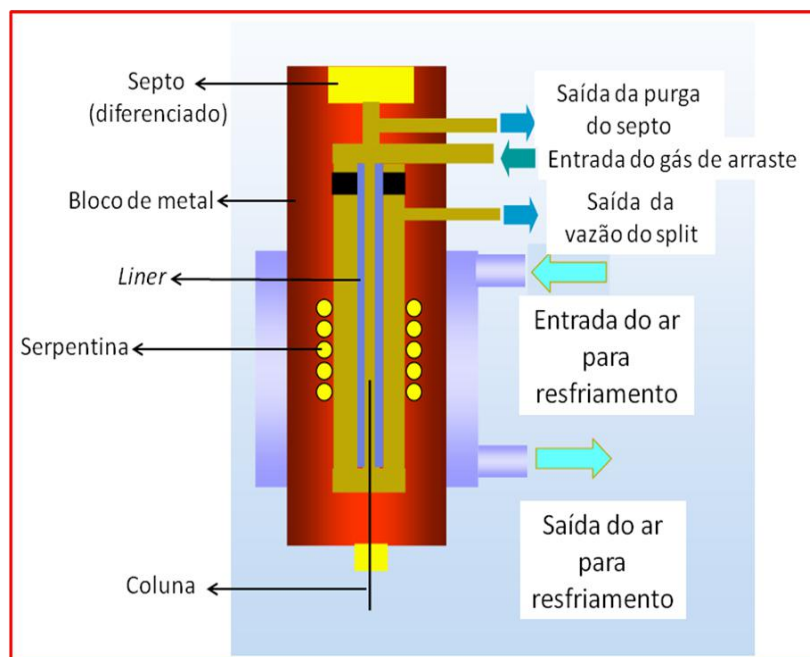


Figura 13. Esquema do injetor de vaporização com temperatura programada (PTV) (Adaptado de DEL GRANDE, 2012).

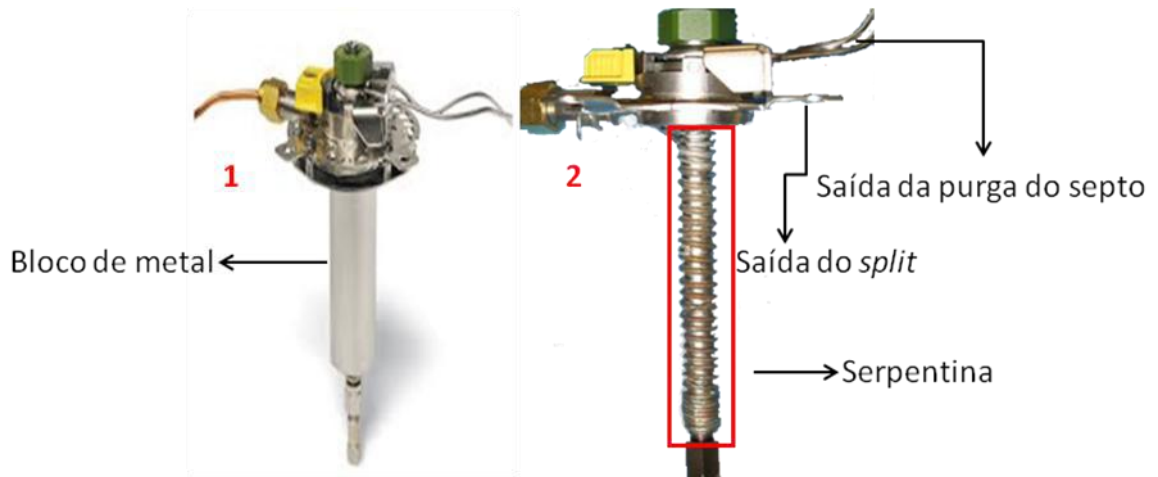


Figura 14. Corpo externo (1) e interno (2) do injetor PTV, destacando a serpentina controladora de temperatura (Disponível em www.gopixpic.com, acesso em 05/12/2014).

2. JUSTIFICATIVA

A aplicação de novas ferramentas analíticas no estudo de amostras geológicas, especialmente o petróleo, tem sido estimulada diante das dificuldades relacionadas ao sistema de análise por GC/MS. A dificuldade de volatilização e também a discriminação de substâncias de alta massa molecular e conseqüentemente, ponto de ebulição elevado, em análises cromatográficas com sistema de introdução de amostra por vaporização do tipo *split/splitless* têm sido uma grande limitação. A implementação de técnicas de introdução de amostras aliadas as técnicas cromatográficas atuais, são de extrema importância no estudo de analitos de alta massa molecular.

Os estudos de hidrocarbonetos em petróleo com elevada massa molecular tem uma considerável atenção na literatura, pois as estruturas resultantes dos processos de formação do petróleo apresentam estabilidade térmica, além de serem potenciais indicadores dos processos de maturação. Assim, relatos na literatura têm mostrado uma vasta aplicação da cromatografia em estudos de analitos de alta massa molecular, como ceras de plantas, série homologa de *n*-alcanos, identificados até, hectano, *n*-C₁₀₀ (AQUINO NETO *et al.*, 1996) e biomarcadores de alta massa molecular (hopanos e terpanos tricíclicos). A série dos hopanos estendidos com números de átomos de carbono até C₄₀ foi relatada pela primeira vez por RULLKÖTTER e PHILP (1981). WANG *et al.* (1996), utilizando GC/MS/MS, observaram os hopanos até C₄₄. SEIFERT (1978) identificou os hopanos até C₃₃ por GC/MS. LI *et al.* (2014) utilizaram a GC×GC-TOFMS com injetor do tipo *splitless* na detecção de terpanos tricíclicos de C₁₉ até C₃₅, e hopanos de C₂₇ até C₃₅.

O uso de técnicas de alta temperatura ampliou a aplicação da GC/MS no estudo de amostras complexas. DE GRANDE *et al.* (1993) avaliaram a série estendida de terpanos tricíclicos de C₁₉ a C₅₄ em amostras de óleo e rochas utilizando GC/MS e GC/MS/MS. Contudo, no cromatograma do íon extraído *m/z* 191 do estudo de terpanos, verificou-se que as substâncias de elevada massa molecular (>C₄₅) se apresentaram com sinal/ruído relativamente baixo, além de verificar uma resolução inadequada. MOLDOWAN *et al.* (1983) identificaram uma série de terpanos tricíclicos de C₁₉ a C₄₅ em petróleo, contudo o cromatograma apresentou picos assimétricos e alargados, resultante da grande interação com a fase estacionária.

Embora já existam estudos do uso do injetor PTV e a técnica de cromatografia gasosa aplicado a amostras de petróleo e suas frações, assim como em conjunto ao uso da GC×GC,

buscou-se ampliar a faixa de analitos detectados e identificados, em particular os biomarcadores de petróleo.

Com isso, foi proposta uma metodologia de análise de substâncias com alta massa molecular utilizando a cromatografia gasosa bidimensional abrangente com injetor de vaporização com temperatura programada. Poucos trabalhos tem relatado o uso de injetor de PTV e GC×GC aplicados a petróleos e derivados. DUTRIEZ *et al.* (2009) identificaram padrões de parafinas até $n\text{-C}_{60}$ utilizando GC×GC de alta temperatura com injetor do tipo *split*. SILVA *et al.* (2011) identificaram parafinas até $n\text{-C}_{50}$ de produtos do processos Fischer-Tropsch. MAHÉ *et al.* (2012) publicaram um trabalho com HT-GC×GC-FID na análise de parafinas $n\text{-C}_{60}$. Nesse estudo, os autores utilizaram o injetor *on-column* para a redução da discriminação das substâncias de alto ponto de ebulição. OLIVEIRA *et al.* (2012) avaliaram amostras de petróleo brasileiro GC×GC-TOFMS com injetor *split/splitless* e identificaram os terpanos tricíclicos ate C_{41} .

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar o uso de diferentes tipos de injetores de amostras na cromatografia gasosa e avaliar qual seria o mais adequado para a análise de biomarcadores de petróleo de alta massa molecular, buscando detectar e identificar as substâncias com mais de 35 átomos de carbono, preservando os usualmente utilizados nos parâmetros convencionais, para assim, futuramente, investigar a importância destes na caracterização geoquímica do petróleo.

Para tanto, usou-se a técnica de cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo e injetor com disposição *split/splitless* e PTV.

4. EXPERIMENTAL

4.1 Amostras

Neste trabalho foram analisadas 2 amostras de óleos, denominadas como óleo A (Bacia de Santos) e óleo E (Bacia de Campos).

4.2 Reagentes e Vidrarias

Os solventes utilizados para os procedimentos de cromatografia líquida, aduto de uréia e cromatografia gasosa foram, metanol (MeOH), diclorometano (DCM), *n*-hexano (HEX) e acetona (ACE), todos com grau cromatográfico, foram adquiridos da Tedia Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). A sílica gel 60 (0,063–0,200 nm) utilizada na cromatografia líquida foi obtida da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Algodão e sílica foram previamente tratados por extração em Soxhlet com diclorometano (Absolv) por 48 horas e armazenados em recipientes tampados em dessecadores até o momento do uso. A uréia (P.A.) utilizada foi adquirida da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil).

Toda a vidraria utilizada foi limpa através das etapas abaixo:

1. Lavagem com água em abundância;
2. Lavagem com detergente comercial neutro;
3. Lavagem com água em abundância;
4. Imersão em solução de Extran alcalino 2% (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) por no mínimo 24 horas;
5. Lavagem com água em abundância;
6. Rinsagem com água destilada;
7. Secagem em estufa a aproximadamente 105°C (exceção para material volumétrico que foi seco a temperatura ambiente).

Neste estudo utilizou-se a solução padrão de *n*-parafinas (C₇ a C₄₀) com concentração de 1 g L⁻¹ (Supelco/ Sigma-Aldrich), para comparar a utilização dos injetores PTV e *split/splitless*.

4.3 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna

As amostras foram fracionadas por cromatografia líquida em coluna, gerando frações de hidrocarbonetos saturados, de compostos aromáticos e de compostos polares. Para isso, fez-se uma suspensão de 3g de sílica em 10 mL de hexano em um bécher de 25 mL, transferiu-se

esta para uma coluna de vidro (13 cm x 0,5 cm) contendo algodão em sua ponta para impedir a passagem da sílica.

A sílica foi previamente extraída por Soxhlet com diclorometano (Absolv) durante 48 horas e ativada na estufa em 120 °C durante 12 horas e posteriormente mantida em dessecador até a utilização.

Pesou-se 0,1 g de óleo e dissolveu-se em, no máximo, 1 mL de hexano (esta quantidade de hexano vai depender da viscosidade de óleo utilizado) e adicionou-se a solução no topo da coluna recheada com sílica gel ativada.

Para obter a fração dos hidrocarbonetos saturados, a amostra foi eluída com 10 mL (no total) de hexano, para a fração dos compostos aromáticos foi utilizada uma mistura de hexano e diclorometano (8:2) e para a fração dos compostos polares uma mistura de diclorometano e metanol (9:1).

Estas frações foram recolhidas em balões volumétricos de 50 mL cada, o solvente evaporado em evaporador rotatório sob baixa pressão. Posteriormente, foram transferidas para frascos de 2 mL, previamente pesados e identificados, utilizando diclorometano. Por fim, o solvente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio para se obter a massa de cada fração eluída (MAROTTA *et al.*, 2014).

4.4 Separação por aduto de uréia

Para o preparo da solução saturada de uréia foram utilizados 30 g de uréia, que foram dissolvidos em 100 mL de metanol, com o auxílio de uma placa de aquecimento. Esta solução foi mantida em geladeira a 8 °C.

Após o fracionamento por cromatografia líquida em coluna, a fração de hidrocarbonetos saturados foi solubilizada em 1 mL de hexano e uma alíquota de 500 µL foi transferida para um tubo de centrífuga de 18x180 mm. Foram adicionados 1 mL de acetona e 1 mL de hexano e a mistura foi agitada em vórtex. Posteriormente, 1 mL da solução saturada de uréia foi adicionado e observou-se a precipitação imediata dos cristais de uréia.

Os cristais de uréia foram solubilizados em banho-maria a 50 °C e resfriados até a temperatura ambiente, em repouso para a recristalização da uréia. Ao cessar a cristalização, o tubo de centrífuga com a amostra foi colocado em refrigeração a -20 °C (em *freezer*), por 12 horas. Após esse período, o solvente foi evaporado, de forma branda, sob fluxo de nitrogênio até a obtenção de cristais secos.

Para obtenção da fração de alcanos cíclicos e ramificados, foi realizada uma etapa de lavagem, com 2 mL de hexano e agitação em centrífuga por 1 minuto a 1000 rpm, repetida 5 vezes. O sobrenadante, que contém a fração de alcanos cíclicos e ramificados, foi reservado em um balão de 25 mL. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo (fração de cíclicos e ramificados) foi transferido para um frasco de 2 mL, previamente pesado. O solvente foi novamente seco, sob fluxo de nitrogênio, e foram adicionados 500 μ L de *n*-hexano ao frasco de 2 mL. Os cristais de aduto foram solubilizados com água destilada e submetidos à agitação com vortex. Fez-se uma extração líquido-líquido com 2 mL de hexano. A fase orgânica foi transferida para um balão de 30 mL com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Essa etapa de extração foi repetida por 5 vezes. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo (fração de *n*-alcanos) foi transferido para um frasco de 2 mL, previamente pesado. O solvente foi novamente seco, sob fluxo de nitrogênio, assim obtendo-se a massa de cada fração (MAROTTA *et al.*, 2014).

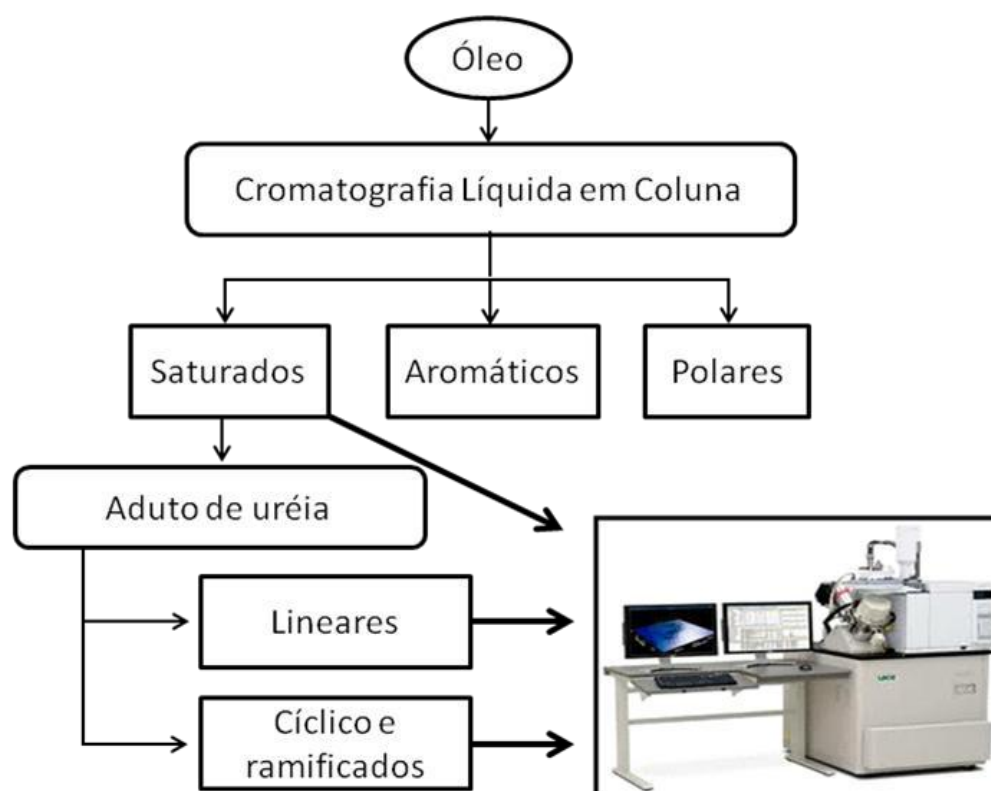


Figura 15. Esquema de preparo de amostra utilizado neste trabalho.

4.5 Avaliação do tipo de injeção

Para a avaliação do método de injeção utilizou-se a solução padrão de *n*-parafinas (C₇ a C₄₀) com concentração de 1 g L⁻¹ (Supelco/ Sigma-Aldrich), pois esta é de fácil detecção e identificação.

4.6 Instrumentação e condições cromatográficas

4.6.1 Métodos de injeção

O volume de injeção utilizado no método foi de 1 µL e vazão de 1,5 mL min⁻¹.

4.6.1.1 PTV

O injetor PTV foi utilizado no modo *split* 1:10 com programação de temperatura do injetor de 50 a 350 °C.

4.6.1.2 *Split/splitless*

O injetor *Split/splitless* foi utilizado no modo *splitless* com temperatura do injetor a 350 °C.

4.6.2 GC×GC-TOFMS

As amostras foram analisadas em um sistema cromatográfico GC×GC-TOFMS Pegasus IV (Leco, St. Joseph, MI), que consiste em um cromatógrafo a gás modelo 6890 (Palo Alto, CA, USA) equipado com um forno secundário, um modulador criogênico de quatro jatos e dois estágios e acoplado a um espectrômetro de massas por tempo de voo modelo Pegasus III (Leco, St. Joseph, MI). A aquisição e processamento de dados foi feita através do *software* ChromaTOF™ versão 4.5 (Leco, St. Joseph, MI).

As colunas cromatográficas utilizadas foram, na primeira dimensão (¹D), uma coluna capilar de sílica fundida, Agilent Technologies- DB-5HT (5% fenila - 95% metilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm d_f; temperatura máxima de 370 °C); uma MEGA - MEGA 17 HT FAST (50%-fenil-50%-metilsiloxano, 1,5 m x 0,1 mm d.i. x 0,1 µm d_f; temperatura máxima de 370 °C) na segunda dimensão (²D). A segunda coluna foi conectada ao espectrômetro de massas através de um capilar desativada (0.5 m × 0.25 mm d.i.). Este sistema foi conectado por uniões (SGE Analytical Science), usando anilhas de *SilTite* (Austin, Texas, USA). A programação de temperatura do forno na ¹D foi de 40 °C (1 min) / 20 °C min

$^{-1} / 170 \text{ }^{\circ}\text{C} / 2 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1} / 350 \text{ }^{\circ}\text{C} (2,5 \text{ min})$ e na ^2D utilizou-se $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a mais que na programação do primeiro forno.

O período de modulação foi de 8 segundos, com 2 segundos de jato quente e com temperatura $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ acima da programação de temperatura do forno ^1D . O espectrômetro de massas por tempo de voo foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons, com energia de 70 eV e a faixa de massas analisada foi de 50 a 800 Da . A temperatura da linha transferência para o espectrômetro de massas foi de $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura da fonte iônica foi de $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o detector foi operado com uma voltagem de 1650 V e a taxa de aquisição foi de 100 espectros/segundo. A identificação dos compostos foi feita utilizando seus espectros de massas, os tempos de retenção relativos e a ordem de eluição de perfil cromatográfico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fracionamento por cromatografia líquida em coluna

O procedimento mais utilizado para o fracionamento de óleos é conhecido como SARA, que é a separação em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. Neste trabalho, a cromatografia líquida em coluna foi utilizada para separar o petróleo em apenas três frações: hidrocarbonetos saturados, compostos aromáticos e compostos polares (SAP). Pelos dados reportados na **Tabela 2**, pode-se observar que a amostra apresenta maior quantidade de hidrocarbonetos saturados. No fracionamento por cromatografia em coluna podem ocorrer perdas de *n*-alcanos leves devido ao procedimento de evaporação. Entretanto, o objetivo deste trabalho refere-se particularmente à fração de hidrocarbonetos saturados de maior massa molecular, não sendo essa perda significativa para a identificação dos compostos de interesse.

Tabela 2 Massa (g) da amostra e das frações de hidrocarbonetos saturados, compostos aromáticos e compostos polares.

Amostra	Massa da amostra (g)	Porcentagem (%)
Óleo A	0,1044	100
Saturados A	0,0531	51
Aromáticos A	0,0127	12
Polares A	0,0172	17

Recuperação do procedimento para óleo A = (% SAT A + % ARO A + % POL A) = 80%

Pode-se observar que a recuperação foi de 80%, o que se considera um valor satisfatório (>70%). O restante da amostra que não foi recuperado, pode atribuído aos asfaltenos e/ou ter sido perdida durante a execução de etapas. Os asfaltenos ficam retidos na sílica durante o fracionamento. Isto acontece devido a baixa solubilidade que estes apresentam com os solventes utilizados no método (*n*-hexano, diclorometano e metanol).

5.2 Separação por aduto de uréia

A aplicação do procedimento de separação de *n*-alcanos por aduto de uréia foi baseada na eficiência que os cristais de uréia possuem de ocluir seletivamente os compostos lineares na sua rede cristalina. Para ter uma melhor oclusão é necessário que a recristalização seja realizada lentamente, pois assim há uma melhor formação dos cristais e um maior contato entre os *n*-alcanos e a solução de uréia. A **Tabela 3** fornece a informação sobre a massa, em gramas, de cada uma das frações após a separação por aduto de uréia.

Tabela 3 Massa (g) da amostra e das frações de hidrocarbonetos saturados, *n*-alcanos e hidrocarbonetos cíclicos e ramificados.

Amostra	Massa da amostra (g)	Porcentagem (%)
Saturados A	0,0266	100
<i>n</i> -alcanos A	0,0061	23
Hidrocarbonetos cíclico e ramificado A	0,0130	49

Recuperação do procedimento para óleo A = (% LIN A + % CR A) = 72%

Pode se observar que a recuperação do método foi acima de 70%, o que se considera um valor satisfatório. O restante da amostra que não foi recuperado, pode ter sido perdido durante os processos de recristalização, lavagem, extração e evaporação do solvente.

A amostra E foi fracionada por cromatografia líquida em coluna e posteriormente por aduto de uréia em trabalho prévio (MAROTTA *et al.*, 2014).

5.3 Análises por GC×GC-TOFMS

Para avaliar os modos de injeção disponíveis no equipamento (Injetor *split/splitless* e PTV), foi feita uma avaliação preliminar utilizando uma solução de padrões de parafinas (C₇ a C₄₀) com concentração de 1 g L⁻¹ (Supelco/ Sigma-Aldrich). Na **Figura 16**, verifica-se claramente a maior relação sinal/ruído (altura) dos picos dos *n*-alcanos na injeção com o PTV. Na **Figura 17** observa-se a maior intensidade das bandas dos *n*-alcanos quando o uso do PTV

(*split* 1:10) comparado com o *Split/splitless* (*splitless*) para a mesma amostra e demais condições analíticas.

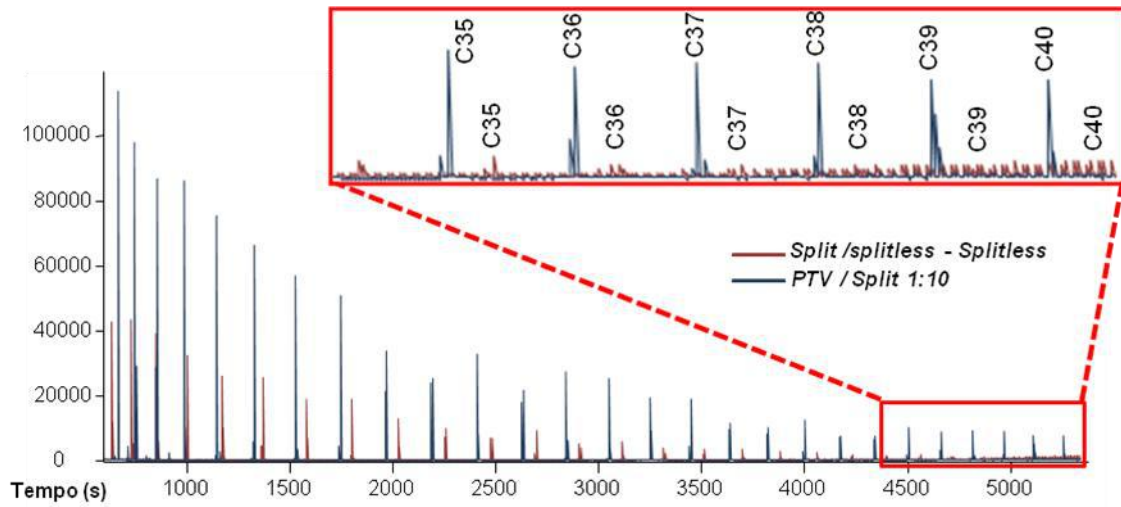


Figura 16. Comparação entre os cromatogramas da solução dos padrões de parafinas (C₁₄-C₄₀) a 100 ng μL^{-1} , utilizando os modos de injeção PTV – *Split* 1:10 e *Split/splitless* – *Splitless*.

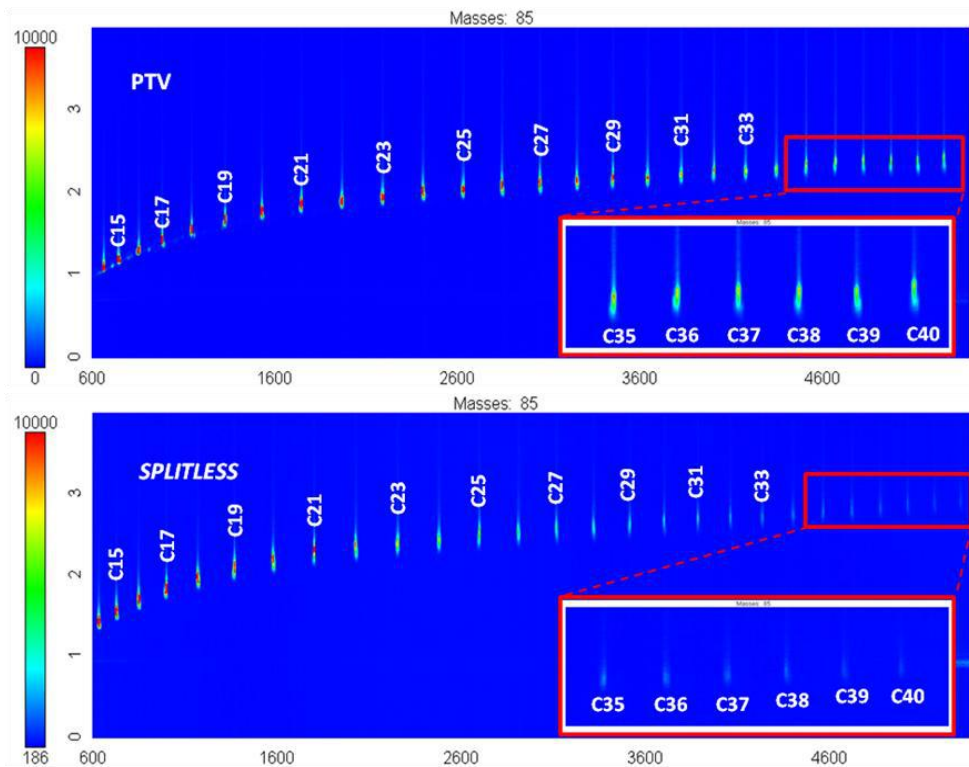


Figura 17. Cromatograma do íon extraído m/z 85 da solução de padrões de parafinas (C₁₄-C₄₀) a 100 ng μL^{-1} em *n*-hexano. Modo de injeção: PTV – *Split* 1:10 e *Split/Splitless* – *Splitless*.

Os dois modos de injeção possibilitaram a detecção das parafinas até C₄₅, mas como evidenciado nas expansões, observa-se uma diferença significativa no sinal das parafinas acima de 35 átomos de carbono. Deve ser destacado que a intensidade dos picos no PTV é superior ao *splitless* apesar da quantidade de amostra transferida para a coluna com a injeção PTV ser 10 vezes menor do que na injeção *splitless*.

Como o injetor PTV se mostrou mais eficiente para a análise de parafinas nas injeções posteriores utilizou-se apenas este para obtenção dos resultados. Para otimização das condições cromatográficas foi utilizada a fração de hidrocarbonetos lineares do óleo A na análise por GC×GC-TOFMS, por ser uma fração menos complexa e de fácil identificação. A **Figura 18** mostra o cromatograma bidimensional da fração de hidrocarbonetos lineares da amostra do óleo A. Neste cromatograma detectou-se as parafinas de C₁₃ a C₄₅. A expansão do final do cromatograma, que é a região onde se encontram os analitos de interesse, possibilitou uma melhor visualização das parafinas de alta massa molecular. A identificação dos picos foi feita através do CIE m/z 85, que é o íon diagnóstico da classe das parafinas, dos espectros de massas obtidos e do perfil cromatográfico da série homóloga.

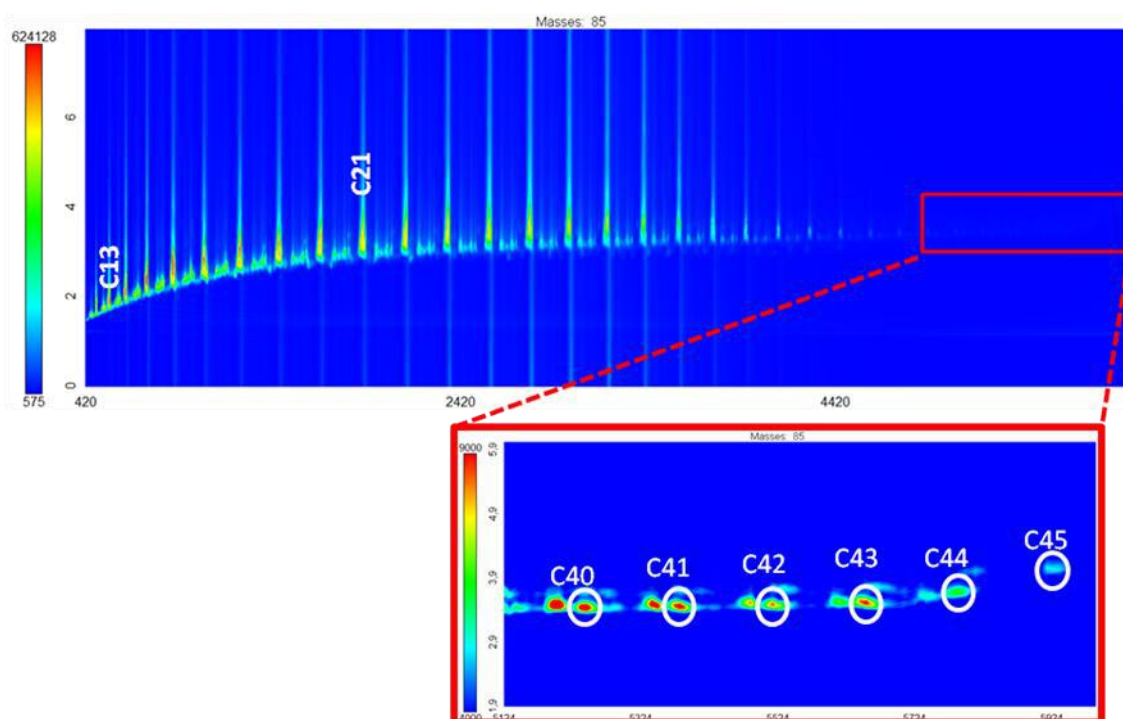


Figura 18. Cromatograma bidimensional do íon extraído m/z 85 da fração de *n*-alcanos do óleo A no modo de injeção PTV-*Split* 1:10.

Na expansão da **Figura 18** observou-se dois picos, o que evidencia que a separação das *n*-parafinas não foi eficiente. Estes picos estão relacionados a presença de iso-parafinas, o que não era o esperado, já que foi utilizado o procedimento de aduto de uréia nesta fração. Na **Figura 19**, selecionou-se dois espectros de massas dos *n*-alcanos, C₁₃ e C₂₁. Estes foram identificados através da comparação com espectros de massas da literatura (MCLAFFERTY e TURECK, 1993) e da biblioteca NIST, do perfil de fragmentação e do seu respectivo íon molecular. A identificação das outras parafinas foi feita utilizando a ordem de eluição na série homóloga. A **Figura 20** mostra o espectro de massas da parafina C₃₁, que foi o último alcano da série homóloga das parafinas onde foi possível se observar a presença do íon molecular.

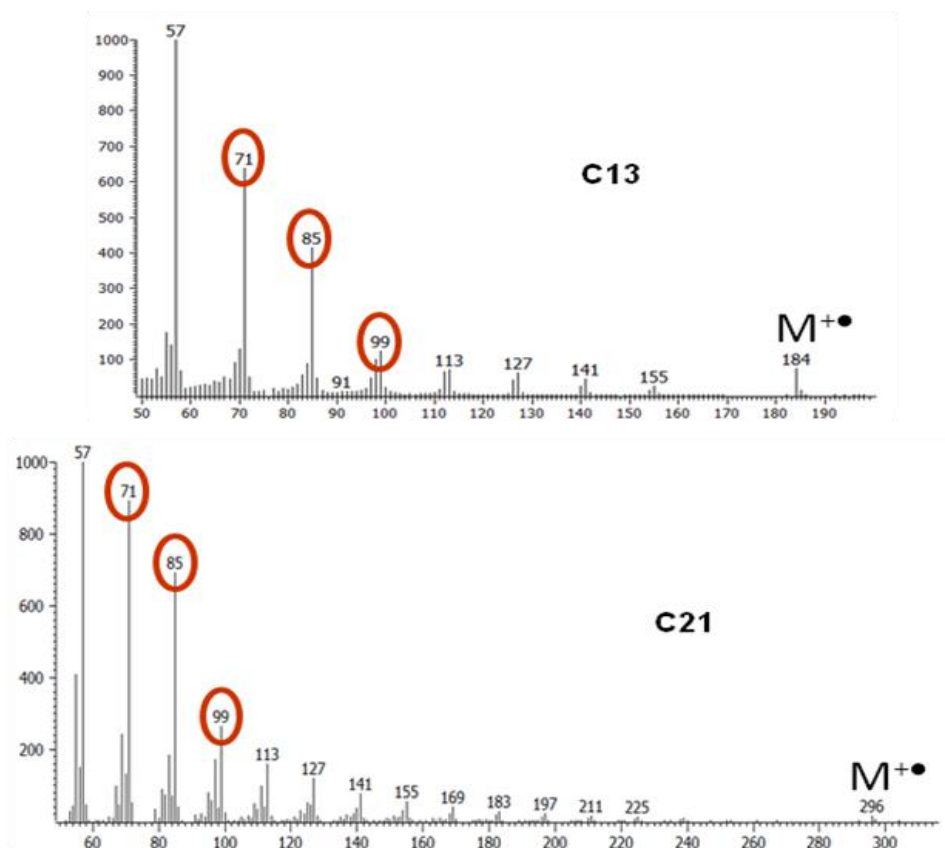


Figura 19. Espectro de massas dos alcanos tridecano (C₁₃) e henicosano (C₂₁), que são mostrados no cromatograma bidimensional na **Figura 18**.

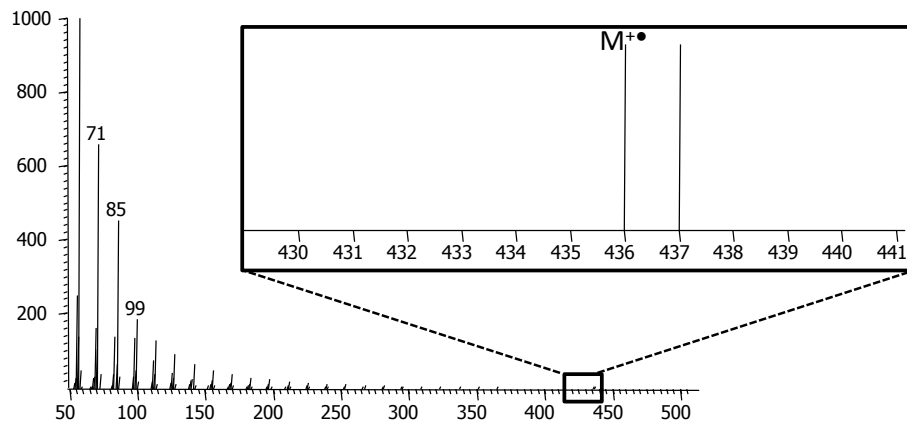


Figura 20. Espectro de massas do hentriacontano, *n*-alcano C₃₁, com ampliação da região onde se encontra o íon molecular (M⁺ 436).

Na **Figura 21** observa-se no espectro de massas, da parafina dotetracontano (C₄₂), o mesmo perfil de fragmentação das outras parafinas que foram identificadas, viabilizando uma maior confiabilidade na identificação.

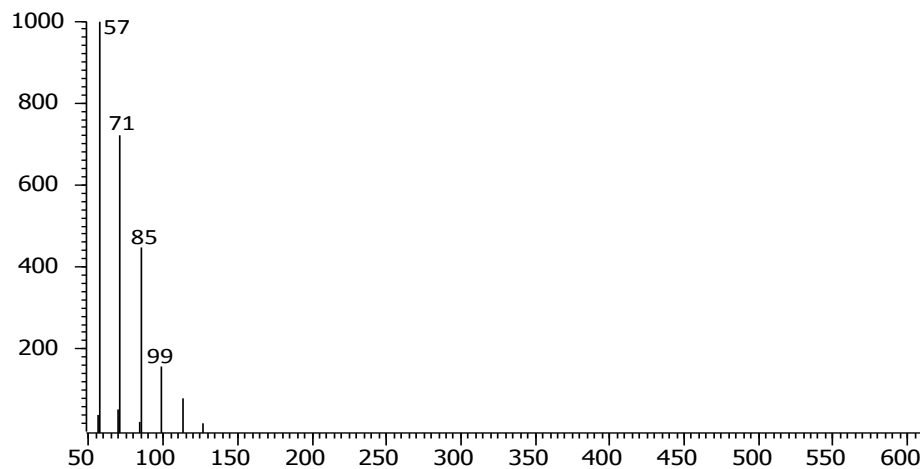


Figura 21. Espectro de massas do dotetracontano, *n*-alcano C₄₂ (M⁺ 590).

A **Figura 22** ilustra um cromatograma unidimensional modulado do íon extraído *m/z* 85 da fração de *n*-alcanos referente ao óleo A, onde evidencia-se a necessidade de uma representação bidimensional ou tridimensional para maximizar a visualização do poder separativo da GC×GC, como também a estruturação cromatográfica dos compostos no plano bidimensional.

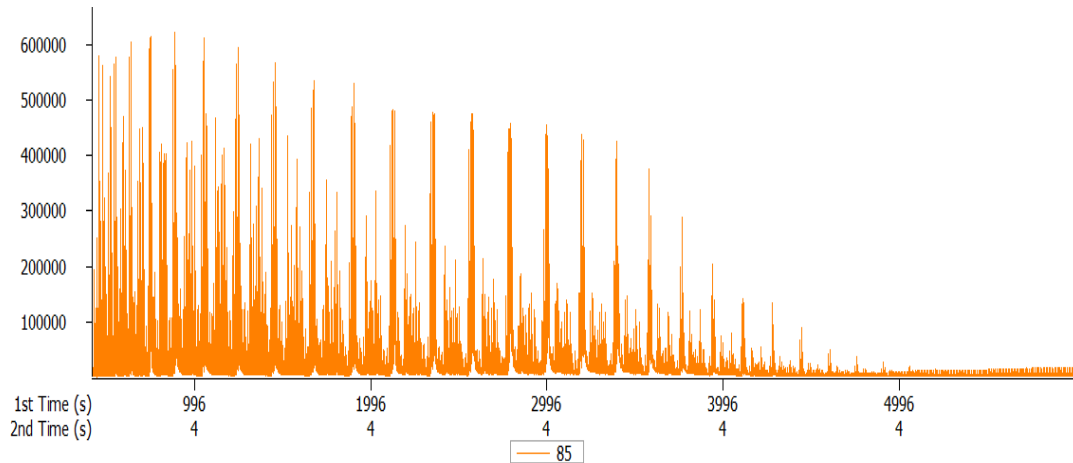


Figura 22. Cromatograma modulado do íon extraído m/z 85 da fração de n -alcanos referente ao óleo A.

Como já dito anteriormente, WANG *et al.* (1996) (Figura 23), utilizando GC/MS/MS, observaram os hopanos até C_{44} . Entretanto, uma baixa relação sinal ruído foi observada para os picos de C_{40} até C_{44} , dificultando a identificação no padrão de distribuição por GC/MS/MS para a transição de m/z $468+14n$ ($n=0-9$) \rightarrow 191.

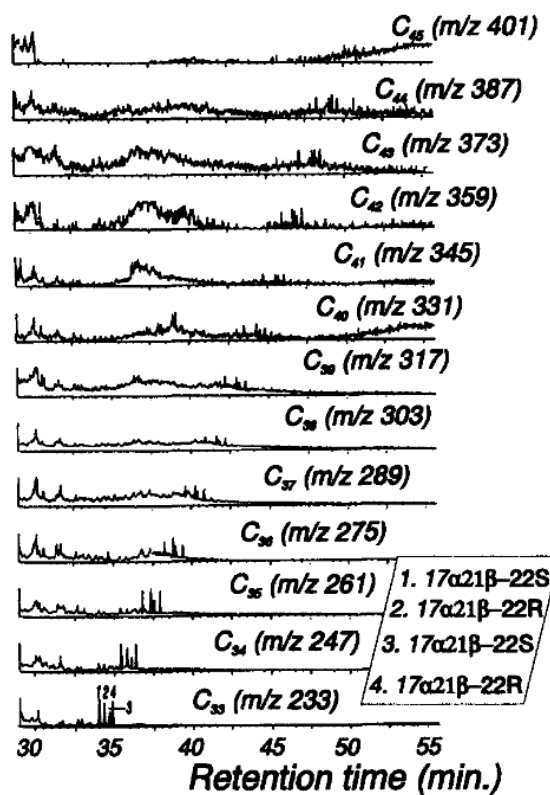


Figura 23. Fragmentos característicos dos hopanos estendidos na fração de hidrocarbonetos saturados (Retirado de WANG *et al.*, 1996).

Fazendo uma analogia ao trabalho de LI *et al.* (2014) (**Figura 24**), que utilizaram o mesmo equipamento (GC×GC-TOFMS), porém com injetor do tipo *splitless*, detectaram terpanos tricíclicos até C₃₅ e hopanos até C₃₅. Já neste trabalho, com o injetor PTV, os hopanos foram detectados até C₃₈ e os terpanos tricíclicos até C₄₅.

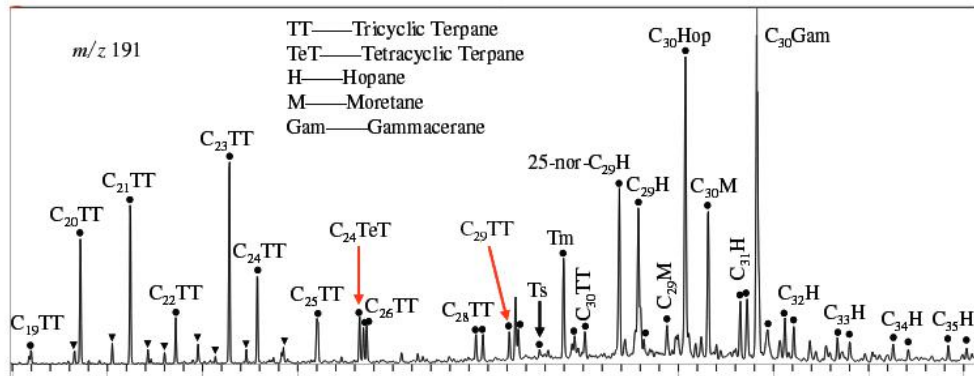


Figura 24. Cromatograma do íon extraído m/z 191 do óleo Y1900 (Retirado de LI *et al.*, 2014).

MOLDOWAN *et al.* (1983) (**Figura 25**) mostraram que as séries homólogas de terpanos tricíclicos podem se estender até C₄₅ em amostras de óleos crus. Em um estudo posteriormente realizado com GC/MS e GC-MS/MS por DE GRANDE *et al.* (1993) (**Figura 26**), foi verificado que as séries de terpanos tricíclicos podem alcançar até C₅₄. No entanto, neste trabalho, observou-se uma dificuldade na identificação dos tricíclicos acima de 45 átomos de carbono. Os picos apresentam uma baixa intensidade, não possuem forma gaussiana e não são bem resolvidos.

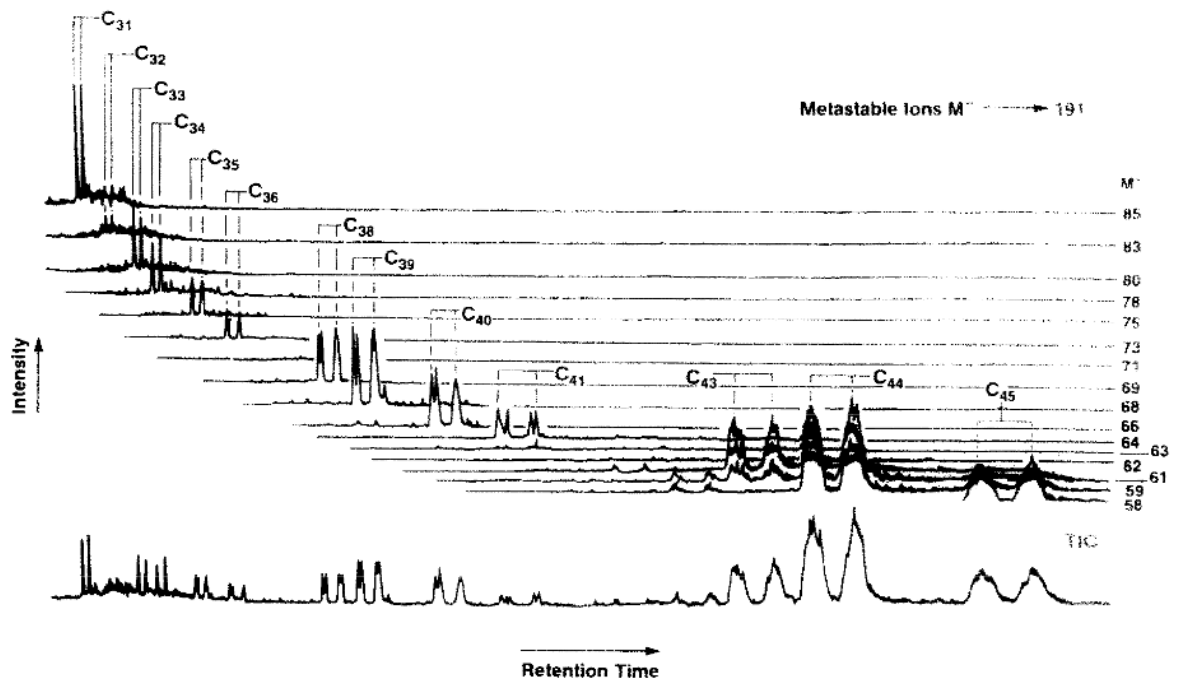


Figura 25. Cromatograma do íon extraído m/z 191 dos terpanos tricíclicos (Retirado de MOLDOWAN *et al.*, 1983).

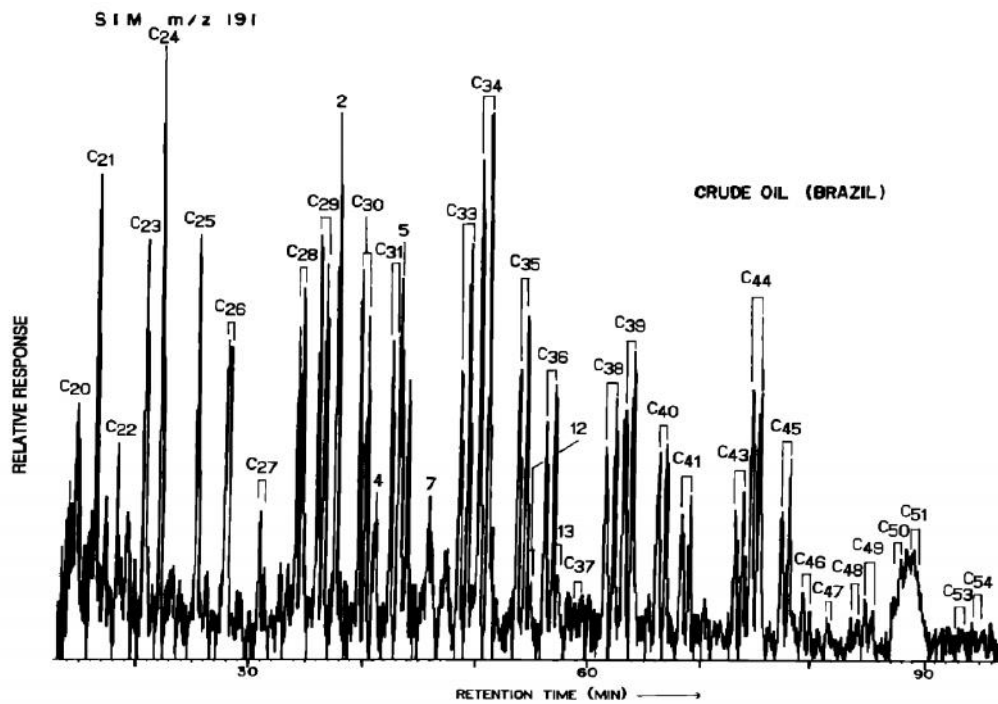


Figura 26. Cromatograma do íon extraído m/z 191 dos terpanos tricíclicos (Retirado de DE GRANDE *et al.*, 1993).

A **Figura 27** ilustra a detecção dos biomarcadores utilizando o cromatograma do íon extraído m/z 191, que é o íon diagnóstico da classe dos terpanos. No objetivo de facilitar a visualização dos biomarcadores de alta massa molecular (hopanos C_{36} a C_{38} e terpanos tricíclicos Tr_{38} a Tr_{45}), foram realizadas expansões em regiões do plano cromatográfico. É indiscutível a enorme complexidade da amostra, centenas de analitos são separados com a possibilidade de ser identificados individualmente pelo espectro de massas. A identificação foi feita utilizando o perfil cromatográfico (posição de cada analito no plano cromatográfico – estruturação cromatográfica), os espectros de massas (**Figuras 28 , 29 e 30**), através do perfil de fragmentação e da detecção do íon molecular.

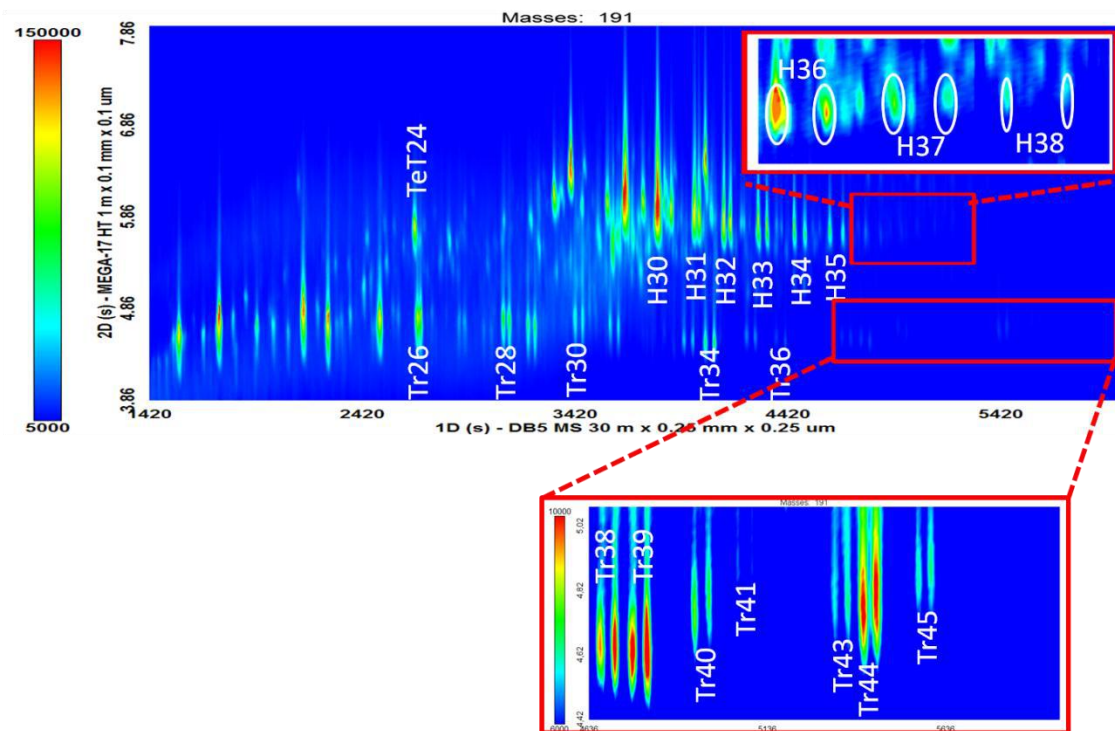


Figura 27. Cromatograma do íon extraído m/z 191 da fração de saturados da amostra E.

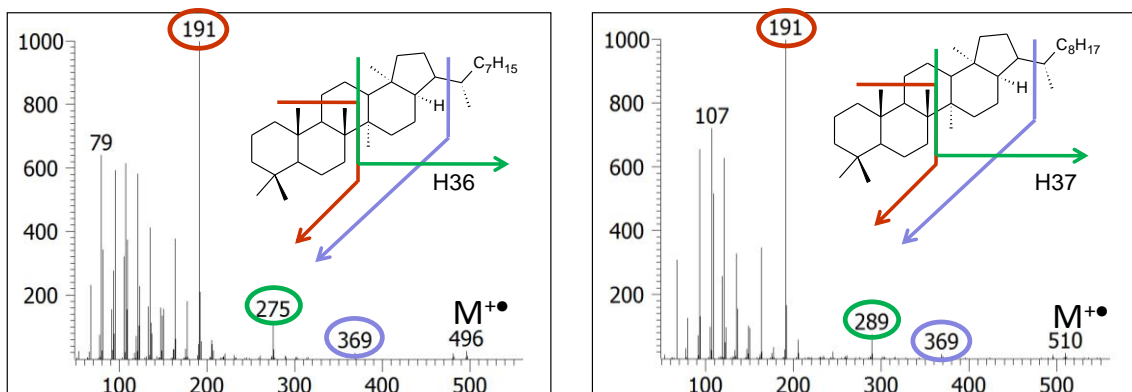


Figura 28. Espectros de massas do Hopano 36 (22*S*-17 α (H), 21 β (H)-30-hexakishomopano e 22*R*-17 α (H), 21 β (H)-30-hexakishomopano) e do Hopano 37 (22*S*-17 α (H), 21 β (H)-30-heptakishomopano e 22*R*-17 α (H), 21 β (H)-30-heptakishomopano).

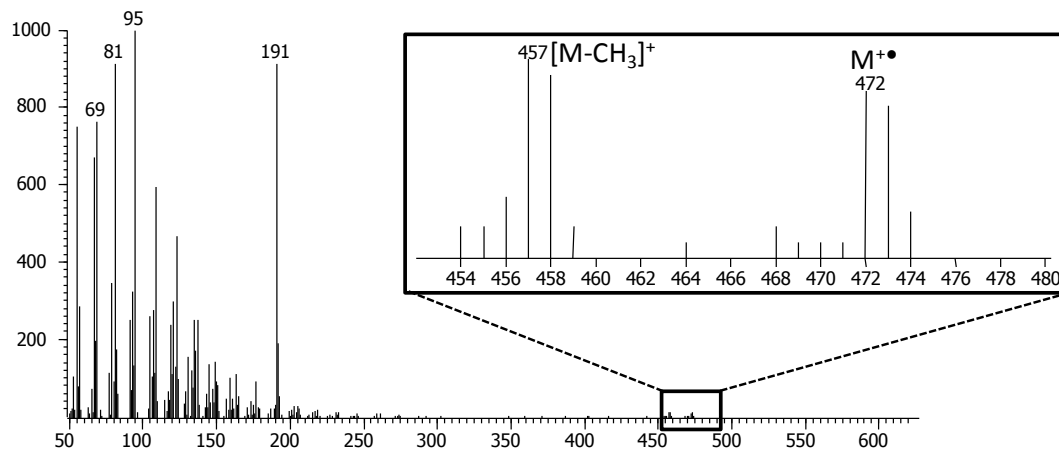


Figura 29. Espectro de massas do terpano tricíclico T₃₄.

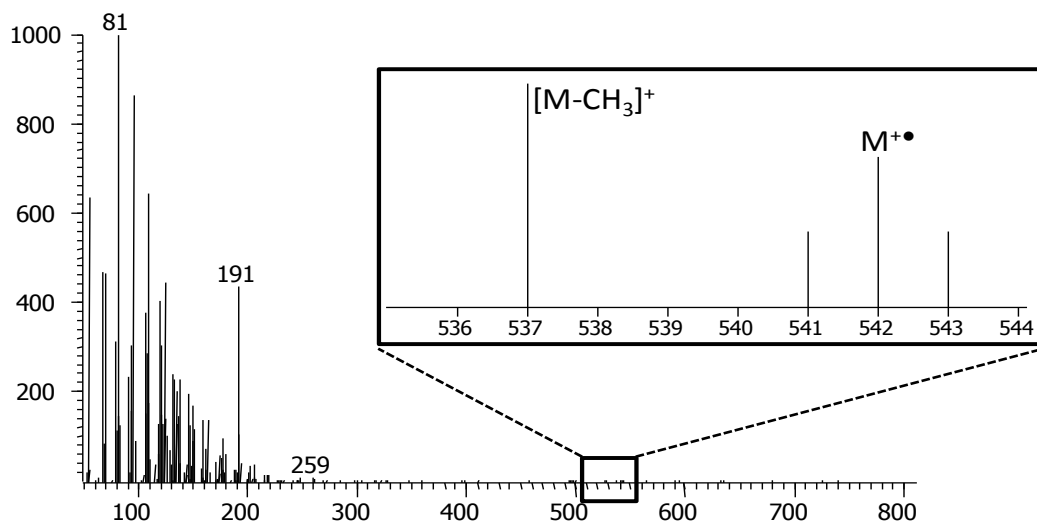


Figura 30. Espectro de massas do terpano tricíclico T₃₉.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, na comparação dos injetores *Split/splitless* e PTV, o injetor PTV se mostrou mais adequado, pois com uma amostra injetada nas mesmas condições de análise, a injeção com PTV evidenciou uma maior relação sinal/ruído e menor discriminação da fração mais pesada.

Com o sistema PTV-GC×GC-TOFMS foram detectados e identificados os alcanos lineares até C₄₅, a série homóloga dos hopanos de H₂₇ a H₃₈ e terpanos tricíclicos até Tr₄₅. Normalmente os hopanos são detectados até o H₃₅ e os terpanos tricíclicos até Tr₄₁ sendo os H₃₆, H₃₇ e H₃₈, e os tricíclicos Tr₄₃, Tr₄₄ e Tr₄₅, raramente detectados em óleos. A informação fornecida pela espectrometria de massas, junto com a posição relativa na série homóloga, possibilitou uma identificação confiável dos hopanos H₃₆ e H₃₇. A investigação destes biomarcadores por PTV, associada a separação por GC×GC e a detecção por TOFMS permitiram a detecção de biomarcadores de alta massa molecular.

7. REFERÊNCIAS

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Th.; Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). I. Introduction and instrumental set-up. **Trends in Analytical Chemistry** 25, 438-454, 2006a.

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN U. A. TH.; Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). II. Modulation and detection. **Trends in Analytical Chemistry** 25, 540-553, 2006b.

AGUIAR, A.; SILVA JÚNIOR, A. I.; AZEVEDO, D. A.; AQUINO NETO, F. R.; Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry to biomarker characterization in Brazilian oils. **Fuel** 89, 2760-2768, 2010.

AQUINO NETO, F. R.; CARDOSO, J. N.; Seleção da técnica de injeção de amostra em CGAR. **Química Nova** 12 (1), 1989.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES D. S.S.; **Cromatografia- Princípios básicos e técnicas afins**. 188 p. 1ª edição, 2003.

AQUINO NETO, F. R.; TRENDEL, J. M.; RESTLÉ, A.; ONNAN, J.; ALBRECHT, P.; Occurrence and formation of tricyclic and tetracyclic terpanes in sediments and petroleums. **Advances in Organic Geochemistry** 1981, 659-676, 1983.

ÁVILA, B. M. F.; **Caracterização química de gasóleos ultra-pesados por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas por Tempo de Voo**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BRASSEUR, C.; DEKEIRSSCHIETER, J.; SCHOTSMANS, E. M. J.; KONING, S. DE; WILSON, A. S.; HAUBRUGE, E.; FOCANT, J-F.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses. **Journal of Chromatography A** 1255, 163-170, 2012.

DALLÜGE, J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. TH.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. **Journal of Chromatography A** 1000, 69-108, 2003.

DE GRANDE, S. M. B.; AQUINO NETO, F. R.; MELLO, M. R.; Extended tricyclic terpanes in sediments and petroleum. **Organic Geochemistry** 20, 1039-1047, 1993.

DEL GRANDE M.; **Apostila de Princípios básicos de cromatografia**, SINC do Brasil, <http://www.sinc.com.br/>, 2012.

DUTRIEZ T.; COURTIADÉ M.; THIÉBAUT D.; DULOT H.; BERTONCINI F.; VIAL J.; HENNION M.; High-temperature two-dimensional gas chromatography of hydrocarbons up to nC_{60} for analysis of vacuum gas oils; **Journal of Chromatography A**, 1216, 2905-2912, 2009.

EISERBECK, C.; NELSON, R. K.; GRICE, K.; CURIALE, J.; REDDY, C. M.; Comparison of GC-MS, GC-MRM-MS, and GC×GC to characterise higher plant biomarkers in Tertiary oils and rock extracts. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 87, 299-322, 2012.

FARRIMOND, P.; BEVAN, J. C.; BISHOP, A. N.; Tricyclic terpanematurity parameters: response to heating by an igneous intrusion. **Organic Geochemistry** 30, 1011-1019, 1999.

FITZ, B. D.; WILSON, R. B.; PARSONS, B. A.; HOGGARD, J. C.; SYNOVEC, R. E.; Fast, high peak capacity separations in comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1266, 116-123, 2012.

GIDDINGS, J. C.; Concepts and comparisons in multidimensional separation. **Journal of High Resolution Chromatography** 10, 319-323, 1987.

GRICE, K.; AUDINO, M.; BOREHAM, C. J.; ALEXANDER, R.; KAGI, R. I.; Distributions and stable carbon isotopic compositions of biomarkers in torbanites from different palaeogeographical locations. **Organic Geochemistry** 32, 1195-1210, 2001.

INNES, H. E.; BISHOP, A. N.; HEAD, I. M.; FARRIMOND, P. Preservation and diagenesis of hopanoids in recent lacustrine sediments of Priest Pot, England.; **Organic Geochemistry** 26, 565-576, 1997.

KIEPPER, A. P.; **Caracterização Química e Geoquímica de óleo Brasileiros por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas**

por Tempo de Voo. 151 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

KILLOPS, S.; KILLOPS, V.; Introduction to organic geochemistry. 2^a edição. **Blackwell Science**, Oxford, 393 p, 2005.

LI, S.; CAO, J.; HU, S.; ZHANG, D.; FAN, R.; Analysis of terpanes in biodegraded oils from China using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. **Fuel** 133, 153-162, 2014.

MAHÉ L.; COURTIADÉ M.; DARTIGUELONGUE C.; PONTUS J.; SOUCHON V.; THIÉBAUT D.; Overcoming the high-temperature two-dimensional gas chromatography limits to elute heavy compounds. **Journal of Chromatography A** 1229, 298-301, 2012

MAROTTA, E.; AQUINO NETO, F. R.; AZEVEDO, D. A.; Separação e determinação quantitativa dos alcanos lineares e dos cíclicos/ramificados em petróleos brasileiros por aduto de ureia e cromatografia gasosa: um estudo de caso revisitado; **Química Nova**, 2014, no prelo.

MARRIOTT, P.; HAGLUND, P.; ONG, R. C. Y.; A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. **Clinica Chimica Acta** 328, 1-19, 2003.

MARRIOTT, P.; SHELLIE, R. Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry** 21, 573-283, 2002.

MOLDOWAN, J. M.; SEIFERT, W. K.; GALLEGOS, E. J.; Identification of an extended series of tricyclic terpanes in petroleum. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 47, 1531-1534, 1983.

OLIVEIRA, C. R.; FERREIRA, A. A.; OLIVEIRA, C. J. F.; AZEVEDO, D. A.; SANTOS NETO, E. V.; AQUINO NETO, F. R.; Biomarkers in crude oil revealed by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry: Depositional paleoenvironment proxies. **Organic Geochemistry** 46, 154-164, 2012.

OLUKAYODE, J. S.; KILDAHL-ANDERSEN, G.; NYTOFT, H. P.; JOHANSEN, J. E.; JONES, M.; Novel tricyclic and tetracyclic terpanes in Tertiary deltaic oils: structural

identification, origin and application to petroleum correlation. **Organic Geochemistry** **41**, 1326-1337, 2010.

PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F. de; FIDÉLIS, C. H. de V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F.; Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). **Química Nova** **32**, 421-430, 2009.

PEREIRA, A. S.; DA SILVA E. F.; AQUINO NETO F. R.; cromatografia gasosa de alta temperatura: a nova fronteira e sua aplicação na análise de compostos de alta massa molecular. **Química Nova** **19**, 600-6004, 1996.

PETERS, K. E. e MOLDOWAN, J. M.; Effects of source, thermal maturity, and biodegradation on the distribution and isomerization of homohopanes in petroleum. **Organic Geochemistry** **17**, 47-61, 1991.

PETERS, K. E.; MOLDOWAN, J. M.; **The Biomarker Guide, Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 363p, 1993.

PETERS, K. E.; Petroleum tricyclic terpanes: predicted physicochemical behavior from molecular mechanics calculations. **Organic Geochemistry** **31**, 497-507, 2000.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M.; **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History**. 2nd Ed. Cambridge University Press, Vol. 1, 471 p, 2005a.

PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M.; **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Petroleum Exploration and Earth History**. 2nd Ed. Cambridge University Press, Vol. 2, 1155 p, 2005b.

RULLKÖTTER, J.; PHILP, R. P.; Extended hopanes up to C40 in Thornton bitumen. **Nature** **292**, 616-618, 1981 *apud* WANG, P.; LI, M.; LATER, S. R.; Extended hopanes beyond C40 in crude oils and source rock extracts from the Liaohe Basin, N.E. China. **Organic Geochemistry** **24**, 547-551, 1996.

SCHOENMAKERS, P. J.; OOMEN, J. L. M. M.; BLOMBERG, J.; GENUIT, W.; VAN VELZEN, G.; Comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas

chromatography – mass spectrometry for the characterization of complex hydrocarbon mixtures. **Journal of Chromatography A** 892, 29-46, 2000.

SEIFERT, W. K.; Steranes and terpanes in kerogen pyrolysis for correlation of oils and source rocks, **Geochimica et Cosmochimica Acta** 42, 473-484, 1978.

SILVA R. S. F.; TAMANQUEIRA J. B.; DIAS J. C. M., PASSARELLI F. M.; BIDART A. M. F.; AQUINO NETO F. R.; AZEVEDO D. A.; Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Time of Flight Mass Spectrometry Applied to Analysis of Fischer-Tropsch Synthesis Products Obtained with and without Carbon Dioxide Addition to Feed Gas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22 (11), 2121-2126, 2011.

SINNINGHE DAMSTÉ, J. S.; VAN DUIN, A. C. T.; HOLLANDER, D.; KOHNEN, M. E. L.; DE LEEUW, J. W.; Early diagenesis of bacteriohopanepolyolderivatives: formation of fossil homohopanoids. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 59, 5141-5147, 1995.

SPEIGHT, J. G.; **The chemistry and technology of petroleum**. 4^a edição. Boca Raton: CRC Press, 945 p, 2006.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H.; **Petroleum Formation and Occurrence**. 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlin, 699 p, 1984.

TRAN, T. C.; LOGAN, G. A.; GROSJEAN, E.; RYAN, D.; MARRIOTT, P. J.; Use of comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the characterization of biodegradation and unresolved complex mixtures in petroleum. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 74, 6468-6484, 2010.

VAN DEURSEN, M.; BEENS, J.; REIJENGA, J.; LIPMAN, P.; CRAMERS, C.; Group-type identification of oil samples using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a time-of-flight mass spectrometer (GC×GC-TOF). **Journal of High Resolution Chromatograph** 23, 507-510, 2000.

VENDREUVE, C.; RUIZ-GUERRERO, R.; BERTONCINI, F.; DUVAL, L.; THIÉBAUT, D.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography for detailed characterisation of petroleum products. **Oil and Gas Science and Technology** 62, 43-55, 2007.

VENTURA, G. T.; KENIG, F.; REDDY, C. M.; FRYSSINGER, G. S.; NELSON, R. K.; VAN MOOY, B.; GAINES, R. B.; Analysis of unresolved complex mixtures of

hydrocarbons extracted from Late Archean sediments by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). **Organic Geochemistry** 39, 846-867, 2008.

VON MÜHLEN, C.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J.; Applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography to the characterization of petrochemical and related samples. **Journal of Chromatography A** 1105, 39-50, 2006.

WANG, P.; LI, M.; LATER, S. R.; Extended hopanes beyond C40 in crude oils and source rock extracts from the Liaohe Basin, N.E. China. **Organic Geochemistry** 24, 547-551, 1996.

WATSON, D. F.; FARRIMOND, P.; Novel polyfunctionalised geohopanooids in a recent lacustrine sediment (Priest Pot, UK). **Organic Geochemistry** 31, 1247-1252, 2000.

WELDEGERGIS, B. T.; VILLIERS, A. de; MCNEISH, C.; SEETHAPATHY, S.; MOSTAFA, A.; GÓRECKI, T.; CROUCH, A. M.; Characterisation of volatile components of Pinotage wines using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC–TOFMS). **Food Chemistry** 129, 188-199, 2011.

ZHANG, S.; HUANG, H.; Geochemistry of Palaeozoic marine petroleum from the Tarim Basin, NW China: Part 1. Oil family classification. **Organic Geochemistry** 36, 1204-1214, 2005.

8. APÊNDICE

Trabalho e participação em congressos:

Trabalho apresentado no SIMCRO – Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins; **PTV-GC×GC-TOFMS: UMA PROMISSORA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES PESADOS EM ÓLEOS BRASILEIROS.** Campos do Jordão (SP), 2014.

Participação no ALAGO – Congress on Organic Geochemistry; Armação de Búzios (RJ), 2014.