

CÉLIO FERNANDO FIGUEIREDO ANGOLINI

ESTUDOS DE CASO EM PETRÓLEO: BIODEGRADAÇÃO E ORIGEM

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

CÉLIO FERNANDO FIGUEIREDO ANGOLINI

ESTUDOS DE CASO EM PETRÓLEO: BIODEGRADAÇÃO E ORIGEM

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR CÉLIO FERNANDO FIGUEIREDO ANGOLINI, E ORIENTADA PELA PROFA. .DRA. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI.

Assinatura da Orientadora

Campinas

2014

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Química Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

An47p	Angolini, Célio Fernando Figueiredo, 1986- Estudos de caso em petróleo: biodegradação e origem / Célio Fernando Figueiredo Angolini. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.
	Orientador: Anita Jocelyne Marsaioli. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	1. Petróleo. 2. Micro-organimos. 3. Biodegradação. I. Marsaioli, Anita Jocelyne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Case studies in oil: biodegradation and origin Palavras-chave em inglês: Petroleum Microorganims Biodegradation Área de concentração: Química Orgânica Titulação: Doutor em Ciências Banca examinadora: Anita Jocelyne Marsaioli [Orientador] Fabio Augusto Luciana Gonzaga de Oliveira Cintia Duarte de Freitas Milagre Georgiana Feitosa da Cruz Data de defesa: 11-04-2014 Programa de Pós-Graduação: Química

"A leitura após certa idade distrai excessivamente o espírito humano das suas reflexões criadoras. Todo o homem que lê de mais e usa o cérebro de menos adquire a preguiça de pensar."

"Uma pessoa que nunca cometeu um erro é uma pessoa que nunca tentou algo de novo"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Criador, pela dádiva desse universo de infinitas possibilidades que é a vida. Aos meus pais Mary Stela e Sérgio Angolini e a alguns familiares pelo amor e apoio nessa etapa de minha vida.

Aos meus avôs Fernando e Edelzita Figueiredo e Célio e Luzita Angolini, pelo nome e pelos muitos momentos de alegria e tristeza que contribuíram à formação de meu caráter.

A professora Anita pela oportunidade, ensinamentos e confiança que sem sombra de dúvidas foram essenciais à minha formação e na conclusão desse trabalho.

A todos os meus professores do colégio (Villa, Deschen, Sandra, Maria Amália, Valéria, Chico e outros tantos), da graduação (Luis, Pilli, Herrera, Italo, Regina e etc.), da pós (Reis, Luzia, Valéria, Coelho, etc.) que contribuíram e contribuem para o meu aprendizado.

As meus amigos Fanny, Vinicius e Ana Luisa meus companheiros desde a época de colégio (bons tempos aqueles); aos meuás amigos da graduação companheiros de relatórios à mão, listas e mais listas de exercícios. Em especial: Elisa, Luciene, Juliana, Danilo, Nathy e Raquel pelas viagens, cachoeiras, praias e tudo o mais. Aos amigos do laboratório Georgiana, Simone, Luciana, Adriana, Dani, Lucas, Bruna, Carla, Duda, Lair, Francine, João, Tiago e Haleem pela amizade e momentos de diversão. Aos amigos do laboratório vizinho Tiago, Rosi, Marilia, Rodrigo, Manoel, João, Lucas, Daniara, Lucimara, Guidoti, Danilo, Zé, grandes amigos onde me refúgio às vezes na hora do café. "Ah, café..." Aos amigos da dança de salão Bruna, Henrique, Paty, Herlon, Lícia, Sato, Sol que se tornaram amigos pra vida. Aos amigos de pira, Rafinha, Marcus, Piranha(Thiago), Ricardo, pra onde eu fujo quando preciso esquecer um pouco da Unicamp.

A Dona Maria que sempre nos ajudou no laboratório e nos trata com muito carinho e respeito. E aos técnicos e funcionários das oficinas do instituto que sempre me atenderam e foram essências a manutenção do laboratório.

A Bel, Gabriela e Miguel da CPG que tanto nos ajudam com a burocracia e estão sempre dispostos a nos atender.

A Petrobrás pelo suporte financeiro. E ao CNPQ e a FAPESP pelas bolsas durante meu doutorado.

Finalmente a todos que contribuíram para a realização desse trabalho, e alguém que eventualmente possa ter esquecido.

CURRICULUM VITAE

Nome: Célio Fernando Figueiredo Angolini

Endereço Eletrônico: <u>celio.fernando@gmail.com</u> ou <u>cangolini@iqm.unicamp.br</u> Currículo na Plataforma Lattes: <u>http://lattes.cnpq.br/8380443920606522</u>

1. FORMAÇÃO E TÍTULOS ACADÊMICOS

2010 - atual Doutorado em Química Orgânica - Universidade Estadula de campinas, SP.

Área de Concentração: Química Orgânica. **Título da Tese:** "PETRÓLEO: MICRO-ORGANISMOS, FRAÇÃO POLAR, PETROLEÔMICA E RAZÃO ISOTÓPICA "

2008 – 2010 Mestrado em Química Orgânica – Universidade Estadual de Campinas, SP.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Título da Tese: "Estudo da microbiota e da biodegradação de petróleo de bacias brasileiras, e suas implicações nos parâmetros de biodegradação"

2004 - 2008 Bacharelado em Química - Universidade Estadual de Campinas, SP.

Iniciação Científica: "Determinação da configuração absoluta de epóxidos pelo principio de Horeau" (2006-2007), "Síntese e desracemização de derivados do 1,2,4-butanotriol, por biotransformação" (2007-2008).

2. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Programa de Estágio a Docência (IQ/Unicamp) – PED C
Disciplina: Química Orgânica Experimental (Fármacia e Química)
Período: 1º Semestre 2009, 2º Semestre 2013.

Empresa Júnior: AllQuímica Consultoria Júnior
Função: Assessor de Marketing (2004) e Projetos (2005), Diretor Presidente (2006),
Administrativo-Financeiro (2008) e Conselho (2009).
Período: 2004-2009

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Trabalhos Resumidos em Eventos

ANGOLINI, C. F. F.; Mantovani, S. M.; Oliveira de, L. G.; Marsaioli, A. J. Síntese e desracemização do 1,2,4-butanotriol por biocatálise. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Marsaioli, A. J. Síntese, desracemização e biotransformação com derivados do 1,2,4-butanotriol. XV Congresso interno de iniciação científica, 2007, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Mantovani, S. M.; Oliveira de, L. G.; Marsaioli, A. J. **1,2,4butanetriol deracemization using whole cells of** *Candida albicans* **CCT0776.** 12th Brazilian Meetin on Organic Synthesis, **2007**, Itapema, SC.

ANGOLINI, C. F. F.; Mantovani, S. M.; Oliveira de, L. G.; Marsaioli, A. J. **Biotransformação de derivados do 1,2,4-butanotriol.** 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2008**, Águas de Lindóia, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Marsaioli, A. J. **Biotransformação de derivados do 1,2,4butanotriol.** XVI Congresso interno de iniciação científica, **2008**, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. Análise da biodegradação aeróbia de petróleo do Campo Pampo Sul, Bacia de Campos. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, CE.

ANGOLINI, C. F. F.; da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. Utilização de microbiota indígena na biodegradação aeróbia de petróleo. III Workshop de Biodegradação & Biorremediação, 2009, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; da Cruz, G. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. Characterization of biosurfactantes produced by petroleum microbial consortia. 3° Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 2009, Campinas, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Estudo e caracterização enzimática de micro-organismos isolados do petróleo" no V Workshop de Biocatálise e Biotransformações, 2010, Maringá, PR.

ANGOLINI, C. F. F.; Fonseca, F. S. A.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Biodegradação de compostos aromáticos por micro-organismos isolados de petróleo **do campo Pintassilgo, Bacia Potiguar, RN**" na 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **2010**, Águas de Lindoia, SP.

ANGOLINI, C. F. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Biodegradação de petróleo por consórcio microbiano isolado de petróleo do campo Pintassilgo, Bacia Potiguar, RN." 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis, SC.

ANGOLINI, C. F. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Acidic fraction analyses of Brazilian oils using petroleomics." 25th Internacional Meeting on Organic Geochemistry, 2011,Interlaken, Suiça.

ANGOLINI, C. F. F.; Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. "Acidic fraction analyses of Brazilian oils by LTQ Orbitrap XL a hybrid FTMS", Congresso Latino Americano de Geoquímica Orgânica- ALAGO, 2012, Santa Marta, Colombia.

3.2 Artigos completos publicados

Mantovani, S. M.; ANGOLINI, C. F. F.; Marsaioli, A. J. "Mechanistic investigation of *Candida albicans* CCT 0776 stereoinversion system and application to obtain enantiopure secondary alcohols", *Tetrahedron: Asimmetry*.2009, 20, 2635-2638.

Cruz, G. F.; ANGOLINI, C. F. F.; Santos Neto, E. V.; Loh, W. Marsaioli, A. J. "Biosurfactants Produced by Petroleum Microbial Consortia of Brazilian Reservoirs.", *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21(8),1517-1523.

Cruz G. F., ANGOLINI C. F. F., Oliveira L. G., Lopes P. F., Vasconcellos S. P., Crespim E., Oliveira, V. M., Santos Neto, E. V.; Marsaioli, A. J. Seraching for monooxygenases and hydrolases in bactéria from an extreme environment. *Applied Microbiology and biotechnology*, **2010**, 87(1), 319-329.

Vasconcellos, S.P., ANGOLINI, C.F.F., Garcia I.N.S., *et al.* Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs." *Organic Geochemistry*, **2010**, 41(7), 675-68.

Cruz G. F., ANGOLINI C. F. F., Dellagnezze, B.M., *et al*, Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microrganisms in deep sea reservoirs?" AMB Express, 2012, 1:47.

Lopes-Oliveira, P.F., Vasconcellos, S.P., ANGOLINI, C.F.F., *et al.* "**Taxonomic Diversity and Biodegradation Potential of Bacteria Isolated from Oil Reservoirs of an Offshore Southern Brazilian Basin**" *Petroleum & Environmental Biotechnology*, **2012**, DOI 10.4172/2157-7463.1000132.

3.3 Capítulos de livro

Marsaioli, A. J.; da Costa, B. Z.; Angolini, C. F. F.; Fonseca, F. S. A. "UMA OXIRREDUTASE DAS PROFUNDEZAS" será lançado em setembro, 2014, no VII BiocatBiotrans.

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a ação de micro-organismos em amostras de petróleo naturalmente biodegradadas e em ensaios de biodegradação realizados em laboratório, através da otimização de um protocolo que utiliza metodologias rápidas de análise da fração polar por ESI-MS. Assim sendo foi possível aferir a composição molecular dos constituintes das classes de compostos oxigenados (O, O₂. O₃ e O₄) e nitrogenados (N, NO, NO₂, NO₃) presentes no petróleo e correlacioná-las ao fenômeno de biodegradação, e ambiente deposicional em óleos da Bacia de Campo e da Bacia Potiguar, respectivamente. As informações geradas nesse estudo contribuíram para o entendimento da origem dos biomarcadores ácidos através da degradação dos respectivos hidrocarbonetos.

Complementando o escopo principal do trabalho foram caracterizados micro-organismos do petróleo por técnicas de espectrometria de massas, mostrando a importância da técnica para construções de bibliotecas de referência necessitando ainda aprimoramento para análise de micro-organismos em misturas. Finalizando foi realizada a síntese de um biomarcador trideuterado com ampla utilização em estudos de petróleo.

Abstract

We have evaluated the action of microorganisms in naturally biodegraded samples and in laboratory assays, using fast analysis of the polar fraction by ESI-MS. Therefore the molecular composition of petroleum compounds containing oxygen (O, O2, O3 and O4) and nitrogen (N, NO, NO2, NO3) were assigned and correlated to the petroleum biodegradation and the depositional environments. These results contributed to a better understanding of the origin of acid biomarkers and its correlation to the neutral hydrocarbons.

Additionally, we characterized the petroleum microorganisms using mass spectrometry techniques, showing the importance of this technique and the necessity to construct a reference library of petroleum MO. Also we synthesized a noncommercial trideuterated biomarker widely used in petroleum studies.

Lista de abreviaturas

MO	Micro-organismos
FT-MS	Espectrômetro de massas com
	transformada de Fourier
ICR	Do inglês "ion cyclotron resonance"
	ou ressonância ciclotrônica de íons
ESI	Do inglês "electronspray ionization"
DBE	Do inglês "Double Bond equivalent"
	ou número de insaturação
Razão A/C	Razão acíclicos/cíclicos
I/P	Ímpar/Par
НСА	Do inglês "Hierarchical component
	analysis"
PCA	Do inglês "Principal component
	analysis"
PCs	Do inglês "Principal component"
KIE	Do inglês "kinetic isotopic effect"
VPDB	Padrão "Vienna Pee Dee Belemnite"
GC-C-IRMS	Cromatografo a gás – combustão –
	razão isotópica
MALDI	Ionização por desorção a laser
	assistida por matrix
GC-MS	Cromatografo a gás – espetrometro
	de massas

HRMS	Espectrômetro de massas de alta
	resolução
DC	Do inglês "direct current"
HOP/STER	Hopanos/Esteranos
TOF-MS	Detector de massas por tempo de voo,
	do inglês "time of flight"

ÍNDICE

Lista de tabelasXXV
Lista de Figuras XXVII
Lista de EsquemasXXXIII
Introdução Geral1
Capitulo I
1 Introdução5
1.1 Condições necessárias a biodegradação6
1.2 Fração polar
1.3 Técnicas de Análise – FT-MS14
2 Área de estudo17
2.1 Estudo de caso I – Biodegradação : Bacia de Campos, RJ17
2.2 Estudo de caso II – Origem (ambiente deposicional): Bacia Potiguar,RN. 20
3 Objetivos
4 Resultados e Discussões25
4.1 Estudos de casos em geoquímica orgânica I - Biodegradação25
4.1.1 Compostos oxigenados $(O, O_2, O_3 e O_4)$
4.1.2 Escala de biodegradação – Fração ácida51
4.1.3 Compostos nitrogenados (Classes NO _x)

	4.1.4	Ensaio de biodegradação em laboratório	55
	4.1.5	Razão isotópica por ESI-Orbitrap	57
	4.2 Estu	udos de casos em geoquímica orgânica II – Origem	62
	4.2.1	Compostos oxigenados	64
	4.2.2	Compostos Nitrogenados	67
5	Conclu	ısões	70

Capitulo II

1	In	trodução	.75
	1.1	Diamantoídes	75
	1.2	MALDI-TOF-MS	.77
2	0	bjetivos	78
3	R	esultados e Discussões	78
	3.1	Síntese de derivados adamantóides	78
	3.2	Caracterização de micro-organismos (MO) do petróleo	82
4	C	onclusões	89

Parte Experimental

1	Equipamentos e condições empregadas	93
	1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura	93
	1.2 Preparo de Amostras	93
	1.2.1 Obtenção das frações neutras	94
		95
	1.3 Obtenção das frações ácidas	.95

2	Μ	létodos de análise97
	2.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas97
	2.2	Ionização por electrospray com analisador de massas de alta resolução
	(orb	itrap)99
3	С	álculos dos parâmetros99
	3.1	Razões O _X /O _y 99
	3.2	Razões Classe O ₂ 100
4	С	onstrução dos gráficos101
5	Si	íntese do derivado do adamantano103
	5.1	Metilação geral do 1-bromo-adamantano103
	5.2	Cristalização do 1-metil-adamantano deuterado103
6	Pı	reparação de amostras das células bacterianas para análises por
N	IALD	DI-MS105
A	NEX	O I - Espectros107

Lista de tabelas

Tabela 1 – Aceptores de elétrons utilizados por diferentes micro-organismos. 7
Tabela 2 - Características dos reservatórios e propriedades geoquímicas das
amostras de petróleo estudadas da Bacia de Campos
Tabela 3 - Características dos reservatórios e propriedades geoquímicas das
amostras de petróleo estudadas da Bacia de Potiguar23
Tabela 4 – Resolução necessária para discriminação dos compostos (m/z 400)
por espectrometria de massas26
Tabela 5 – Razões entre as classes de compostos oxigenados da fração ácida
de amostras com diferentes níveis de biodegradação
Tabela 6 - Razões entre as classes de compostos dioxigenados das amostras
com diferentes níveis de biodegradação41
Tabela 7 – Preferência de biodegradação entre os compostos com números
ímpares e pares de carbono45
Tabela 8 – Padrões isotópicos de ¹³ C para o ácido cólico obtidos pelo IRMS e
Orbitrap
Tabela 9 – Padrões isotópicos de ¹³ C das classes dos compostos oxigenados
para as amostras com diferentes níveis de biodegradação
Tabela 10 - Resumo dos resultados para testes de metilação do 1-bromo-
adamantano79
Tabela 11 – Resumo das condições experimentais da deuterometilação do 1-
Br-adamantano
Tabela 12 - Atividades enzimáticas (hidrolases) em bactérias isoladas do
consórcio microbiano recuperado das amostras de óleo da Bacia de Campos
(% de conversão)82

Tabela 13 - Variância dos dados espectrais de MALDI-MS explicada para	a as
5 PCs e erros de calibração e validação da PCA	.86
Tabela 14 – Massas das frações dos óleos P1-P5.	.97

Lista de Figuras

Figura 12 – Exemplos de compostos encontrados na classe O da fração ácida
do petróleo
Figura 13 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a
classe O da fração ácida das amostras P1-535
Figura 14 – Distribuição dos hidrocarbonetos lineares (fração neutra- CG/MS)
e ácidos lineares (fração ácida - ESI) da amostra P1, levemente biodegradada.
Figura 15 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a
classe O ₂ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5. A escala de cores
representa a abundância relativa dos compostos
Figura 16 - Representação de algumas classes de compostos encontrados na
classe O ₂ na fração ácida do petróleo40
Figura 17 – Correlação entre a razão A/C e os índices de biodegradação de
Peter & Moldowan ^x . A amostra P1 não foi utilizada para regressão linear42
Figura 18 - Abundância dos compostos da classe O ₂ com diferentes valores de
DBE43
Figura 19 – Cromatograma reconstruído de íons (RIC m/z 71, GC-MS) dos
hidrocarbonetos alifáticos das amostras P5, P3, P2 e P4 com seus respectivos
níveis de biodegradação44
Figura 20 – Distribuição dos compostos com DBE = 1 da classe O_2 da fração
ácida para as amostras com diferentes níveis de biodegradação45
Figura 21 - Cromatograma reconstruído de íons (RIC m/z 82, GC-MS) dos
hidrocarbonetos saturados (alquil-cicloexanos) das amostras P5, P3, P2 e P4
com seus respectivos níveis de biodegradação46
Figura 22 – Cromatograma reconstruído de íons (RIC <i>m/z</i> 123 e 191, GC-MS)
dos bicíclicos tricíclicos e hopanos das amostras P5 e P4 com seus respectivos
níveis de biodegradação47

xxviii

Figura 23 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O₃ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5......49 Figura 24 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O₄ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5......50 Figura 25 – Escala de biodegradação proposta para classificação das amostras de óleos com relação aos compostos oxigenados da fração ácida. Níveis de biodegradação L (leve), M (moderado), A (Alto), Severa......52 Figura 26 – Abundância normalizada das classes de compostos nitrogenados (¹²C e ¹³C) da fração ácidas dos petróleos P1, P2, P3, P4 e P5 em relação à todos os heterocíclicos com fórmula molecular aferida com erros de até 3 ppm......53 Figura 27 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe NO₂ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5......54 Figura 28 - Abundância normalizada das classes de compostos oxigenados (¹²C e ¹³C) da fração ácidas das alíquotas do ensaio de biodegradação (10 em 10 dias) em relação à todos os heterocíclicos com fórmula molecular aferida com erros de até 3 ppm.55 Figura 29 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O2 da fração ácida para as alíquotas do ensaio de biodegradação em Figura 30 - Correlação entre a razão A/C e o tempo de biodegradação em dias para o ensaio de biodegradação em laboratório......57 Figura 31 – Representação gráfica do fenômeno de fracionamento isotópico. Figura 32 - Abundância relativa das classes de compostos encontrados nas

análises de óleo bruto dos petróleos LC1, LC2, M1 e M2 de todos os heterocompostos com fórmula molecular aferida com erros de até 3 ppm.64

Figura 33 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a Figura 34 – Cromatograma reconstruído de íons (RIC m/z 71, GC-MS) dos hidrocarbonetos alifáticos das amostras LC1, LC2, M1 e M2.66 Figura 35 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O dos óleos brutos da Bacia Potiguar.....67 Figura 36 – Abundância relativa das classes de compostos nitrogenados encontrados nas análises de óleo bruto dos petróleos LC1, LC2, M1 e M2....68 Figura 37 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a Figura 38 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe NO dos óleos brutos da Bacia Potiguar......70 Figura 40 – Cromatogramas obtidos das análises por GC-MS do extrato das reações: (A) Metilação do 1-bromo-adamantano (entrada 1, Tabela 10), (B) Metilação do 1-bromo-adamantano com CD_3I (entrada 2), (C) após Figura 42 - Perfil de MALDI-TOF para a cepa do micro-organismo AF35 (Bacillus pumilus) crescida em diferentes meios de cultivo: Agar nutriente Figura 43 - Perfil de MALDI-MS para a cepa do micro-organismo SG33 (Bacillus safensis) crescida em diferentes meios de cultivo: Agar nutriente Figura 44 – Dendograma obtido da análise de HCA (centrado na média) dos picos de massas obtidos das análises por MALDI-ToF para os micro-

Figura 45 - Gráfico dos escores do PCA (centrado na média) dos picos de
massas obtidos das análises por MALDI-ToF dos micro-organismos SG - X.
Figura 46 – (A) Cromatogramas reconstruídos e gráficos de loadings vs.
<i>variáveis:</i> (B) fator 1 e (C) fator 287
Figura 47 - Análise filogenética baseada na sequência parcial do gene da
girase B obtida das bactérias isoladas pertencentes ao gênero
Figura 48 – Sistema utilizado na separação por afinidade em coluna das
amostraras de óleo96
Figura 49 – Exemplo da lista de compostos obtidos das análises de ESI-MS
Figura 50 – Exemplo de separação das classes de compostos realizadas no
Excel
Figura 51 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo
P5107
Figura 52 – Espectro de massas ampliado para a fração ácida do óleo P5107
Figura 53 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo
P3108
Figura 54 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo
P2108
Figura 55 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo
P4109
Figura 56 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo
P1109
Figura 57 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo LC 1110
Figura 58 – Espectro de massas ampliado de alta resolução para o óleo LC 1.

Figura 59 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo LC 2111
Figura 60 – Espectro de massas ampliado de alta resolução para o óleo LC 2.
Figura 61 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo M 1112
Figura 62 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo M 2112
Figura 63 – Espectro de RMN de ¹ H para a mistura 1-trideuterometil-
adamantano (90%) e adamantano(10%)
Figura 64 – Espectro de ${}^{13}C$ (A) e DEPT-135 (B) para a mistura 1-
trideuterometil-adamantano (90%) e adamantano(10%)114
Figura 65 – Espectro de massas do 1-trideuterometil-adamantano

Lista de Esquemas

Esquema 1 – Rota metabólica simplificada de micro-organismos
heterotróficos9
Esquema 2 – Rota de biodegradação aeróbia de alcanos10
Esquema 3 - Rota de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos
(adaptado de Fritsche <i>et al.</i>)11
Esquema 4 - Representação gráfica da transformação dos ácidos carboxílcos
do petróleo em hidrocarbonetos e hidrocarbonetos saturados
Esquema 5 – Rotas de biodegradação aeróbia de alcanos alifáticos
Esquema 6 - Rota simplificada de biodegradação anaeróbia de
hidrocarbonetos via fumarato (adaptado de Grossi et al.)
Esquema 7 - Reações envolvidas nas vias de degradação aeróbia de tolueno.
As moléculas de catecol, 3- metilcatecol e protocatecuato são metabolizadas
por meta ou orto clivagem, produzindo intermediários centrais do ciclo de
Krebs. (Modificada de Gülensoy e Alavarez, 1999)48
Esquema 8 - Rota de biodegradação de carbazol por micro-organismos do
gênero Pseudomonas sp53
Esquema 9 - Síntese do 1-metil-adamantano trideuterado via reação de
Grignard79
Esquema 10 - Reações colaterais na alquilação do 1-bromo-adamantano80
Esquema 11 - Esquema de reações envolvidas no processo de triagem para as
sondas de lípase , esterase e epóxido hidrolase82

Introdução Geral

No passado muito se discutiu a respeito da origem do petróleo. Hoje a origem orgânica é a mais aceita e as características dos óleos estão diretamente ligadas aos ambientes deposicionais da matéria orgânica que daram origem ao mesmo. Estes eram anóxicos, já que em ambientes ricos em oxigênio ocorre mais de 99,9% de mineralização da matéria orgânica (CO₂ e H_2O),¹ a qual é soterrada numa taxa de 5 a 500 metros por milhão de anos. Neste processo ocorre transformação química, microbiana (aeróbia e anaeróbia) e térmica da matéria orgânica, onde os grupos funcionais são eliminados.

As diferenças na distribuição, proporção e constituintes da matéria orgânica dependem da biota presente nos ambientes deposicionais. Por exemplo, a biomassa de origem continental é mais rica em oxigênio e mais pobre em hidrogênio do que a biomassa marinha, devido à maior contribuição de plantas terrestres constituídas principalmente de lignina e celulose. Com isso, a matéria orgânica derivada de vegetais superiores tende a gerar gás, enquanto o material derivado de zooplâncton e fitoplâncton, marinho ou lacustre, tende a gerar óleo.¹ Juntamente com a matéria orgânica, outros sedimentos também são depositados dando origem à rocha geradora de petróleo, a qual deverá conter no mínimo 2% de matéria orgânica e ser submetida a temperaturas menores que 50- 60 °C para dar origem ao petróleo.² Após sua geração, o petróleo é expulso da rocha geradora em direção à rocha

¹Tissot, B.P.; Welte, D.H.; Petroleum Formation and Occurrence – A New Approach to Oil and Gas Exploration, 2th ed., Springer, New York, **1978**.

² Milles, J. A. Illustrate glossary of petroleum geochemistry, Oxford Science Publications, Oxford, **1989**.

através de falhas e discordâncias até encontrar um reservatório capeado por uma rocha impermeável (migração secundária), ou aflorar à superfície. A composição do óleo pode ainda sofrer mudanças em diferentes fenômenos após a sua geração. Existem os denominados processos primários que ocorrem antes da acumulção como: geocromatografia, e extração de matéria orgânica durante migração, etc. Já os secundários ocorrem após acumulação e são: solubilização de constituintes em água (*water washing*), evaporação, oxidação, biodegradação e etc.³

Sendo assim, as pesquisas sobre origem, migração, acúmulo e biodegradação de óleos são de grande importância para a exploração eficaz do petróleo e estas são auxiliadas pela análise das diversas classes de biomarcadores utilizados em geoquímica orgânica.^{4,5,6} Neste trabalho serão abordados estudos de caso em petróleo sobre biodegradação e origem (Capítulo I) e caracterização de micro-organismos de petróleo (Capítulo II).

³ Trindade, L. A. F. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, Stanford University, **1992**.

⁴ Philp, F. P.; Fossil Fuel Biomarkers: Applications and Spectra, 1th ed., Elsevier, New York, **1985**.

⁵ Mello, M. R.; Telnaes, N.; Gaglianone, P. C.; Chicarelli, M. I.; Brassell, S. C.; Maxwell, J. R. Organic Geochemistry. **1988**, 13 (1-3), 31-45.

⁶ Holba, A. G.; Dzou, I. I.; Wood, G. D.; Ellis, L.; Adam, P.; Schaeffer, P.; Albrecht, P. Greene, T.; Hughes, W. B. Organic Geochemistry. **2003**, 34(3) 441-469.

Capítulo I

"Estudo de Casos em Petróleo"
1 Introdução

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos, aliciclicos e aromáticos além de outros compostos contendo enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos como níquel e vanádio. ⁷ Desde o inicio da produção comercial de petróleo, a indústria petroquímica tem se deparado com problemas relacionados à ação de micro-organismos nos diversos processos de beneficiamento do mesmo. ⁸

Os micro-organismos são equipados com arsenais enzimáticos capazes de utilizar os constituintes do petróleo como fonte de nutrientes e energia, e podem atuar isoladamente ou em consórcios e degradar desde alcanos lineares a compostos poliaromáticos, processo conhecido como biodegradação.⁹ Sendo este o principal responsável pela diminuição do valor econômico do petróleo relacionada à biodegradação e à corrosão de equipamentos e tanques de estocagem. ¹⁰ Sabe-se que os componentes do petróleo podem ser degradados seletivamente no reservatório durante de 0 processo biodegradação, que ocorre a diferentes temperaturas e pressões. Contudo esse processo ainda é objeto de discussões conflitantes uma vez que se atribui a degradação tanto aos micro-organismos aeróbios^{11,12,13} quanto aos anaeróbios ^{14,15,16} isolados ou em consórcios mistos.¹⁷

⁷ Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, 67 (4), 503-549.

⁸ Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B. K. C. Antonie van Leewenhock. 2000, 77, 103-116.

⁹ Atlas, R. M.; Marine pollution Bulletin. 1995, Oxford, 31, 178-182.

¹⁰ Cord-Ruwich, R.; Kleinitz, W.; Widdel, F. Journal of Petrleum Technology. 1987, 1, 97-106.

¹¹ Orphan, V. J.; Taylor, L. T.; Hafenbradl, D.; Delong, E. F. *Applied and Environmental Microbiology*. **2000**, 66, 700-711.

¹² Bonch-Osmolovskaya, E. A.; Miroshnichenko, M. L.; Lebedinsky, A. V.; Chernyh, N. A.; Nazina, T. N.; Ivoilov, V. S.; Belyaev, S. S.; Boulygina, E. S.; Lysov, Y. P.; Perov, A. N.; Mirzabekov, A. D.; Hippe, H.; Stackebrandt, E.; L'Haridon, S.; Jeanthon, C. *Applied and Environmental Microbiology*. **2003**, 69, 6143-6151.

Porém, independente do aceptor final de elétrons, os micro-organismos precisam sintetizar moléculas muito complexas necessárias à manutenção da vida, e realizam isso com um alto nível de organização, o que ocasiona um estado de baixa entropia, necessitando de uma fonte de energia como força motriz para a realização desses processos, por exemplo, o petróleo.

Com isso, o estudo da biodegradação do petróleo torna-se um tópico importante para o entendimento do metabolismo desses micro-organismos. Uma maneira de se compreender esse processo é através dos compostos contendo heteroátomos, pois nos processos metabólicos e nos ciclos de reciclagem dos elementos no ambiente, observa-se a formação de compostos heteroatômicos como intermediários e/ou produtos finais de muitos desses ciclos biogeoquímicos. O que torna de grande valia a caracterização e a determinação da variação da concentração desses compostos durante o processo de biodegradação nas amostras de petróleo.

1.1 Condições necessárias a biodegradação

Para que a biodegradação ocorra é necessária a presença de compostos aceptores de elétrons e nutrientes adequados para manter ativos os mais diversos micro-organismos. Por exemplo, os micro-organismos aeróbios necessitam da presença de oxigênio molecular como aceptor final de elétrons para seu crescimento e para converter os seus substratos (*e.g.*, hidrocarbonetos) em CO₂, H₂O e biomassa. Já os micro-organismos

¹³ Borzenkov, I. A.; Milekhina, E. I. Gotoeva, M. T.; Rozanova, E. P.; Beliaev, S. S. *Mikrobiologia*. **2006**, 75, 82-89.

¹⁴ Coates J. D.; Woodward, J.; Allen, J.; Philip, P.; Lovley, D. R.; *Applied and Environmental Microbiology*. **1997**, 63, 3589-3593.

¹⁵ Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A.; Santas, R. Applied and Environmental Microbiology. **1997**, 48, 677-686.

¹⁶ Voordouw, G. et al. Applied and Environmental Microbiology. 1996, 62, 1623-1629.

¹⁷ da Cruz, G, F; Vasconcellos, S. P.; Angolini, C. F. F.; et al. AMB Express, 2011, 1:47.

anaeróbios utilizam sais inorgânicos (nitratos, sulfatos, cloratos, etc.) como aceptores finais de elétrons, existem também alguns micro-organismos facultativos os quais adaptam seus metabolismos em função das condições ambientais, entre outros, Tabela 1.

Micro-organismos	Aceptores de elétrons	Produtos
Aeróbios	O_2	CO_2
Metanogênicas	H_2/H^+	CH_4
Sulfato redutoras	SO_4^{2-}	H_2S
Denitrificantes	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	NO_2/N_2
Outros anaeróbios	Fumarato	Succinato

 Tabela 1 – Aceptores de elétrons utilizados por diferentes micro-organismos.

Outros nutrientes inorgânicos, como nitrogênio e fósforo são essenciais na biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios. Traços de metais, como molibdênio, cobalto e cobre são importantes em reações enzimáticas e podem limitar o processo de biodegradação do petróleo.¹⁸

Nos reservatórios, de modo geral, a biodegradação ocorre devido à presença de bactérias e arqueias. Essas devido a sua grande diversidade metabólica estão envolvidas no ciclo da maioria dos elementos, dois exemplos são as bactérias metanogênicas (convertem CO_2 em CH_4) e as fixadoras de nitrogênio (transformam o N₂ inorgânico em N biológico) que desempenham funções apenas realizadas por esses procariotos e que são essenciais nos ciclos do carbono e do nitrogênio. Existem também os organismos denominados litotróficos que utilizam como fonte de energia compostos inorgânicos como amônia e H₂S.

¹⁸ Peters, K. E.; Walters, C. C.; Moldowan, J. M. *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human Historyy.* **2005**, vol. 1, 2nd Ed, Cambridge University Press.

No contexto geoquímico, o ciclo do carbono está diretamente ligado ao do oxigênio, e de forma simplificada pode-se visualizá-lo como a ligação da fotossíntese com a respiração aeróbia/anaeróbia e/ou a fermentação. Onde na fotossíntese há o consumo de CO_2 e H₂O, gerados durante a respiração, com a liberação do oxigênio que será usado na respiração aeróbia. Cabe ressaltar que esta é uma visão simplista de todo um processo metabólico que é essencial para a manutenção da vida desses organismos, uma vez que esses ciclos estão diretamente ligados à produção de energia que é essencial para manter a complexidade celular.

Ainda olhando para os diferentes tipos de micro-organismos pode-se classificá-los em dois tipos: os autotróficos e os heterotróficos, os primeiros são capazes de utilizar apenas carbono inorgânico (CO_2) e água para a construção de biomoléculas essenciais para o seu desenvolvimento. Os heterotróficos usam as moléculas orgânicas ($(C_cH_hO_o, Esquema 1)$ e aceptores de elétrons para o seu crescimento e obtenção de energia, portanto são os principais responsáveis pela biodegradação dos constituintes do petróleo. De maneira bem simplificada essa energia é obtida através de reações de óxido-redução, onde através de uma cascata de reações catabólicas os organismos realizam a transferência de elétrons de compostos com baixos potenciais de redução para compostos com altos potencias de redução, armazenando a energia liberada desse processo na forma de ATP ("fosforilação oxidativa" ou "fosforilação a nível de substrato") que será utilizada posteriormente nos processos anabólicos.





Esquema 1 – Rota metabólica simplificada de micro-organismos heterotróficos.

A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos por micro-organismos aeróbios já é bem estabelecida na literatura e pode ocorrer na porção terminal e/ou subterminal da cadeia do hidrocarboneto. ^{19, 20, 21} A etapa inicial é a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular como aceptor de elétrons. A oxidação terminal inicia-se com a formação de um álcool primário. Em seguida o álcool é oxidado a aldeído e posteriormente a ácido carboxílico, que por sua vez é utilizado como substrato pela acil-CoA sintetase e é biodegradado pelo processo de β -oxidação. A oxidação subterminal inicia-se pela inserção de oxigênio numa ligação CH em posição não terminal gerando

¹⁹ Atlas, R. M. *Microbiology Review*. **1981**, 45(1), 180-209.

²⁰ Berthe-Corti, L.; Fetzner, S. Acta Biotechnology. 2002, 3-4, 299-336.

²¹ Wentzel, A.; Ellingsen, T. E.; Kotlar, H-K.; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M. Applied Microbiology and Biothechnology.

um álcool secundário o qual na cascata de eventos seguintes é oxidado a cetona e éster. O éster é hidrolisado e transformado em álcool primário e ácido carboxílico pela ação de esterases. Estes últimos passam a ser degradados seguindo o ciclo da β -oxidação, Esquema 2.



Esquema 2 – Rota de biodegradação aeróbia de alcanos. (adaptado de Wentzel *et al.*)²²

A biodegradação de compostos aromáticos e cíclicos também é iniciada pela ação de oxigenases (mono- ou dioxigenases) as quais promovem a oxidação dos substratos formando catecois (dióis) que sofrem clivagem do anel e são degradados a diferentes intermediários (acetaldeído, piruvato e succinato).^{23, 24}

²² Wentzel, A.; Ellingsen, t. E.; Kotlar, H-K; Zotchev, S. B.; Throne-Holst, M.; *Applied Microbiology and biotechnology*. **2007**, 76, 1209-1221.

²³ Evans, P. J.; Ling, W.; Goldschimidt, B.; Ritter, E. R.; Young, L. Y.; *Applied Environment Microbiology*. 1992, 58, 496-501.

²⁴ Berthe-Corti, L.; Höpner, T.; *Paleo*.**2005**, 219, 171-189.



Esquema 3 – Rota de biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos (adaptado de Fritsche *et al.*)²⁵

Contudo, apesar da rota de biodegradação de algumas classes de compostos já serem bem estabelecidas na literatura, ainda existem muitas outras presentes no petróleo em que ainda não se conhece tal processo. Por isso, a necessidade de se estudar os processos de biodegradação não só avaliando os hidrocarbonetos, mas também os compostos funcionalizados (ácidos, alcoóis, ésteres, etc – Fração Polar) possíveis intermediários dessa degradação.

²⁵ Fritsche, W.; Hofrichter, M.; In: *biotechnology*.**2000**, Vol. 11b (J. Klein, ed.), John Wiley & Sons, New York, p.146-164.

1.2 Fração polar

A fração polar corresponde, em média, a 5% da massa do petróleo bruto, podendo ser maior em óleos muito biodegradados. Desta, os ácidos orgânicos, que podem ser lineares ou cíclicos, saturados ou aromáticos, são os mais estudados. Além dos compostos ácidos, usualmente chamados de ácidos naftênicos, existem diversos compostos heteroatômicos (ácidos e básicos) contendo átomos de O, N e S e a presença dos mesmos é de grande preocupação para a indústria petrolífera, pois estão diretamente relacionados aos problemas de deposição, floculação, desativação de catalisadores, instabilidade no armazenamento e problemas de corrosão nos processos de transporte e refino.²⁶ Por isso, a extrema importância de estudar e caracterizar essa fração do petróleo.

Atualmente isso é feito determinando-se as distribuições dos números de carbonos e de insaturação uma vez que muito desses problemas estão diretamente relacionados ao tamanho e às estruturas desses compostos,²⁷ suas caracterizações são relevantes para a geoquímica orgânica particularmente nos estudos de migração e biodegradação.²⁸

No entanto a espectrometria de massas de baixa resolução não é capaz de resolver e analisar todos os componentes de amostras tão complexas, e ainda existe o problema do limite da faixa dinâmica dos equipamentos o que dificulta a análise de uma classe específica de compostos heteroátomicos

²⁶ Rodger, R.P.; Schaub, T. M.; Marshall, A. G. Petroleomics: MS returns to its roots. *Analytical Chemistry* **2005**, 21-27.

²⁷ Hsu, C. S.; Dechert, G. J.; Robbins, W. K.; Fukuda, E. K. Naphthenic Acids in Crude Oils Characterized by Mass Spectrometry. *Energy & Fuels* **2000**, 14, 217-223.

²⁸ Koike, L.; Reboucas, L. M. C.; Reis, F. De A. M.; Marsaioli, A.J.; Richnow, H. H.; Michaelis, W. Naphthenic acids from crude oils of Campos Basin. *Org. Geochem.* **1992**, *18*, 851-860.

frente a grande quantidade de compostos analisados simultêcnemente.²⁹ Esse problema até poucos anos atrás era resolvido realizando-se várias etapas de purificação para obter as frações de interesse com o mínimo possível de interferencias. Contudo essas frações eram difíceis de serem analisadas por técnicas como a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, devido a presença de compostos com altos pontos de ebulição. Alternativamente ácidos transformados OS compostos eram em hidrocarbonetos, Esquema 4, e então analisados aumentando muito o trabalho e os custos das análises.



Esquema 4 – Representação gráfica da transformação dos ácidos carboxílcos do petróleo em hidrocarbonetos e hidrocarbonetos saturados.

Assim com uso de ionizadores e analisadores de massas mais eficientes, tornou possível avaliar e caracterizar essas frações do petróleo de modo direto ou com o mínimo de preparo de amostras surgindo-se uma nova modalidade

²⁹ Shi, Q.; Zhao, S.; Xu, Z.; Chung, K. H.; Zhang, Y.; Xu, C. Distribution of acids and neutral nitrogen compounds in a Chinese crude oil and its fractions: characterized by negative-ion electrospray ionization fourier transform ion cyclotron ressonance mass spectrometry. *Energy&Fuels* **2010**, 24, 4005-4011,

de análise denominada petroleômica.²⁶ Onde devido as técnicas de ionização por electrospray ³⁰ ou MALDI, que permitem a ionização suave de compostos orgânicos, teoricamente não há limite de massa molecular desde que seja possível carregá-lo positiva ou negativamente. Outro advento que permitiu a realização dessas análises foi o surgimento das técnicas que medem razão massa/carga (m/z) com alta resolução e exatidão denominadas FT-MS ou espectrometria de massas com transformada de Fourier (FT-ICR e Orbitrap).

Na literatura existem relatos apontando que apenas o FT-ICR possui poder de resolução suficiente, *i.e.* m/ $\Delta m_{50\%}$ > 350.000, para que a complexidade da amostra não exceda a capacidade de picos da técnica (largura do espectro dividida pela largura de um pico típico).²⁶ Contudo, este trabalho e outros relatos na literatura apontam que é possível realizar as mesmas análises obtendo bons resultados utilizando como medidor de razão m/z o Orbitrap.³¹

1.3 Técnicas de Análise – FT-MS

A grande sacada para a análise direta da fração polar do petróleo foi utilizar ao nosso favor a complexidade das razões massa/carga gerada pela diversidade isotópica natural dos elementos. Isso só é possível devido ao uso de detectores de massas de alta resolução (FT-MS), com medidas de massas de elevada exatidão.

³⁰ Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C.K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.; Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. Science, **1989**, 246, 64-71.

³¹ Pomerantz, A. E.; Mullins, O.C.; Paul, G.; Ruzicka, J.; Sanders, M.; Orbitrap Mass Spectrometry: A Proposal for Routine Analysis of Nonvolatile Components of Petroleum. Energy&Fuels, **2011**, 25, 3077-3082.

Atualmente os melhores equipamentos para a realização dessas análises são os espectrômetros de massas com ressonância ciclotrônica de íons (ICR) e transformada de Fourier. Resumidamente essa técnica baseia-se na injeção de íons em um campo magnético (7 ou 9.4 T) onde esses íons sob influência do campo iniciam um movimento em orbita ciclotrônica. Os mesmos ainda ficam aprisionados em uma barreira potencial devido à aplicação de uma voltagem DC. Cada pacote de íons, de razões m/z específico, induz uma diferença de carga oscilante nos eletrodos detectores, gerando um sinal no domínio do tempo que consiste da soma de todos os sinais das diferentes razões m/z, que são convertidos em m/z através de uma fórmula quadrática, Figura 1.³²



Figura 1 – Estágios na análise por FT-ICR. (adaptado de 32)

³² Marshall, A. G.; Accurate mass measurement: taking full advantage of nature's isotopic complexity. Physica B, **2004**, 503-508.

Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Equipamentos similares usados para esse tipo de análise são os espectrômetros de massa munidos de um analisador de massas do tipo Orbitrap. ³¹ Estes equipamentos, apesar de alcançarem resoluções inferiores aos FT-ICR, são capazes de aferir fórmulas moleculares únicas para os compostos presentes nas misturas complexas das amostras de petróleo. O funcionamento é bastante similar ao FT-ICR, porém agora os íons são capturados e orbitam um campo eletromagnético. As razões *m/z* agora são determinadas pela medição das frequências de oscilação axial dos íons, Figura 2. O uso do Orbitrap traz inúmeras vantagens como: menor custo de manutenção e da análise e a não necessidade de um supercondutor. Apesar das limitações de resolução com o avanço nas técnicas de produção das celas do orbitrap já se consegue atingir resoluções na mesma faixa do ICR.



Figura 2 – Esquema tridimensional do Orbitrap e exemplo de uma trajetória estável de íon.

2 Área de estudo

2.1 Estudo de caso I – Biodegradação : Bacia de Campos, RJ

A Bacia de Campos é atualmente a bacia mais prolífica do Brasil, abrangendo uma área de cerca de 100.000 km². Os campos de petróleo estão localizados em uma alta faixa de profundidade de água, porém não impediu as operações de perfuração dos reservatórios, cada vez mais profundos. O estabelecimento da bacia está relacionado com a ruptura do Gondwana e seu desenvolvimento está ligado à abertura Atlântico Sul, Figura 3.³³

As rochas reservatório dos óleos da bacia de Campos são formadas principalmente por folhelhos depositados sob condições lacustres salinas durante o Cretáceo Inferior. As análises isotópicas de ¹³C e de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos óleos confirmam uma rocha geradora comum (Lagoa Feia) e um nível de maturidade térmica similar para as amostras, que apresentam diferentes níveis de biodegradação, Tabela 2, o que as tornam únicas para o estudo. ³⁴

³³ Guardado, L.R., Gamboa, L.A.P., Lucchesi, C.F., **1989**. Petroleum geology of CamposBasin, a model for a producing Atlantic Type Basin. In: Edwards, J.D., Santagrossi, P.A. (Eds.), Divergent/Passive Margin Basins, vol. 48. American Association of Petroleum Geologists Memoir, pp. 3–79.; Guardado, L.R., Spadini, A.R., Brandão, J.S.L., Mello, M.R., **2000**. Petroleum system of the Campos Basin, Brazil. In: Mello, M.R., Katz, B.J. (Eds.), Petroleum Systems of South Atlantic Margins, vol. 73. American Association of Petroleum Geologists Memoir, pp. 317–324.

³⁴ Vasconcellos, S. P., et al. Organic Geochemistry, 2009, 574-588.



Figura 3 - Mapa de localização e seção transversal do campo de estudo na Bacia de Campos. (reproduzido de 34)

	Nível de Biodegradação ^a	Т	Profundidade	Parâmetros de origem ^b , biodegradação ^c e maturidade ^d dos óleos.							
Poço		(°C)	(m)	HOP/STER	21/23 26/	26/25	TET/26	% SAT ^e	NOR	αββ	Ts/Ts+
					TRI	TRI	TRI		25/H30		Tm
P1	Leve	82	2405-2588	13,72	0,97	1,30	0,39	46,6	0,05	0,43	0,20
	(0-1)										
P2	Moderado/alto (5-6)	71	1988-2222	10,62	0,97	1,18	0,41	45,7	0,05	0,46	0,30
P3	Leve/moderado (3-4)	62	3023	9,95	0,92	1,20	0,39	50,3	0,04	0,49	0,29
P4	Alto	62	2066	5,30	0,93	1,19	0,41	36,7	0,88	0,43	0,39
	(6)										
Р5	Leve	85	3070-3240	11,17	0,97	1,23	0,44	62,7	0,04	0.43	0,37
	(0-1)										

Tabela 2 - Características dos reservatórios e propriedades geoquímicas das amostras de petróleo estudadas da Bacia de Campos.

^a De acordo com a escala de Peters and Moldowan.¹⁸

^b *m/z* 191 e 217 para HOP/STER, (razão hopano/sterano); *m/z* 191 para 21/23TRI (C21 terpano tricíclico /C23 terpano tricíclico), 26/25TRI (C26 terpano tricíclico /C25 terpano tricíclico) e TET/26TRI (C24 terpano tricíclico /C26 terpano tricíclico).

^c *m/z* 191 para NOR25/H30 (C29, 25-nor-17a(H) hopano/C30 17α,21β (H) hopano).

^d *m/z* 191 para Ts/Ts+Tm (C27 18α(H)-trisnorneohopano/C27 18α(H)-trisnorneohopano + C27 17α(H)-trisnorhopano), *m/z* 217 para αββ (razão αββ ααα+αββ) para C29 5α(H),14β(H),17β(H), 20 R+S 24-etilcolestano/C29 5α(H),14β(H),17β(H),20 R+S 24-etilcolestano/C29 (H),14β(H),17β(H),20 R+S 24-etilcolestano/C29 (H),14β(H),17β(H),18β(H),19β(H),19β(H),19β(H),19β(H),19β(H),19β(H),19β(H),19β(H),19β(

^e % Hidrocarbonetos saturados por MPLC.

2.2 Estudo de caso II – Origem (ambiente deposicional): Bacia Potiguar, RN.

A Bacia Potiguar está localizada na margem equatorial brasileira cobrindo uma área aproximadamente de 50.000 km² contendo um segmento emerso e outro submerso. ³⁵ A gênese da bacia está associada à separação dos continentes sul-americano e africano e a formação do oceano Atlântico Sul a partir do final do Jurássico.³⁵

Dentro do contexto de sistemas petrolíferos, as acumulações de petróleo nas porções *onshore* e *offshore*³⁶ na Bacia Portiguar são correlacionadas às rochas geradoras de duas unidades litoestratigráficas³⁷: Formação Pendência e Formação Alagamar, Figura 4. ³⁸

A Formação Pendência de idade Eocretácica corresponde à fase rifte³⁹ e é composta por pelitos de paleoambiente⁴⁰ lacustre, ricos em querogênio tipo I. A Formação Alagamar de idade Neoaptiana, representa a fase transicional dentro de cenário tectono-sedimentar continental para um cenário tectono-

³⁵ Pessoa Neto, O. C.; Soares, U.M.; Silva, J.G.F.; Roesner. E.H., 2007, Bacia Potiguar. *Bol. Geocien. Petrobras*, 15, 2, 357-369.

³⁶ Onshore = terra adentro. Designação dos levantamentos geofísicos realizados em terra firme;

Offshore= mar adentro. Região de plataforma continental com lâmina d'água superior a 10 metros;

³⁷ Unidade Litoestratigráfica= Pacote de rocha sedimentar definido, exclusivamente, com base em atributos litológicos;

³⁸ Rodrigues, R., **1983**, *Bol. Tec. Petrobras*, 26, 163–179.; MELLO, M.R., **1988**, *PhD. Thesis*, University of Bristol.; Mello, M.R., Gaglione, P.C., Brasell, S.C., Maxwell, J.R., **1988**.

Mar. Pet. Geol., 5, 205–222.; Mello, M.R., Telnaes, N., Gaglione, P.C., Chicarelli, M.I., Brasell,S.C., Maxwell, J.R., **1988**. Organic geochemical characterisation of depositional palaeoenvironments of source rocks and oils in Brazilian marginal basins. In: Katz, B.J., Pratt, L.M. (Eds.), 1987, *Advances in Org. Geochem.*, Pergamon Press, Oxford, pp. 31–45.

³⁹ Rifte= Fissura crustal aberta e de longa extensão, resultante de esforços tensionais.

⁴⁰ Paleoambiente= Conjunto das condições ambientais em um determinado intervalo do tempo geológico.

sedimentar marinho de evolução da bacia. A Formação Alagamar é composta por folhelhos e calcilutitos ricos em querogênio do tipo I e II.⁴¹



Figura 4 – Secção transversal da Bacia Potiguar.⁴²

A escolha da Bacia Potiguar para esse estudo foi devido ao fato dos óleos nela produzidos apresentarem diferenças composicionais de dois sistemas petrolíferos muito distintos, Figura 5. Os óleos classificados como lacustre (LC-1 e LC-2) apresentaram a predominância de *n*-alcanos de alto peso molecular (>n-C23), e alta razão pristano/fitano, Tabela 3. Já os classificados como misto (M-1 e M-2) são compostos por uma mistura do óleo de origem continental e transicional onde predominam características geoquímicas, ora relacionadas ao ambiente lacustre de água doce, ora ao ambiente marinho hipersalino. 43

⁴¹ da Silva, A. A. "Estudos Geoquímicos com Evidências Paleoambientais, Maturação e Biodegradação dos Óleos de Diferentes Origens da Bacia Potiguar, Brasil. Síntese de Biomarcadores de Esteróis" 2008, Tese de Doutotado, IO-UNICAMP, Campinas-SP.

 ⁴² http://www.anp.gov.br/brasil-rounds/round2/Idocs/Ibacias/IBframe07.htm acessado em 26/02/2014
 ⁴³ Santos Neto, E. V., Mello, M. R., Rodrigues, R. **1990**, Caracterização Geoquímica dos óleos da Bacia Potiguar, Congr. Bras. Geol., Natal, 2, 974-985.



Figura 5 – Mapa de localização de óleos das amostras da Bacia Potiguar (modificado de Rosane).³⁸

Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

	Nível de biodegradação ^a	Profundidade (m)	Parâmetros de origem ^b , biodegradação ^c e maturidade ^d dos óleos.						
Poço			HOP/STER	23/24	Pr/ δ ¹³ C Ph (‰)	δ ¹³ C	% SAT ^e	αββ	Ts/Ts+
				TRI		(‰)			Tm
M1	Leve/moderado(2-3)	845	3,12	1,31	0.59	-26,08	49,1	0,49	0,36
M2	Leve	3330	2,20	1,27	1,1	-25,93	59,0	0,48	0,45
	(0-1)								
LC1	Não biodegradado	1100 1400	19,90	1,22	2,8	-31,14	69,6	0,42	0,54
	(0)	1100-1400							
LC2	Não biodegradado	1100-1400	20,24	1,25	2,9	-31,27	68,3	0,40	0.52
	(0)								0,32

Tabela 3 - Características dos reservatórios e propriedades geoquímicas das amostras de petróleo estudadas da Bacia de Potiguar.

^a De acordo com a escala de Peters and Moldowan.¹⁸

^b *m/z* 191 e 217 para HOP/STER, (razão hopano/sterano); *m/z* 191 para 21/23TRI (C21 terpano tricíclico /C23 terpano tricíclico), 26/25TRI (C26 terpano tricíclico /C25 terpano tricíclico) e TET/26TRI (C24 terpano tricíclico /C26 terpano tricíclico).

^c *m/z* 191 para NOR25/H30 (C29, 25-nor-17a(H) hopano/C30 17α,21β (H) hopano).

^d m/z 191 para Ts/Ts+Tm (C27 18α(H)-trisnorneohopano/C27 18α(H)-trisnorneohopano + C27 17α(H)-trisnorhopano), m/z 217 para αββ (razão αββ ααα+αββ) para C29 5α(H),14β(H),17β(H), 20 R+S 24-etilcolestano/C29 5α(H),14β(H),17β(H),20 R+S 24-etilcolestano/C29 F(H),14β(H),17β(H),20 R+S 24-etilcolestano/C29 F(H),14β(H),17β(H),16H),178(H),178(H),178(H),178(H),178(H),178(H),178(H),178(H),178(

^e % Hidrocarbonetos saturados por MPLC.

3 Objetivos

Os objetivos gerais deste trabalho foram à implementação e a utilização de técnicas de análises por FT-MS (Orbitrap) para caracterização dos compostos da fração polar do petróleo em estudos de casos sobre biodegradação e origem de matéria-orgânica.

Os objetivos específicos para os estudos de caso foram:

em biodegradação;

- Caracterizar os constituintes da fração polar de 5 amostras de petróleo da Bacia de Campos com diferentes níveis de biodegradação,
- Correlacionar os dados encontrados da fração polar com as análises dos hidrocarbonetos saturados e aromáticos da fração neutra,
- Elaborar parâmetros e escalas de biodegradação utilizando os informações obtidas da fração polar,
- Avaliar a variação isotópica dos constituintes ácidos nas próprias análises da fração polar com o Orbitrap.

em origem;

- Caracterizar os constituintes da fração polar de 4 amostras de petróleo da Bacia Potiguar que apresentavam diferentes origens de matéria-orgânica,
- Correlacionar os dados obtidos da fração polar com os diferentes tipos de matéria-orgânica de origem.

4 Resultados e Discussões

4.1 Estudos de casos em geoquímica orgânica I - Biodegradação

A análise dos ácidos carboxílicos do petróleo tem sido feita há anos pelo nosso grupo⁴⁴, porém a metodologia empregada necessitava de cinco etapas de purificação e quatro etapas de derivatização, uma vez que os ácidos carboxílicos eram analisados na forma de hidrocarbonetos ou hidrocarbonetos deuterados.

Porém, devido à necessidade de avaliar esses compostos de uma maneira mais rápida optamos por usar um detector de massas com ionização por *eletrospray* capaz de analisar os ácidos carboxílicos diretamente e de ionizar moléculas de maior massa molecular. Para estabelecer a metodologia de análise selecionou-se um conjunto de amostras de petróleo naturalmente biodegradadas, que apresentam características únicas por possuírem alterações em sua composição exclusivamente devido aos fenômenos de biodegradação. Estas 5 amostras foram originadas de uma mesma rocha geradora, ou seja, os óleos apresentavam composição semelhante em sua origem, Tabela 2.

Como visto na introdução a análise de amostras complexas como o petróleo necessita de um alto poder de resolução, para que se possa analisar compostos de massas muito próximas com fórmulas moleculares diferentes. Especificamente para o petróleo, algumas combinações de massas são recorrentes e necessitam de resoluções diferentes para serem discriminadas pelo espectrômetro, Tabela 4.

⁴⁴ D.C. Rodrigues ; Koike, L. ; Reis, F. A. M. ; H.P. Alves ; H. K. Chang ; L.A. Trindade ; Marsaioli, A. J., **2000.** Organic Geochemistry, v. 31, p. 1209-1222.

Koike, L.; Rebouças, L. M. C.; Reis, F. A. M.; Marsaioli, A. J.; Richbow, H. H.; Michaelis, W. **1992.** Organic Geochemistry, v. 18, p. 851-860,.

	1	
Dupla	∆m (10 ⁻³ u)	Resolução (m/∆m)
SH ₄ vs. C ₃	3,4	135.000
C ₂ H ₃ vs. ¹³ CN	17,0	27.000
O vs. CH ₄	36,4	13.000
H ₁₂ vs. C	93,9	5.000

Tabela 4 – Resolução necessária para discriminação dos compostos (*m/z* 400) por espectrometria de massas

A diferença de massas nesses compostos esta diretamente relacionada à composição molecular. Como cada elemento apresenta um defeito de massa característico incluindo seus diferentes isótopos (Figura 6), é possível resgatar a fórmula molecular de cada composto com a massa aferida, desde que a mesma tenha sido aferida com exatidão suficiente.



Figura 6 – Defeitos de massa característicos dos isótopos encontrados nos constituintes do petróleo.

As análises realizadas utilizando o FT-MS orbitrap apresentaram erros maiores que 3 ppm, valores que muitas vezes não são suficientes para trabalhar com amostras complexas como o petróleo. Para contornar esse problema diversos métodos de recalibração podem ser usados, ⁴⁵ neste trabalho utilizou-se uma ferramenta do próprio *Xcalibur*, o "*RecalOffline*", onde através do uso de padrões internos ou até mesmo usando compostos da própria amostra é possível realizar uma segunda recalibração dos dados, o que forneceu análises com erros na faixa de até ppb,

Figura 7. Para tal seleciona-se um composto conhecido na análise (por exemplo, um padrão) e usamos ele como referência para correção dos demais compostos, pois pode-se calcular sua massa molecular exata a partir de sua fórmula molecular.



Figura 7 – Gráficos da exatidão de massa (ppm) vs. Razão massa carga (*m/z*) para classe
 O₂ amostra P5, antes da calibração (esquerda) e após calibração (direita).

Mesmo de posse dos dados com exatidão adequada, limitam-se alguns parâmetros para calcular e aferir as composições moleculares a partir das massas. Isso é necessário, pois como se trata de uma operação matemática o algoritmo poderá reportar qualquer combinação que apresente o menor erro possível sem levar em consideração outros fatores (estabilidade, probabilidade

⁴⁵ Kozhinov, A. N.; Konstantin, O. Z.; Tsybin, Y. O.; *Petroleomics. Analytical Chemistry*, **2013**, 85, 6437–6445.

dos elementos, etc.) chegando a resultados que nem sempre são reais. Portanto após avaliar diferentes combinações observou-se que o melhor seria limitar à $C_{100}^{13}C_2H_{200}O_4N_2S$ com erros de até 2 ppm. Após isso foram obtidas listas de compostos com massas moleculares aferidas para todas as amostras.

De início, a composição elementar fornece três propriedades da molécula: Classe ($N_nS_sO_o$), insaturações (DBE – *Double Bond Equivalent*⁴⁶), e número de carbonos (onde para uma dada classe com um DBE específico o número de carbonos mostra o grau de alquilação e/ou alongamento dos grupos alquílicos).

Atualmente, existem dois programas utilizados para essas análises, o Composer da Sierra Analytics e o PetroMS software desenvolvido pela Petrobras em colaboração com a UNICAMP. Neste trabalho as análises foram realizadas sem o auxílio desses *softwares* utilizando-se apenas a plataforma *Office* (Excel - utilizado para classificação e reorganização dos dados) e o *Origin*® (para construção das representações gráficas) para o tratamento dos dados, obtendo resultados semelhantes aos *softwares* mencionados.⁴⁷

Primeiramente, as amostras de P1 a P5 de petróleo foram analisadas sem nenhuma purificação, contudo a quantidade de compostos observados mesmo na análise de ESI em modo negativo foi muito elevada, o que em algumas amostras tornava mais elaborada a obtenção de dados confiáveis. Portanto, as amostras de petróleo foram purificadas com sílica modificada com KOH, recolhendo-se uma fração denominada fração ácida. Este processo

 $^{^{46}}$ DBE (C_cH_hN_nO_oS_s) = c - h/2 + n/2 + 1, na literatura é comum observar os valores quebrados para o número de insaturação, pois são fornecidos assim pelo equipamento. Porém como sabemos que as moléculas analisadas apresentam um H a menos, devido à desprotonação (ionização no modo negativo), aqui relatamos os valores de DBE inteiros, pois consideramos que o H removido no processo de ionização faz parte da molécula.

⁴⁷ Para melhor compreensão da construção dos gráficos vide parte experimental.

ocasionou uma grande diminuição dos compostos analisados, sem perda das classes de interesse, Figura 8 e Figura 9. Procedimento este que auxiliou muito na exatidão dos resultados, pois a quantidade de íons analisados pode afetar diretamente o erro desse tipo de análise.



Figura 8 - a) Espectros de razão massa/carga da amostra de óleo P5; ampliação de m/z 408 ao 410, b) da fração ácida da amostra P5, c) e da análise do óleo bruto da amostra P5.



Figura 9 – Compostos observados nas análises por ESI-HRMS para o óleo bruto e a fração ácida da amostra P1.

4.1.1 Compostos oxigenados (O, O₂, O₃ e O₄)

A classe dos compostos oxigenados é uma das mais abundantes nas frações polares do petróleo cuja composição e abundância oscilam com a biodegradação, Figura 10. Contudo devido a grande complexidade das rotas metabólicas é complicado estabelecer o papel dessas moléculas na biodegradação, uma vez que a mesma molécula pode participar de mais de uma rota metabólica.



Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Figura 10 – Abundância normalizada das classes de compostos oxigenados (¹²C e ¹³C) da fração ácidas dos petróleos P1, P2, P3, P4 e P5 com erros de até 3 ppm.

As moléculas aferidas com massa molecular apresentam de um a quatro átomos de oxigênio e, devido à técnica de ionização utilizada (ESI), algumas informações já podem ser obtidas. Por exemplo, os compostos com um átomo de oxigênio são essencialmente fenóis ou alcoóis aromáticos, pois devido à necessidade de uma desprotonação para que haja a ionização para medida de massas este é o único grupo funcional, com apenas um oxigênio, que possui hidrogênios ácidos capazes de serem removidos na ionização por *eletrospray*. As moléculas com dois átomos de oxigênio são em sua grande maioria ácidos carboxílicos, podendo haver também dióis com pelo menos uma das hidroxilas ligadas a anel aromático (maior acidez). Para moléculas com três ou quatro átomos de oxigênio mais combinações são possíveis como, por exemplo, um ácido e um álcool, ou dois ácidos, aldeídos, etc.

De maneira geral pode-se observar que os compostos com dois átomos de oxigênio (*i.e.* ácidos carboxílicos) se tornam mais abundantes com o decorrer da biodegradação sofrendo uma ligeira queda nas amostras com nível de biodegradação acima de 4(amostra P4), Figura 10. Isso corrobora com as rotas já conhecidas de biodegradação de hidrocarbonetos, uma vez que ácidos carboxílicos são muitas vezes os metabólitos finais de algumas delas. Com o aumento da biodegradação e consequente total consumo dos hidrocarbonetos, os ácidos carboxílicos se tornam uma fonte mais viável de energia e passam a ser consumidos sem reposição.

A correlação dos compostos oxigenados com a biodegradação, levando em consideração que os mesmos são geralmente encontrado em intermediários (O e O₃) ou produtos finais (O₂ e O₄) das rotas metabólicas levou a algumas razões, Tabela 5. A melhor delas foi a razão de O₂ por O, a qual mostrou uma tendência semelhante à observada na Figura 10, porém estas razões não apresenta uma correlação linear com a biodegradação, o que torna mais difícil o seu uso como parâmetro de biodegradação. Isso ocorre, pois diferente dos hidrocarbonetos que são apenas consumidos durante a biodegradação, os compostos ácidos estão sendo gerados e consumidos ao mesmo tempo, o que gera essa tendência oscilante nos parâmetros.

Razão	P5 (0-1)	P1 (0-1)	P3 (3-4)	P2 (5-6)	P4 (6)
0 ₂ /0	95,39	114,02	122,89	76,84	47,30
O ₄ /O ₃	0,14	0,37	0,42	0,29	0,85
0 ₂ +0 ₄ /0+0 ₃	2,08	14,84	10,39	14,35	11,10

Tabela 5 – Razões entre as classes de compostos oxigenados da fração ácida deamostras com diferentes níveis de biodegradação.

4.1.1.1 Fenóis, Aldeídos e Cetonas (0)

Os compostos com um átomo de oxigênio (O) foram pouco abundantes nas frações ácidas dos óleos da Bacia de Campos, contudo foi possível observar uma correlação direta entre a biodegradação e o aumento da abundância destes compostos, Figura 11. Por serem predominantemente fenóis estes compostos apresentam número de insaturação (DBE) \geq 4, Figura 12.



Figura 11 – Abundância normalizada dos compostos com um átomo de oxigênio da fração ácida das amostras P5, P3, P2 e P4.



Figura 12 – Exemplos de compostos encontrados na classe O da fração ácida do petróleo.

Observa-se também que com o aumento da biodegradação além da quantidade há um aumento na variedade desses compostos, principalmente na região de DBE igual a cinco e com número de carbonos entre 20 e 25,Figura 13. Fato este diferente do já relatado na literatura onde a classe O diminui com o decorrer da biodegradação. ⁴⁸ Na grande maioria dos casos, os compostos aromáticos são mais recalcitrantes que os hidrocarbonetos saturados, por isso são biodegradados por rotas metabólicas que geralmente envolvem a ação de mono- e di-oxigenases (*e.g.* citrocomo P450) que levam à formação do catecol, Esquema 3, através de intermediários como epóxidos, diois, fenóis e quinonas. Os catecóis sofrem então diferentes clivagens gerando produtos mais oxidados que são convertidos em intermediários do metabolismo central (*e.g.* acetil-CoA, oxalato e piruvato) podendo então ser transformados em energia para a célula.

⁴⁸ Kim, S.; Stanford, L. A.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; Walters, C. C.; Qian, K.; Wenger, L.M.; Mankiewicz, P.; **2005.** *Organic Geochemistry* 36, 1117-1134.



Figura 13 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O da fração ácida das amostras P1-5.

4.1.1.2 Ácidos carboxílicos (O₂)

Os compostos ácidos podem ser gerados por meios biológicos durante a degradação da matéria orgânica, Esquema 5 e Esquema 6, ou por meios químicos através de reações de oxidação. Em óleos termicamente evoluídos, não biodegradados e sem contribuição de outras fontes de matéria orgânica existem pequenas quantidades de ácidos carboxílicos. Porém com o decorrer da biodegradação essa classe passa a ser mais abundante na fração ácida, o que traz grandes problemas para indústria petrolífera.



Esquema 5 – Rotas de biodegradação aeróbia de alcanos alifáticos.

Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"



Esquema 6 - Rota simplificada de biodegradação anaeróbia de hidrocarbonetos via fumarato (adaptado de Grossi *et al.*).⁴⁹

Apesar de esta classe originar-se da biodegradação dos hidrocarbonetos lineares, ambos apresentam máximos em posições diferentes do gráfico (hidrocarbonetos tem máximo nC-15 e os ácidos lineares tem máximo em nC-30), Figura 14. Também é possível notar que a faixa de análise da classe ácida é bem maior que a dos hidrocarbonetos, isso acontece devido às características intrínsecas das técnicas de análise, por exemplo, na cromatografia gasosa com ionização por impacto de elétrons a faixa de análise é limitada pela menor volatilização dos compostos de maior massa molecular, já para a técnica com ionização por eletrospray a volatilização não é necessária uma vez que as moléculas são ionizadas através da formação da dispersão do liquído em um aerosol que por repulsão coulômbica ejeta as moléculas ionizadas para a fase gasosa.

Em algumas amostras observa-se ainda uma maior abundância dos ácidos C_{16} e C_{18} , que acontece por serem produzidos por muitos microorganismos na síntese de ácidos graxos para a produção de fosfolipídios.

⁴⁹Grossi, V.; Cravo-Laureau, C.; Guyoneaud, R.; Ranchou-Peyruse, A.; Hirschler-Réa, A. Organic Geochemistry. **2008**, 39, 1197-1203.



Figura 14 – Distribuição dos hidrocarbonetos lineares (fração neutra- CG/MS) e ácidos lineares (fração ácida - ESI) da amostra P1, levemente biodegradada.

Analisando a classe como um todo se observa que os ácidos carboxílicos com DBE igual a três e quatro (bicíclicos e tricíclicos, respectivamente) se sobressaem aos demais, Figura 15. E com o avanço da biodegradação observa-se o aumento de suas abundâncias relativas o que condiz com o fato destes serem compostos mais recalcitrantes considerando o nível máximo de biodegradação das amostras estudadas (Nível 6).¹⁸



Figura 15 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O₂ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5. A escala de cores representa a abundância relativa dos compostos.

Nessa classe de compostos podem-se visualizar os produtos de biodegradação de diversos biomarcadores encontrados no petróleo, Figura 16.


Figura 16 - Representação de algumas classes de compostos encontrados na classe O₂ na fração ácida do petróleo.

Com base nesses resultados calcularam-se alguns parâmetros com o intuito de encontrar uma razão que pudesse ser utilizada para caracterizar o nível de biodegradação das amostras. Para tal, as razões entre as classes de DBE 6 (*e.g.* pentacíclicos, hopanos) e DBE 8 (*e.g.* ácidos naftênicos, esteróides monoaromáticos) pelas classes de DBE 3 e 4,

Tabela 6. Observa-se que as razões diminuem com a biodegradação, mas novamente em P4 as razões voltam a aumentar provavelmente devido ao início da degradação dos compostos ácidos com DBE 3 sem que haja reposição de da degradação de seus precursores, já esgotados da fração neutra.

Razões ⁵⁰	P1	P5	P3	P2	P4
A _{4/3}	1,13	1,07	0,95	0,75	1,11
A _{6/3}	0,53	0,66	0,56	0,40	0,64
A _{8/3}	0,35	0,67	0,31	0,21	0,37
A _{6/4}	0,47	0,61	0,59	0,53	0,57
A _{8/4}	0,31	0,63	0,32	0,27	0,33

 Tabela 6 - Razões entre as classes de compostos dioxigenados das amostras com diferentes níveis de biodegradação.

A razão A/C, ⁵¹ que corresponde à razão entre os ácidos acíclicos (A) sobre os cíclicos (C) {Classe O_2 , DBE 1/ Σ (DBE 2 – 4)}, mostrou boa correlação com o índice de biodegradação de Peter & Moldowan para a fração ácida, Figura 17. Contudo a amostra P1 que é considerada pouco biodegradada novamente apresentou um índice próximo ao das amostras moderadamente biodegradada. Este fato sugere que neste óleo ocorreu uma possível mistura de um óleo biodegradado com um não biodegrado, o que mostra a importância da utilização dos compostos ácidos para complementar a classificação do nível de biodegradação das amostras de óleo.

⁵⁰ O calculo destes parâmetros esta evidenciado na parte experimental.

⁵¹ S. Kim, Stanford, L. A.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.; Walters, C. C.; Qian, K; Wenger, L. M.; Mankiewicz, P. *Organic Geochemistry*, **2005** (36), 1117-1134.



Figura 17 – Correlação entre a razão A/C e os índices de biodegradação de Peter & Moldowan^x. A amostra P1 não foi utilizada para regressão linear.

Apesar de a razão A/C se correlacionar com a biodegradação para o seu calculo leva-se em consideração apenas os compostos de DBE até 4. O que é útil para classificação de amostras até level 6 de biodegradação, pois em amostras mais biodegradadas esses compostos passam a serem consumidos o que complica o uso destes para classificação de amostras severamente biodegradadas. Portanto, como se observou uma correlação dos compostos ácidos com os hidrocarbonetos, iniciou-se a elaboração de uma escala de biodegradação semelhante à de Peter & Moldowan.

Avaliando então detalhadamente as classes de DBE dos ácidos carboxílicos foi possível observar uma tendência comum às classes de DBE onde havia o aumento na abundância seguido de decréscimo. Observou-se também que conforme se aumentava o número de DBE (estrutura mais complexa) esse máximo de abundância era deslocado para amostras com maiores níveis de biodegradção, Figura 18.

42



Figura 18 - Abundância dos compostos da classe O₂ com diferentes valores de DBE.

Para compreender melhor então este fenômeno analisou-se cada classe de DBE individualmente em conjunto com seus precursores neutros. A classe de DBE 1 são ácidos carboxílicos lineares e ramificados (isoprenóides) e são originados principalmente da degradação dos hidrocarbonetos lineares e isoprenóides (m/z 71- CG/MS). Como mencionado é possível observar que o esgotamento dos compostos neutros ocorre da amostra P3 para a P2 (Figura 19), que coincide com o inicio do consumo dos compostos ácidos correspondentes (Figura 18).



Figura 19 – Cromatograma reconstruído de íons (RIC *m/z* 71, GC-MS) dos hidrocarbonetos alifáticos das amostras P5, P3, P2 e P4 com seus respectivos níveis de biodegradação.

A biodegradação dos hidrocarbonetos (até C_{33}) ocorre preferencialmente com compostos de número par (P) de carbonos, o que pode ser evidenciado pelas razões da

Tabela 7 e Figura 19 eFigura 20, onde se observa um aumento da razão Ímpar/Par (I/P) para os hidrocarbonetos lineares, referente à maior degradação dos hidrocarbonetos lineares pares, e um aumento para a razão I/P para os ácidos carboxílicos lineares, referente à maior biodegradação dos ácidos carboxílicos lineares pares.



Figura 20 – Distribuição dos compostos com DBE = 1 da classe O_2 da fração ácida para as amostras com diferentes níveis de biodegradação.

Tabela 7 – Preferência de biodegradação entre os compostos com números ímpares e pares de carbono.

Razões	P5	P3	P2	P4
I/P (neutros)	0.95	1.1	-*	-*
I/P (ácidos, até C ₂₂)	0.65	0.95	0.97	0.82
I/P (ácidos)	0.69	0.93	0.94	0.82

* todos os hidrocarbonetos lineares foram consumidos.

Os compostos de DBE 2 são ácidos carboxílicos cíclicos oriundos da biodegradação de compostos como alquilcicloexanos (m/z)82) e alquilciclopentanos (m/z 68). Novamente é possível observar seu esgotamento de P3 para P2 (Figura 21), o que logo em seguida acarreta no início do consumo dos ácidos de DBE 2. Ainda nessa classe, analisando os gráficos da fração ácida (Figura 18) observa-se que os ácidos carboxílicos cíclicos (DBE 2) são bem mais abundantes que os lineares (DBE 1), diferente do encontrado na fração neutra, mas isto pode ser explicado pela facilidade de biodegradação que é maior para estruturas mais simples (menores valores de DBE), portanto os ácidos carboxílicos lineares logo que são formados já são mineralizados e transformado em energia pelos organismos.

Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"



Figura 21 - Cromatograma reconstruído de íons (RIC *m/z* 82, GC-MS) dos hidrocarbonetos saturados (alquil-cicloexanos) das amostras P5, P3, P2 e P4 com seus respectivos níveis de biodegradação.

A mesma tendência de um máximo de concentração seguida de decréscimo que acompanha o esgotamento da classe na fração neutra parece continuar para as demais classes de DBE, Figura 18 e Figura 22. Contudo, agora se torna um pouco mais complexo observar essas correlações entre fração neutra e ácida, pois a degradação de moléculas com maior quantidade de anéis pode dar origem a ácidos com número variado de DBE, uma vez que os anéis podem ser abertos durante a biodegradação.



Figura 22 – Cromatograma reconstruído de íons (RIC *m/z* 123 e 191, GC-MS) dos bicíclicos tricíclicos e hopanos das amostras P5 e P4 com seus respectivos níveis de biodegradação.

4.1.1.3 Classes O3 e O4

A classe dos compostos contendo 3 e 4 átomos de oxigênio também se tornaram mais abundantes em quantidade e variedade com a biodegradação. Contudo a racionalização desta classe é um pouco mais complicada uma vez que estes compostos estão presentes em várias etapas das rotas de biodegradação em especial para os compostos aromáticos, Esquema 7. Os intermediários com quatro átomos de oxigênio também são encontrados em algumas rotas de biodegradação de hidrocarbonetos por micro-organismos anaeróbios que iniciam a biodegradação com inserção de fumarato, Esquema 6. Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"



Esquema 7 - Reações envolvidas nas vias de degradação aeróbia de tolueno. As moléculas de catecol, 3- metilcatecol e protocatecuato são metabolizadas por meta ou orto clivagem, produzindo intermediários centrais do ciclo de Krebs. (Modificada de Gülensoy e Alavarez, 1999).

De maneira geral podemos observar que com a biodegradação há uma maior abundância dos compostos com maiores valores de DBE, que são provenientes de moléculas mais complexas e mais recalcitrantes, Figura 23 e Figura 24. Podemos ainda observar diferentes máximos de abundância em DBEs 6-7 e 4-5 para as classes O_3 e O_4 , respectivamente (Figura 23 e Figura 24). Existe também um pequeno aumento da abundância para moléculas com maiores números de carbono com o decorrer da biodegradação.



Figura 23 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O₃ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5.



Figura 24 – Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O₄ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5.

4.1.2 Escala de biodegradação - Fração ácida

Analisando as frações ácidas das amostras biodegradas pode-se perceber que a abundância dos ácidos carboxílicos está diretamente relacionada à biodegradação dos seus precursores neutros. Outro fato interessante foi o caso da amostra P1 cuja fração neutra não é biodegradada, mas o perfil da fração ácida é semelhante a uma amostra moderadamente biodegradada. Mostrando-se a necessidade da elaboração de uma escala de biodegradação utilizando os compostos da fração ácida como marcadores.

As escalas de biodegradação são utilizadas para avaliar a extensão da biodegradação em uma amostra de petróleo, por meio de parâmetros baseados na abundância relativa de várias classes de compostos. As escalas existentes classificam o petróleo em níveis que vão de 1 para amostras não biodegradadas até 10 para amostras severamente biodegradadas.^{18, 52} Contudo, estas escalas não são trazem informações suficientes para trabalhar com amostras muito biodegradadas, ou como visto em mistura de óleos.

Neste âmbito, desenvolveu-se uma escala de biodegradação, semelhante a da fração neutra de Peter & Moldowan, para ser utilizada como classificação de nível de biodegradação de amostras de petróleo utilizando os compostos da fração ácida, Figura 25. Cabe ressaltar que utilizamos amostras com níveis de biodegradação até 6, sendo ainda necessário a avaliação de amostras com níveis maiores de biodegradação vara verificar sua aplicação.

⁵² Cruz, G. F.; Marsaioli, A.J. 012, **2012**. Química Nova (Impresso), Vol. 35, Fac. 8, pp.1628-1634.

		L	M	A	Severa			
Escala de biodegradação acidos	0	1	2	3	4	5	6	?
Ácidos carboxílicos lineares – DBE 1					1			
Á. carboxílicos monocíclicos – DBE 2								
Á. Carboxílicos – DBE 3								
Á. Carboxílicos – DBE 4								
Á. Carboxilicos – DBE 5								

Figura 25 – Escala de biodegradação proposta para classificação das amostras de óleos com relação aos compostos oxigenados da fração ácida. Níveis de biodegradação L (leve), M (moderado), A (Alto), Severa.

4.1.3 Compostos nitrogenados (Classes NO_x)

No processo de obtenção da fração ácida os compostos nitrogenados neutros (indois, carbazois, etc.) são na grande maioria removidos, porém os compostos nitrogenados que apresentam grupos ácidos (oxigenados) são mantidos. Observa-se também a alteração desses compostos com a biodegradação, principalmente na classe NO₂, Figura 26 eFigura 27, evidenciando a biodegradação dos compostos nitrogenados, ação que ocorre por rotas similares as que já foram mencionadas, Esquema 8.



Figura 26 – Abundância normalizada das classes de compostos nitrogenados (¹²C e ¹³C) da fração ácidas dos petróleos P1, P2, P3, P4 e P5 em relação à todos os heterocíclicos com fórmula molecular aferida com erros de até 3 ppm.



Esquema 8 – Rota de biodegradação de carbazol por micro-organismos do gênero *Pseudomonas sp.*⁵³

⁵³ Santos, F. R.A,. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do rio de Janeiro, **2010.**



Figura 27 – Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe NO₂ da fração ácida para as amostras de óleo de P1-5.

4.1.4 Ensaio de biodegradação em laboratório

Os ensaios de biodegradação em laboratório são interessantes, pois como temos o controle de todos os parâmetros experimentais temos certeza de quais foram os processos que provocaram a alteração na composição do óleo. Para estes ensaios também foi possível avaliar a variação dos constituintes ácidos com o decorrer da biodegradação. Onde novamente observou-se o aumento dos compostos oxigenados (O_2) com o decorrer da biodegradação, Figura 28.



Figura 28 - Abundância normalizada das classes de compostos oxigenados (12 C e 13 C) da fração ácidas das alíquotas do ensaio de biodegradação (10 em 10 dias) em relação à todos os heterocíclicos com fórmula molecular aferida com erros de até 3 ppm.

Para este ensaio ateve-se as análises às classes de compostos oxigenados, pois foi observado que os mesmos são os mais alterados com a biodegradação. A variação da distribuição dos compostos contendo O_2 foi também semelhante a das amostras naturalmente biodegradadas, Figura 29, com máximos na região de DBE 3 e 4 na região 25 a 30 átomos de carbono. A correlação entre a razão A/C e o grau de biodegradação também foi observada Figura 30.



Figura 29 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O_2 da fração ácida para as alíquotas do ensaio de biodegradação em laboratório.



Figura 30 – Correlação entre a razão A/C e o tempo de biodegradação em dias para o ensaio de biodegradação em laboratório.

Estes resultados são maiores indícios de que a alteração observada nos compostos oxigenados é proveniente da biodegradação, uma vez que nos ensaios realizados em laboratório os únicos fenômenos que ocorrem com o petróleo são alteração da constituição devido a biodegradação e perda de compostos devido evaporação.

4.1.5 Razão isotópica por ESI-Orbitrap

A composição isotópica de alguns elementos como C, N, S e até O, pode ser pode ser avaliada por cromatografia a gás acoplada a combustão e espectrometria de massas (GC-C-IRMS), e fornecem informações a respeito da origem da matéria orgânica, paleoecologia e até biodegradação. Alternativamente com as análises de ESI-MS (Orbitrap) podem-se conseguir resultados semelhantes para o carbono, uma vez que é possível analisar separadamente as moléculas que apresentam nenhum átomo de ¹³C e as que apresentam um ou mais. Com isso, as razões entre o número de ¹³C sobre ¹²C podem ser calculadas tanto para uma classe como individualmente para cada composição molecular. Essas razões são interessantes, pois os microorganismos apresentam uma preferência maior por compostos com átomos leves, fenômeno conhecido como efeito isotópico cinético (*kinetic isotope effect,* KIE) que está relacionado à força mais fraca das ligações ¹²C-¹²C do que das ligações ¹²C-¹³C. ⁵⁴

Portanto quando uma ligação específica é quebrada haverá influencia do efeito isotópico primário, quando a ligação conter o isótopo pesado, ou efeito isotópico secundário quando o isótopo pesado estiver adjacente à mesma. Como resultado os isótopos pesados tendem a se enriquecerem nos reagentes e diluírem nos produtos, Figura 31.

⁵⁴ Meier-Augenstein, W.; J. Chromatogr. A, **1999**, 842, 351-371.

Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"



Figura 31 – Representação gráfica do fenômeno de fracionamento isotópico.

Esse processo é conhecido como fracionamento isotópico ou efeito isotópico cinético quando a reação envolvida é unidirecional (não envolve equilíbrios). Em sistemas mais simples esse fenômeno pode ser descrito pela equação de Rayleigh. ⁵⁵

A abundância (A_s) de um isótopo pesado (n₂) em uma amostra (s) é dada em % pela equação:

$$A_{S} = \frac{{}^{13}C}{C_{total}} \times 100 = \frac{R_{S}}{1+R_{S}} \times 100 \,(\%) \tag{1}$$

onde R_s é a razão entre n_2/n_1 dos dois isótopos da amostra e n_1 é o isótopo leve.

⁵⁵ Hatzinger, P.B.; Böhlke, J.K.; Sturchio, N.C.; **2013**, Current Opinion in Biotechnology, 24,542-549.

O enriquecimento ou fracionamento isotópico de uma amostra são reportados em comparação a um padrão ($A_{padrão}$) num excesso em % (APE):

$$APE = A_s - A_{padrão} \tag{2}$$

Porém como a variação tende a ser pequena, os dados são reportados como δ^{13} C em partes por mil ou ‰:

$$\delta^{13}C = \left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} - 1\right) \times 1000$$
(3)

onde $R_{amostra}$ é a razão entre n_2/n_1 da amostra e $R_{padrão}$ é a razão n_2/n_1 do padrão.

Para implementação da metodologia precisava-se de uma amostra de referência para que os dados pudessem ser obtidos com relação à amostra VPDB.⁵⁶ Portanto Inicialmente realizou-se a análise de um padrão, o ácido cólico, no GC-C-IRMS (na forma de éster) e no Orbitrap (na forma de ácido) com o intuito de se comparar os resultados de ¹³C/¹²C obtido pelas duas técnicas, Tabela 8. Os valores obtidos pelas duas técnicas foram muito próximos com uma diferença de 7%, que pode ter ocorrido pela necessidade de uma metilação do ácido para o mesmo ser analisado pelo GC-C-IRMS, devido à incompatibilidade da coluna utilizada com ácidos. Sendo assim para as análises realizadas no orbitrap utilizamos como referência o ácido cólico para o cálculo dos parâmetros isotópicos.

⁵⁶ Em geoquímica as razões isotópicas de carbono são todas referenciadas a amostra Vienna Pee Dee <u>Belemnite</u> (VPDB).

Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Parâmetros	IRMS		Orbitrap		
	0.011030		0.010067		
	0.011033	1,1031x10 ⁻²	-	1,005 x10 ⁻²	
¹³ C/ ¹² C	0.011033	± 2.7x10 ⁻⁶	0.009995	± 4.9 x10 ⁻⁵	
	0.011031	(média)	0.010091	(média)	
	0.011026		-		
	-13.37				
$S^{13}c(0)$	-13.12	12 24 + 0.1			
0 C (‰)	-13.15	-13.24 ± 0.1		-	
VS. VPDD	-13.34	(meula)			
	-13.24				

Tabela 8 – Padrões isotópicos de ¹³C para o ácido cólico obtidos pelo IRMS e Orbitrap.

O interessante dessas razões é que trazem informações a respeito da origem dos compostos oxigenados. Avaliando as classes individualmente observa-se, por exemplo, na classe O, que a abundância de isótopos de ¹³C diminui no inicio da biodegradação (Tabela 9, P5 e P3) voltando a aumentar em amostras mais biodegradadas (P2 e P4).

Fato que pode ser facilmente explicado pelo surgimento desses compostos através da biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Pois como há uma preferência por hidrocarbonetos com isótopos mais leves os compostos formados também terão uma maior abundância em compostos com isótopos mais leves, Figura 31. Nos níveis de biodegradação maiores a abundância de ¹³C começa a aumentar, o que pode estar sendo ocasionado por dois motivos o esgotamento dos hidrocarbonetos com isótopos mais leves o que leva o aumento da biodegradação dos hidrocarbonetos mais pesados (>[¹³C]), ou o consumo dos compostos oxigenados já formados que também se da com preferência pelos compostos mais leves (<[¹²C]).

Esta tendência também é observada para a classe O_2 , contudo para as demais classes o mesmo não é observado, o que pode estar ligado ao fato

destas pertencerem aos intermediários das rotas metabólicas o que torna mais difícil o entendimento do seu comportamento. Esses mesmos resultados podem ser ainda calculados individualmente para cada composto com fórmula molecular aferida e de maneira geral seguem o mesmo comportamento encontrado na classe.

Parâmetros isotópicos		P5	P3	P2	P4	
0	¹³ C/ ¹² C	0.002531	0.002039	0.002094	0.003878	
	A _s (%)	0.252423	0.203489	0.208931	0.386329	
	δ ¹³ C (‰) vs. VPDB	-765.821	-813.885	-808.542	-634.056	
02	¹³ C/ ¹² C	0.008016	0.007724	0.007599	0.007693	
	A _s (%)	0.795206	0.766452	0.754128	0.763399	
	δ ¹³ C (‰) vs. VPDB	-229.515	-258.073	-270.308	-261.105	
O ₃	¹³ C/ ¹² C	0.006709	0.006994	0.00676	0.006315	
	A _s (%)	0.666425	0.694552	0.67143	0.627563	
	δ ¹³ C (‰) vs. VPDB	-357.289	-329.411	-352.331	-395.783	
O ₄	¹³ C/ ¹² C	0.005564	0.006525	0.006221	0.006889	
	A _s (%)	0.553328	0.648314	0.618293	0.68421	
	δ ¹³ C (‰) vs. VPDB	-469.23	-375.232	-404.961	-339.656	

Tabela 9 – Padrões isotópicos de ¹³C das classes dos compostos oxigenados para as amostras com diferentes níveis de biodegradação

4.2 Estudos de casos em geoquímica orgânica II – Origem

Os ambientes sedimentares de lagos e oceanos são diferentes em alguns aspectos, o que resulta em variações na quantidade e no tipo da matéria orgânica depositada. Lagos são menores e recebem mais contribuição de matéria orgânica de origem terrestre, assim como há uma maior quantidade de nutrientes o que favorece a produção primária de matéria orgânica. A sedimentação também é maior em lagos (~1m/1000 anos) quando comparado com os oceanos (~1-10cm/ 1000 anos), com isso há uma maior preservação da mesma por ser soterrada mais rapidamente.¹⁸ Outro fator utilizado para distinção entre a origem da matéria orgânica em sedimentos é a razão C/N, pois algas e plantas vasculares apresentam razões C/N de 4-10 e >20, respectivamente.⁵⁷

Portanto, com o intuito de se aplicar a petroleômica para correlacionar a origem do óleo com os compostos da fração polar, selecionou-se um segundo grupo de amostras pertencentes à Bacia Potiguar que apresentam óleos com diferentes composições por serem de dois sistemas petrolíferos muito distintos. Para isso utilizou-se duas amostras lacustres da formação pendência (LC1 e LC2, Figura 5) e duas amostras mistas, provenientes da mistura de amostras marinha evaporíticas com as lacustres dessa Bacia, sendo uma *onshore* (M1) e a outra *ofshore* (M2). Diferentemente do estudo de caso anterior como neste caso temos interesse nos compostos nitrogenados optouse pela realização das análises com os óleos brutos ao invés da fração ácida.

Como pode ser visto nas análises, Figura 32, os compostos nitrogenados novamente estão presentes em maior quantidade. Porém, diferente das amostras biodegradadas da Bacia de Campos, Figura 9, onde tínhamos uma razão de 5:4 de compostos nitrogenados (N) para compostos oxigenados (O₂), nas amostras da Bacia Potiguar os compostos oxigenados estão presentes em menores quantidades tendo uma razão de 5:2, Figura 32.

⁵⁷ Meyers, P.A., **1994**. *Chemical Geology*, 144,289-302.



Figura 32 – Abundância relativa das classes de compostos encontrados nas análises de óleo bruto dos petróleos LC1, LC2, M1 e M2 de todos os heterocompostos com fórmula molecular aferida com erros de até 3 ppm.

N20 N202 N203

Z

N204

SO

S02

S03 S04

S

4.2.1 Compostos oxigenados

02 03 04 g

N02 N03 N04

z

0

0

Analisando as distribuições da classe O_2 , Figura 33, pode-se observar que os principais responsáveis pela abundância da classe são os ácidos lineares C_{16} e C_{18} , sem eles a abundância dos ácidos seria praticamente nula. Geralmente a presença destes ácidos em maior quantidade está associada com a biodegradação da amostra, pois a principal fonte destes ácidos é de fosfolipídios de membrana celular dos micro-organismos responsáveis pela biodegradação. Contudo com exceção da amostra M1, os óleos não apresentam biodegradação significativa, Figura 34, nos sugerindo que estes ácidos possam ser provenientes de outras fontes como: incorporação no processo migratório, ou a presença de ácidos autóctones ou uma possível mistura de óleos. Essa maior abundância de ácidos C_{16} e C_{18} nos óleos da Bacia Potiguar já foram relatadas em trabalhos anteriores do grupo.^{38,41}



Figura 33 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O₂ dos óleos brutos da Bacia Potiguar.



Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Figura 34 – Cromatograma reconstruído de íons (RIC *m/z* 71, GC-MS) dos hidrocarbonetos alifáticos das amostras LC1, LC2, M1 e M2.

A classe contendo um átomo de oxigênio apesar de ter uma menor abundância, apresentou uma variedade significativa de compostos com destaque para a amostra M1, onde provavelmente estes foram originados da degradação dos seus precursores aromáticos, Figura 35. Podemos notar também uma diferença na distribuição desses compostos com relação ao ambiente deposicional, os óleos lacustres apresentam um máximo em moléculas com 25-30 átomos de carbono, enquanto que os óleos mistos apresentam um máximo na região de 35- 40 átomos de carbono. Contudo nenhuma correlação evidente pode ser encontrada para essa classe com a origem da matéria-orgânica, principalmente por esta classe de compostos sofrer alteração devido a biodegradação.



Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Figura 35 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe O dos óleos brutos da Bacia Potiguar.

4.2.2 Compostos Nitrogenados

Os compostos nitrogenados se mostraram os mais abundantes nas amostras de óleos dessa Bacia, de início pode-se observar que os óleos mistos apresentam uma quantidade maior de compostos da classe NO, o que se atribuiu devido à contribuição dos óleos marinho evaporíticos, Figura 36.



Figura 36 – Abundância relativa das classes de compostos nitrogenados encontrados nas análises de óleo bruto dos petróleos LC1, LC2, M1 e M2.

Avaliando a distribuição dos compostos nitrogenados, Figura 37 e Figura 38, observa-se uma maior variedade de compostos das classes N e NO para os óleos mistos, fato que é condizente com as quantidades maiores de N encontrado na matéria orgânica de origem marinha. ^{57,58}

⁵⁸ Lima, E. A. M., **2008**, Tese de doutorado do IG-UFPE.



Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Figura 37 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe N dos óleos brutos da Bacia Potiguar.



Capitulo I - "Estudos de casos em petróleo"

Figura 38 - Representação gráfica de DBE vs. Número de carbonos para a classe NO dos óleos brutos da Bacia Potiguar.

5 Conclusões

Foi possível estabelecer e otimizar um protocolo de análise das frações polares dos petróleos brutos e das frações ácidas por ESI-MS no modo negativo e com isso acessar uma classe de compostos que no nosso grupo até então era conseguida através de diversas etapas de derivatizações e purificações. Através dessas análises foi possível aferir a composição molecular dos constituintes do petróleo e separá-los em classes de compostos oxigenados (O, O₂, O₃ e O₄) e nitrogenados (N, NO, NO₂, NO₃). Com os quais foram possível elaborar parâmetros e correlacioná-los com o nível de biodegradação das diferentes amostras estudadas (Caso I) além de verificar as diferenças das frações polares e relacioná-las a origem e ao ambiente deposicional (Caso II).

A classe dos ácidos carboxílicos se mostrou a mais interessante quando falamos de biodegradação, mostrando que os compostos com menor número de insaturação (DBE) são preferencialmente biodegradados, o que também é condizente com a fração dos hidrocarbonetos. A razão A/C se correlacionou linearmente com o nível de biodegradação (R=0,96), mas a forma que este parâmetro é calculado pode limitar seu uso para amostras mais biodegradadas. Por isso, propôs-se nesse trabalho uma nova escala de biodegradação utilizando as abundâncias relativas dos constituintes da classe O_2 como indicadores de biodegradação.

As classes dos compostos nitrogenados em especial os NO se mostraram mais importantes para uma possível classificação das amostras de acordo com a origem da matéria-orgânica, fato este que corrobora com informações encontradas na literatura. Contudo, mais análises ainda precisam ser realizadas para confirmação e publicação dos resultados.

Os resultados preliminares do estudos de razão isotópicas mostraram-se condizentes com a biodegradação, contudo essas análises precisam ser repetidas por métodos convencionais como GC-C-IRMS para confirmação dos resultados obtidos.

Com a implementação dessa metodologia foi possível a colaboração com outros grupos de pesquisa, obtendo-se informações relevantes em outros estudos de caso (dados não mostrados nessa tese) com alguns artigos já publicados e outros em elaboração. Com esses estudos pôde-se notar a relevância do estudo da fração polar em conjunto às análises dos biomarcadores neutros de petróleo, pois acabam trazendo informações complementares que podem auxiliar a sanar as dúvidas muitas vezes encontradas em caracterizações geoquímicas de óleos. Capítulo II

"Trabalhos complementares ao escopo principal"

1 Introdução

1.1 Diamantoídes

Diamantóides são hidrocarbonetos do tipo cela ou diamantes. São encontrados naturalmente em diferentes concentrações nas frações de hidrocarbonetos do petróleo. Não são encontrados em seres vivos, mas são formados por bioprecursores orgânicos através da reação de íons carbônio com ácidos de Lewis, podendo ser sintetizados também em laboratório. ⁵⁹ Apesar de não ser claro seu mecanismo de formação na natureza, Wei e colaboradores ⁶⁰ constataram esta hipótese submetendo sedimentos recentes ricos em hidrocarbonetos naturais de diversas classes à pirólise para simular a diagênese. O grupo detectou que minerais ácidos como aluminosilicato ácido e montmorilonita K-10 catalisam a formação de adamantanos (1) e diamantanos (2), com diminuição da concentração dos hidrocarbonetos.

O adamantano é o representante mais simples da série e tem o ponto de fusão mais alto (270 °C), com maior estabilidade que os adamantanos metilados e diamantóides. Os diamantanos são constituídos por duas unidades de adamantano e ainda podem possuir grupos metila em diversas posições. Existem ordens mais complexas de diamantóides, mas raramente são encontrados na natureza. Devido à alta estabilidade térmica e mecânica, destes compostos, estes são encontrados em maior quantidade em amostras que apresentam maior degradação térmica.

⁵⁹ Schwertfeger, H.; Fokin, A. A.;. Schreiner, P. R. Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 1022.

⁶⁰ Wei, Z.; Moldowan, J. M.; Paytan. A.Org. Geochem. 2006, 37, 891.


Figura 39 - Adamantano (1) e diamantano (2), respectivamente.

As características de alta resistência fazem dos diamantóides um problema na produção de petróleo, pois se acumulam nas tubulações. Por outro lado, as mesmas características dão um alto valor agregado a este grupo, que está sendo estudado como novo material para circuitos elétricos, polímeros e blocos construtores para medicamentos sendo a maior aplicação na geoquímica orgânica.⁵⁹ Apesar de não serem relacionados diretamente com as estruturas dos precursores biológicos, os diamantóides fornecem importantes informações sobre a fonte da matéria orgânica, ambiente deposicional da rocha e grau de maturação, principalmente quando os biomarcadores estão ausentes pela alta biodegradação ou craqueamento térmico.⁶¹

Essas caracteristicas tornam esta classe de compostos interessantes para o uso como padrões em estudos dos fenomenos que acercam o petróleo como por exemplo, na simulação de biodegradação em laboratório. Contudo modificações ainda são necessárias para tornar esses padrões diferentes daqueles naturalmente encontrado nas amostras de petróelo, como inserção de grupos enriquecidos com isotopos pesados de C ou H.

⁶¹ Schulz, L.K.; Wihelms, A.; Rein, E.; Steen, A.S. Org. Geochem. 2001, 32, 365

1.2 MALDI-TOF-MS

A técnica de identificação de micro-organismos por MALDI-MS surgiu como uma ferramenta da medicina, para tornar mais rápidas as análises clínicas, uma vez que as técnicas existentes baseadas em reconhecimento de anticorpos, e análise de DNA amplificado por PCR, costumam levar horas para se obter os resultados. Porém essas mesma técnica pode ser utilizada para análise de micro-organismos ambientais, como é o caso dos encontrados no petróleo.

Os espectros de proteínas de micro-organismos intactos por MALDI apresentam picos intensos abaixo de m/z 25.000. Sendo estes suficientemente distintos para que se possam construir bibliotecas de *fingerprint*, que serão utilizadas nas identificações por comparação. Contudo, esse tipo de análises sofre influência de muitos fatores experimentais, como: solubilidade das proteínas biomarcadoras, variação no nível de expressão dessas proteínas devido ao tempo e ao meio de cultivo, eficiência na ionização e variação na energia do pulso do laser.⁶²

Porém apesar de todas essas resalvas já existem diversos trabalhos na literatura que tem aplicações envolvendo desde a identificação de microorganismos, ⁶³ até aplicações mais práticas como combate ao bioterrorismo. ⁶⁴

⁶² Demirev, P. A.; Fenselau, C.; Annu. Rev. Anal. Chem. 2008 (1), 71–93

⁶³ Demirev, P.A.; Ho, Y.; Ryzhov, V.; Fenselau, C; Anal. Chem. **1999** (71), 2732-2738

⁶⁴ Castanha, E.R.; Fox, A.; Fox, K. F.; Journal of Microbiological Methods, 2006 (67), 230–240.

2 Objetivos

Síntese de derivados isotópicamente marcados de adamantano para o uso como padrão em estudos de geoquímica orgânica.

Avaliar a viabilidade do uso de técnicas de espectrometria de massas para a caracterização de micro-organismos do petróleo.

3 Resultados e Discussões

3.1 Síntese de derivados adamantóides

Neste trabalho visou-se a otimização de um método simples de metilação do adamantano (1) (Esquema 9), que possa ser utilizado em grande escala, buscou-se desenvolver um método que ofereça a maior conversão utilizando reagentes de menor custo possível. Para isso optou-se pela realização da formação de um ligação C-C através de uma reação de Grignard entre o 1-bromo-adamantano comercial e o CH_3MgBr produzido no laboratório. A utilização posterior do reagende de Grignard deuterado levou obtenção do 1-metil-adamantano trideuterado (**5**) que é de grande importância para a geoquímica orgânica, devido a sua aplicação como marcador para análises em espectrometria de massas.⁵⁹



Esquema 9 - Síntese do 1-metil-adamantano trideuterado via reação de Grignard

Diversas condições foram testadas (Tabela 10), ⁶⁵ para diminuir a formação de subprodutos como os compostos 1 e 7 (Esquema 10).

Entrada	Re	esultados	por GC-N	AS	Condições				
	% 1	% 4	% 3	% 7	Prep. Grignard	Alquilação			
1	6,8	11,8	2,7	78,7	1,5 mol L ⁻¹ , 2h, 50 ℃	1h, 90 °C			
2	5,3	9,0	-	85,7	1,8 mol L ⁻¹ , 40', 40 °C	4h, 100 °C			
3	5,4	19,7	-	75,0	1,8 mol L ⁻¹ , 2h30, 90 °C	1h, 90 °C			
4	18,0	39,4	-	42,6	1,8 mol L ⁻¹ , 2h, 90 ℃	1h, 90 °C			
5	7,8	30,3	-	58,4	1,8 mol L ⁻¹ , 20h, 100 °C	1h, 90 °C			

 Tabela 10 - Resumo dos resultados para testes de metilação do 1-bromo-adamantano.

Chegou-se à condição otimizada (Entrada 1 - Tabela 11) onde obtivemos uma conversão de 100% no produto de interesse, iniciou-se então a utilização do reagente de Grignard deuterado. Contudo observamos a formação novamente do subproduto 1, de inicio atribuímos sua formação devido ao excesso do reagente de Grignard. Sendo assim reduzimos sua quantidade e observamos uma mudança muito pouco significativa no

⁶⁵ Dados iniciais obtidos por Daniele de Oliveira Rocha, na época aluna de doutorado do grupo.

rendimento, com exceção na condição equimolar (entrada 4, Tabela 11), onde o a produção de 1 aumentou para 57%.



Esquema 10 - Reações colaterais na alquilação do 1-bromo-adamantano. Tabela 11 – Resumo das condições experimentais da deuterometilação do 1-Bradamantano.

		Reager	ntes	Conc	Conversão**			
Entrada	Mg^0	CH ₃ I/CD ₃ I	3	Eter	Prep.	Alguilação	07 1	% 4
	mg(mmol)	mL (mmol)	g(mmol)	etílico mL	Grignard	Alqunação	70 1	ou 5
1	425(17)	1,87(30)	1,07(5)	10	Refluxo, 2h	24h, 80°C		100
2*	874(36)	1,87(30)	1,07(5)	10	Refluxo, 2h	24h, 80°C	25	75
3*	437(18)	1,1(18)	1,07(5)	10	Refluxo, 2h	24h, 80°C	23	77
4*	175 (7)	0,311(7)	1.07(5)	10	Refluxo, 2h	24h, 80°C	57	43

* foi utilizado CD₃I. ** Conversões calculadas pelo cromatograma.

Não conseguindo melhorar o rendimento alterando as condições reacionais quando utilizamos reagente isotópicamente marcado (entradas 2,3 e 4), optou-se por buscar um processo de purificação. Inicialmente tentou-se a purificação por sublimação, porém sem muito sucesso, pois todas as frações continham a mesma proporção da mistura inicial. Resolveu-se aplicar a purificação por cristalização, utilizando uma condição em que o adamantano (1) cristalizava, tornando possível aumentar a purificação do metil-adamantano para 90%, recuperando o adamantano formado com >99% de pureza, Figura 40.

100 -А Т В _ ÇD₃ . 10 . 12 С 12 6 8 10 D

Capitulo II – "Trabalhos complementares ao escopo principal"

Figura 40 – Cromatogramas obtidos das análises por GC-MS do extrato das reações: (A) Metilação do 1-bromo-adamantano (entrada 1, Tabela 10), (B) Metilação do 1-bromoadamantano com CD₃I (entrada 2), (C) após purificação por cristalização, (D) cristais obtidos da cristalização.

3.2 Caracterização de micro-organismos (MO) do petróleo

Alguns dos MO isolados do petróleo P2 destacaram-se por apresentarem atividades enzimáticas expressivas,Tabela 12, frente à biodegradação do petróleo e às sondas fluorogênicas⁶⁶, Esquema 11.



Esquema 11 - Esquema de reações envolvidas no processo de triagem para as sondas de lípase, esterase e epóxido hidrolase.

Tabela 12 - Atividades enzimáticas (hidrolases) em bactérias isoladas do consórciomicrobiano recuperado das amostras de óleo da Bacia de Campos (% de conversão)

MO	Sondas					мо	Sondas				
	EH1	EH2	ES3	ES4	LP5	MO	EH1	EH2	ES3	ES4	LP5
SG10	2%	7%	0,5%	2%	17%	SG26	0,4%	2%	1%	5%	77%
SG12	2%	6%	2%	3%	46%	SG27	0,5%	5%	3%	17%	81%
SG13	1%	6%	3%	18%	51%	SG42	2%	5%	0,9%	2%	1%
SG16	0,6%	7%	0,3%	1%	11%						

⁶⁶ Cruz, Georgiana F. ; Angolini, Célio F. F. ; Oliveira, Luciana G. ; Lopes, Patrícia F. ; Vasconcellos, Suzan P. ; Crespim, Elaine ; Oliveira, Valéria M. ; Santos Neto, Eugênio V. ;Marsaioli, Anita J., **2010**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 319-329.

Para identificar esses MO, foram utilizadas técnicas de rDNA 16S sendo inicialmente todos classificados como *B. pumillus*, contudo esses microorganismos apresentavam diferentes atividades tanto nos os ensaios de biodegradação de petróleo quanto com as sondas fluorogênicas. Sendo assim, decidiu-se avaliar a variabilidade e uma possível diferenciação neste conjunto de sete micro-organismos utilizando análise de MALDI-TOF de células íntegras.

Inicialmente verificou-se um efeito, já relatado na literatura, ⁶⁷ de que o perfil observado desses micro-organismos por MALDI-TOF podem sofrer influência não apenas da espécie estudada, mas também do meio de cultivo utilizado. Portanto num primeiro momento analisaram-se algumas cepas do mesmo micro-organismo crescidas em dois meios de cultivo diferentes, Figura 41 e Figura 42.



Figura 41 - Perfil de MALDI-TOF para a cepa do micro-organismo AF35 (*Bacillus pumilus*) crescida em diferentes meios de cultivo: Agar nutriente (superior) e Agar marinho (inferior).

⁶⁷ Demirev, P. A.; Fenselau, C.; Annu. Rev. Anal. Chem. 2008. 1:71–93



Figura 42 - Perfil de MALDI-MS para a cepa do micro-organismo SG33 (*Bacillus safensis*) crescida em diferentes meios de cultivo: Agar nutriente (superior) e Agar marinho (inferior).

Nesse experimento observou que apesar de existir alguns sinais comuns aos dois meios de cultivo, os micro-organismos apresentavam diferenças significativas quando crescido em meios de cultivo diferentes. Sendo assim, optou-se por crescer os micro-organismos em um mesmo meio de cultivo para a realização das análises de massas com célula integra, e o meio escolhido foi o agar nutriente. Apesar de este ser o meio com menor variedade de nutrientes, foi o único em que todas as cepas estudadas foram capazes de se desenvolver.

Obteve-se os espectros para as 7 cepas selecionadas, onde para avaliação e classificação dos dados optou-se pela realização de uma análise quimiométrica utilizando o *software* Piruette® v3.11. A análise de agrupamentos hierárquico (HCA, do inglês "*hierarchical cluster analysis*") dos resultados obtidos revelou quatro grupos diferentes, com similaridade de até 45% (Figura 43).



Capitulo II – "Trabalhos complementares ao escopo principal"

Figura 43 – Dendograma obtido da análise de HCA (centrado na média) dos picos de massas obtidos das análises por MALDI-ToF para os micro-organismos SG - X, onde X se refere a número das cepas (tabela 11).

Realizou-se também uma análise de componentes principais, (PCA, do inglês "*Principal Components Analysis*"), centrada na média. O número de componentes principais (PC) a serem consideradas no modelo foi definido com base nos dados da validação cruzada, no erro de validação (Press Val), e na variância explicada pelas PCs, Tabela 13. Em geral escolhe-se o modelo com o número de fatores que provoca a queda mais acentuada nos valores de Press Val, acumulando o máximo de variância explicada pelas PCs. No nosso cálculo selecionou-se 4 fatores como sendo o ótimo do modelo.

Fatores	Variância	Percentual	% Cumulativo	Press Val
Fator 1	68,616	42,88	42,87	110,88
Fator 2	36,186	22,61	65,49	72,11
Fator 3	14,67	9,16	74,65	61,52
Fator 4	12,87	8,04	82,70	44,37
Fator 5	7,96	4,97	87,67	39,37

Tabela 13 – Variância dos dados espectrais de MALDI-MS explicada para as 5 PCs e erros de calibração e validação da PCA.

Observando-se o gráfico de *scores*, Figura 44, é possível visualizar a distribuição das amostras com base nos sinais obtidos pela análise de MALDI-MS, onde os mesmos grupos obtidos pelo HCA (destacados no gráfico) são novamente discriminados. O gráfico de *loadings* para os *scores* selecionados mostram as variáveis que mais contribuíram para a distribuição das amostras e é possível notar que praticamente todos os sinais mais intensos dos espectros de massas foram relevantes para a classificação.



Figura 44 – Gráfico dos escores do PCA (centrado na média) dos picos de massas obtidos das análises por MALDI-ToF dos micro-organismos SG - X.

Capitulo II - "Trabalhos complementares ao escopo principal"



Figura 45 – (A) Cromatogramas reconstruídos e gráficos de *loadings vs. variáveis:* (B) fator 1 e (C) fator 2.

Com base nesses dados, onde se observa uma evidente separação entre alguns dos micro-organismos estudados optou-se por realizar uma melhor caracterização genética desses através do sequenciamento do gene *gyrB* onde após análise filogenética permitiu a discriminação dos isolados bacterianos para as diferentes espécies de *Bacillus* (Figura 46).⁶⁸ O interessante é que a nova identificação usando marcadores genéticos coincidiu com a classificação obtida pelas análises quimiométricas dos dados de MALDI-MS.

⁶⁸ Patrícia F. Lopes-Oliveira, Suzan P. Vasconcellos, Célio F. F. Angolini, Georgiana F. da Cruz, Anita J. Marsaioli, Eugênio V. Santos Neto and Valéria M. Oliveira; *Petroleum & Environmental Biotechnology*, **2012**, DOI 10.4172/2157-7463.1000132.

Com isso iniciou-se a construção de um banco de dados com todos os micro-organismos já isolados e identificados por técnicas de rDNA 16S e gyrB, com o intuito de no futuro quando se isolar novas cepas de microorganismos do petróleo a sua identificação possa ser realizada de maneira mais rápida e barata. Deixando as técnicas mais sofisticadas apenas para os micro-organimos que não estiverem no banco de dados ou apresentarem alguma dúvida no resultado.



Figura 46 - Análise filogenética baseada na sequência parcial do gene da girase B obtida das bactérias isoladas pertencentes ao gênero

4 Conclusões

Conseguiu-se realizar a síntese de um derivado de adamantoíde com uma marcação de três deutérios, o 1-trideuterometil-adamantano, porém devido à formação de subprodutos e a propriedades intrínsecas do produto formado, como sublimação, obteve-se o mesmo com no máximo 90% de pureza.

Foi possível ainda avaliar sete diferentes cepas de Bacillus, indígenas de petróleo, que possuíam atividades biológicas diferenciadas frente a sondas fluorogênicas, o que demonstra a grande versatilidade deste gênero. Estabeleceu-se uma metodologia por MALDI-MS que foi aplicada com sucesso para a caracterização destas cepas bacterianas de petróleo. Onde características intrínsecas da técnica, tais como a velocidade de análise, a exigência de baixa quantidade de amostra e a relativa facilidade de utilização tornam MALDI-MS uma abordagem promissora para a identificação de bactérias de petróleo. Cabe ressaltar que a técnica de identificação por massas se mostrou mais eficiente nesse conjunto de micro-organismos, uma vez que foi necessário um segundo marcador filogenético (*gyrB*) para a confirmação da identificação pelas técnicas de filogenia.

Abordagens de bioinformática têm sido desenvolvidas proporcionando identificações rápidas e confiantes das cepas bacterianas por análises de MALDI-MS. No entanto, os programas já comercialmente disponíveis para a identificação de bactérias não identificam cepas presentes em um consórcio, o que indica ainda necessidade de desenvolvimento de *softwares* robustos para lidar com misturas mais complexas de micro-organismos.

Parte Experimental

1 Equipamentos e condições empregadas

1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Os reagentes, solventes e meios de cultura utilizados nestes trabalhos foram analiticamente puros e/ou indicados pelos fabricantes para uso em diferentes análises. Quando necessário os reagentes foram devidamente purificados antes de seu uso seguindo métodos descritos na literatura. ⁶⁹ Os meios de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave a 121 °C e pressão de 1 atm por 20 minutos.

A vidraria foi adequadamente limpa e esterilizada em autoclave a 121 °C, 1 atm por 30 minutos ou em estufa de esterilização a 180 °C durante 1 hora. Todo material que não pôde ser esterilizado em autoclave foi submetido à radiação UV durante 30 minutos antes de seu uso. Utilizou-se água Milli-Q no preparo de todas as soluções utilizadas neste trabalho. Todos os ensaios foram realizados em condições aeróbias e foram manipulados em câmaras de fluxo laminar.

1.2 Preparo de Amostras

Para a caracterização dos óleos seja ela por CG ou CL, algumas etapas de purificação são necessárias para a obtenção das diferentes frações estudadas: Fração ácida e Fração Neutra.

⁶⁹ Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, 2^a Ed., Pergamon Press, New York, **1980**.

1.2.1 Obtenção das frações neutras

As frações neutras foram obtidas em dois momentos: caracterização dos óleos nos estudos de caso, onde a purificação é feita partindo do próprio óleo; e dos ensaios de biodegradação onde a purificação é feita com o óleo extraído do ensaio. No caso dos ensaios os extratos brutos foram realizados a cada 10 dias num período de 50 dias através da extração com 2x10 mL de CH₂Cl₂. Os óleos foram submetidos a um fracionamento cromatográfico em coluna cromatográfica utilizando sílica gel obtendo-se 3 (três) frações neutras distintas: hidrocarbonetos saturados, insaturados e aromáticos leves(F1); aromáticos pesados (F2); resinas e asfaltenos (F3).

As diferentes frações foram obtidas através da eluição do extrato com diferentes solventes: 15 mL de hexano (F1), 10 mL de hexano:tolueno (1:1) (F2) e 10 mL clorofórmio:metanol (95:5) (F3). A fração F1 foi então evaporada para posterior análise em CG/MS, na concentração de 6 mg mL⁻¹ em hexano bidestilado, Fluxograma 1.



Fluxograma 1 – Representação esquematica de obtenção das frações neutras.

1.3 Obtenção das frações ácidas

Para obtenção da fração ácida das amostras de petróleo realizou-se separação por afinidade em sílica modificada com KOH em refluxo utilizando sistema representado na Figura 47. Onde é usado de 3 a 5 gramas de sílica para 1 grama de petróleo. A sílica é empacotada com éter que também remove o excesso de KOH, e então a amostra é adicionada. A fração neutra é

removida com éter em refluxo de 4 a 6 horas. A fração ácida é obtida em seguida pela eluição da coluna com éter:ácido fórmico (20% v/v), em refluxo de 2 horas. Em seguida a fração ácida é evaporada em rotaevaporador resultando num óleo espesso ou sólido.



Figura 47 – Sistema utilizado na separação por afinidade em coluna das amostraras de óleo.

Sílica modificada: 25 gramas de KOH são diluídos em 400 ml de isopropanol a 50 °C até completa dissolução, em seguida adiciona-se a 200 gramas de sílica a frio mantendo a mistura em repouso por 1 hora, em seguida o isopropanol é evaporado.

	Extração F	ração Neutra	Extração Fração Ácida (~1g óleo) (g)			
Óleo		óleo) (g)				
	F1	F2	F3	FN	FA	
P1	0.0582	0.0199	0.0185	0.8929	0,0165	
P2	0.0224	0.0132	0.0174	0.6978	0.0132	
P3	0.0431	0.0064	0.0091	0.3780	0.0135	
P4	0.0281	0.0143	0.0239	0.8633	0.0245	
P5	0.0370	0.0045	0.0048	0.820	0.0046	

Tabela 14 – Massas das frações dos óleos P1-P5.

2 Métodos de análise

2.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Após fracionamento das amostras, as frações F1 foram analisadas utilizando um CG HP6890 (Agilent Technologies) acoplado a detector seletivo de massas (HP 5970-MSD) através das técnicas de varredura de íons totais (TIC, *Total Ion Chromatogram*) e monitoramento de íons seletivo (SIM, *Single Ion Monitoring*).

O cromatógrafo a gás é equipado com um injetor tipo split/splitless com coluna capilar de sílica do tipo MDN5S (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), cuja fase estacionária consiste de 5% de fenilmetilsilicone. As amostras foram adequadamente diluídas (6 mg de amostra em 1mL de hexano) e 1 μ L desta solução foi utilizado nas injeções, utilizando-se hélio como gás de arraste.

As temperaturas do injetor e do forno variaram conforme o método utilizado. O espectrômetro de massas operou com velocidade de 0,77 scans.seg⁻¹ na faixa de m/z 40-700.

Os programas utilizados para detecção e monitoramento dos biomarcadores presentes na fração neutra estão descritos a seguir:

- ✓ Programa I (análise de alcanos, isoprenoides, aromáticos leves e sesquiterpanos bicíclicos): Injetor a 300° C; Linha de transferência a 260° C; Forno a 80° C por 2 minutos, eleva-se a temperatura até 270° C à 4 °C/min, depois eleva-se novamente até 300° C à 10° C por minuto e mantém nessa temperatura por 25 minutos. Coluna capilar MDN5S 30m.0,25mm.0,25µm;
- ✓ Programa II (Análise de terpanos tricíclicos, tetracíclicos e pentaciclícos, esteranos normais, alquil esteranos, e diasteranos: Injetor a 300 °C; Linha de transferência a 260 °C; Forno a 70 °C por 2 minutos, eleva-se a temperatura a 190 °C à 30 °C/min, depois eleva-se novamente a 250 °C à 1 °C/min, e novamente a 300 °C à 2 °C/min e mantém a temperatura por 25 minutos. Coluna capilar MDN5S 30m.0,25mm.0,25µm;

2.2 Ionização por electrospray com analisador de massas de alta resolução (orbitrap)

Para as análises de espectrometria de massas por eletrospray foi utilizado um LTQ Orbitrap XL da *Thermo Scientific*. As amostras da fração ácida (1mg/ml) foram inseridas por infusão direta num fluxo de 3-10 μ L min⁻¹ e um fluxo de nitrogênio de 5 μ L min⁻¹. O capilar foi mantido na temperatura de 275° C com voltagem de -48 V e a voltagem do spray de 3,6 kV. Uma mistura de tolueno:metanol (1:1, v/v) foi empregada para dissolução e análise dos óleos brutos e das frações ácidas acrescidas de 0,1% de hidróxido de amônio. As análises foram feitas no modo negativo na faixa de razão *m/z* de 200-1000, as análises de baixa resolução foram realizadas no iontrap 3D com resolução de 100.000 (*m/z* 400).

3 Cálculos dos parâmetros

As razões obtidas para os compostos aferidos com massa molecular foram calculadas pelas fórmulas mostradas a seguir, utilizando-se as abundâncias absolutas obtidas dos espectros de razão m/z.

3.1 Razões O_X/O_y

As razões dos compostos oxigenados foram calculadas com a somatória das abundâncias de todos os compostos da classe em questão que foram aferidos com composição molecular com erros inferiores a 3 ppm.

$$\frac{O_2}{O} = \frac{\sum Classe O_2}{\sum Classe O}$$

Onde: Classe O_2 são todos os compostos aferidos com fórmula molecular $C_cH_hO_2$; Classe O são todos os compostos aferidos com fórmula molecular C_cH_hO .

$$O_4/O_3 = \frac{\sum Classe O_4}{\sum Classe O_3}$$

Onde: Classe O_4 são todos os compostos aferidos com fórmula molecular $C_cH_hO_4$; Classe O são todos os compostos aferidos com fórmula molecular $C_cH_hO_3$.

$$O_2 + O_4 / O_1 + O_3 = \frac{\sum Classe O_2 + \sum Classe O_4}{\sum Classe O_3 + \sum Classe O_4}$$

3.2 Razões Classe O₂

$$A_{x/y} = \sum_{DBE \ x} Classe \ O_2 \Big/ \sum_{DBE \ y} Classe \ O_2$$

Onde: $\sum_{DBE x} Classe O_2$ é o somatório das abundâncias de todos os compostos da classe O_2 que apresente grau de insaturação (DBE) igual a x. x= 4, 6 e 8. y = 3 e 4.

Razão A/C =
$$\sum_{DBE_{1}} Classe O_{2} / \sum_{DBE_{2}}^{DBE_{4}} Classe O_{2}$$

Onde: $\sum_{DBE2}^{DBE4} Classe O_2$ é o somatório das abundâncias de todos os compostos da classe O_2 com DBE de 2 até 4.

$$=\sum$$
Hidrocarboneto ímpares/ \sum Hidrocarbonetos pares

Razão I/P (ácidos)

$$= \sum_{DBE \ 1} Classe \ O_2 \ impares / \sum_{DBE \ 1} Classe \ O_2 \ pares$$

Onde: $\sum_{DBE1} Classe O_2$ *(mpares é* o somatório das abundâncias de todos os compostos da classe O_2 com DBE 1 e número ímpar de carbono; e $\sum_{DBE1} Classe O_2$ pares é o somatório de todos os compostos da classe O_2 com DBE 1 e número par de carbono.

4 Construção dos gráficos

De maneira simplificada os gráficos mostrados nessa Tese são obtidos seguindo-se as seguintes etapas: Do programa do espectrômetro de massas (Xcalibur) é obtida uma lista de fórmulas moleculares com até 10.000 compostos com razão massa/carga de 200 a 1000, com os erros da aferição de massa, DBE (RDB), etc., Figura 48.

SPECTRUM - MS

- P1-FA-1-1mg_ml-0-5 amônio.raw
- FTMS c ESI Full ms [200.00-1000.00]
- Scan #: 23

RT: 2	.98
-------	-----

m/z	Intensity	Relative	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
201.1278	11897.3	0.18	-3.61	6.5	C14 H17 O
203.107	16986.2	0.26	-3.73	6.5	C13 H15 O2

205.159	36676.4	0.56	-3.79	4.5	C14 H21 O
219.1382	20581.4	0.31	-3.97	5.5	C14 H19 O2
219.1748	36788.4	0.56	-2.75	4.5	C15 H23 O
220.1125	37382.5	0.57	-2.97	10.5	C16 H14 N
221.0811	13510.8	0.21	-3.97	6.5	C12 H13 O4
221.1176	25272.5	0.38	-3.18	5.5	C13 H17 O3
221.154	101500.5	1.54	-3.15	4.5	C14 H21 O2
222.1284	15272.2	0.23	-1.75	9.5	C16 H16 N
222.1571	14988.6	0.23	-4.5	4.5	C13 [13]C H21 O2
223.1333	28788.8	0.44	-2.92	4.5	C13 H19 O3
223.1696	161451.1	2.46	-3.3	3.5	C14 H23 O2
224.1647	10626	0.16	-3.87	3.5	C13 H22 O2 N

Figura 48 – Exemplo da lista de compostos obtidos das análises de ESI-MS

Com essas listas usando o Excel são então extraídas as informações de interesse separando-as nas respectivas classes (N, O₂, O₃, etc.), Figura 49. Com as informações agora separadas por classes são então construído os gráficos reportados nessa tese utilizando-se o programa Origin.

m/z	Intensidade	Relativa	erro (ppm)	RDB equiv.	Norm		C	Compo	osição		
				·		С	C13	н	0	Ν	S
203.107	16986.2	0.26	-3.73	6	0.2939143	13		15	02		
219.1382	20581.4	0.31	-3.97	5	0.3561225	14		19	02		
221.154	101500.5	1.54	-3.15	4	1.7562755	14		21	02		
222.1571	14988.6	0.23	-4.5	4	0.2593496	13	1	21	02		
223.1696	161451.1	2.46	-3.3	3	2.793608	14		23	02		

Figura 49 – Exemplo de separação das classes de compostos realizadas no Excel.

No total foram geradas 18 planilhas do Excel com em média 150 MB, as mesmas estarão disponíveis em um CD junto com a tese, porém devido ao tamanho das mesmas se tornou impraticável adicioná-las ao texto. Sendo mostrados apenas os espectros obtidos para cada amostra no anexo I.

5 Síntese do derivado do adamantano

5.1 Metilação geral do 1-bromo-adamantano.

Em um balão tipo pêra de 10 mL foi adicionado CH_3I e 10 mL de éter etílico anidro (Synth). Esta solução foi adicionada lentamente a um balão contendo Mg^0 a 0 °C formando o reagente de Grignard, após diminuição no desprendimento de bolhas a reação foi mantida sob refluxo por 2 horas. Após resfriada, a suspensão foi canulada para o reservatório de vidro de um extrator soxhlet sobre pressão que estava sob atmosfera de argônio e continha contendo 1-bromo-adamantano (Aldrich) em 5 ml de éter etílico. A mistura final foi aquecida por 90 °C, após este período foi lavada com HCl 1mol L⁻¹, água e NaHCO₃ aquoso saturado. A fase aquosa foi extraída com éter etílico e as fases orgânicas combinadas foram secas com MgSO₄. A solução final foi seca sobre fluxo de nitrogênio, pois no evaporador rotativo havia perda total do produto devido à sublimação.

5.2 Cristalização do 1-metil-adamantano deuterado.

Após eliminação do éter etílico os cristais resultantes contendo 1-metiladamantano e adamantano, são solubilizados na menor porção possível de isopropanol quente (40 °C) e são deixados em repouso em freezer (-20 °C) por 2 horas. Após esse período o sobrenadante foi removido e evaporado sobre fluxo de nitrogênio resultando no 1-metil-adamantano com 90% de pureza. Obs.: Uma segunda recristalização foi realizada mais não houve aumento na pureza do produto. O mesmo foi caracterizado por espectrometria de massas e RMN de ¹H e ¹³C.

Caracterização por CG/EM: 1-metil-adamantano deuterado *m/z*: 153.1 (15) [M]⁺, 135(100), 107(4), 96(12), 93(12), 79(13). 1-metil-adamantano: *m/z* 150(100) [M⁺], 135(100), 107(7), 93(26), 79(18), 44(28); 1-Iodo-adamantano: *m/z* 135 (100) [M+-I], 107(9), 93(19), 79 (23), Adamantano *m/z* 136(100) [M⁺], 121(9), 107(9), 93(43), 67(19), 44(94).

Caracterização por RMN: RMN de ¹H (250,13 MHz, CDCl₃,TMS) δ 1,4 (6H, CH₂, a); 1,5-1,7 (6H, m, CH₂, b); 1,9 (3H, CH, c). RMN de ¹³C (62,89 MHz, CDCl3, TMS) δ 28,8 (CH, c); 36,9 (CH₂, b); 44,5 (CH₂, a). Espectros no anexo I.



6 Preparação de amostras das células bacterianas para análises por MALDI-MS.

Aproximadamente 2-5 mg de células bacterianas (massa úmida) foram suspensas em 1 ml de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e centrifugadas durante 3 minutos a 11000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido. O processo foi repetido 3 vezes por amostra. Após extração, 50 μ l de TFA (0,1%) foram adicionados e as células foram armazenadas em congelador.

Todas as análises foram realizadas com um espectrômetro de massa HDMS SYNAPT (Waters, Manchester, UK). O MALDI (+)-QTof (*Quadrople Time of Fligth*) MS de células foi realizado utilizando um reflectron V-mode e um laser do estado sólido de 200 Hz (Nd: YAG). Uma alíquota (4 µl) de uma suspensão de células foi adicionado a 10 µl MeCN com 0,1% de HCO₂H e misturada (1:10) com uma de uma solução a 10 mg ml⁻¹ α -CHCA matriz em (50:50) H₂O/MeCN com 0,1% HCO₂H. A mistura foi, em seguida, diretamente aplicada (1,5 µl) sobre as placas de MALDI de aço inoxidável deixadas secar. As condições de operação típicas foram: energia de laser 250 a.u., placa de amostra 20 V, energia do trap e zona de colisão de 6 e 4 V, respectivamente. A calibração foi realizada com adutos de sódio com PEG 600/1000/2000 entre *m/z* 300 e 3000.

ANEXO I - Espectros



Figura 50 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo P5.



Figura 51 – Espectro de massas ampliado para a fração ácida do óleo P5







Figura 53 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo P2.



Figura 54 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo P4.



Figura 55 – Espectro de massas de alta resolução para a fração ácida do óleo P1



Figura 56 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo LC 1.



Figura 57 – Espectro de massas ampliado de alta resolução para o óleo LC 1.



Figura 58 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo LC 2.



Figura 59 – Espectro de massas ampliado de alta resolução para o óleo LC 2.


Figura 60 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo M 1.



Figura 61 – Espectro de massas de alta resolução para o óleo M 2.



Figura 62 – Espectro de RMN de ¹H para a mistura 1-trideuterometil-adamantano (90%) e adamantano(10%).



Figura 63 – Espectro de ¹³C (A) e DEPT-135 (B) para a mistura 1-trideuterometil-adamantano (90%) e adamantano(10%).



Figura 64 – Espectro de massas do 1-trideuterometil-adamantano.