

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO THOMSON DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS



TESE DE DOUTORADO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS E PETRÓLEO  
POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS  
EM CONDIÇÕES AMBIENTE E COM ALTA EXATIDÃO E RESOLUÇÃO

**Autora:** Rosineide Costa Simas

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

CAMPINAS, SETEMBRO 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

Si42c Simas, Rosineide Costa.  
Caracterização de óleos vegetais e petróleo por espectrometria de massas em condições ambiente e com alta exatidão e resolução / Rosineide Costa Simas. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Compostos polares. 2. Triacilglicerídeos.  
3. Ionização ambiente. 4. Petroleômica. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Characterization of vegetable oils and petroleum by mass spectrometry in ambient conditions and with high-accuracy and resolution

**Palavras-chaves em inglês:** Polar compounds, Triacylglycerols, Ambient ionization, Petroleomics

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (orientador), Prof. Dr. Adão Aparecido Sabino (UFMG/MG), Prof. Dr. Eugênio Vaz dos Santos Neto (CENPES/PETROBRAS), Profa. Dra. Luzia Koike (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 30/09/2010



**Dedico este trabalho ao meu irmão e amigo Renato**

*(in memoriam)*

**É tão estranho  
Os bons morrem jovens  
Assim parece ser  
Quando me lembro de você  
Que acabou indo embora  
Cedo demais**

**Eu continuo aqui  
Meu trabalho e meus amigos  
E me lembro de você  
Em dias assim  
Dia de chuva  
Dia de sol  
E o que sinto não sei dizer...**

**Vai com os anjos  
Vai em paz  
Era assim todo dia de tarde  
A descoberta da amizade  
Até a próxima vez...**

**Eu aprendi a ter  
Tudo o que sempre quis  
Só não aprendi a perder  
Lembro das tardes que passamos juntos  
Não é sempre mais eu sei  
Que você está bem agora  
Só que neste mundo  
O verão acabou...**

*(Os bons morrem Jovens: Renato Russo)*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Marcos N. Eberlin pela oportunidade de participar do dia a dia do laboratório ThoMSon e aprender espectrometria de massas;

Agradeço a todos os colegas do laboratório ThoMSon pelo carinho, dedicação e apoio que me ajudaram na realização deste momento: Mirela, Elaine, Regina, Thaís, Vanessa, Wanderson, Maíra, Adriana, Eduardo, Flamys, Mário, Patrícia Abdelnur, Francesca, Gustavo Souza, Gustavo Sanvido, Priscila, Martin, Miquéias, Rodrigo, Raquel, Deleon, Fabio D’Alexandri, Patrícia Porciuncula, Alexandra, José, Andréia, Helinho, Lygia, Fabiane, Aninha, Carmen, Marquinhos, Adão, dona Cida, Beth, Niina, Lívia, Renato Haddad, Léo, Phellipe, Marla, Sérgio, Jerusa, Marcos Paulo, Felipe Lalli, Patrícia Braga, Mônica e Rafael;

Agradeço aos amigos do grupo de óleos e biodiesel por tudo que me ensinaram: Dena e Rosana Alberici pelas discussões teóricas, experiências práticas e conselhos...

Agradeço ao meu grupo de petroleômica da UNICAMP que me acolheram e me ajudaram em tudo sempre: Yuri, Heliara, Clécio, Marcos Pudenzi e em especial ao Boni que é meu anjo e Núbia minha fada madrinha...

Agradeço ao laboratório de óleos e gorduras da FEA-UNICAMP: Raquel, Gabriel, Renato Grimaldi e prof. Daniel;

Agradeço aos colegas do meu grupo de petroleômica CENPES-Petrobras por toda ajuda prestada: Rosana Cardoso, Guimarães, Wagner, Érica, Eugênio e Cerqueira;

Agradeço a minha família tão importante em tudo sempre: a mãe e o irmão mais amados do mundo... Que nunca me deixaram desistir... Margarida e Caco;

Agradeço aos amigos da Nutron Alimentos, Mogiana Alimentos e Eurofins do Brasil que acompanharam a minha trajetória...

Agradeço aos funcionários do Instituto de Química, especialmente, a Bel da GPG e ao seu Nelson da manutenção por toda ajuda prestada;

Agradeço a pessoas muito especiais: Alvino, Matheus Prado, Aline, dona Meire, seu Zé, Rodrigo, Rafael, Juninho, Lucas, Cintia, Daniel, Roulber, Felipe Percin, Glauber, Dinorah, Socrates, Edson Brito, Dedê e Welson;

Agradeço aos meus anjos da guarda vó Maria e Renato que sempre vão estar no meu coração e em todos os momentos da minha vida...Saudades...

Agradeço de todo meu coração a minha irmã por escolha *Christina Ramires Ferreira*, por tudo que fizemos e ainda vamos fazer juntas...

Agradeço ao INMETRO pela parceria com os óleos vegetais...

Agradeço a Petrobras pela bolsa e pelo projeto de petroleômica...

Agradeço a **Deus** meu refúgio e fortaleza em todas as horas, razão da minha existência e a quem dedico minha vida...

***"Para que todos vejam, saibam, considerem e juntamente entendam que as  
mãos do Senhor fez isso..."***



**Simas, RC; 2010.** Caracterização de óleos vegetais e petróleo por espectrometria de massas em condições ambiente e com alta exatidão e resolução. Campinas: tese de doutorado- Instituto de Química: UNICAMP, 150 p.

## RESUMO

A caracterização química de óleos de forma rápida, eficiente e com mínimo preparo de amostras é um desafio para a química analítica moderna. Este estudo abrangeu a caracterização química de 15 amostras de óleos vegetais e 6 amostras de petróleo, e demonstrou a versatilidade da técnica de espectrometria de massas (MS) nesta área. A caracterização de óleos vegetais foi feita por uma técnica de ionização ambiente desenvolvida no Brasil, denominada *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization* (EASI) e utilizando como analisador de massas um equipamento monoquadrupolar, que possui resolução unitária. Foi obtido, para os óleos vegetais, a sua composição de triacilglicerídeos (TAG), ácidos graxos livres e hidroperóxidos utilizando apenas uma gota de óleo e nenhum preparo de amostra. A análise direta de óleos vegetais possibilitou ainda propor um método quantitativo por EASI-MS para determinação do teor de triacilglicerídeos, que demonstrou concordância com os métodos de referência. Já a caracterização do petróleo empregou a altíssima exatidão e resolução da espectrometria de massas por ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (FT-ICR MS) com as técnicas de ionização EASI e *Electrospray* (ESI). O presente trabalho representou ainda a primeira tese de doutorado no Brasil em petroleômica, descrevendo um método de análise que dispensa uma série de procedimentos analíticos dispendiosos e demorados, de maneira a conferir um alto grau de refinamento e desempenho à análise de petróleo. Foram estudados os compostos polares do petróleo que contêm os heteroátomos nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O) na sua composição, sendo possível caracterizá-los por distribuição em porcentagem de classes de heteroátomos, número de carbonos e insaturações por *double bond equivalents* (DBE). Foi apresentada uma proposta de estudo de precisão para a metodologia de petroleômica-MS por meio da estimativa de repetitividade e reprodutibilidade, além do estudo comparativo de eficiência das técnicas de ionização ESI e EASI.



**Simas, RC; 2010.** Characterization of vegetable oils and petroleum by mass spectrometry in ambient conditions and with high accuracy and resolution. Campinas: Scientiae Doctorate - Chemistry Institute: UNICAMP, 150 p.

## **ABSTRACT**

The chemical characterization of oils in a fast way and with minimal sample preparation is a challenge for modern analytical chemistry. The present study comprised the chemistry characterization of 15 vegetal oil samples and 6 samples of petroleum, demonstrating the versatility of the mass spectrometry (MS) technique in this area. Vegetal oils characterization was performed by an ambient ionization technique developed in Brazil, named Easy Ambient Sonic-Spray Ionization (EASI), and using a monoquadrupole mass analyzer with unitary resolution. EASI-MS detected for vegetable oils the composition of triacylglycerols (TAG), free fat acids and hydroperoxides using only one drop of oil and without sample preparation. The direct analysis provided by EASI-MS allowed us to propose also a quantitative method based on EASI MS data to determine the level of triacylglycerols of the vegetal oils. This method was in agreement with reference methods. For petroleum characterization, we used ultra-high accuracy and resolution of the Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) with EASI and electrospray (ESI) ionization. The present work describes results from the first doctorate thesis in Brazil dealing with petroleomic MS, a method of analysis that precludes a series of expensive and time-consuming analytical procedures and that can confer a high degree of refinement and performance to petroleum analysis. We have studied polar components of the petroleum containing nitrogen (N), sulphur (S) and oxygen (O) as heteroatoms in their composition. These components were classified according to the percentage distribution of heteroatoms, carbon number and unsaturations, as well as double bond equivalent (DBE). The study also evaluated precision for petroleomic MS via estimations of repeatability and reproducibility. The efficiencies of ESI and EASI for the petroleum analysis were also compared.



## SÚMULA CURRICULAR

*Rosineide Costa Simas*

Possui curso técnico-profissionalizante em Bioquímica pela Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado (ETECAP, 1994), graduação em Farmácia pela Universidade Metodista de Piracicaba (1999), mestrado em química analítica pela UNICAMP (2005). Trabalhou como analista de desenvolvimento e pesquisa na Nutron Alimentos Ltda de 1995 a 2007 e de 2007 a 2009 na Eurofins do Brasil Análise de Alimentos Ltda como gerente de serviços técnicos.

### Dissertação de mestrado

**Química Analítica – Quimiometria:** 2002-2005. UNICAMP (calibração multivariada aplicando NIR). Título: Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectrofotometria no infravermelho próximo. Orientador: Ronei J Poppi.

### Lista de Publicações:

Alberici RM, Simas RC, de Souza V, de Sá GF, Daroda RJ, Eberlin MN (2010). **Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry.** Anal Chim Acta 659: 15-22.

Simas RC, Catharino RR, Cunha IBC, Cabral EC, Barrera-Arellano D, Eberlin MN, Alberici RM (2010). **Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry.** Analyst 135: 738-744.

Corilo YE, Vaz BG, Simas RC, Nascimento HD, Klitzke CF, Pereira RC, Bastos WL, Santos Neto EV, Rodgers RP, Eberlin MN (2010). **Petroleomics by EASI(±) FT-ICR MS.** Anal Chem. 82: 3990-3996.

Sant'ana AS, Simas RC, Almeida CAA, Cabral EC, Rauber RH, Mallmann CA, Eberlin MN, Rosenthal A, Massaguer PR (2010). **Influence of package, type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssoschlamys nivea* and *Byssoschlamys fulva*.** Intern J Food Microb. 142:153 – 163.

Alberici RM, Simas RC, Sanvido GB, Romão W, Lalli PM, Benassi M, Cunha IBS, Eberlin MN (2010). **Ambient mass spectrometry: bringing MS into the real world.** Anal Bioanal Chem. 398:265 – 294.

## **Lista de trabalhos apresentados em congressos**

**Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal ISSN:** 2175-702X, 148pg. Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas em Produção Animal, pag. 109-136. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009. Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil.

**18 th International Mass Spectrometry Conference. Bremen, Germany, Aug 30-sep 04, 2009.**

**PWA (poster) - 060 Estradiol-17 $\beta$  Quantification in Blood Serum Used for Ruminant Embryo in Vitro Production by LC-MS/MS.** Martins-Júnior, Helio Alves; Ferreira, Christina Ramires; Simas, Rosineide Costa; Basso, Andréa Cristina; Pontes, José Henrique Fortes; Meirelles, Flávio Vieira; Eberlin, Marcos Nogueira.

**PWA (poster) - 064 Identification of primary oxidation products of edible oils by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry.** Simas, Rosineide Costa; Alberici, Rosana Maria; Catharino, Rodrigo Ramos; Eberlin, Marcos Nogueira.

**15° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA). Salvador, BA. 18-21 outubro, 2009.**

**(poster) 236 – Determinação da solubilidade protéica em KOH 0,2% em farelo de soja através de planejamento fatorial fracionária.** Samantha C Chiquetti, Luciano A trevillin, Rosineide C Simas, Roy E Bruns, Tereza N C Dantas, Djalma R da Silva.

**XIII Congresso Latino Americano de Grasas y Aceites. Rosário, AR. 1- 6 de novembro, 2009.**

**(Poster) Monitoring of cottonseed oil thermal oxidation via high accuracy Fourier Transform Mass Spectrometry.** Simas, Rosineide Costa, Alberici, Rosana Maria, Eberlin, Marcos Nogueira, Barrera-Arellano, Daniel.

**III Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas (BrMass). Campinas, SP. 12-15 de dezembro de 2009.**

**(Palestra oral) Single shot vegetable oil characterization via EASI MS.** Rosineide Costa Simas: sessão Oil & Fuel Chemistry.

**(Poster)** Caracterização de óleos de Pirólise utilizando FT-ICR MS. Rosineide C Simas, Boniek G Vaz, Heliara Nascimento, Clécio F Klitzke, Raquel VS Silva, Márcia CC Veloso, Raimundo D Nonato, Marcos N Eberlin, Gilberto A Romeiro.

**(Poster)** Evolution of in vitro progesterone releasing kinetics from supercritical biopolymer nanoparticles supported in supercritical fluid. José Rodrigo Valim Pimentel; Rosineide Costa Simas; Patricia Helena Paiva Miguez; Helio Alves Martins Junior; Lúcio Cardoso Filho; Christina Ramires Ferreira; Marcos Hirouqui Kunita; Felipe Perecin; Rogério Favaretto; Marcos N Eberlin; Ed Hoffmann Madureira.

**58 th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. Salt Lake City, Utah, USA. May 23-27, 2010.**

**(Poster) MP 506** - Fatorial design and optimization of the Petroleomic MS Analysis: Accessing Data for Precision Evaluation. Rosineide C Simas, Heliara Lopes Nascimento, Boniek G Vaz, Yuri E Corilo, Clécio F Klitzke, Rosana CL Pereira, Wagner L Bastos, Marcos N Eberlin.

**(Poster) MP 488-** Petroleomic via FAB-MS VS ESI FT-ICR MS characterization of naphthenic acids from brazilian crude oil samples. Clecio F Klitzke, Yuri E Corilo, Heliara Nascimento, Boniek G Vaz, Rosineide C Simas, Rosana CL Pereira, Wagner L Bastos, Marcos N Eberlin.

**Poster MP 489** – Naphthenic acids profiles via ESI FT-ICR MS as markers of crude oil sources. Heliara Nascimento, Boniek G Vaz, Yuri E Corilo, Rosineide C Simas, Clecio F Klitzke, Rita CC Silva, Reinaldo JR Moraes, Antônio EG Sant'Ana, Lucia MC Rebouças, Marcos N Eberlin.

**Poster MP490-** Petroleomics by EASI( $\pm$ ) FT-ICR MS. Boniek G. Vaz, Yuri E Corilo, Rosineide C Simas, Heliara Nascimento, Clecio Klitzke, Rosana CL Pereira, Wagner L Bastos, Ryan P Rodgers, Marcos N. Eberlin.

**Poster ThP 544-** PetroMassSpec: simplifying petroleomic data analysis via software processing and graphics. Yuri E Corilo, Boniek G Vaz, Rosineide C Simas, Clecio Klitzke, Heliara Nascimento, Rosana CL Pereira, Wagner L Bastos, Marcos N Eberlin.

**Poster MP 558-** Quantitative analysis of free and bound glycerin in biodiesel by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Rosana M Alberici, Ildenize BS Cunha, Rosineide C Simas, Jose Luis P Jará, Marcos N Eberlin.

### **Outras realizações:**

1. Membro Comissão de Métodos Analíticos do Sindirações (Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal) por 8 anos;
2. Responsável pelo gerenciamento da documentação do Programa de Gestão de Qualidade ISO 9000 dentro do laboratório na elaboração e controle de procedimentos operacionais padrões;
3. Participou do processo de implantação de HACCP, PBF, Acreditação INMETRO 17025 e Credenciamento junto ao MAPA das empresas em que trabalhou;
4. Coordenação e distribuição de serviço e funções dentro de laboratórios analíticos;
5. Verificação e liberação de resultados para a emissão de laudos analíticos;
6. Otimização, validação e implantação de novos métodos analíticos;
7. Atendimento de dúvidas técnicas de clientes internos e externos;
8. Elaboração de relatórios de pesquisa e validação, prestação de contas de departamento, metas e reuniões entre departamentos;
9. Domínio de análises clássicas e bromatológicas como proteína, extrato etéreo, fibra, umidade e matéria mineral em alimentos;
10. Domínio de técnicas analíticas HPLC, GC-FID, UV/Visível, Karl Fischer, absorção atômica, ICP-OES, Espectroscopia (NIR, MID e FAR), EASI MS, Q-TOF MS, Q-TRAP MS, MALDI MS, FT-ICR MS, GC-Q-TOF, LC-MS/MS;
11. Noções de microbiologia de alimentos;
12. Consultora em ISO 17025, validação analítica, desenvolvimento de metodologias para quantificação por HPLC, LC-MS/MS e NIR.
13. Coordenadora do grupo de Petroleômica do Laboratório ThoMSon.

## LISTA DE SIGLAS

<b>AGC</b>	<i>Automatic Gain Control</i>
<b>AGL</b>	<i>Ácidos Graxos Livres</i>
<b>ANOVA</b>	<i>Analyses of variance</i>
<b>ANP</b>	<i>Agência Nacional do Petróleo</i>
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
<b>API</b>	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
<b>APPI</b>	<i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
<b>ASAP</b>	<i>Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe</i>
<b>CENPES</b>	<i>Centro de Pesquisas Leopoldo A. Miguez de Melo</i>
<b>CI</b>	<i>Chemical Ionization</i>
<b>CRM</b>	<i>Charged Residue Model</i>
<b>Da</b>	<i>Dalton</i>
<b>DAG</b>	<i>Diacilglicerídeo (s)</i>
<b>DART</b>	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
<b>DBE</b>	<i>Doble Bond Equivalent</i>
<b>DC</b>	<i>Direct Current</i>
<b>DESI</b>	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
<b>DeSSI</b>	<i>Desorption Sonic Spray Ionization</i>
<b>DHB</b>	<i>ácido 2,5-dihidroxibenzóico</i>
<b>EASI</b>	<i>Easy Ambient Sonic-Spray Ionization</i>
<b>EI</b>	<i>Electron Ionization</i>
<b>ELSD</b>	<i>Evaporative Light-Scattering Detector</i>
<b>ESI</b>	<i>Electrospray</i>
<b>FEA-UNICAMP</b>	<i>Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas</i>
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i>
<b>FT-ICR MS</b>	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>
<b>HCA</b>	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HPSEC</b>	<i>High-Performance Size-Exclusion Chromatography</i>
<b>IEM</b>	<i>Ion Evaporation Model</i>
<b>INMETRO</b>	<i>Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial</i>
<b>IP</b>	<i>índice de peróxidos</i>
<b>IpA</b>	<i>índice de para-anisidina</i>

<b>IT</b>	<i>Ion Trap</i>
<b>KMN</b>	<i>Kendrick Nominal Mass</i>
<b>LIT</b>	<i>Linear Ion Trap</i>
<b>LLL</b>	triacilglicerídeo formado pelo ácido linoléico (C18:2-C18:2-C18:2)
<b>LnLnLn</b>	triacilglicerídeo formado pelo ácido linolênico (C18:3-C18:3-C18:3)
<b>m/z</b>	razão massa-sobre-carga
<b>MAG</b>	Monoacilglicerídeo (s)
<b>MALDESI</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization</i>
<b>MALDI</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<b>MIMS</b>	<i>Membrane Introduction Mass Spectrometry</i>
<b>MQ</b>	Média Quadrática
<b>MQD</b>	Média Quadrática Dentro
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>MUFA</b>	<i>Monounsaturated Fatty Acid</i>
<b>N-compostos</b>	compostos nitrogenados do petróleo
<b>nm</b>	nanômetros
<b>NSO</b>	compostos polares nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O)
<b>NOS</b>	classe de compostos mistos formados por nitrogênio, oxigênio e enxofre
<b>O- compostos</b>	compostos oxigenados do petróleo
<b>OAM</b>	<i>Oxygen Active Method</i>
<b>OOO</b>	triacilglicerídeo formado pelo ácido oléico (C18:1-C18:1-C18:1)
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i>
<b>PI</b>	período de indução
<b>ppm</b>	parte por milhão
<b>PUFA</b>	<i>Poliunsaturated Fatty Acid</i>
<b>Q-TOF</b>	Espectrômetro híbrido: quadrupolo e tempo de vôo
<b>RF</b>	rádio frequência
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>S-Compostos</b>	compostos sulfurados do petróleo
<b>SQ</b>	Soma Quadrática
<b>SSI</b>	<i>Sonic Spray Ionization</i>
<b>TAG</b>	Triacilglicerídeo (s)
<b>TBA</b>	teste do ácido 2-tiobarbitúrico
<b>TLC</b>	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
<b>TOF</b>	<i>Time of Flight</i>
<b>U</b>	incerteza da média
<b>UV-VIS</b>	Detector de Ultra Violeta/Visível

# INDICE GERAL

<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	xvii
<b>ÍNDICE FIGURAS</b> .....	xxiv
<b>ÍNDICE TABELAS</b> .....	xxviii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS</b> .....	3
<b>CAPÍTULO 1: ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA AOS ESTUDOS DE ÓLEOS VEGETAIS E PETRÓLEO</b> .....	5
1.0- A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: CONCEITOS GERAIS .....	7
2.0-TÉNICAS DE IONIZAÇÃO UTILIZADAS .....	10
2.1- Ionização à pressão atmosférica por ESI .....	10
2.2- Ionização sob vácuo por MALDI.....	11
2.3- Ionização em condições ambiente por EASI MS .....	13
3.0- ANALISADORES UTILIZADOS .....	15
3.1- Analisador monoquadropolar.....	15
3.2- Analisador TOF .....	16
3.3- Espectrometria de massas de alta exatidão e resolução com analisador híbrido (LIT-ICR).....	17
<b>CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM CONDIÇÕES AMBIENTE</b> .....	21
1.0-ÓLEOS VEGETAIS: COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE .....	23
1.1- Ácidos graxos .....	24
1.2-Triacilglicerídeos.....	26
1.3- Origem e composição teórica em ácidos graxos de alguns óleos vegetais.....	27
1.3.1- Óleo de soja .....	27
1.3.2- Azeite de oliva.....	29
1.3.3- Óleo de canola .....	30
1.3.4- Óleo de girassol .....	30
1.3.5- Óleo de milho .....	31
1.3.6- Óleo de semente de uva .....	31
1.3.7- Óleo de avelã .....	32
1.3.8- Óleo de gergelim.....	32
1.3.9- Óleo de linhaça .....	32

1.3.10- Óleo de buriti.....	33
1.3.11- Óleo de andiroba.....	33
1.3.12- Óleo de açaí.....	34
1.3.13- Óleo de castanha do Brasil.....	34
1.3.14- Óleo de pinhão manso.....	34
1.3.15- Óleo de mamona.....	35
1.4- Estabilidade de óleos vegetais: rancidez.....	36
2.0- MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS E NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	37
2.1- Métodos analíticos utilizados na caracterização de óleos vegetais.....	37
2.2- Métodos analíticos para determinar hidroperóxidos e estabilidade em óleos vegetais.....	38
3.0- MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1- Amostras.....	40
3.2- Equipamentos.....	41
3.3- Softwares.....	41
3.4- Parte Experimental.....	42
3.4.1- Determinação de ácidos graxos por GC-FID.....	42
3.4.2- Determinação do período de indução por Rancimat.....	43
3.4.3- Perfil de TAG do óleo de soja por MALDI TOF MS.....	43
3.4.4- Perfil de TAG do óleo de soja por ESI Q-TOF MS.....	44
3.4.5- Caracterização de TAG e AGL em óleos vegetais por EASI MS.....	44
3.4.6- Caracterização de hidroperóxidos por EASI MS.....	44
4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1- Composição de ácidos graxos por GC-FID.....	45
4.2- Comparativo entre EASI, MALDI e ESI para caracterização de óleo de soja.....	46
4.3- Interpretação dos dados de TAG e AGL obtidos por EASI MS.....	47
4.3.1- Composição de TAG do óleo de soja.....	51
4.3.2- Composição de TAG do azeite de oliva.....	52
4.3.3- Composição de TAG do óleo de canola.....	54
4.3.4- Composição de TAG do óleo de girassol.....	55
4.3.5- Composição de TAG do óleo de milho.....	57
4.3.6- Composição de TAG do óleo de semente de uva.....	58
4.3.7- Composição de TAG do óleo de avelã.....	59
4.3.8- Composição de TAG do óleo de gergelim.....	61
4.3.9- Composição de TAG do óleo de linhaça.....	62
4.3.10- Composição de TAG do óleo de buriti.....	64
4.3.11- Composição do TAG do óleo andiroba.....	65
4.3.12- Composição de TAG do óleo de açaí.....	66
4.3.13- Composição de TAG do óleo de castanha do Brasil.....	67
4.3.14- Composição de TAG do óleo de pinhão manso.....	69
4.3.15- Composição de TAG do óleo de mamona.....	70
4.4- Caracterização de hidroperóxidos por EASI MS.....	71
5.0- CONCLUSÕES.....	77
6.0- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	78

**CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO DE PETRÓLEO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTÍSSIMA EXATIDÃO E RESOLUÇÃO .....79**

1.0- PETRÓLEO: A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE COMPOSTOS POLARES .....	81
1.1- Composição química e formação do petróleo .....	81
1.1.1- Hidrocarbonetos saturados e naftênicos .....	83
1.1.2- Hidrocarbonetos aromáticos .....	83
1.1.3- Resinas e asfaltenos .....	84
1.2- Compostos polares (NSO).....	84
1.2.1- Compostos sulfurados (S).....	85
1.2.2- Compostos nitrogenados (N) .....	86
1.2.3 Compostos oxigenados (O).....	89
1.3- A importância dos compostos polares na exploração, na produção e no refino de petróleo.....	90
2.0- PETROLEÔMICA E SUAS FERRAMENTAS.....	92
3.0- ESTIMATIVA DE PRECISÃO PARA ANÁLISES DE PETRÓLEO .....	98
4.0- MATERIAL E MÉTODOS.....	100
4.1- Amostras e equipamentos .....	100
4.2- Procedimento para aquisição de dados do comparativo entre ESI e EASI .....	101
4.3- Procedimento para aquisição de dados em ESI( $\pm$ ) FT-ICR MS utilizados na rotina de petroleômica .....	102
4.4- Software para tratamento de dados .....	103
5.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	103
5.1- Comparativo entre ESI e EASI para análise de petróleo .....	103
5.2- Comparativo da estimativa de precisão para as análises de petróleo .....	108
5.2- Repetitividade e reprodutibilidade para ESI(+) FT-ICR MS.....	108
5.2.2- Repetitividade e reprodutibilidade para ESI(-) FT-ICR MS .....	110
5.3- Caracterização de amostras de petróleo .....	114
5.3.1- Caracterização por ESI(+) FT-ICR MS .....	115
5.3.2- Caracterização por ESI(-) FT-ICR MS .....	120
6.0- CONCLUSÕES .....	126
7.0- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129

**ANEXO1:** Cálculos para os testes de Dixon e Cochran.....142

**ANEXO 2:** Cálculo da ANOVA para o estudo de repetitividade e reprodutibilidade em ESI(+) FT-ICR MS.....144

**ANEXO 3:** Cálculo da ANOVA para o estudo de repetitividade e reprodutibilidade em ESI(-) FT-ICR MS.....147



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. ....	8
Figura 2. Esquema ilustrativo da resolução em analisadores de massas com (a) resolução unitária e (b) alta resolução. ....	9
Figura 3. Esquema do processo de ionização por ESI .....	11
Figura 4. Esquema do processo de ionização por MALDI. ....	12
Figura 5. Esquema do processo de ionização por EASI. ....	14
Figura 6. Diagrama esquemático de um analisador monoquadrupolar. ....	15
Figura 7. Diagrama esquemático de um analisador TOF. ....	16
Figura 8. Esquema do funcionamento de uma cela de ICR com diagrama do movimento ciclôtrônico de íons, a rotação dos íons ocorre perpendicularmente ao campo magnético B e a cela de ICR. ....	19
Figura 9. Exemplo esquemático de uma molécula de triacilglicerídeo (TAG). ....	26
Figura 10. Esquema simplificado da auto-oxidação. ....	36
Figura 11. Equipamento monoquadrupolo com fonte de EASI MS utilizado para as análises de óleos vegetais. ....	42
Figura 12. Comparativo entre os espectros de massas do óleo de soja, obtido por EASI MS, MALDI-TOF MS e ESI Q-TOF MS. ....	46
Figura 13. Espectros de massas de EASI MS. Os TAG do óleo de soja (a) são obtidos em modo positivo de ionização e AGL do óleo de andiroba (b) são obtidos em modo negativo de ionização. ....	49
Figura 14. Espectros de massas EASI(+) MS de TAG (a) óleo de avelã e (b) azeite de oliva. ....	50
Figura 15. Espectro EASI(+) MS do óleo de soja. ....	51
Figura 16. Espectro EASI(+) MS do azeite de oliva. ....	53
Figura 17. Espectro EASI(+) MS do óleo de canola. ....	54
Figura 18. Espectro EASI(+) MS do óleo de girassol. ....	55

Figura 19. Espectro EASI(+) MS do óleo de milho.....	57
Figura 20. Espectro EASI(+) MS do óleo de semente de uva.....	59
Figura 21. Espectro EASI(+) MS do óleo de avelã.....	60
Figura 22. Espectro EASI(+) MS do óleo de gergelim.....	61
Figura 23. Espectro EASI(+) MS do óleo de linhaça.....	63
Figura 24. Espectro EASI(+) MS do óleo de buriti.....	64
Figura 25. Espectro EASI(+) MS do óleo andiroba.....	65
Figura 26. Espectro EASI(+) MS do óleo de açai.....	66
Figura 27. Espectro EASI(+) MS do óleo de castanha do Brasil.....	68
Figura 28. Espectro EASI(+) MS do óleo de pinhão manso.....	69
Figura 29. Espectro EASI(+) MS do óleo de mamona.....	70
Figura 30. Espectros de EASI(+) MS de amostras de óleo de soja analisadas com diferentes tempos de aquecimento. (a) 0 h, (b) 3 h, (c) 7 h e (d) 13 h. Simulação de Rancimat com oxidação acelerada: as amostras foram aquecidas a 110°C, sob fluxo de ar de 20 L h <sup>-1</sup> .....	72
Figura 31. Monitoramento da oxidação feita por EASI(+) MS para o TAG LLL do óleo de soja.....	74
Figura 32. Espectros de EASI(+) MS de amostras de azeite de oliva analisadas com diferentes tempos de aquecimento. (a) 0 h, (b) 8 h, (c) 15 h e (d) 21 h. Simulação de Rancimat com oxidação acelerada: as amostras foram aquecidas a 110°C e sob fluxo de ar de 20 L h <sup>-1</sup> .....	75
Figura 33. Monitoramento da oxidação feita por EASI(+) MS para o azeite de oliva, (a) curva para o TAG OOO íon de <i>m/z</i> 907 e (b) curva para o TAG POO íon de <i>m/z</i> 881.....	76
Figura 34. Evolução da matéria orgânica durante a sedimentação e soterramento.....	82
Figura 35. Exemplos de S-compostos encontrados em petróleo.....	86
Figura 36. Exemplos de N-compostos encontrados em petróleo.....	87
Figura 37. Exemplos de carbazóis encontrados no petróleo.....	88

Figura 38. Exemplos de O-compostos encontrados em petróleo.....	89
Figura 39. Espectros de massas de uma amostra de petróleo (a) por ESI(+) e (b) por ESI(-).....	93
Figura 40. Comparação entre duas amostra de petróleo por ESI(+). Classes vs intensidade relativa e DBE vs intensidade relativa dentro da classe N .....	95
Figura 41. Comparação entre quatro classes de uma amostra de petróleo por ESI(+) em relação ao número de carbonos .....	95
Figura 42. Comparação entre duas amostra de petróleo por ESI(+). Relação H/C, N/C e O/C para as classes N, NO e NO <sub>2</sub> .....	96
Figura 43. Exemplo de gráfico de Kendrick utilizado em petroleômica. (a) corresponde ao gráfico clássico e (b) corresponde ao gráfico de DBE vs Carbono, mais comumente utilizado. ....	97
Figura 44. Esquema da análise de petróleo por EASI(±) FT-ICR MS .....	102
Figura 45. ESI(±) FT-ICR MS e EASI(±) FT-ICR MS. Modo positivo de ionização (a) e modo negativo de ionização (b) para amostra PD04 de petróleo . ....	104
Figura 46. Expansão do (a) ESI(+) e (b) EASI(+) ilustrando resolução e sinal-ruído similares em ambos os espectros.....	105
Figura 47. Porcentagem das classes majoritárias dos componentes do petróleo obtidas por ESI(+) FT-ICR MS e EASI(+) FT-ICR MS.....	105
Figura 48. Gráfico de Kendrick para classe N dos constituintes polares obtidos a partir dos dados de EASI(+) FT-ICR MS (superior) e ESI(+) FT-ICR MS (inferior) .....	106
Figura 49. Diagrama de van Krevelen (H/C vs N/C) para classe N dos constituintes polares obtidos a partir dos dados de ESI(+) FT-ICR MS (superior) e EASI(+) FT-ICR MS (inferior) .....	107
Figura 50. Espectros de massas de petróleo obtidos por ESI(+) FT-ICR MS. Amostra (a) PD01, amostra (b) PD02, amostra (c) PD03 e amostra (d) PD06. ....	115
Figura 51. Classes das amostras de petróleo obtidas por ESI(+) FT-ICR MS. ....	116
Figura 52. Comparativo das classes N obtidas por ESI(+) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.....	117

Figura 53. Comparativo das classes NO obtidas por ESI(+) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.....	118
Figura 54. Comparativo das classes OS, N2 e NS obtidas por ESI(+) FT-ICR MS nas amostras PD 01 (OS, N2 e NS), PD 02 (OS), PD 06 (N2). .....	119
Figura 55. Espectros de petróleo obtidos por ESI(-) FT-ICR MS. Amostra (a) PD01, amostra (b) PD02, amostra (c) PD03 e amostra (d) PD06.....	120
Figura 56. Classes das amostras de petróleo obtidas por ESI(-) FT-ICR MS. ....	121
Figura 57. Comparativo das classes N obtidas por ESI(-) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.....	122
Figura 58. Comparativo das classes O2 obtidas por ESI(-) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.....	123
Figura 59. Comparativo das classes O e O3 obtidas por ESI(-) FT-ICR MS. A classe O está presente nas amostras PD 02 (a) e PD 03 (b). A classe O3 está presente na amostra PD 03 e PD 06. ....	124
Figura 60. Comparativo das classes NO, NO2, O3S e O4 obtidas por ESI(-) FT-ICR MS. A classe NO está presente nas amostras PD 01 (a) e PD 02 (b). A classe NO2 (c) e O3S (d) estão presentes na amostra PD 01. A classe O4 (e) está presente na amostra PD 03. ....	125

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos em porcentagem da extração dos óleos estudados .....	23
Tabela 2. Principais ácidos graxos de óleos vegetais .....	25
Tabela 3. Valores da literatura para composição média em % de ácidos graxos dos óleos vegetais estudados.....	28
Tabela 4. Composição em % de AG dos óleos vegetais analisados por GC-FID.....	45
Tabela 5. Composição dos principais TAG encontrados em óleos vegetais.....	48
Tabela 6. Valores encontrados de TAG para o óleo de soja.....	52
Tabela 7. Valores encontrados de TAG para o azeite de oliva.....	53
Tabela 8. Valores encontrados de TAG para o óleo de canola.....	55
Tabela 9. Valores encontrados de TAG para o óleo de girassol.....	56
Tabela 10. Valores encontrados de TAG para o óleo de milho.....	58
Tabela 11. Valores encontrados de TAG para o óleo de semente de uva.....	59
Tabela 12. Valores encontrados de TAG para o óleo de avelã.....	60
Tabela 13. Valores encontrados de TAG para o óleo de gergelim.....	62
Tabela 14. Valores encontrados de TAG para o óleo de linhaça .....	63
Tabela 15. Valores encontrados de TAG para o óleo de buriti.....	64
Tabela 16. Valores encontrados de TAG para o óleo de andiroba.....	66
Tabela 17. Valores encontrados de TAG para o óleo de açaí.....	67
Tabela 18. Valores encontrados de TAG para o óleo de castanha do Brasil.....	68
Tabela 19. Valores encontrados de TAG para o óleo de pinhão manso.....	70
Tabela 20. Valores encontrados de TAG para o óleo de mamona.....	71

Tabela 21. Distribuição de N-compostos de caráter ácido (a) e básico (b) encontrados em frações destiladas de quatro amostras de petróleo .....	88
Tabela 22. Resultados de polares em petróleo por ESI(+) FT-ICR MS.....	94
Tabela 23. Resultados de polares em petróleo por ESI(-) FT-ICR MS. ....	94
Tabela 24. Resultados em % para as classes obtidas no estudo de precisão ESI(+) FT-ICR MS.....	108
Tabela 25. Avaliação de dispersos pelo teste de Dixon e Cochran por ESI(+) FT-ICR MS.....	109
Tabela 26. Resumo da ANOVA para os resultados de ESI(+) FT-ICR MS. ....	109
Tabela 27. Resumo dos valores de massa média e DBE para as classes da amostra de petróleo por ESI(+) FT-ICR MS.....	110
Tabela 28. Resultados em % para as classes obtidas no estudo de precisão ESI(-) FT-ICR MS.....	111
Tabela 29. Avaliação de dispersos pelo teste de Dixon e Cochran por ESI(-) FT-ICR MS.....	112
Tabela 30. Resumo da ANOVA para os resultados de ESI(-) FT-ICR MS.....	113
Tabela 31. Resumo dos valores de massa média e DBE para as classes da amostra de petróleo por ESI(-) FT-ICR MS.....	114
Tabela 32. Tabela esquemática para o teste de Dixon. ....	141
Tabela 33. ANOVA de dois fatores para classe N(ESI+).. ....	143
Tabela 34. ANOVA de dois fatores para classe N2(ESI+).. ....	144
Tabela 35. ANOVA de dois fatores para classe NO(ESI+).....	145
Tabela 36. ANOVA de dois fatores para classe N(ESI-).. ....	146
Tabela 37. ANOVA de dois fatores para classe O(ESI-).....	147
Tabela 38. ANOVA de dois fatores para classe O2(ESI-).....	148
Tabela 39. ANOVA de dois fatores para classe NO(ESI-).....	149
Tabela 40. ANOVA de dois fatores para classe NO2(ESI-).....	150

# INTRODUÇÃO GERAL

Neste trabalho foram caracterizadas por espectrometria de massas duas matrizes distintas: óleos vegetais e petróleo, ambas consideradas misturas complexas. Para isso foram utilizadas técnicas de ionização e analisadores de massas compatíveis com o grau de detalhamento desejado.

A motivação do trabalho para óleos vegetais foi buscar uma técnica que além de rápida fosse economicamente viável. A caracterização de óleos vegetais ainda depende do emprego de vários métodos analíticos, com tempos longos de análises, preparo complexo de amostra e gasto de grande volume de solventes orgânicos. A espectrometria de massas vem sendo utilizada para caracterizar óleos vegetais através das técnicas de ionização/dessorção a laser assistida por matriz, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) e *Electrospray* (ESI) sempre com analisadores do tipo tempo de voo, *Time of Flight* (TOF) que possuem uma boa resolução na separação dos compostos, porém apresentam maior custo. A proposta apresentada utiliza ionização ambiente por spray sônico, *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization* (EASI), é uma das primeiras técnicas de ionização ambiente em espectrometria de massas que elimina totalmente o preparo de amostra e se torna economicamente viável para óleos vegetais por produzir excelentes resultados adaptada um analisador monoquadrupolar, considerado simples e barato quando comparado aos outros tipos de analisadores de massas. Além disso, são poucos os trabalhos na literatura que apresentam métodos diretos para a caracterização de hidroperóxidos em óleos vegetais. A proposta apresentada neste trabalho possibilita estudar desde as espécies formadas individualmente até a cinética de reação de formação destes hidroperóxidos que são de grande importância para determinar a qualidade e a estabilidade de um óleo vegetal. Além disso, o perfil de triacilglicerídeos (TAG) pode ser utilizado como *fingerprint* confirmando o tipo do óleo vegetal analisado.

Já a caracterização química dos constituintes polares do petróleo (NSO) é fundamental em várias áreas na cadeia petrolífera que vão da exploração até a obtenção dos produtos refinados. A utilização da ionização por eletrospray com

espectrometria de massas de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* (ESI FT-ICR MS), propõe um método de análise que dispensa uma série de procedimentos e técnicas analíticas mais dispendiosas e que confere à análise de petróleo um alto grau de refinamento e performance. Os dados aqui apresentados são os primeiros estudos brasileiros para caracterização da composição de polares em petróleo e poderão complementar estudos posteriores em “petroleômica”. A metodologia desenvolvida para a caracterização de polares pode ser utilizada não só para petróleo como também para seus derivados como, por exemplo, diesel e gásóleo. A caracterização de polares no petróleo faz parte de um projeto de pesquisa com a gerência de Geoquímica da Petrobras, localizado no Centro de Pesquisas Leopoldo A. Miguez de Melo (CENPES) e que poderá beneficiar também áreas como exploração, produção e refino.

O trabalho foi dividido em três capítulos:

**Capítulo 1:** Espectrometria de Massas Aplicada aos Estudos de Óleos Vegetais e Petróleo.

**Capítulo 2:** Caracterização de Óleos Vegetais por Espectrometria de Massas em Condições Ambiente.

**Capítulo 3:** Caracterização de Petróleo por Espectrometria de Massas de Altíssima Exatidão e Resolução.

A introdução geral e as referências bibliográficas são comuns às três partes deste trabalho. Optou-se por utilizar todas as siglas em inglês para padronizar o conteúdo apresentado.

## OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O principal objetivo deste estudo foi caracterizar de forma rápida e abrangente por espectrometria de massas, óleos vegetais empregando uma técnica de ionização ambiente aliada a um analisador de resolução unitária e petróleo empregando uma técnica de ionização à pressão atmosférica aliada a um analisador de altíssima resolução e exatidão.

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar quimicamente amostras de óleos vegetais através da identificação de triacilglicerídeos e de hidroperóxidos utilizando a técnica de ionização ambiente EASI MS sem preparo de amostra.
- Comparar a técnica de ionização ambiente EASI com ESI para a caracterização de compostos polares no petróleo por FT-ICR MS;
- Caracterizar amostras de petróleo determinando a presença de quantidades relativas de classes e suas séries homólogas (compostos NS, NO, NOS, O<sub>2</sub>, entre outros), provenientes das fórmulas moleculares dos inúmeros compostos polares que poderão ser ordenados também por número de carbonos e índice de insaturação empregando a altíssima resolução e exatidão do FT-ICR MS.



# **-CAPÍTULO 1-**

## *Espectrometria de Massas Aplicada aos Estudos de Óleos Vegetais e Petróleo*



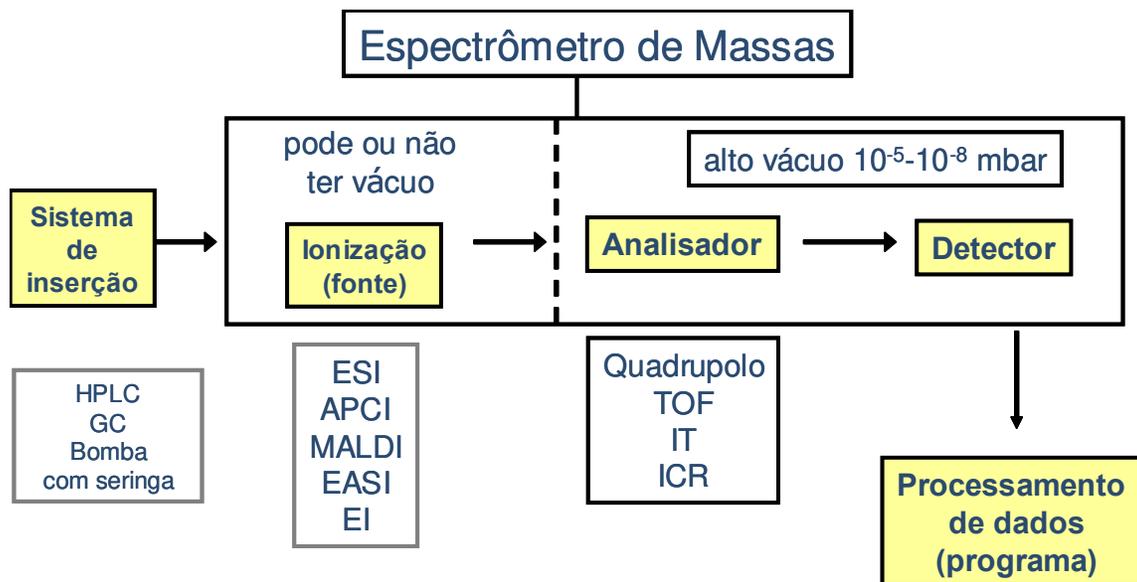
## 1.0- A ESPECTROMETRIA DE MASSAS: CONCEITOS GERAIS

A espectrometria de massas (MS) constitui uma das técnicas instrumentais mais abrangentes da ciência, com amplas aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Isto é devido a recentes avanços em instrumentação e o desenvolvimento de novas técnicas de ionização. Existe há quase um século, entretanto, inicialmente era restrita a análise de gases e substâncias com altas pressões de vapor e termicamente estáveis. Desde então, foram realizadas muitas inovações, como por exemplo, o desenvolvimento dos analisadores quadrupolo (1953), os analisadores ICR (1974) e o acoplamento com cromatografia gasosa (1957)<sup>1</sup>.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite discriminar íons de acordo com a massa-sobre-carga ( $m/z$ ) de cada espécie analisada. O valor da razão  $m/z$ , atribuída a um íon, é um número adimensional, ou seja, a razão  $m/z$  não é uma unidade e sim um adjetivo do íon<sup>2</sup>. Isto é importante ressaltar, pois o que é medido em espectrometria de massas é a razão  $m/z$  e não a massa de um íon em Da (Daltons). Apenas para íons monocarregados a razão  $m/z$  reflete a massa do íon.

Além de discriminar íons, a MS é capaz de contar a quantidade de íons numa determinada razão  $m/z$ . A MS não analisa átomos neutros ou moléculas neutras. Antes de discriminar os íons é necessário, primeiramente, gerá-los utilizando um sistema de ionização ou fonte de íons. Os diferentes tipos de fonte de ionização existentes determinam a aplicabilidade da espectrometria de massas<sup>3</sup>.

A **Figura 1** apresenta um diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. Em geral a análise de um composto compreende cinco etapas: (i) a introdução da amostra, (ii) a ionização das moléculas, (iii) a passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão  $m/z$ , (iv) o detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica e (v) o processador que converte a magnitude do sinal elétrico em função da razão  $m/z$  em dados proporcionando um espectro de massas correspondente<sup>1</sup>.



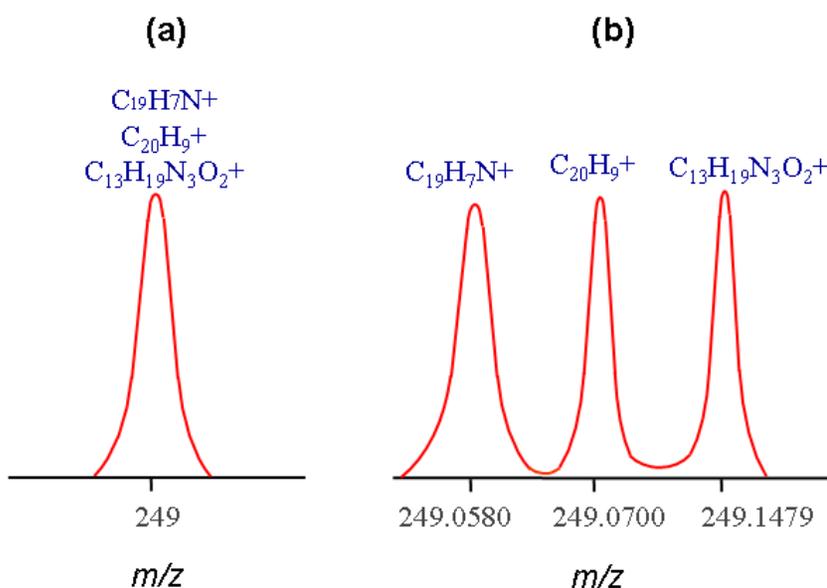
**Figura 1.** Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

A **Figura 1** também mostra que o analisador de massas e o sistema de detecção são mantidos sob alto vácuo, o que não se aplica necessariamente aos sistemas de ionização, pois alguns deles estão à pressão atmosférica, fato que revolucionou a espectrometria de massas. Os sistemas de ionização determinam a versatilidade da MS, pois as fontes de íons são responsáveis pelos tipos de analitos que podem ser determinados. Inúmeros métodos para gerar íons foram desenvolvidos ao longo da história da MS, desse modo há métodos de ionização aplicáveis praticamente a todos os tipos de analitos, tanto para moléculas apolares e voláteis como a ionização por elétrons, *Electron Ionization* (EI) e a ionização química, *Chemical Ionization* (CI), quanto para moléculas polares como ESI que transfere íons em solução para fase gasosa e MALDI a ionização sob vácuo por dessorção de matriz<sup>1</sup>. As técnicas de ionização ambiente como EASI tornaram a introdução da amostra em espectrometria de massas mais simples e prática.

Existem diferentes estratégias para se discriminar os íons, dependendo do analisador de massas, cujo mais comum é o monoquadrupolar que possui resolução unitária. Outros que podem ser citados são os analisadores de aprisionamento de íons, *ion trap* (IT), analisadores por tempo de voo (TOF), ressonância ciclôtrônica de íons

(ICR), todos utilizados neste trabalho. Cada analisador possui diferenças de resolução e exatidão de acordo com sua eletrônica e princípio físico utilizado para discriminar as razões  $m/z$  medidas<sup>1</sup>.

A **Figura 2** mostra a diferença de resolução entre dois analisadores de massas. O analisador de resolução unitária mede a massa nominal (**Figura 2a**), assim o íon de  $m/z$  249 com resolução unitária pode se referir a fórmula molecular  $C_{19}H_7N$ ,  $C_{20}H_9$ , ou  $C_{13}H_{19}N_3O_2$ . Já um analisador de alta resolução mede a massa exata de cada isótopo mais abundante (**Figura 2b**), logo é possível atribuir fórmulas moleculares para cada sinal resolvido de acordo com o seu defeito de massa 249,0580 ( $C_{19}H_7N$ ), 249,0700 ( $C_{20}H_9$ ) e 249,1479 ( $C_{13}H_{19}N_3O_2$ ). Assim, resolução pode ser definida como a capacidade do analisador discriminar  $m/z$  adjacentes. Existem analisadores que possuem resolução que vão de 5000 a 1000000. A exatidão é medida pelo erro calculado em ppm do desvio da medida experimental em relação ao valor de massa teórico, ou seja, indica quão próximo o valor experimental está próximo do valor verdadeiro. A alta exatidão de massa oscila de valores entre 0,1 a 50 ppm de erro. Quando menor o erro maior é a probabilidade de a fórmula molecular atribuída ser a verdadeira.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo da resolução em analisadores de massas com (a) resolução unitária e (b) alta resolução.

## 2.0 TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO UTILIZADAS

### 2.1- Ionização a pressão atmosférica por ESI

Eletrospray (ESI), introduzida por John Fenn e colaboradores, em 1984<sup>4</sup>, é uma técnica de ionização onde três processos de formação de íons ocorrem: oxidação/redução, protonação/desprotonação e a formação de adutos pela coordenação de cátions e ânions como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Os íons formados, portanto, dependem do balanço entre estes três processos, produzindo assim íons moleculares  $\text{M}^{*+}/\text{M}^-$ , moléculas protonadas  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ou desprotonadas  $[\text{M}-\text{H}]^-$  e adutos  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  ou  $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ . A ionização por ESI (**Figura 3**) é realizada sob pressão atmosférica, produzindo íons gasosos a partir de uma solução de amostra inserida através de um capilar, ao qual um potencial elétrico é aplicado (2-4 kV). ESI é um método de dessorção de íons em solução para a fase gasosa. Este processo pode ser dividido em três etapas principais: (i) a nebulização da solução de amostra em gotículas carregadas produzidas pela aplicação direta de voltagem no capilar, (ii) a liberação dos íons a partir das gotículas e (iii) transporte dos íons da região de pressão atmosférica da fonte para a região de alto vácuo do analisador<sup>5</sup>.

Para explicar a liberação dos íons a partir das gotículas carregadas, existem duas propostas, o modelo de cargas residuais, *charged residue model* (CRM) e o modelo da evaporação dos íons, *ion evaporation model* (IEM). O CRM propõe que as gotículas carregadas saem da ponta do capilar num spray de formato cônico (cone de Taylor) e com o auxílio de um fluxo de gás aquecido ( $\text{N}_2$ ). Essas gotículas carregadas com várias unidades de carga sofrem a evaporação do solvente, tendo seu tamanho reduzido e conseqüentemente um aumento da densidade de carga, tornando a repulsão entre as cargas maior que a tensão superficial. Este efeito faz com que as gotículas se desintegram em gotículas ainda menores e o mesmo processo pode ser repetido até que o solvente seja evaporado por completo, restando apenas os íons da amostra<sup>5,6</sup>.

O IEM propõe que esse aumento da densidade superficial de carga devido à evaporação do solvente cria um campo superficial que supera as forças de solvatação dos íons antes de exceder a tensão superficial do solvente, causando a ejeção do íon

antes da explosão coulômbica. Estes mecanismos favorecem a formação de íons multiplamente carregados, característica que pode ser utilizada na determinação de macromoléculas<sup>5,6</sup>.

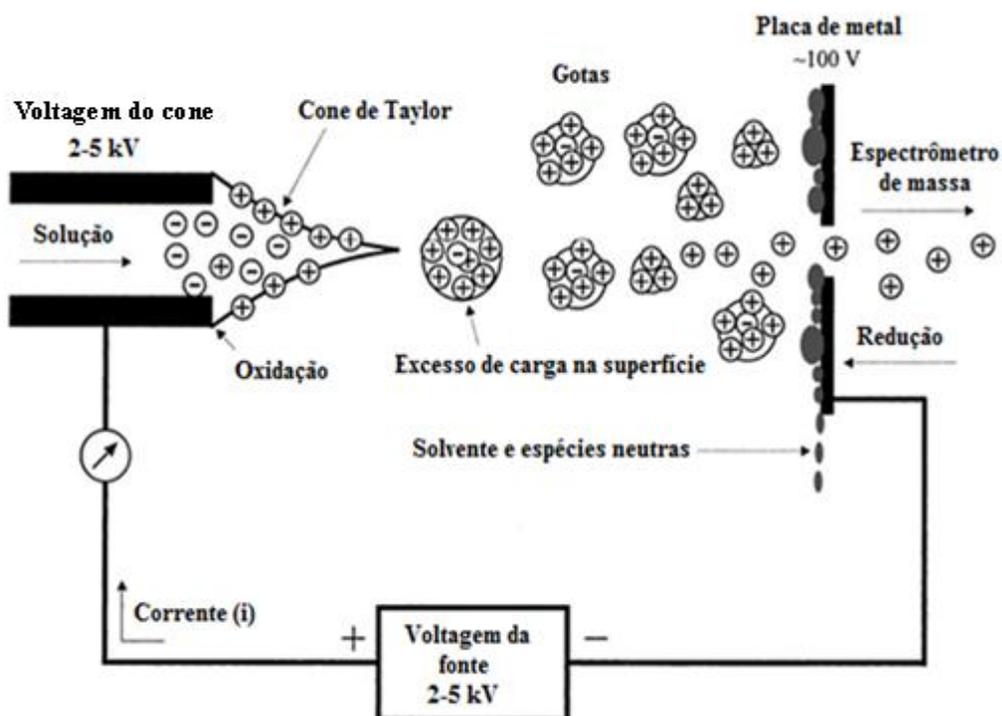
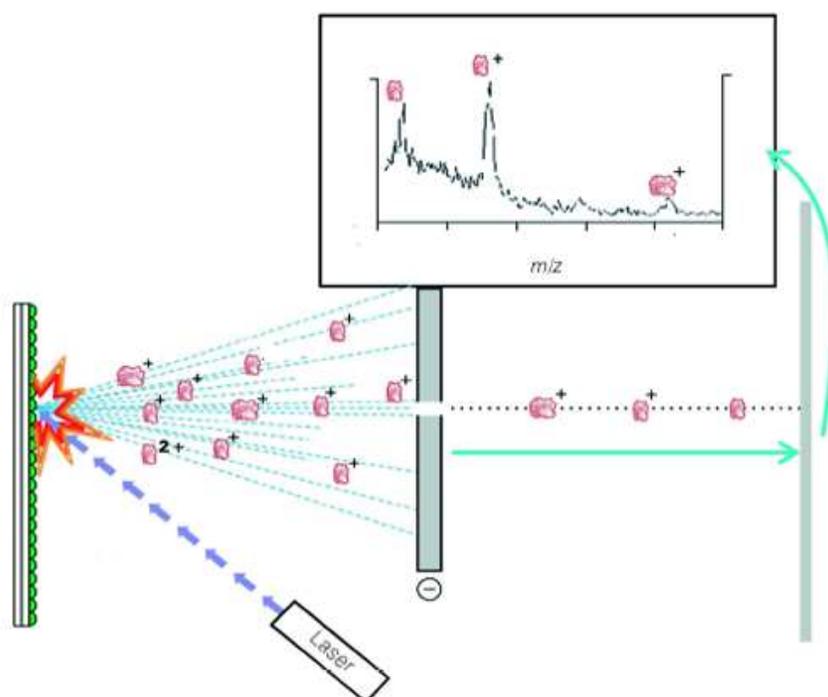


Figura 3. Esquema do processo de ionização por ESI<sup>5</sup>.

## 2.2- Ionização sob vácuo por MALDI

A técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz, usualmente chamada de MALDI foi descrita por Karas et al., em 1985<sup>7</sup>. Nesta técnica, a amostra contendo a espécie de interesse e uma matriz (composto necessário para a ionização da amostra) são solubilizadas em solvente orgânico e/ou água e uma pequena quantidade de cada solução (normalmente 1  $\mu$ L) é depositada sobre uma placa. Com a evaporação do solvente, a matriz cristaliza e as moléculas da amostra se encontram

inclusas nestes cristais. A matriz utilizada (geralmente ácidos orgânicos aromáticos) deve absorver no comprimento de onda utilizado no experimento. Deste modo, um pulso de laser, com comprimento de onda na região do ultravioleta, incide sobre essa mistura e a energia do laser é absorvida pela matriz, o que promove a sua sublimação. As moléculas do analito, que estavam inclusas na matriz, são arrastadas para a fase gasosa e a formação dos íons ocorre através da transferência de carga (transferência de prótons) das moléculas da matriz para o composto analisado que é detectado na forma protonada  $[M+H]^+$ , como mostra a **Figura 4**. Observações similares são feitas para íons quasi-moleculares gerados por coordenação com metais, como por exemplo, os adutos do tipo  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+Li]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  e  $[M+Cl]^-$ . Na maioria dos casos, se formam espécies monocarregadas<sup>8</sup>.



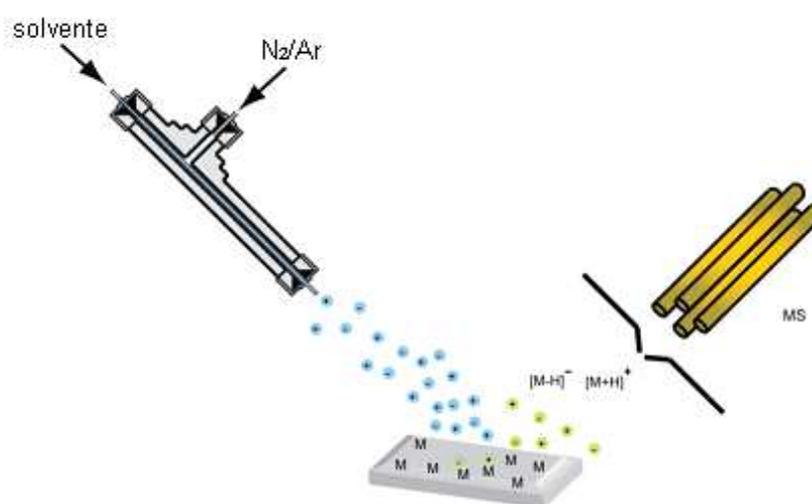
**Figura 4.** Esquema do processo de ionização por MALDI<sup>9</sup>.

## 2.3- Ionização em condições ambiente por EASI MS

Na última década um avanço ainda mais significativo em MS ocorreu com a introdução de técnicas de ionização que permitem a dessorção e ionização de moléculas diretamente da superfície de sua matriz original no ambiente<sup>10,11</sup>. Entre estas técnicas destaca-se a ionização/dessorção por eletrospray, *Desorption Electrospray Ionization* (DESI)<sup>12</sup>, a análise direta em tempo real, *Direct Analysis in Real Time* (DART)<sup>13</sup>, a probe de análise de sólidos a pressão atmosférica, *Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe* (ASAP)<sup>14</sup> e a ionização por eletrospray com dessorção a laser assistida por matriz, *Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization* (MALDESI)<sup>15</sup>. No Brasil, Eberlin e colaboradores<sup>16</sup> estabeleceram a técnica de ionização ambiente por spray sônico, *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization* (EASI), primeiramente denominada de ionização/dessorção por spray sônico, *Desorption Sonic Spray Ionization* (DeSSI) e seu acoplamento com interface de membrana, *Membrane Introduction Mass Spectrometry* (MIMS)<sup>17</sup> e com cromatografia em camada delgada, *Thin-Layer Chromatography* (TLC)<sup>18</sup>.

Na técnica de ionização por EASI a fonte é de fácil fabricação podendo ser utilizada com qualquer analisador de massas. O mecanismo de ionização é baseado em *Sonic Spray Ionization* (SSI)<sup>19,20</sup> sem utilização de qualquer radiação, voltagem ou mesmo temperatura, como na maioria das técnicas de ionização conhecidas<sup>4,21,22</sup>. A hipótese que melhor explica o fenômeno de ionização por EASI está baseada na possibilidade de gotas carregadas, com desequilíbrio entre as cargas positivas e negativas serem formadas no spray sônico (**Figura 5**). O bombeamento de um solvente polar, através de um capilar de sílica fundida (d.i. 100  $\mu\text{m}$ ) com vazão de 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  junto com vazão do gás de arraste ( $\sim 3 \text{ L min}^{-1}$ ), promove um cisalhamento intenso com a liberação no spray de microgotículas. Estas microgotículas têm uma capacidade bem limitada de acomodar carga e assim apresentam baixa densidade de cargas com a probabilidade estatística de ocorrer um desequilíbrio tanto a favor das cargas positivas quanto das cargas negativas. Ao entrar em contato com a amostra, estas microgotículas dessorvem moléculas do analito que estão na superfície<sup>23</sup>. A evaporação

do solvente é favorecida pela energia térmica do ambiente e por auxílio do gás do spray que age como secante. Após a dessorção, o processo é semelhante à ESI, assim conforme a gota perde solvente, a densidade de cargas aumenta até um ponto que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e os íons são ejetados da gota<sup>5</sup>. Depois de formados, os íons agora dessolvatados e na fase gasosa alcançam o orifício (da ordem de poucos micrometros) do cone de amostragem (*skimmer*). Um campo elétrico na entrada do cone é responsável por atrair os íons formados, assim os íons são guiados ao analisador de massas<sup>24</sup>.



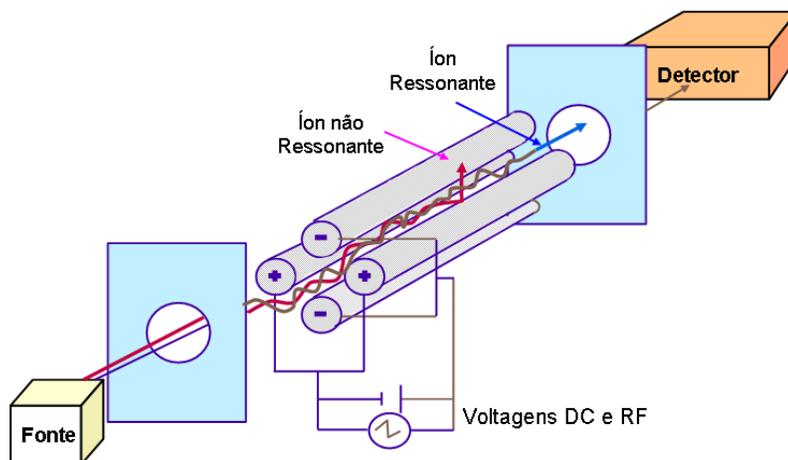
**Figura 5.** Esquema do processo de ionização por EASI<sup>23</sup>.

A composição do solvente no spray, a superfície de ionização, a pressão do gás de nebulização e a polaridade do solvente são parâmetros importantes no desenvolvimento de um método EASI MS. Estas variáveis podem afetar a estabilidade do sinal. Uma variedade de superfícies tem sido empregada incluindo papel de envelope, placas de cromatografia em camada delgada e vidro. Normalmente são utilizados como solvente o metanol e a acetonitrila, puros ou com água na proporção 9:1, com ou sem aditivos (ácido fórmico e hidróxido de amônio). Emprega-se N<sub>2</sub> como gás nebulizador ou ar comprimido com pressão a 7 bar ou 100 psi<sup>23</sup>.

### 3.0- ANALISADORES UTILIZADOS

#### 3.1- Analisador monoquadrupolar

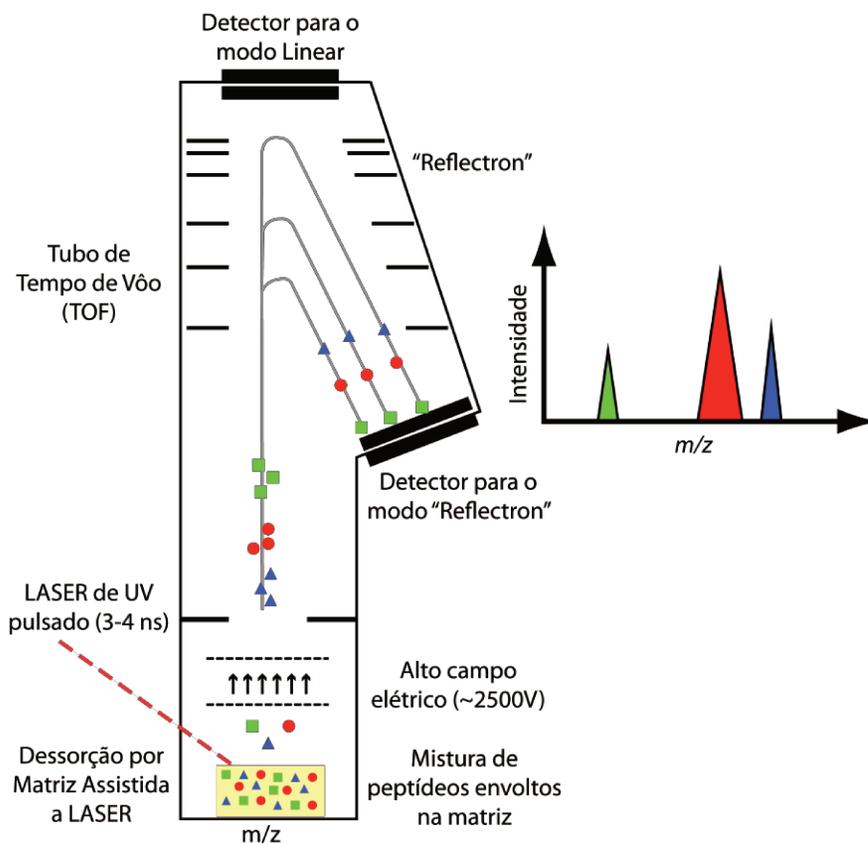
No analisador monoquadrupolar os íons são separados por sua estabilidade de trajetória em um campo criado por oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos<sup>25</sup>. A **Figura 6** mostra esse analisador que consiste de quatro cilindros metálicos paralelos nos quais uma corrente elétrica do tipo contínua, *direct current* (DC) e um potencial de rádio frequência (RF) são aplicados alternadamente. Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados no centro da região entre os quatros cilindros e atravessam axialmente o quadrupolo. Suas trajetórias serão dependentes do campo elétrico produzido onde apenas íons de uma razão  $m/z$  específica terão uma trajetória estável e chegarão ao detector. A RF é variada para que íons de diferentes razões  $m/z$  obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim um espectro de massas<sup>26</sup>. O analisador monoquadrupolar é uma alternativa robusta e de baixo custo para a caracterização de óleos vegetais e hidroperóxidos. Apesar da resolução unitária e de não permitir fragmentação, fornece espectros com informação de alta qualidade e fácil interpretação para análises de rotina em óleos vegetais.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de um analisador monoquadrupolar.

### 3.2- Analisador TOF

O analisador por tempo de voo (TOF) foi desenvolvido por William Stephens em 1946<sup>27</sup>, mas só foi comercializado após 1955. Todos os íons que entram no TOF recebem um pulso de energia igual (pulso de extração), mas são acelerados de maneiras diferentes devido à sua razão  $m/z$  e chegam ao detector em tempos diferentes, os íons mais leves chegam mais rapidamente ao detector do que os mais pesados (**Figura 7**). Desta forma, pela medida do tempo de voo dos íons no tubo, pode-se deduzir sua razão  $m/z$ , podendo analisar compostos de massa baixa até macromoléculas. Em teoria, os analisadores TOF, não tem limite máximo de massa. Portanto são especialmente adequados para acoplar com técnicas suaves de ionização como ESI e MALDI, que podem ionizar macromoléculas sem induzir fragmentação.



**Figura 7.** Diagrama esquemático de um analisador TOF.

Estes analisadores também têm alta taxa de transmissão de íons, fazendo com que tenham alta sensibilidade. Se os íons são formados de forma pulsada (como no MALDI), o pulso de extração do TOF pode ser coordenado com a fonte de ionização e todos os íons formados podem ser detectados. Atualmente, os analisadores TOF são instrumentos de alta resolução, com erro de até 5 ppm e alta sensibilidade. O analisador TOF pode operar em modo linear e reflectron. O modo linear é utilizado para moléculas de massa molecular elevada, como as proteínas, peptídeos e polímeros e o modo reflectron para moléculas de massa de até aproximadamente 5000 Da, como é o caso dos TAG (~1000 Da). O emprego do reflectron promove o aumento de resolução<sup>1</sup>.

### **3.3- Espectrometria de massas de alta exatidão e resolução com analisador híbrido (LIT-ICR)**

O analisador de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR ou simplesmente FT-MS) é considerado até o momento o tipo mais complexo em espectrometria de massas. O FT-ICR utilizado na caracterização de petróleo é um analisador híbrido que pode apresentar na sua configuração, por exemplo, um *ion trap* linear, *Linear Ion Trap* (LIT) e uma cela de ICR que une alta sensibilidade do *ion trap* com altíssima resolução do ICR<sup>28</sup>.

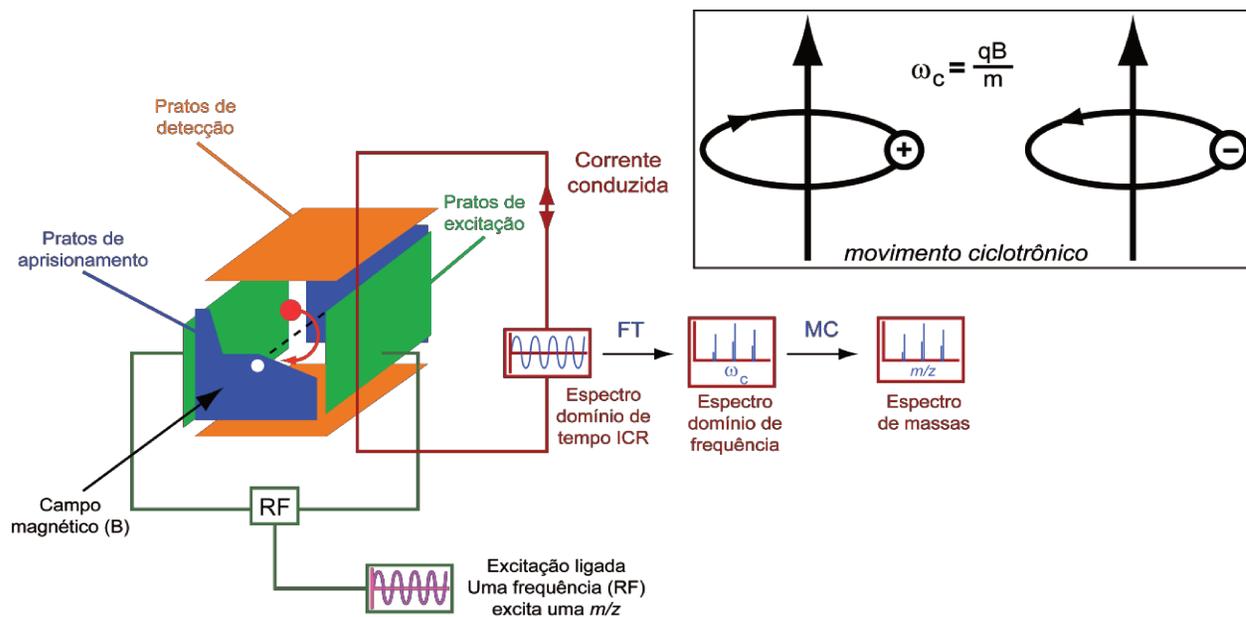
O LIT é um analisador de massas que faz uso da estrutura básica de um quadrupolo, ou seja, um arranjo de quatro cilindros metálicos, no entanto, em vez de filtrar íons de todas as razões  $m/z$ , ele é utilizado para aprisionar os íons e fazer ejeção radial para o analisador ICR<sup>28</sup>.

O ICR analisa a razão  $m/z$  dos íons a partir da frequência ciclôtrica que estes adquirem na presença de campo magnético espacialmente uniforme. Essa frequência é inversamente proporcional a razão massa-sobre-carga. Os íons gerados por uma fonte de ionização (por exemplo, ESI), são ejetados e aprisionados dentro da cela de ICR (**Figura 8**), esta também designada por *penning trap* (*trap* na presença de um campo

magnético). Cada íon adquire uma frequência de oscilação dependente da sua  $m/z$ , entretanto a posição espacial dentro da cela para uma mesma  $m/z$  pode diferir. Logo, o sinal dos íons só é detectável se os mesmos apresentarem um movimento sincronizado (em fase). Com o intuito de obter essa sincronia, aplica-se um campo elétrico (RF) ressonante à faixa de  $m/z$  desejável e espacialmente uniforme. O registro da frequência dos íons em movimento ciclotrônico é resultante, portanto, da corrente induzida pelos íons ao se aproximar dos dois eletrodos condutores opostos paralelamente criando um espectro de frequência em domínio de tempo. O espectro em domínio de frequência é obtido pela transformada de Fourier do espectro de frequência no domínio de tempo. Em seguida, após uma simples conversão matemática, este é transformado em domínio de razão massa-sobre-carga gerando assim o espectro de massa correspondente<sup>29</sup>.

O controle do número de íons dentro da cela de ICR é essencial para a obtenção de valores ótimos de resolução, exatidão e relação sinal-ruído. O efeito *space charge* altera o movimento dos íons dentro da cela de ICR podendo aumentar o tamanho do pacote de íons dentro da mesma, produzindo uma maior dispersão dos íons, diminuindo assim a resolução. Do mesmo modo a alta densidade de carga na cela de ICR provoca fenômenos de coalescência que é a rápida diminuição do sinal de transiente<sup>30</sup>. A altíssima resolução é obtida quando o sinal do transiente é coletado por períodos relativamente longos que precisam ser controlados a fim de evitar perdas de resolução.

O principal parâmetro a ser controlado na cela de ICR é a quantidade de íons dentro deste analisador, mantendo um valor ótimo usualmente menor que 10000000 (para celas de 1 cm de diâmetro), assegurando que as interações espaciais de cargas sejam minimizadas, permitindo a esse analisador medir  $m/z$  com um alto valor de resolução e exatidão<sup>29</sup>, visto que, por exemplo, um íon de  $m/z$  100 percorre 30 km em 1 segundo na presença de um campo magnético de 3 tesla, o que evidencia o motivo pelo qual o ICR fornece sinais com as características já mencionadas, já que a frequência ciclotrônica de qualquer íon é coletada em milhares de ciclos em poucos segundos fornecendo valores  $m/z$  com alta relação sinal/ruído.



**Figura 8.** Esquema do funcionamento de uma cela de ICR com diagrama do movimento ciclotrônico de íons, a rotação dos íons ocorre perpendicularmente ao campo magnético B e a cela de ICR.



# **-CAPÍTULO 2-**

## *Caracterização de Óleos Vegetais por Espectrometria de Massas em Condições Ambiente*



## 1.0-ÓLEOS VEGETAIS: COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE

O óleo vegetal é uma matéria graxa extraída de plantas, formado por aproximadamente 95-98% de TAG, além de vários componentes minoritários tais como esteróis, tocoferóis, fosfolipídeos, ácidos graxos livres (AGL), monoacilglicerídeos (MAG) e diacilglicerídeos DAG<sup>31</sup>. Os TAG são ésteres de glicerina, mistos de ácidos graxos insaturados ou saturados de cadeia longa, contendo um número par de carbonos<sup>32</sup>. Os óleos vegetais são utilizados principalmente na indústria de alimentos e também como lubrificantes<sup>33</sup>, cosméticos<sup>34</sup>, em produtos farmacêuticos<sup>35</sup> e na produção de combustível como o biodiesel<sup>36,37</sup>.

Apesar de outras partes da planta também serem utilizadas na extração de óleo, na prática este é extraído na sua maioria (quase exclusivamente) das sementes. O Brasil possui uma enorme diversidade de espécies vegetais oleaginosas das quais se podem extrair uma grande quantidade de óleos, como por exemplo, a soja. Já os óleos como oliva e palma são obtidos do endosperma do fruto<sup>38</sup>. Existem três processos para a obtenção dos óleos vegetais: (i) prensagem a frio; (ii) prensagem à quente seguida da prensagem a frio (iii) e extração com a utilização de solventes orgânicos<sup>39</sup>.

A composição em porcentagem de rendimento do óleo extraído para cada espécie de oleaginosa estudada é mostrada na **Tabela 1**, considerando na sua maioria extração por solvente orgânico do fruto ou semente.

**Tabela 1.** Rendimento em porcentagem da extração dos óleos estudados<sup>38</sup>.

Óleo	Redimento (%)	Óleo	Redimento (%)	Óleo	Redimento (%)
soja	18-25	uva	45-50	andiroba	55-60
oliva <sup>a</sup>	22-25	avelã	57-62	açaí <sup>b</sup>	50-53
canola	40-45	gergelim	49-60	cast. do Brasil	65-69
girassol	42-47	linhaça	40-45	pinhão manso	50-52
milho <sup>c</sup>	10-15	buriti	45-58	mamona	45-55

<sup>a</sup> Azeite extraído por prensagem a frio;

<sup>b</sup> Óleo extraído da polpa;

<sup>c</sup> Óleo extraído do germen.

## 1.1- Ácidos graxos

Os ácidos graxos são compostos monocarboxílicos alifáticos formados por cadeias de átomos de carbono ligados a hidrogênio presentes nos óleos vegetais e gorduras animais. Podem ser classificados de acordo com o tamanho da cadeia carbônica (curta, média, longa) ou com o tipo de ligação da cadeia carbônica (saturados, mono e poliinsaturados) <sup>40</sup>.

Os ácidos graxos saturados são encontrados em óleos e gorduras animais, com a exceção para o óleo de côco, de origem vegetal que também é rico em ácidos graxos saturados. Já os ácidos graxos insaturados são comuns em produtos de origem vegetal, exceto os óleos de peixe, também ricos em ácidos graxos insaturados e de origem animal. Podem conter uma ou mais ligações duplas na cadeia e pela posição dos hidrogênios na sua estrutura são chamados de *cis* ou *trans*, quando as duplas ligações estão no mesmo lado do plano são chamados de *cis*, se estão em lados opostos são chamados de *trans*. Os ácidos graxos com uma única dupla ligação são conhecidos como monoinsaturados, *monounsaturated fatty acid* (MUFA) e com duas ou mais ligações duplas são denominados poliinsaturados, *polyunsaturated fatty acid* (PUFA)<sup>41</sup>.

Os ácidos graxos essenciais PUFA não são sintetizados pelas células do organismo humano, portanto, devem ser adquiridos através da alimentação. Atualmente, nas áreas de nutrição e bioquímica, verifica-se uma tendência em agrupar os PUFA em famílias conhecidas como  $\omega$  (ômega). Sua representação costuma ser baseada no número de carbonos, número de duplas ligações e na posição que a primeira dupla ligação ocupa na sua estrutura a partir do grupo terminal metila, 18:3n6 ou 18:3 $\omega$ 6. Os ácidos oléico, linoléico e linolênico são referidos como as séries  $\omega$ 9,  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3. Se por um lado o ácido graxo ômega 3 é encontrado principalmente nos óleos de peixe e em pequenas quantidades em óleos vegetais, por outro, o ácido graxo ômega 6 é encontrado preferencialmente nos óleos vegetais (girassol, milho, soja, canola e algodão) <sup>41</sup>.

Os ácidos graxos mais abundantes na natureza são formados por 16 ou 18 átomos de carbono <sup>40</sup>. Na **Tabela 2** estão descritos os principais ácidos graxos dos óleos vegetais de C4 a C24.

**Tabela 2.** Principais ácidos graxos de óleos vegetais <sup>40</sup>.

<b>Ácido</b>	<b>Representação</b>	<b>símbolo</b>
Butírico	C4:0	B
Capróico	C6:0	Co
Caprílico	C8:0	Cy
Cáprico	C10:0	C
Láurico	C12:0	La
Mirístico	C14:0	M
Palmítico	C16:0	P
Cis-7-hexadecanóico	C16:1 <i>cis</i> 7	Hx
Palmitoléico	C16:1 <i>cis</i> 9	Po
Esteárico	C18:0	S
Oléico ( $\omega$ 9)	C18:1 <i>cis</i> 9	O
Vacênico	C18:1 <i>cis</i> 11	V
Estercúlico	<i>cis,cis</i> - $\Delta^9,\Delta^{10d}$ C18:2	St
Ricinoléico	12-OH-C18:1 <i>cis</i> 9	R
Linoléico ( $\omega$ 6)	18:2 <i>cis</i> 9 e <i>cis</i> 12	L
Linolênico ( $\omega$ 3)	18:3 <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12 e <i>cis</i> 15	Ln
Araquídico	20:0	A
Gadoléico	C20:1 <i>cis</i> 9	Ga
Behênico	22:0	Be
Erúcido	C22:1 <i>cis</i> 13	Er
Lignocérico	24:0	Lg

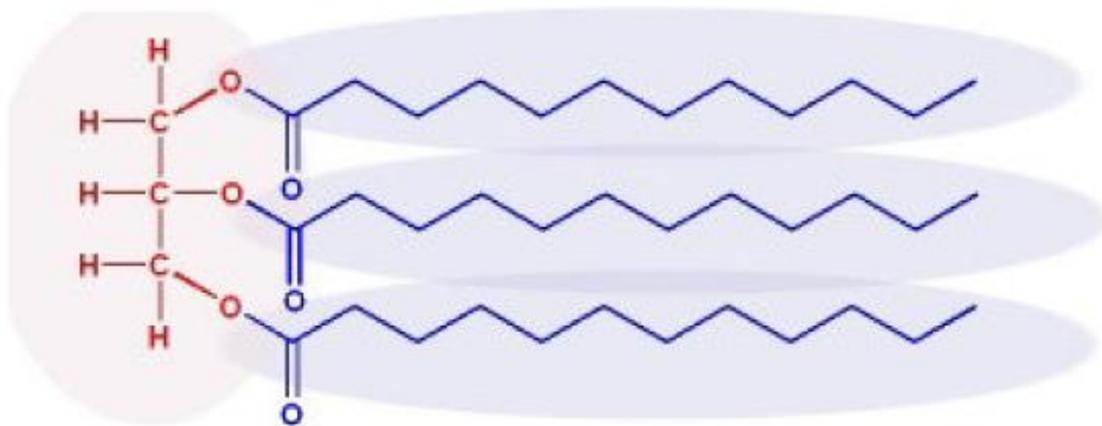
A estrutura de um ácido graxo pode ser indicada mediante uma notação simplificada, na qual se escreve o número de átomos de carbono seguido de dois

<sup>d</sup> *cis/trans*-Delta-x ou *cis/trans*- $\Delta^x$ : forma de descrever onde as ligações duplas se encontram na molécula, No caso de haver mais de uma ligação, a notação fica, por exemplo, *cis,cis*- $\Delta^9,\Delta^{10}$ .

pontos e depois um número que indica quantas ligações duplas estão presentes na molécula, como por exemplo, o ácido linoléico que é representado por **C18:2** <sup>41</sup> .

## 1.2-Triacilglicerídeos

TAG é uma denominação genérica para qualquer tri-éster formado pela união de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol, cujas três hidroxilas ligam-se aos radicais carboxílicos dos ácidos graxos (**Figura 9**). Quando apenas uma ou duas hidroxilas são esterificadas com ácidos graxos tem-se, respectivamente um MAG e DAG. Os MAG, DAG e AGL são encontrados na natureza em quantidades menores que os TAG <sup>42</sup>.



**Figura 9.** Exemplo esquemático de uma molécula de triacilglicerídeo (TAG).

Os TAG que contêm uma única espécie de ácido graxo ligado ao glicerol são chamados TAG simples, como por exemplo, o tripalmitato de glicerila ou tripalmitina, simbolizado pela sigla PPP e representa um TAG formado pela presença de três moléculas de ácido palmítico. Os TAG mistos contêm dois ou mais ácidos graxos diferentes como, por exemplo, o 1- palmitato-3-esterato-2-oleato de glicerila (PSO). Tradicionalmente identifica-se um TAG mencionando primeiro os ácidos graxos

saturados no sentido do aumento do comprimento da cadeia carbônica e posteriormente, os ácidos graxos insaturados também no sentido do aumento do comprimento da cadeia. As regras de nomenclatura levam em conta o fato de muitos TAG presentes em óleos vegetais, apresentarem seu ácido graxo mais insaturado ligado no segundo átomo de carbono. Assim, um TAG formado pelo ácido esteárico (saturado), oléico (monoinsaturado) e linoléico (diinsaturado) é simbolizado por SLO, ou seja, 1-estearato-2-linoleato-3-oleato de glicerila. Da mesma maneira os DAG são nomeados. Os TAG contendo um total de 54 átomos de carbono são predominantes na natureza e simbolicamente representados por C54 ou T54. A trioleína (OOO) é um exemplo destes <sup>42</sup>.

### **1.3- Origem e composição teórica em ácidos graxos de alguns óleos vegetais**

Os dados apresentados na **Tabela 3**, mostram valores da literatura de ácidos graxos dos óleos vegetais, realizados por cromatografia gasosa com ionização de chama segundo as recomendações da *Food and Agricultural Organization Codex Alimentarius Committee on Fat and Oils* <sup>43</sup>. São apresentados apenas os óleos deste estudo para que se conheçam os valores de composição média relatados na literatura que servirão de apoio na discussão dos resultados.

#### **1.3.1- Óleo de soja**

A soja (*Glicine max*) é uma planta leguminosa originária da China e do Japão, conhecida há mais de cinco mil anos. Foi introduzida na Europa no século XVIII. No Brasil sua introdução data do final do século XIX, no estado da Bahia. O maior produtor de soja do mundo são os Estados Unidos (32%), seguido do Brasil (28%), Argentina (21%) e China (7%). O óleo de soja é o mais consumido mundialmente <sup>44</sup>.

**Tabela 3.** Valores da literatura para composição média em % de ácidos graxos dos óleos vegetais estudados.

Simbolo <sup>e</sup>	Represent. <sup>f</sup>	soja	oliva	canola	girassol	milho	uva	avelã	gergelim	linhaça	buriti	andiroba	açaí	castanha do Brasil	pinhão manso	mamona
La	12:0				0,5	0,3	0,5						0,1			
M	14:0	0,1	0,1		0,2	0,3	0,3		0,1		0,1		0,2	0,4	1,4	
P	16:0	11,0	13,7	3,9	6,8	15,7	11,0	4,7	10,0	6,4	21,3	27,6	27,0	16,0	8,4	1,4
Po	16:1	0,10	3,5	0,2	0,1		1,1	0,3	0,2	0,5	0,2	1,0	5,0	0,3	0,9	
S	18:0	4,0	5,0	1,9	4,7	3,3	6,0	3,7	6,2	4,0	2,1	8,3	1,8	9,2	8,0	1,2
O	18:1	23,4	55,0	64,1	18,6	35,2	21,0	79,0	31,2	17,0	73,0	51,0	56,0	29,0	42,0	4,7
R	12OH 18:1															83,1
L	18:2	53,4	21,0	18,7	68,2	41,7	58,0	12,0	50,0	15,0	1,4	10,0	9,0	44,0	38,0	6,2
Ln	18:3	7,5	1,0	9,2	0,5	1,5	1,0	0,1	0,7	57,0	1,0	0,3	0,8	0,8	0,2	0,6
A	20:0	0,30	0,5	0,6	0,4	0,7	1,0		0,7	0,1	0,2	1,2	0,1	0,3	0,2	2,0
Ga	20:1			1,0		0,4			0,3		0,7	0,1			0,1	0,8
Er	20:2							0,2								
Be	22:0	0,10		0,2		0,5						0,5			0,7	
Lg	24:0		0,2	0,2		0,4	0,1		0,3						0,1	

Fonte: Firestone, 2006.

<sup>e</sup> Símbolo do ácido graxo;

<sup>f</sup> Representação correspondente ao número de carbonos e o número de insaturações dos ácidos graxos, sem considerar a nomenclatura *cis/trans* e a posição da dupla.

No Brasil temos vários incentivos para a produção e comercialização do óleo de soja, que pode ser produzido como: bruto, degomado e refinado. O óleo de soja refinado é levemente amarelado, límpido, com odor e sabor suave característico. Tem uma utilização alimentícia bastante diversificada como óleo de cozinha, produção de margarinas, gordura vegetal, maionese, entre outras. A vantagem do óleo de soja em relação a outros óleos é seu baixo preço de comercialização <sup>45</sup>.

### 1.3.2- Azeite de oliva

A oliva (*Olea europaea* L) também conhecida como azeitona no Brasil é o fruto da oliveira <sup>46</sup>. O cultivo de oliveiras se remonta há seis mil anos, muito embora desde a pré-história já existissem oliveiras selvagens. Atualmente, a Espanha é o produtor líder mundial de azeite<sup>9</sup> de oliva exportando para mais de 100 países. Os olivais cobrem vastas áreas da região mediterrânea, particularmente a Espanha, que conta com uma longa tradição na elaboração do azeite de oliva. Cada oliveira gera em torno de 15 a 50 quilos de azeitona. Após 24 horas de colhidas, as azeitonas são levadas para a trituradora. Nessa fase, se produz uma pasta da fruta inteira, inclusive o caroço. Geralmente, esse processo é realizado em trituradoras de pedra de granito. A pasta é estendida em cestos, que são empilhados e colocados em prensas. A prensa aplica forte pressão e à medida que o faz, a pasta se transforma numa mistura composta por água e azeite. Na etapa seguinte o azeite fica repousando e a água é retirada. O azeite é classificado segundo seu processo de produção em extra-virgem, virgem e óleo refinado <sup>47</sup>:

- a) Azeite extra-virgem é aquele cuja acidez não pode passar de 0,8% (em ácido oléico);
- b) Azeite de oliveira virgem que apresenta acidez máxima de 2%;
- c) Óleo de oliva refinado, produzido pelo refino do azeite virgem e que apresenta acidez alta com valores acima de 2%.

---

<sup>9</sup> O azeite é a única matéria graxa vegetal comercial que não é extraído por solventes químicos e não sofre o processo de refino, se for refinado é chamado de óleo de oliva.

### 1.3.3- Óleo de canola

A canola (abreviação do inglês para **Canadian oil low-acid seed** ou *Canadian oil*) é o nome dado para uma variedade de colza (*Brassica napus* L ou *Brassica campestris* L) que devido a manipulação genética, apresenta baixa quantidade de ácido erúxico e glucosinolatos. O ácido erúxico é um ácido graxo que causa problemas em ratos de laboratório e os glucosinolatos são substâncias que dificultam o processo de hidrogenação do óleo de colza <sup>48</sup>. Embora ainda pouco semeada no Brasil, mundialmente é a terceira planta oleaginosa mais produzida e seu maior consumo ocorre nos países mais desenvolvidos. Os principais produtores são a União Européia, o Canadá, os Estados Unidos da América, a Austrália, a China e a Índia. Na Índia, ocupa até 13% do solo cultivável. Atualmente o óleo de canola é muito consumido no Canadá, onde ocupa 80% do mercado de óleos para salada e supre 25% do mercado mundial. O rendimento da semente em óleo gira em torno de 40 a 45%, apresenta cor amarelada com odor e sabor suave <sup>43</sup>.

### 1.3.4- Óleo de girassol

O óleo de girassol é obtido das sementes de *Helianthus annuus* L, do grego *Hélios* (para sol), e *Anthus* (para flor), é a mais pura tradução de uma flor que gira procurando o sol a todo instante. Planta que alcança mais de 2 metros de altura e com espécies de flores de várias tonalidades de cores. O girassol é originário da América, entre o México e o Peru, e atualmente os principais produtores mundiais são a Rússia, Argentina, Estados Unidos e China. A semente de girassol tem um rendimento médio de 47% de um óleo límpido, de cor amarelo claro, com odor e sabor suave. O óleo de girassol é uma fonte importante do ácido linoléico e de vitamina E. Pode ser utilizado em molhos para saladas, no preparo de maioneses e frituras <sup>43</sup>.

### 1.3.5- Óleo de milho

O óleo de milho (*Zea mays* L) é extraído do germe do milho por prensagem e apresenta rendimento máximo de 15%. Possui cor amarelo claro, odor e sabor suave. O milho é um cereal rico em amido e proteínas, originário das Américas e com uma tradição de cultivo de pelo menos cinco mil anos. A maior utilização do milho é para alimentação animal, consumindo cerca de 70% da produção mundial <sup>49</sup>. O óleo de milho contém 968 mg de fitosteróis<sup>h</sup> por 100 gramas de óleo, um dos mais altos níveis de fitosterol encontrado em um óleo vegetal refinado. Apenas o óleo de farelo de arroz tem um teor tão alto (1190 mg/100 gramas) <sup>50</sup>.

### 1.3.6- Óleo de semente de uva

A videira ou parreira é uma planta de clima temperado, típica do sul da Europa a oeste da Ásia. Ela é muito cultivada em todas as regiões temperadas do mundo. No Brasil é mais cultivada na região Sul produzindo a uva. As sementes de *Vitis vinifera* L, eram no passado um subproduto de pouca utilidade na indústria de vinho, hoje é extraído o óleo da semente de uva, utilizando solventes orgânicos. O óleo pode ser obtido por prensagem a frio, apesar desta extração ser demorada e onerosa, o óleo produzido é de altíssima qualidade e pode consumir 200 kg de semente para produzir apenas 1 litro de óleo. Alemanha, França e Itália foram os primeiros países a beneficiarem o óleo de semente de uva enquanto que na América do Sul foram Argentina e Chile. Os principais produtores mundiais deste óleo são Estados Unidos, Espanha e Itália. O óleo de semente de uva apresenta coloração amarelo esverdeado, sabor agradável e odor suave. Sua digestibilidade é de 97%. O óleo é muito apreciado na alimentação humana e tem uma aplicação muito variada na indústria cosmética, por ser um óleo fino e ter boa penetração na pele é muito usado para massagem e na indústria farmacêutica <sup>43</sup>.

---

<sup>h</sup> Os fitosteróis são substâncias encontradas apenas nos vegetais que apresentarem propriedades hipocolesterolêmicas.

### **1.3.7- Óleo de avelã**

As aveleiras produzem um fruto de casca rija chamado avelã, nome botânico *Corylus avellana*, que no grego é *korys* (elmo). O nome avelã está ligado a Avellino, província da Itália. Tem sua origem no Oeste Asiático e América do Norte, pertencem à família das betuláceas e pode atingir os 4 metros de altura. A Turquia é o maior exportador de avelãs, Giresun é uma província turca capital mundial da Avelã. O óleo de avelã é utilizado em saladas e na indústria farmacêutica entre outras aplicações <sup>43</sup>.

### **1.3.8- Óleo de gergelim**

O gergelim (*Sesamum indicum*) apresenta um bom nível de resistência à seca. É originário da Ásia e da África. A Índia e a China detêm 50% da produção mundial, seguidos do Sudão, Etiópia e Bangladesh. O óleo tem cor amarelo claro, com um sabor característico e agradável. É destinado, em sua maior parte, para fins alimentícios, principalmente na culinária chinesa e japonesa. Sendo apreciado também na cozinha do médio oriente e na fabricação de doces e balas. O óleo de gergelim ou óleo de sésamo é muito utilizado em cosméticos, farmacêuticos, em perfumes, massagens e aromaterapias <sup>43</sup>.

### **1.3.9- Óleo de linhaça**

A semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) é considerada um alimento funcional por suas propriedades nutricionais básicas e preventivas graças aos compostos antioxidantes e anticancerígenos. O óleo de linhaça é uma das maiores fontes vegetais de ômega 3 da natureza (cerca de 57%) e de ômega 6. A relação ideal entre ômega 3 e ômega 6 é de 1:4 respectivamente, enquanto o óleo vegetal de linhaça apresenta uma relação de 1:3, muito próxima do ideal. O óleo de linhaça é utilizado na indústria farmacêutica e cosmética. Outros usos do óleo de linhaça incluem a fabricação de linóleo e a diluição de tintas a óleo para pinturas de telas <sup>43</sup>.

### 1.3.10- Óleo de buriti

A *Mauritia flexuosa* Mart é uma palmeira popularmente conhecida como miriti, buriti ou buriti do brejo. É da família da *Arecaceae*<sup>51</sup>, encontrada nos Estados do Pará, Amazonas, Amapá, Rondônia, Goiás, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Ceará e Maranhão<sup>52</sup>. É conhecida como “árvore da vida” por algumas tribos indígenas. A composição do fruto está distribuída em caroço (40%), casca de polpa (30%), envoltório celulósico (20%) e polpa (10%). O óleo de buriti é basicamente composto de tocoferol conhecido como vitamina E, carotenóides<sup>i</sup> e ácidos graxos de cadeia longa. Apresenta diversas aplicações, tais como filtro solar, cosméticos, alimentos, entre outros<sup>53</sup>.

### 1.3.11- Óleo de andiroba

No Estado do Amazonas, o nome andiroba é atribuído a duas espécies, *Carapa guianensis* Aubl com ocorrência em toda bacia amazônica, preferencialmente em ambiente de várzea e *Carapa procera* D.C., espécie mais restrita a algumas áreas na Amazônia, porém com ocorrência também na África<sup>54</sup>. A andiroba é uma árvore alta, frondosa, de folhas alongadas, com pequenas flores brancas, que pertence à mesma família *Meliaceae*. Característica da região amazônica e dos solos úmidos de toda a região em especial no Amapá, Acre e Pará, seu tronco pode chegar até 1,20 m de diâmetro<sup>55</sup>. Começa a frutificar 10 anos após o plantio e cada fruto contém de 4 a 6 sementes. Uma árvore de andiroba é capaz de produzir de 180 a 200 kg por ano de sementes. O óleo possui coloração amarelo claro transparente, solidifica em temperaturas inferiores a 25°C com consistência parecida com vaselina, tem sabor amargo e rancifica rapidamente após a extração das sementes pelo processo artesanal, sendo considerado impróprio para a alimentação. Entretanto, é muito usado na medicina indígena como anti-reumático antiinflamatório e cicatrizante, é também empregado na fabricação de velas repelentes contra insetos, sabonetes e cosméticos<sup>54</sup>. As meliáceas possuem metabólitos denominados limonóides, substâncias que são

---

<sup>i</sup> Os carotenóides são compostos lipossolúveis, poliisoprenóides que formam um dos mais importantes grupos de pigmentos naturais encontrados na natureza.

conhecidas pelo fato de apresentarem atividade em insetos, seja interferindo no crescimento, sejam através da inibição de alimentação <sup>56</sup>.

### **1.3.12- Óleo de açaí**

A etimologia da palavra açaí encontra-se no vocabulário Tupi e significa “fruto que chora”, ou seja, fruta que expele água. O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart) é nativo da Amazônia brasileira e o Estado do Pará é o principal centro de dispersão natural dessa palmácea. No entanto, é na região do estuário do Rio Amazonas que se encontram as maiores e mais densas populações naturais dessa palmeira. Destaca-se, entre os diversos recursos vegetais, pela sua abundância e por produzir importante alimento para as populações locais. É a principal fonte de matéria-prima para a agroindústria de palmito no Brasil, em especial pela importância econômica para a fruticultura regional. A fruta é pequena, arredondada e muito roxa, quase preta, lembra uma jabuticaba em tamanho reduzido. Tem um caroço grande e pouca polpa <sup>57</sup>. O óleo extraído do açaí é composto de ácidos graxos de boa qualidade que são aplicados a produtos cosméticos para promover maior hidratação da pele. O açaí é utilizado em todas as suas possibilidades tais como óleo, extrato e corante sendo totalmente aproveitado <sup>58</sup>.

### **1.3.13- Óleo de castanha do Brasil**

A castanha do Brasil ou castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) é a semente de uma castanheira da família *Lecythidaceae*, nativa da região amazônica. Ocorre nos Estados do Acre, Amazonas, Pará, Roraima e Rondônia e em boa parte do Maranhão, Tocantins e Mato Grosso. O fruto da castanha se chama ouriço que contém de 15 a 24 sementes que são as amêndoas da castanha <sup>55</sup>. A castanha possui 69% de óleo, obtido por processo de prensagem a frio com altíssima qualidade e elevado valor comercial. Apresenta-se como um óleo amarelo claro, com odor e sabor característicos. Possui propriedades emolientes, hidratantes e lubrificantes, sendo muito utilizado como matéria-prima na fabricação de produtos cosméticos e farmacêuticos, além de ser utilizado em culinária <sup>51</sup>.

### **1.3.14- Óleo de pinhão manso**

Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L), também conhecido como pinhão de purga, pinhão Paraguai, manduri graça e mandobiguaçu. É um arbusto ou árvore com até quatro metros de altura, flores pequenas, amarelo-esverdeadas, cujo fruto é uma cápsula com três sementes escuras, lisas, dentro das quais se encontra a amêndoa branca, tenra e rica em óleo. A semente fornece de 50 a 52% de óleo extraído com solventes e 32 a 35% em caso de extração por prensagem <sup>59</sup>. O óleo serve para a fabricação de sabão e como purgativo para o gado bovino. Acredita-se que seu principal uso será na fabricação de biodiesel, mas também pode ser utilizado na indústria de tintas e de vernizes <sup>60</sup>.

### **1.3.15- Óleo de mamona**

Mamona ou rícino é a semente da mamoneira (*Ricinus communis* L), uma *euforbiácea*. Recebe outras designações, conforme a região, no nordeste brasileiro chama-se carrapateira e em algumas regiões da África recebe o nome de abelmeluco. Os principais países produtores de mamona são a Índia (73%), a China (18%) e o Brasil (8%) e os principais consumidores são Estados Unidos, França, Alemanha e Japão. No Brasil, a produção está concentrada no Estado da Bahia (67%), seguida do Ceará (15%), Minas Gerais (11%) e Pernambuco (3%). A maior parte das cultivares plantada comercialmente no Brasil possui teor de óleo variando entre 45% e 50%. O óleo bruto é de coloração palha e ao ser refinado fica quase incolor <sup>61</sup>. O óleo de mamona não é comestível e a principal razão para a grande demanda mundial pelo óleo de mamona é sua forma de utilização que é a base dos mais diversos produtos industriais como tintas, vernizes, óleo secativo, solventes, nylon, lubrificantes, fluidos hidráulicos, plastificantes, graxas especiais, espumas, cosméticos, resinas alquídicas, ceras e emulsificantes. Atualmente, uma das reações químicas do óleo de mamona de maior destaque é a de produção do biodiesel <sup>62</sup>.

## 1.4- Estabilidade de óleos vegetais: rancidez

Sabe-se que os óleos e gorduras deterioram durante o armazenamento, quando são submetidos a altas temperaturas, o processo da oxidação é acelerado ocorrendo reações de oxipolimerização e decomposição termo-oxidativa<sup>63,64</sup>. Isto também pode ser observado durante as fases de refino dos óleos vegetais<sup>65</sup>. A rancidez é definida como alterações nos óleos vegetais organolepticamente detectáveis e pode ser hidrolítica ou oxidativa. A rancidez hidrolítica resulta da hidrólise da ligação éster por lipase ou umidade produzindo ácidos graxos livres.

A degradação oxidativa dos ácidos graxos insaturados pode ocorrer por diferentes vias, em função do meio e dos agentes catalisadores<sup>66</sup>. A mais comum em óleos vegetais é a auto-oxidação (**Figura 10**).

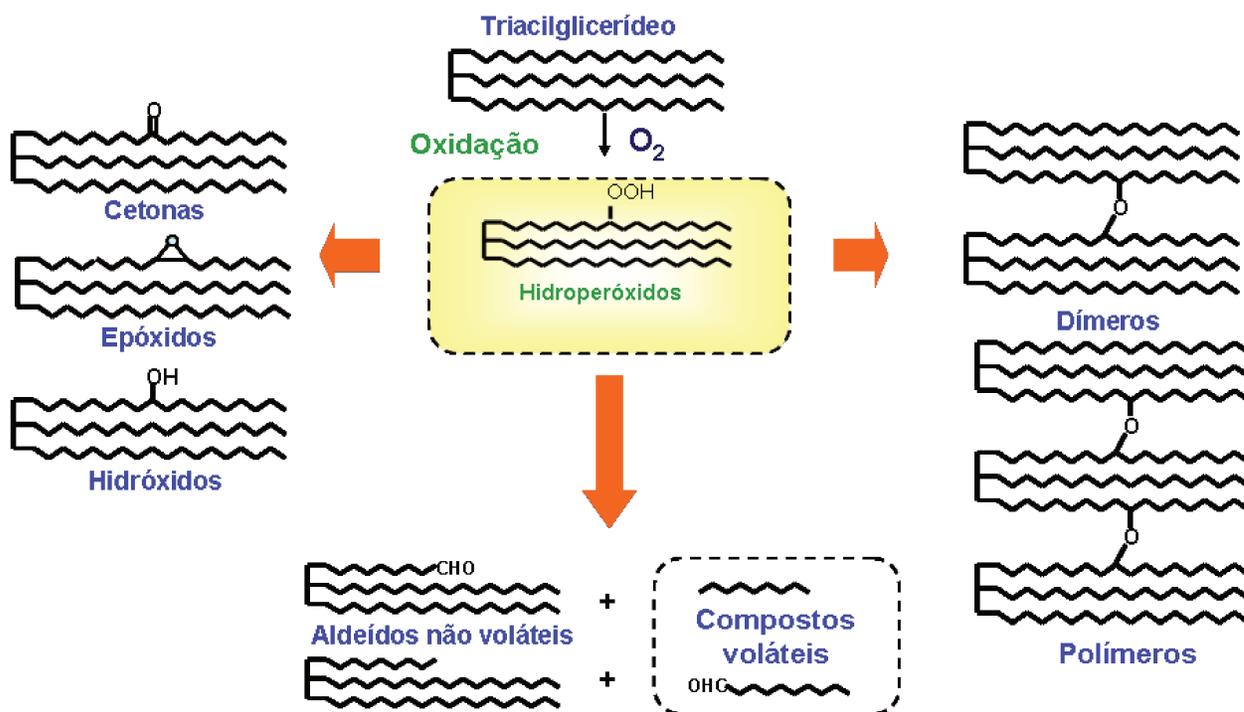


Figura 10. Esquema simplificado da auto-oxidação.

Trata-se de um fenômeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reações radicalares capazes de auto-propagação, a seqüência reacional é classicamente dividida em iniciação, propagação e finalização. É possível distinguir também três etapas de evolução oxidativa: diminuição dos substratos de oxidação (oxigênio, lipídio insaturado); aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes e aparecimento dos produtos secundários de oxidação obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis), cuja natureza e proporção dependem de diversos parâmetros.

## **2.0-MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS E NOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE**

### **2.1- Métodos analíticos utilizados na caracterização de óleos vegetais**

Determinar a composição da mistura de TAG é uma tarefa complexa, devido à variedade de ácidos graxos, que diferem quanto ao tamanho da cadeia e ao grau de insaturação, bem como a distribuição destes na estrutura do glicerol <sup>67</sup>.

A cromatografia gasosa, *Gas Chromatography* (GC) com detector de ionização de chama, *Flame Ionization Detector* (FID)<sup>68,69</sup> ou acoplada a um espectrômetro de massas (GC MS) <sup>70</sup> é a técnica mais utilizada para caracterizar óleos vegetais através da determinação da composição de ácidos graxos. Neste procedimento, as amostras são hidrolisadas em meio alcalino e os ácidos graxos são extraídos da fração insaponificável. Estes ácidos são transformados em ésteres metílicos (espécies mais voláteis), através de uma reação de derivatização com metanol para serem injetados e separados em uma coluna cromatográfica capilar. Como resultado é obtido a distribuição graxa, isto é, os ácidos graxos que compõem os TAG e suas porcentagens relativas. Apesar de ser bastante utilizado, trata-se de um procedimento que consome tempo e recursos uma vez que necessita de tratamento da amostra e separação cromatográfica. Quando se emprega GC-FID, os ácidos graxos da amostra (convertidos

em ésteres metílicos) são identificados por meio da comparação com tempo de retenção de uma mistura padrão de ésteres graxos metílicos. Publicações na área de óleos como Mlayah e colaboradores <sup>71</sup> investigaram somente os óleos vegetais da Amazônia e conseguiram analisar a composição e propriedades físicas de diferentes óleos de palma (frações saponificável e insaponificável) por GC-FID.

Os óleos vegetais também podem ser caracterizados através de cromatografia líquida, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sem a necessidade de derivatização. Utiliza-se a cromatografia líquida acoplada a detector de espalhamento de luz evaporativo, *Evaporative Light-Scattering Detector* (ELSD) <sup>72</sup>, espectrometria de massas utilizando principalmente como técnica de ionização química a pressão atmosférica, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) <sup>73,74</sup>, Infravermelho <sup>75</sup> e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) <sup>76</sup>. Essas técnicas analíticas são utilizadas no estudo de óleos, principalmente quanto à autenticidade e qualidade.

A análise direta de óleos vegetais com pequeno preparo de amostra por espectrometria de massas é uma ferramenta alternativa cada vez mais empregada. Destaca-se a infusão direta de óleos vegetais (análise dos TAG) ou de sua fração polar (análise de ácidos graxos livres) em espectrômetros de massas, utilizando ionização por ESI <sup>77,78,79</sup>. A técnica de MALDI TOF MS <sup>80,81,82</sup> foi incorporada recentemente ao arsenal de técnicas analíticas para a determinação de TAG em óleos vegetais, Catharino e colaboradores <sup>83</sup> desenvolveram um procedimento de avaliação da composição de TAG através da técnica MALDI-TOF MS para tipificação de óleos e gorduras vegetais amazônicos.

## **2.2- Métodos analíticos para determinar hidroperóxidos e estabilidade em óleos vegetais**

Existem numerosos métodos para avaliar o estado oxidativo em tempo real para óleos vegetais medidos de forma indireta, entre eles os mais usados são índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina, dienos conjugados e número de TBA (teste do ácido 2-tiobarbitúrico). O índice de peróxidos (IP) demonstra a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos, sendo expresso em milimoles de oxigênio ativo por kg de

óleo, deve ser determinado nos primeiros estados do processo oxidativo. O índice de *p*-anisidina (IpA) é o produto complexo de cor amarela formado em meio acético com os aldeídos, que possuem duas duplas ligações conjugadas, em particular com o *trans,trans*-2,4-decadienal resultante da degradação do ácido linoléico. O índice de dienos conjugados é baseado na oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados com formação de hidroperóxidos e deslocamento de duplas ligações resultando nos dienos conjugados. O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) está fundamentado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído<sup>84</sup>. Todos esses índices representam apenas indicação sobre o grau de oxidação atual do óleo. É importante ressaltar a necessidade de realizar mais de um índice por amostra, pois os resultados são complementares uma vez que medem uma das etapas distintas da oxidação<sup>85,86</sup>. Já com o uso da cromatografia líquida, métodos diretos começaram a ser propostos como o de Neff e colaboradores<sup>87</sup> que estudaram os produtos de oxidação em padrões de trioleína (OOO), trilinoleína (LLL) e trilinolenina (LnLnLn) utilizando APCI-HPLC MS, foram identificados mono e diepóxidos além dos hidroperóxidos utilizando para a separação em coluna de fase reversa. Existem na literatura vários trabalhos<sup>88,89,90</sup> para analisar hidroperóxidos publicados nos anos 90 utilizando técnicas cromatográficas, como o de Bauer-Plank e colaboradores<sup>91</sup> que analisaram hidroperóxidos em óleos vegetais por HPLC com detector de ultravioleta (UV). Outros tipos de separação como fase normal<sup>92</sup> e detecção eletroquímica<sup>93</sup> também são relatados, mas todas com extenso preparo de amostra e tempos longos de corrida.

Esses métodos para avaliar o estado oxidativo são utilizados de forma auxiliar para medir a estabilidade oxidativa de um óleo vegetal que pode ser feita com testes em tempo real e testes de estabilidade acelerada. Em tempo real são avaliadas as condições normais de armazenamento ou de distribuição. Já nos testes acelerados, a avaliação da resistência à oxidação é efetuada por testes preditivos, os quais promovem um envelhecimento acelerado<sup>84</sup>. Uma das dificuldades para avaliar o grau de oxidação reside na escolha do momento mais adequado para efetuar esta determinação, de um modo geral, procura-se avaliar em condições padronizadas e selecionar um determinado parâmetro indicador, o período de indução (PI) da reação,

ou seja, o tempo necessário para se atingir um ponto crítico de oxidação. Os testes específicos para determinar a estabilidade acelerada geralmente são método do oxigênio ativo, *Oxygen Active Method* (OAM), teste de estufa de Schaal, bomba de oxigênio e Rancimat, entre outros. Os testes acelerados recorrem a condições padronizadas de oxidação acelerada como oxigenação intensiva e tratamento térmico e permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de um óleo vegetal. Uma vez que os fenômenos naturais de oxidação são processos lentos, os testes de estabilidade em tempo real tornam-se incompatíveis com o controle de qualidade a nível industrial. Deste modo, os testes de estabilidade acelerados assumem particular importância na rotina analítica <sup>94</sup>. Dos métodos de estabilidade acelerada o Rancimat é um dos mais utilizados, a avaliação do teor de ácidos voláteis é usualmente feita por condutimetria e baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular. Os principais ácidos voláteis formados são o ácido fórmico e o ácido capróico que aumentam a condutividade elétrica para determinar o PI (nível de rancidez detectável pela mudança brusca na taxa de oxidação). A formação do ácido fórmico pode ser explicada pela peroxidação de aldeídos. Estes compostos são obtidos normalmente após iniciação forçada da oxidação a uma temperatura de 110-130°C e com corrente de ar ou de oxigênio <sup>95</sup>.

### **3.0- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Amostras**

As amostras de óleos vegetais foram obtidas junto ao Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA-UNICAMP (Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas) e ao INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Foram estudadas quinze amostras: óleo de soja (*Glycine max*), azeite de oliva (*Olea europaea*), óleo de canola (*Brassica napus* ou *Brassica campestris*), óleo de girassol (*Helianthus annuus*), óleo de milho (*Zea mays*), óleo de semente de uva (*Vitis vinifera*), óleo de avelã (*Corylus avellana*), óleo de gergelim (*Sesamum indicum*), óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*), óleo de buriti (*Mauritia*

*flexuosa* Mart), óleo bruto de andiroba (*Carapa guianensis*), óleo bruto de açaí (*Euterpe oleracea*), óleo bruto de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) e óleo de mamona (*Ricinus communis*).

### 3.2- Equipamentos

a) Cromatógrafo gasoso GC- 2010 (*Shimadzu, Kyoto, Japão*), equipado com o detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Supelco SP2340 (60m x 0,25mm x 0,2µm) utilizado para análise de ácidos graxos feitas pelo laboratório de óleos e gorduras da FEA-UNICAMP.

b) Rancimat 743 (Metrohm, UK) utilizado para determinar o período de indução dos óleos de soja e azeite de oliva feito no INMETRO-RJ;

c) Espectrômetro de massas MALDI TOF (Micromass, UK) em modo reflectron, utilizado para obter o perfil de TAG do óleo de soja.

d) Espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, UK), utilizado para obter o perfil de TAG do óleo de soja.

e) Espectrômetro de massas LCMS 2010 EV (*Shimadzu, Kyoto, Japão*), munido de analisador monoquadrupolar e fonte de EASI construída no laboratório (**Figura 11**) utilizado para analisar o perfil de TAG dos óleos vegetais e os hidroperóxidos obtidos por oxidação acelerada.

### 3.3- Softwares

Foi utilizado o software LCMS solution versão 3.50 SP2 da Shimadzu, o software desenvolvido por Lanças e colaboradores <sup>96</sup> para o cálculo de TAG de seis amostras analisadas por GC-FID, masslynks versão 4.1 para os equipamentos MALDI e Q-TOF.



**Figura 11.** Equipamento monoquadrupolo com fonte de EASI MS utilizado para as análises de óleos vegetais.

### **3.4- Parte Experimental**

#### **3.4.1- Determinação de ácidos graxos por GC-FID**

As amostras de óleo de soja, azeite de oliva, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho e óleo de semente de uva foram analisadas por GC-FID. Em um tubo de ensaio com tampa rosqueável, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra de óleo vegetal e 500  $\mu\text{L}$  de reagente de saponificação composto por KOH 0,5 M em metanol (2,8 g de KOH + 100 mL de metanol). Os tubos foram deixados em digestor a 80  $^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Após o resfriamento a temperatura ambiente, foi adicionado 1,5 mL de reagente de esterificação composto por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  em metanol 0,1M (6 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 120 mL de metanol) e novamente os tubos ficaram em digestor a 80  $^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Após este período, os tubos foram retirados do digestor e esfriaram naturalmente <sup>97</sup>. Foram adicionados 2 mL de hexano, submetidos a agitação para que os ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos migrassem para o hexano. Assim ocorreu separação de fases, a fração do hexano foi coletada com pipeta de Pasteur e transferida para frascos

próprios para o injetor do cromatógrafo. Foi injetado em CG-FID, equipado com coluna capilar Supelco SP2340 (60m x 0,25mm x 0,2 $\mu$ m), o volume de 1  $\mu$ L com razão de *split* de 1:100, com temperaturas do detector e injetor de 260°C e 240°C, respectivamente. A temperatura da coluna iniciou com 120°C por 5 minutos e aumentou gradualmente 4°C por minuto até a temperatura final de 240°C, permanecendo assim por 10 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com velocidade linear de 17 cm s<sup>-1</sup>, o que corresponde ao fluxo na coluna de 0,67 mL min<sup>-1</sup> e o tempo de corrida para cada amostra foi de 50 minutos. A identificação dos picos foi efetuada pela comparação dos tempos de retenção dos picos característicos com o padrão de ésteres metílicos (Supelco 37- PN 47885-U). A normalização é realizada pela razão da área do pico do éster metílico de interesse, em relação à área total dos picos identificados, expressa em percentagem <sup>98</sup>. Os resultados dos ácidos graxos foram utilizados para calcular a porcentagem de TAG nas amostras utilizando software de Lanças e colaboradores <sup>96</sup>.

#### **3.4.2- Determinação do período de indução por Rancimat**

Foram pesados três gramas de óleo de soja e azeite de oliva em tubo de vidro que foram adaptados ao Rancimat com um fluxo de ar passando através do óleo de 20 L h<sup>-1</sup> e mantido sob aquecimento em temperatura ~110°C. Os ácidos carboxílicos voláteis gerados no processo de oxidação, são recolhidos em recipiente com água destilada se solubilizando e aumentando a condutividade elétrica da água que é medida pelo equipamento. A partir da curva de condutividade elétrica ( $\mu$ s) vs tempo constroem-se duas paralelas que se interceptam num ponto que corresponde na escala de tempo ao período de indução ou índice de estabilidade oxidativa.

#### **3.4.3- Perfil de TAG do óleo de soja por MALDI TOF MS**

Para o preparo da amostra foi utilizada a matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) misturada à amostra na proporção 10:1, foi adicionado 1  $\mu$ L de solução 10 mM de cloreto de sódio antes da homogeneização. Foi aplicada e fixada uma quantidade mínima da mistura no *spot* da placa de amostragem com auxílio de uma espátula. Os espectros foram adquiridos em modo positivo de ionização no MALDI TOF, com modo

reflectron de aquisição de íons e nas seguintes voltagens: tensão de pulso 2,5 kV, tensão do *reflectron* 2 kV, tensão da fonte 15 kV e tensão do MCP 1,8 kV. A dessorção/ionização foi realizada através de um laser de nitrogênio (337 nm). O espectro foi adquirido na faixa de  $m/z$  500-1500.

#### **3.4.4- Perfil de TAG do óleo de soja por ESI Q-TOF MS**

Foi utilizado 50 $\mu$ L de óleo de soja diluído em 1 mL de uma mistura de metanol/H<sub>2</sub>O (1:1), com 0,1% de ácido fórmico e 10  $\mu$ L de solução 5 mM de cloreto de sódio. A amostra foi submetida à agitação em um vórtex por 1 minuto e depois foi analisada por inserção direta no espectrômetro de massas Q-TOF em modo positivo de ionização e o tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. As condições de operação do equipamento foram: voltagem do capilar 3 kV, voltagem do cone 40 V, temperatura da fonte e da dessolvatação 100°C. As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard) com um fluxo contínuo de 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Os espectros de *full scan* foram adquiridos na faixa de  $m/z$  50 a 1500.

#### **3.4.5- Caracterização de TAG e AGL em óleos vegetais por EASI MS**

A aquisição de espectros de massas foi feita utilizando 2  $\mu$ L de óleo depositado sob uma superfície de papel posicionado com ângulo aproximadamente de 30° na entrada do cone do espectrômetro de massas. Foi utilizado N<sub>2</sub> como gás nebulizante com vazão de 3 L min<sup>-1</sup>, fluxo de metanol puro de 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup> para modo positivo e metanol com 0,1% hidróxido de amônio as análises em modo negativo. Os espectros de massas adquiridos foram acumulados por 60 segundos e a faixa de  $m/z$  50-2000.

#### **3.4.6- Caracterização de hidroperóxidos por EASI MS**

Foram pesados três gramas de azeite de oliva e de óleo de soja em balança analítica. As amostras foram aquecidas a 110°C em banho de óleo mineral, sob fluxo de ar de 20 L h<sup>-1</sup> e foram retiradas alíquotas de 10  $\mu$ L a cada uma hora. O tempo de monitoramento de cada amostra variou de acordo com sua estabilidade (14 h óleo de soja e 24 h azeite de oliva). A cinética da oxidação foi monitorada por EASI MS. A

aquisição dos espectros seguiu o procedimento descrito em 3.4.5 apenas para EASI(+) MS. Para a amostra de azeite de oliva foi feita a aquisição no tempo 0 h e depois as medidas começaram após 8 h de oxidação acelerada, pois não houve alterações significativas no azeite devido a sua alta estabilidade.

## 4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Composição de ácidos graxos por GC-FID

Desde a década de 50, algumas técnicas baseadas na distribuição estatística de ácidos graxos têm sido desenvolvidas para auxiliar na identificação de TAG<sup>99</sup>. A maioria dos softwares desenvolvidos procuram prever a porcentagem molar do TAG presentes nos óleos vegetais, a partir da composição de ácidos graxos destas amostras baseados na hipótese de distribuição 1,2,3-randômica<sup>100</sup>. Fornecendo os valores de ácidos graxos encontrados por GC-FID ao programa de computador obtêm-se uma previsão da composição triacilglicerídica dos óleos vegetais de óleo de soja, azeite de oliva, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho e óleo de semente de uva.

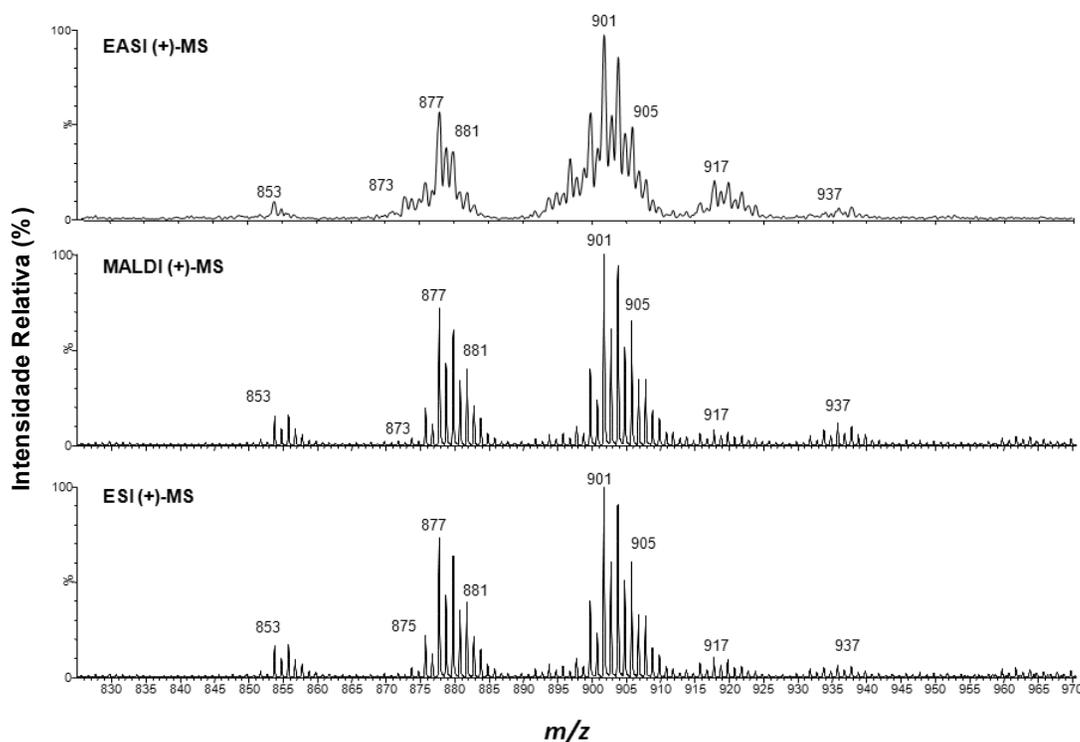
O teor de ácidos graxos mostrado na **Tabela 4** é o resultado das análises realizadas por GC-FID que serão utilizados para calcular a porcentagem de TAG dos óleos vegetais através do software feito por Lanças e colaboradores<sup>96</sup>.

**Tabela 4.** Composição em % de ácidos graxos dos óleos vegetais analisados por GC-FID.

Ácido Graxo	Símbolo	soja	oliva	canola	girassol	milho	uva
M	14:0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
P	16:0	10,6	13,3	4,7	5,8	11,7	8,3
Po	16:1	0,1	1,3	0,3	0,1	0,1	0,1
S	18:0	3,6	2,6	2,6	3,8	2,3	3,3
O	18:1	24,0	70,5	62,4	31,5	37,4	27,7
L	18:2	53,3	10,1	17,9	56,9	45,4	58,7
Ln	18:3	6,7	0,7	9,2	0,2	1,3	0,4
A	20:0	0,4	0,4	0,8	0,3	0,6	0,3
Ga	20:1	0,2	0,3	1,1	0,2	0,3	0,2
Be	22:0	0,5	0,1	0,4	0,8	0,2	0,4
Lg	24:0	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2

## 4.2- Comparativo entre EASI, MALDI e ESI para caracterização de óleo de soja

A utilização de um analisador monoquadrupolar confere a análise simplicidade, preço relativamente baixo e boa linearidade em análises quantitativas. Apesar de usualmente ter baixa resolução ( $R=1000$ ) e exatidão de massas entre 0,1 e 0,2 Da, as informações contidas no espectro de massas são as mesmas comparadas aos analisadores do tipo Q-TOF e TOF como é possível observar na **Figura 12**. O experimento com MALDI foi obtido com um TOF com  $R= 7000$ . Já o experimento utilizando ESI, foi realizado em um Q-TOF com  $R= 5000$  <sup>101</sup>.



**Figura 12.** Comparativo entre os espectros de massas do óleo de soja, obtido por EASI MS, MALDI TOF MS e ESI Q-TOF MS <sup>101</sup>.

O perfil observado nos três espectros de massas é muito similar detectado como íons  $[TAG+Na]^+$  sendo PPL (C50:2 íon de  $m/z$  853), PPO (C50:1 íon de  $m/z$  855), PLL (C52:4 íon de  $m/z$  877), PLO (C52:3 íon de  $m/z$  879), POO (C52:2 íon de  $m/z$  881), LnLL/LnLnO (C54:7 íon de  $m/z$  899), LLL/LnLO (C54:6 íon de  $m/z$  901), LLO/LnOO (C54:5 íon de  $m/z$  903), LOO (C54:4 íon de  $m/z$  905) e OOO (C54:3 íon de  $m/z$  907),

onde O corresponde ao ácido oléico, L ao ácido linoléico, Ln ao ácido linolênico e P ao ácido palmítico. É possível verificar as espécies com íons  $[TAG+K]^+$  sendo PLL (íon de  $m/z$  893), PLO (íon de  $m/z$  895), LLL/LnLO (íon de  $m/z$  917), LLO ou LnOO (íon de  $m/z$  919) e LOO (íon de  $m/z$  921), sendo que o TAG majoritário nos três espectros de massas é o LLL, combinação do ácido graxo linoléico presente na quantidade de 53%, segundo a análise do óleo de soja por GC-FID para determinar a % de ácidos graxos (**Tabela 4**), utilizado também como amostra neste comparativo.

### 4.3- Interpretação dos dados de TAG e AGL obtidos por EASI MS

A **Tabela 5** descreve os principais TAG encontrados em óleos vegetais. Ela foi elaborada com a razão  $m/z$  do TAG, a razão  $m/z$  do aduto de sódio  $[TAG+Na]^+$  e a razão  $m/z$  do aduto de potássio  $[TAG+K]^+$ , assim as siglas utilizadas no decorrer da discussão serão melhor compreendidas.

As espécies com potássio não devem ser mais intensas do que as suas correspondentes com sódio, uma vez que a inversão desta proporção pode indicar contaminação do solvente ou sujeira no cone do espectrômetro de massas. Por esta razão, essas espécies atuam como indicadores da qualidade analítica. Já as espécies sodiadas serão amplamente discutidas tanto na caracterização dos espectros quanto nos cálculos de normalização da porcentagem relativa que atribui teor aos TAG identificados por EASI MS.

A **Figura 13** representa espectros de massas típicos de TAG e AGL obtidos por EASI MS. O espectro de massas de óleo de soja (**Figura 13a**) foi obtido por EASI MS no modo positivo de ionização, fornecendo a composição total de TAG de forma direta com espécies cationizadas formando adutos com os metais sódio e potássio no mesmo espectro de massas, o que leva a soma 23 ou 39 Da na  $m/z$  do TAG observado. O mesmo vai ocorrer para todos os TAG presentes nos demais óleos. Para as análises de óleos vegetais as espécies formadas são sempre adutos de metal alcalino diferente de outros analitos também ionizados por EASI(+) MS, por exemplo, corantes em tinta de caneta que formam espécies protonadas  $[M + H]^+$  <sup>102</sup>.

**Tabela 5.** Composição dos principais TAG encontrados em óleos vegetais.

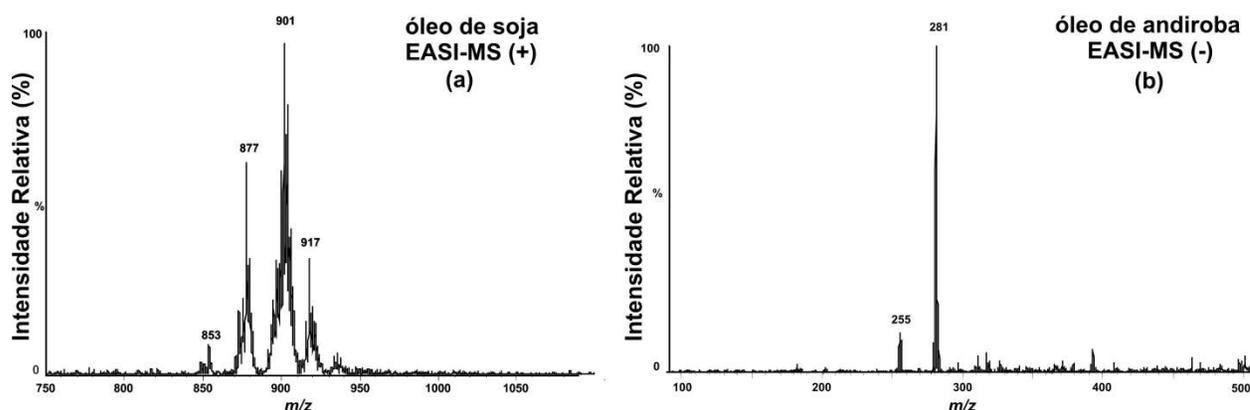
TAG (m/z)	[TAG+ Na] <sup>+</sup>	[TAG+ K] <sup>+</sup>	FM <sup>J</sup>	TAG <sup>K</sup>	NC/DL <sup>I</sup>
778	801	817	C <sub>49</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	MMS	46:0
802	825	841	C <sub>51</sub> H <sub>94</sub> O <sub>6</sub>	PPoPo	48:2
804	827	843	C <sub>51</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	PPPo	48:1
806	829	845	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PPP	48:0
828	851	867	C <sub>53</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	PPLn	50:3
830	853	869	C <sub>53</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PPL	50:2
832	855	871	C <sub>53</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	PPO	50:1
834	857	873	C <sub>53</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	PPS	50:0
854	877	893	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PLL	52:4
856	879	895	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub> <sup>6</sup>	PLO/PoOO	52:3
858	881	897	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	POO	52:2
860	883	899	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	PSO	52:1
862	885	901	C <sub>55</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	PSS	52:0
876	899	915	C <sub>57</sub> H <sub>96</sub> O <sub>6</sub>	LnLL	54:7
878	901	917	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	LLL/LnLO	54:6
880	903	919	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	LLO/LnOO	54:5
882	905	921	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	LOO/SLL	54:5
884	907	923	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	OOO/SLO	54:3
886	909	925	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	SOO/SSL	54:2
888	911	927	C <sub>57</sub> H <sub>108</sub> O <sub>6</sub>	SSO	54:1
890	913	929	C <sub>57</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	SSS	54:0
910	933	949	C <sub>59</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	ALL	56:4
912	935	951	C <sub>59</sub> H <sub>108</sub> O <sub>6</sub>	ALO	56:3
914	937	953	C <sub>59</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	SAL/AAO	56:2
916	939	955	C <sub>59</sub> H <sub>112</sub> O <sub>6</sub>	SAO	56:1
918	941	957	C <sub>59</sub> H <sub>114</sub> O <sub>6</sub>	SSA	56:0
932	955	971	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>9</sub>	RRR	54:3
942	965	981	C <sub>61</sub> H <sub>114</sub> O <sub>6</sub>	AAL	58:2
944	967	983	C <sub>61</sub> H <sub>116</sub> O <sub>6</sub>	AAO	58:1

<sup>J</sup> Fórmula molecular;

<sup>K</sup> Abreviações utilizadas para os ácidos graxos: mirístico (M, C14:0), palmítico (P, C16:0), palmitoléico (Po, C16:1), esteárico (S, C18:0), oléico (O, C18:1), linoléico (L, C18:2), linolênico (Ln, C18:3), araquídico (A, C20:0) e ricinoléico (R, 12OH-18:1);

<sup>I</sup> NC/DL = número de carbonos/número de duplas ligações das três unidades de ácido graxo.

Em técnicas como ESI a coordenação por metais ocorre com maior frequência para aumentar a intensidade do composto de interesse, sendo necessário adicionar soluções diluídas de sais de sódio ou potássio<sup>103</sup>. Em EASI(+) MS não é adicionado nem um tipo de sal, acredita-se que o sódio e o potássio são contaminações do ambiente ou do solvente. Já a **Figura 13b** representa os ácidos graxos livres do óleo bruto de andiroba que são vistos em modo de ionização negativo.

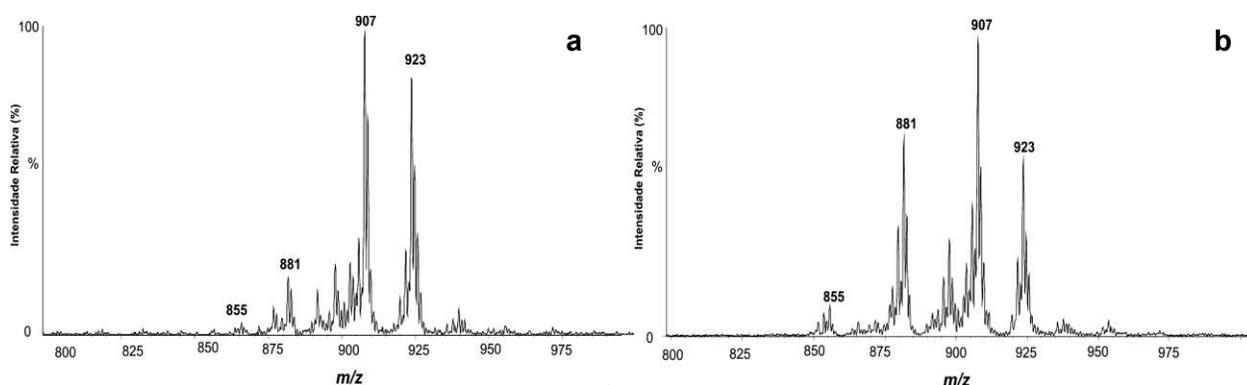


**Figura 13.** Espectros de massas de EASI MS. Os TAG do óleo de soja (a) são obtidos em modo positivo de ionização e AGL do óleo de andiroba (b) são obtidos em modo negativo de ionização.

As espécies de AGL observadas em ESI(-) MS são desprotonadas, o íon de  $m/z$  255 corresponde ao ácido palmítico e o íon de  $m/z$  281 ao ácido oléico. Como as reações para formarem moléculas desprotonadas são do tipo ácido/base, para favorecer a ionização dos óleos vegetais em EASI(-) MS é adicionado  $\text{NH}_4\text{OH}$  como aditivo no solvente na concentração de 0,1% v/v<sup>23</sup>. Os AGL foram analisados apenas nos óleos vegetais brutos, pois são removidos no processo de refino<sup>104</sup>. O aparecimento de AGL em óleos refinados é um indicativo de degradação do produto, assim EASI(-) MS pode ser uma ferramenta útil no controle de qualidade de óleos vegetais<sup>101</sup>.

O perfil de TAG para cada óleo vegetal é bem definido e ainda que a composição de TAG seja a mesma para dois óleos diferentes a proporção entre eles não é igual na

maioria dos casos. Como por exemplo, no azeite de oliva e no óleo de avelã comparados na **Figura 14**, a diferença marcante está na proporção do TAG POO, íon de  $m/z$  881, que no espectro de massas do óleo de avelã (**Figura 14a**) é de 18%, enquanto que no azeite de oliva (**Figura 14b**) é de 65%.

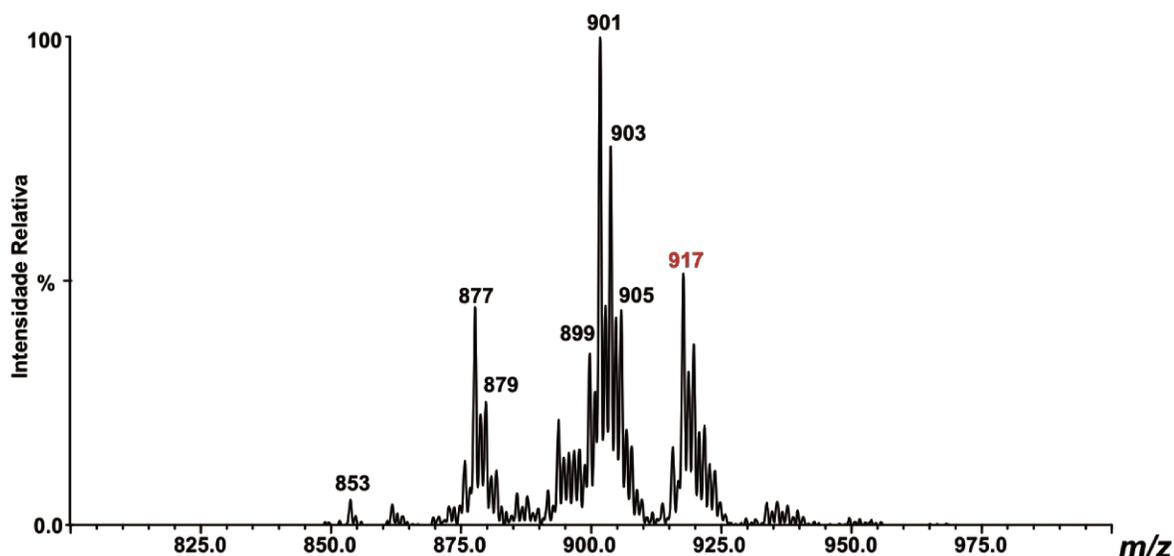


**Figura 14.** Espectros de massas EASI(+) MS de TAG (a) óleo de avelã e (b) azeite de oliva.

Será abordada ao longo da discussão de caracterização de óleos vegetais a correlação das porcentagens de TAG obtidas por EASI(+) MS, calculadas considerando a soma total dos íons com sódio de interesse em relação à razão  $m/z$  de cada TAG. Esses valores serão comparados com o valor de TAG das amostras calculadas pelos resultados de GC-FID utilizando o software para as seis primeiras amostras e a comparação dos valores de % de TAG encontrados na literatura para todas as amostras.

### 4.3.1-Composição de TAG do óleo de soja

A **Figura 15** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de soja que possui como composição teórica de ácidos graxos principais 11,0% de ácido palmítico, 4,0% de ácido esteárico, 23,4% de ácido oléico, 53,4% de ácido linoléico e 7,5% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos [TAG + Na]<sup>+</sup> encontrados por EASI(+)<sup>+</sup> MS, segundo a **Tabela 6**.



**Figura 15.** Espectro EASI(+)<sup>+</sup> MS do óleo de soja.

A caracterização feita por EASI(+)<sup>+</sup> MS apresenta o mesmo perfil de TAG estabelecido na literatura por técnicas de GC e HPLC para o óleo de soja. Considerando o teor calculado por normalização das intensidades relativas tanto por EASI quanto por GC-FID, é possível notar boa concordância dos dados com pequena exceção para os TAG PSL/POO, LnLL e LLL/LnLO. O perfil da literatura abrange todos os valores demonstrados o que mostra a coerência dos dados apresentados para o óleo de soja. O íon de  $m/z$  917 corresponde ao íon com potássio do TAG LLL/LnLO.

**Tabela 6.** Valores encontrados de TAG para o óleo de soja.

TAG	m/z	% EASI <sup>m</sup>	%GC-FID <sup>n</sup>	% Teórica <sup>o</sup>
PPL	853	1,2	1,7	0,9-3,1
PLnL	875	3,1	3,1	2,1-3,4
PLL	877	10,0	9,8	0,8-10,23
PLO	879	7,6	8,2	6,4-9,4
PSL/POO	881	5,0	2,8	2,3-5,1
LnLL	899	8,8	5,8	7,9-8,9
LLL/LnLO	901	22,8	19,4	17,6-20,6
LLO/LnOO	903	18,8	18,6	16-25,9
LOO/SLL	905	12,5	12,4	6,3-12,8
OOO/SLO	907	6,3	5,6	3,2-8,0
SOO/SSL	909	1,9	1,2	1,7-2,3

Pelos cálculos do software foram atribuídos 88,6% das combinações de TAG identificados por GC-FID e 11,4% correspondem a outras combinações possíveis.

#### 4.3.2-Composição de TAG do azeite de oliva

A **Figura 16** apresenta a caracterização dos TAG do azeite de oliva que possui como composição teórica de ácidos graxos principais 13,7% ácido palmítico, 5,0% de ácido esteárico, 55,0% de ácido oléico, 21,0% de ácido linoléico e apenas 1,0% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos [TAG + Na]<sup>+</sup> encontrados por EASI(+) MS, segundo a **Tabela 7**. Pelos cálculos do software foram atribuídos 96,2% das combinações de TAG identificados por GC-FID e 3,8% correspondem a outras combinações possíveis. Tanto os TAG calculados por EASI MS, quanto os calculados pelos resultados de ácidos graxos por GC-FID, estão dentro da faixa teórica apresentada por Firestone <sup>43</sup>.

<sup>m</sup> Resultados de TAG calculados pela soma de todas as espécies com sódio, exceto produtos de oxidação;

<sup>n</sup> Resultados de TAG calculados a partir da análise de GC-FID utilizando software de Lanças e colaboradores <sup>96</sup>;

<sup>o</sup> Resultados de TAG teóricos extraídos de Firestone 2006 <sup>43</sup>.

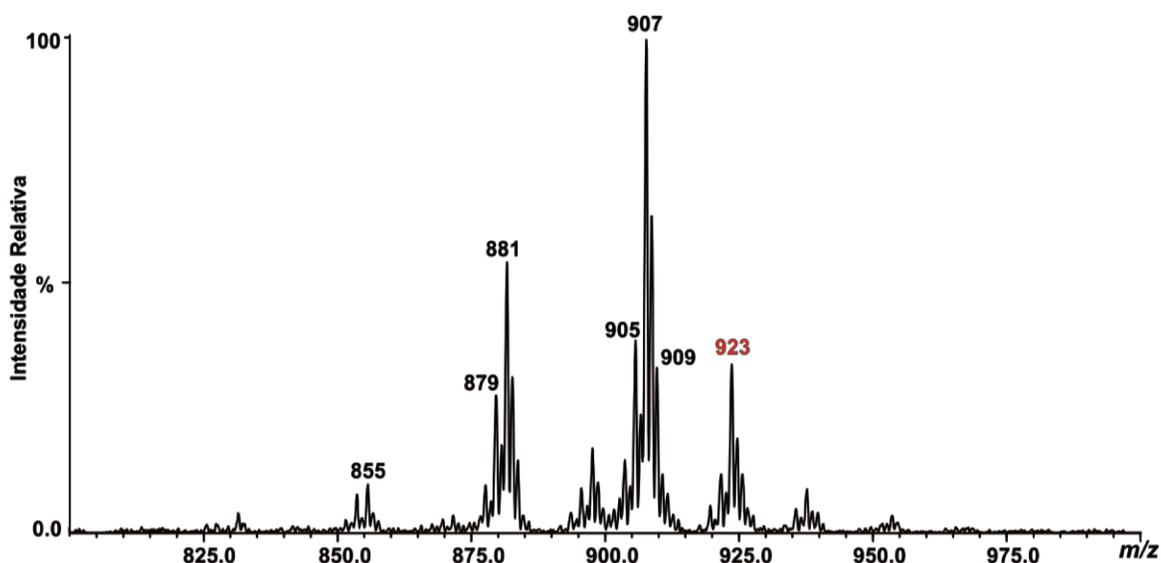


Figura 16. Espectro EASI(+) MS do azeite de oliva.

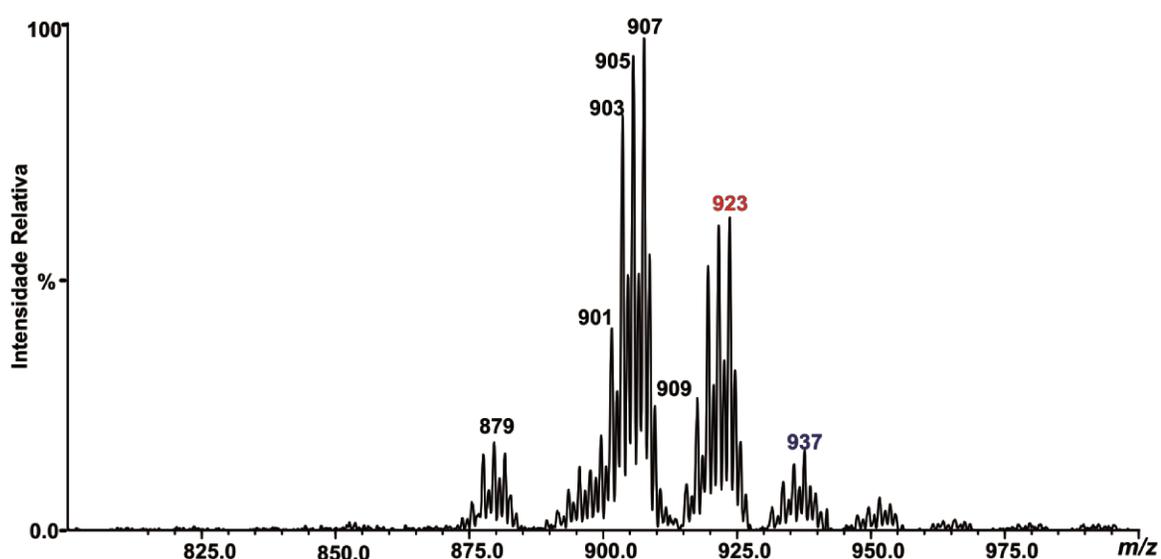
Comparando EASI MS com GC-FID as maiores diferenças estão nos íons de  $m/z$  899, 903 e 909. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para azeite de oliva, rico em TAG OOO como o óleo de canola, avelã, oliva e buriti. O íon de  $m/z$  923 corresponde ao TAG com potássio OOO/SLO.

Tabela 7. Valores encontrados de TAG para o azeite de oliva.

TAG	$m/z$	% EASI	% GC-FID	% teórica
PPL	853	2,2	1,0	3,0-3,5
PPO	855	2,9	3,7	3- 4,0
PLL	877	3,0	2,0	2,0- 4,0
PLO	879	9,3	7,7	4,0-10,0
POO/PSL	881	17,8	20,2	18,0-23,0
LnLL	899	4,0	2,0	2,0 -5,0
LLL/LnLO	901	1,6	1,0	1,0-2,0
LLO/LnOO	903	4,8	2,2	5,0-10,0
LOO/SLL	905	12,4	14,2	12,5-20,0
OOO/SLO	907	32,2	36,2	35,0-59,0
SOO/SSL	909	9,7	6,0	8,0 -10,0

### 4.3.3- Composição de TAG do óleo de canola

A **Figura 17** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de canola. Este óleo possui como ácidos graxos principais 3,9% de ácido palmítico, 1,9% de ácido esteárico, 64,1% de ácido oléico, 18,7% de ácido linoléico e 9,2% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$  encontrados por EASI(+)<sup>MS</sup>, segundo a **Tabela 8**.



**Figura 17.** Espectro EASI(+)<sup>MS</sup> do óleo de canola.

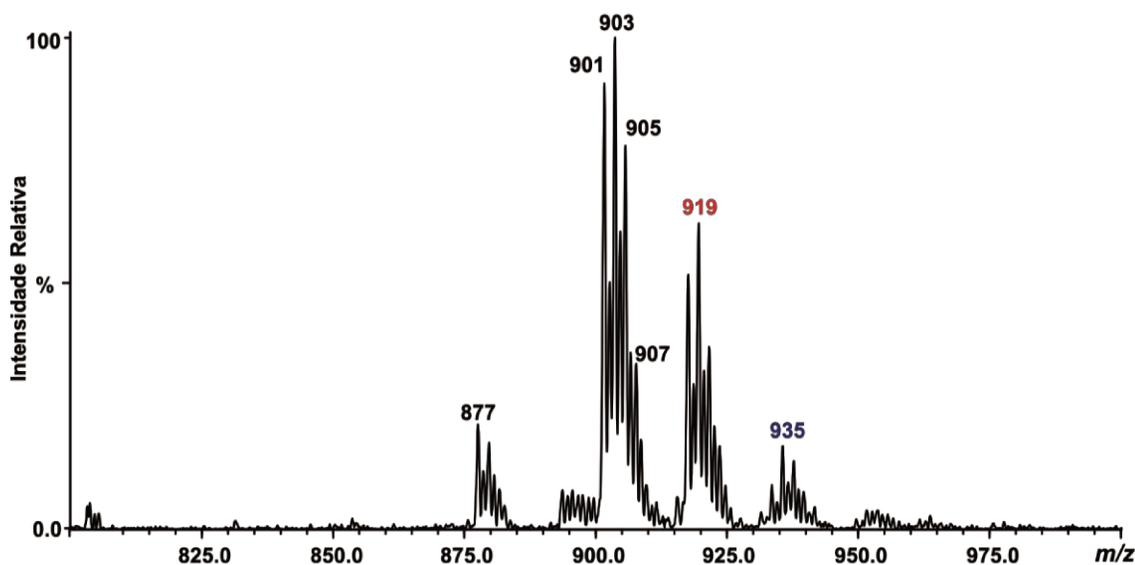
Pelos cálculos do software foram atribuídos 97,5% das combinações de TAG identificados por GC-FID e 2,5% correspondem a outras combinações possíveis. Os TAG tanto calculados por EASI(+)<sup>MS</sup>, quanto calculados pelos resultados de ácidos graxos por GC-FID, estão dentro dos teóricos apresentados por Firestone<sup>43</sup>, como os mesmos não são dados por faixa existe uma diferença entre os TAG LLO e OOO. Comparando EASI<sup>MS</sup> com GC-FID existem pequenas diferenças nos íons de  $m/z$  875 e 909. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de canola, rico em TAG OOO como azeite de oliva, avelã, canola e óleo de buriti. O íon de  $m/z$  923 corresponde ao íon com potássio do TAG OOO/SLO e o íon de  $m/z$  937 corresponde ao hidroperóxido  $[\text{LOO} + \text{OOH} + \text{Na}]^+$  que é um produto de oxidação.

**Tabela 8.** Valores encontrados de TAG para o óleo de canola.

TAG	<i>m/z</i>	% EASI	%GC-FID	% Teórica
PLnL	875	4,5	5,6	4,6
PLL	877	3,8	2,0	1,4
PLO	879	3,7	3,2	5,7
LnLL	899	9,2	7,0	8,2
LLL/ LnLO	901	9,0	8,1	8,6
LLO/ LnOO	903	16,0	17,0	10,4
LOO/SLL	905	23,0	22,1	22,5
OOO/SLO	907	28,8	28,1	21,4
SSL/SOO	909	2,0	3,3	2,6

#### 4.3.4- Composição de TAG do óleo de girassol

A **Figura 18** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de girassol que possui como ácidos graxos principais 6,8% de ácido palmítico, 4,7% de ácido esteárico, 18,6% de ácido oléico, 68,2% de ácido linoléico e 0,5% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos [TAG + Na]<sup>+</sup> encontrados por EASI(+)<sup>+</sup> MS, segundo a **Tabela 9**.



**Figura 18.** Espectro EASI(+)<sup>+</sup> MS do óleo de girassol.

Pelos cálculos do software foram atribuídos 95,0% das combinações de TAG identificados por EASI(+) MS e 5% correspondem a outras combinações possíveis. Tanto os TAG calculados por EASI MS, quanto os calculados pelos resultados de ácidos graxos por GC-FID, estão dentro dos teóricos apresentados por Firestone<sup>43</sup>, como os resultados apresentados não são dados por faixa existe uma diferença entre os TAG LLL, LLO e LOO.

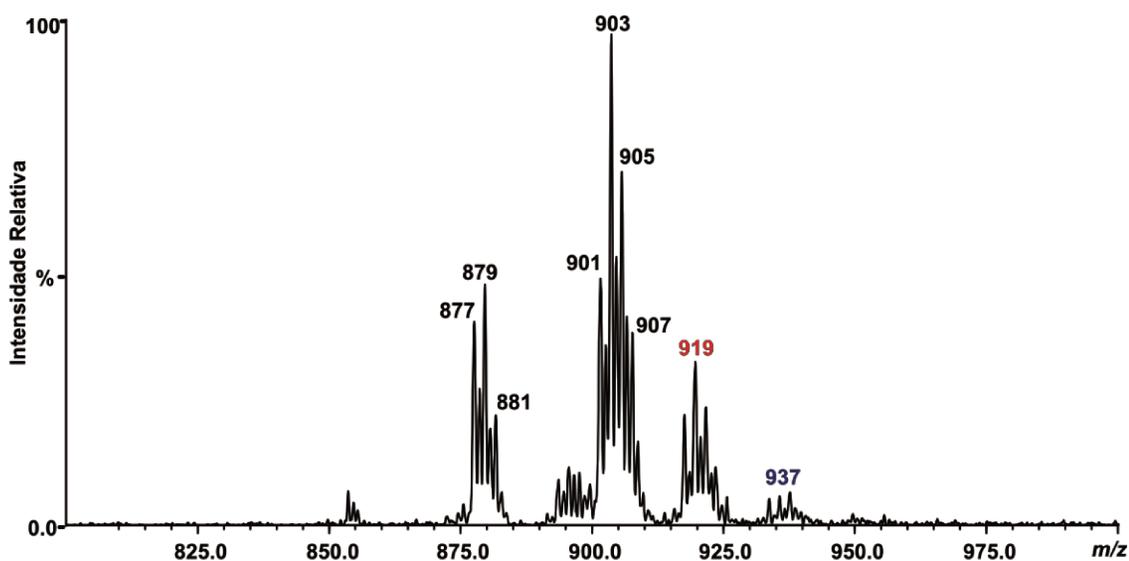
**Tabela 9.** Valores encontrados de TAG para o óleo de girassol.

TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% GC-FID	% Teórica
PPL	853	0,5	0,6	0,8
PLnL	875	2,5	2,4	1,6
PLL	877	7,0	5,7	8,9
PLO	879	6,5	6,3	6,4
POO/PSL	881	2,0	2,4	1,6
PSO	883	0,5	0,4	0,6
LLL/ LnLO	901	22,3	18,4	20,6
LLO/ LnOO	903	33,2	30,6	25,9
LOO/SLL	905	17,3	20,2	14,8
OOO/SLO	907	6,5	6,8	7,0
SOO/SSL	909	1,7	1,2	1,2

Comparando EASI MS com GC-FID existem pequenas diferenças nos íons de *m/z* 901, 903 e 905, mesmo assim não ultrapassam 4%. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de girassol, rico em TAG LLO como os óleos semente de uva, milho, gergelim e castanha do Brasil. O íon de *m/z* 919 corresponde ao TAG com potássio LLO/LnOO e o íon de *m/z* 935 corresponde ao hidroperóxido [LLO+OOH+Na]<sup>+</sup> que é um produto de oxidação.

### 4.3.5- Composição de TAG do óleo de milho

A **Figura 19** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de milho. Ele possui como ácidos graxos principais 15,7% de ácido palmítico, 3,3% de ácido esteárico, 35,2% de ácido oléico, 41,7% de ácido linoléico e 1,5% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$  encontrados por EASI(+) MS, segundo a **Tabela 10**. Pelos cálculos do software foram atribuídos 93,8% das combinações de TAG identificados por GC-FID e 6,2% correspondem a outras combinações possíveis. Tanto os TAG calculados por EASI(+) MS, quanto os calculados pelos resultados de ácidos graxos por GC-FID, estão dentro dos teóricos apresentados por Gustone<sup>45</sup>, existe uma diferença entre os TAG POO/PSL, LLL/LnLO, LLO/LnOO e LOO/SLL.



**Figura 19.** Espectro EASI(+) MS do óleo de milho.

Comparando EASI MS com GC-FID existem pequenas diferenças nos  $m/z$  901, 903 e 905, mesmo assim não ultrapassam 4%. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de milho, rico em TAG LOO como os óleos de girassol,

semente de uva, gergelim e castanha do Brasil. O íon de  $m/z$  919 corresponde ao TAG com potássio LLO/LnOO e o íon de  $m/z$  937 corresponde ao hidroperóxido  $[LOO+OOH+Na]^+$  que é um produto de oxidação.

**Tabela 10.** Valores encontrados de TAG para o óleo de milho.

TAG	$m/z$	% EASI	% GC-FID	% Teórica
PLnL	875	9,0	8,6	8,0
PLL	877	9,0	7,6	9,0
PLO	879	10,0	9,0	12,5
PSL/POO	881	6,0	5,7	3,5
PSO	883	1,0	0,6	0,2
LLL/LnLO	901	14,0	10,8	11,8
LLO/LnOO	903	25,4	23,8	20,0
LOO/SLL	905	18,0	16,5	14,5
OOO/SLO	907	6,0	6,5	6,2
SOO/SSL	909	1,6	1,0	0,6

#### 4.3.6- Composição de TAG do óleo de semente de uva

A **Figura 20** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de semente de uva que possui como ácidos graxos principais 11,0% de ácido palmítico, 6,0% de ácido esteárico, 21,0% de ácido oléico, 58,0% de ácido linoléico e 1,0% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[TAG + Na]^+$  encontrados por EASI MS, segundo a **Tabela 11**. Pelos cálculos do software foram atribuídos 90,0% das combinações de TAG identificados por GC-FID e 10,0% correspondem a outras combinações possíveis. Tanto os TAG calculados por EASI(+) MS, quanto os calculados pelos resultados de ácidos graxos por GC-FID, estão dentro dos teóricos apresentados por Timms<sup>40</sup>, como resultados não são dados por faixa existe uma diferença entre os TAG PLL, LLL/LnLO, LOO/SLL e OOO/SLO. Comparando EASI MS com GC-FID existem pequenas diferenças nos íons de  $m/z$  877, 901 e 907, mesmo assim não ultrapassam 5%. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de semente de uva, rico em TAG LLO como os óleos de girassol, milho, gergelim, soja e castanha do Brasil.

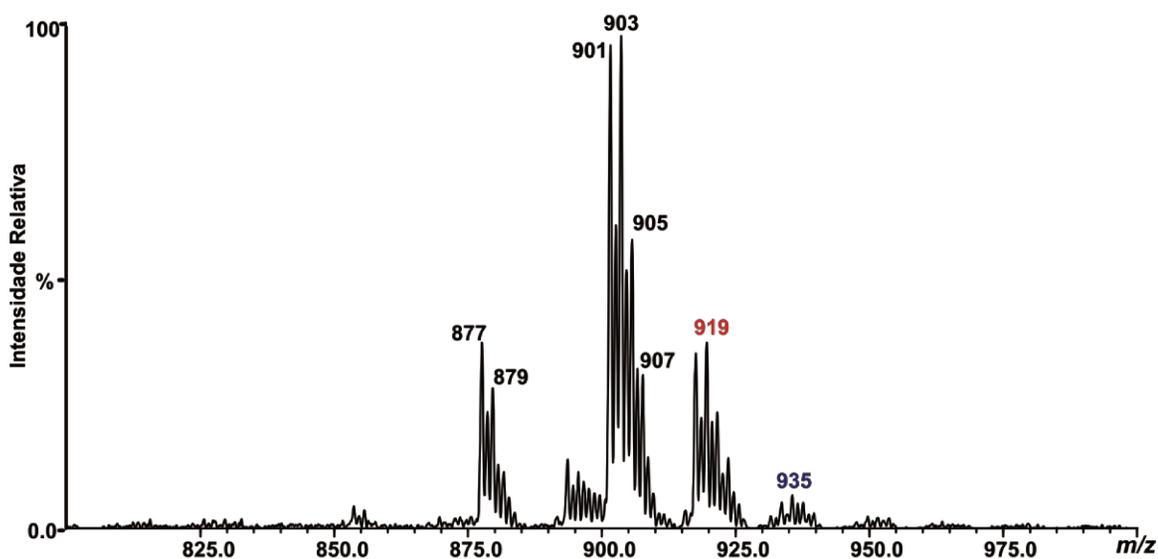


Figura 20. Espectro EASI(+) MS do óleo de semente de uva.

O íon de  $m/z$  919 corresponde ao TAG com potássio LLO/LnOO e o íon de  $m/z$  935 corresponde ao hidroperóxido  $[LLO+OOH+Na]^+$  que é um produto de oxidação.

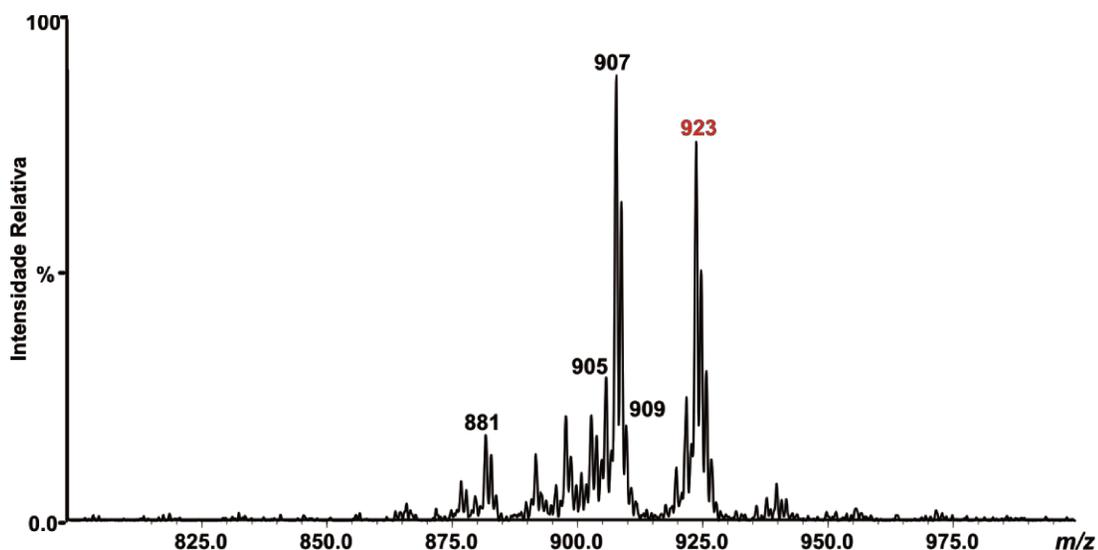
Tabela 11. Valores encontrados de TAG para o óleo de semente de uva.

TAG	$m/z$	% EASI	% GC-FID	% Teórica
PLL	877	10,5	8,1	8,3
PLO	879	7,1	5,9	7,0
POO/PLS	881	3,0	2,9	2,0
LnLL	899	1,9	1,0	0,8
LLL/LnLO	901	25,1	20,2	23,5
LLO/LnOO	903	27,2	28,5	27,0
LOO/SLL	905	15,4	16,8	11,7
OOO/SLO	907	8,0	5,4	5,0
SOO/SSL	909	1,8	1,2	1,6

#### 4.3.7- Composição de TAG do óleo de avelã

A Figura 21 apresenta a caracterização dos TAG do óleo de avelã que possui como ácidos graxos principais 4,7% ácido palmítico, 3,7% de ácido esteárico, 79,0% de ácido oléico, 12,0% de ácido linoléico e apenas 0,1% de ácido linolênico. A combinação

desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[TAG + Na]^+$  encontrados por EASI(+) MS, segundo a **Tabela 12**.



**Figura 21.** Espectro EASI(+) MS do óleo de avelã.

Tanto os TAG calculados por EASI(+) MS, quanto os teóricos apresentados por Firestone<sup>43</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para os TAG LLO/LnOO e OOO/SLO.

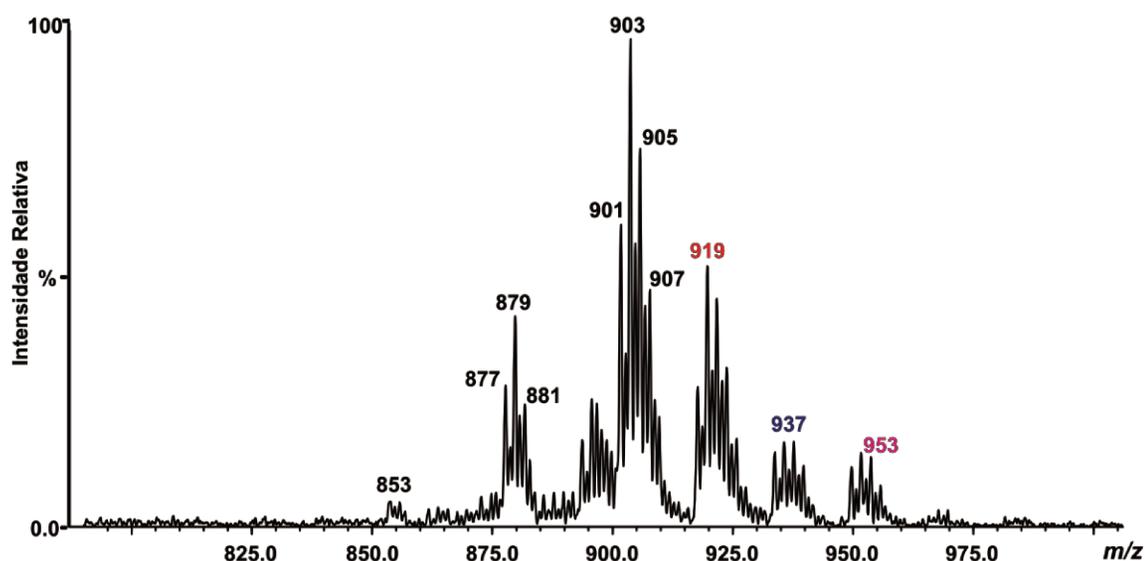
**Tabela 12.** Valores encontrados de TAG para o óleo de avelã.

TAG	<i>m/z</i>	%EASI	% Teórica
PLL	877	0,8	1,0
PLO	879	2,0	3,0-10
POO/PSL	881	3,0	3,0-18,0
LnLL	899	4,5	5,0
LLL/LnLO	901	2,0	0,5-4,0
LLO/LnOO	903	2,0	1,7
LOO/SLL	905	5,5	5,0-24,0
OOO/SLO	907	73,0	35,0-70,0
SOO/SSL	909	7,2	2,0-7,0

O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de avelã, rico em TAG OOO como os óleos de canola, buriti e azeite de oliva. O íon de  $m/z$  923 corresponde ao TAG com potássio OOO/SLO.

#### 4.3.8- Composição de TAG do óleo de gergelim

A **Figura 22** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de gergelim que possui como ácidos graxos principais 10,0% de ácido palmítico, 6,2% de ácido esteárico, 31,2% de ácido oléico, 50,0% de ácido linoléico e apenas 0,7% de ácido linolênico.



**Figura 22.** Espectro EASI(+)-MS do óleo de gergelim.

A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[TAG + Na]^+$  encontrados por EASI(+)-MS, segundo a **Tabela 13**. Tanto os TAG calculados por EASI(+)-MS, quanto os teóricos apresentados por Firestone<sup>43</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para os TAG PLO, LLO/LnOO e LOO/SLL. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de gergelim, rico em TAG

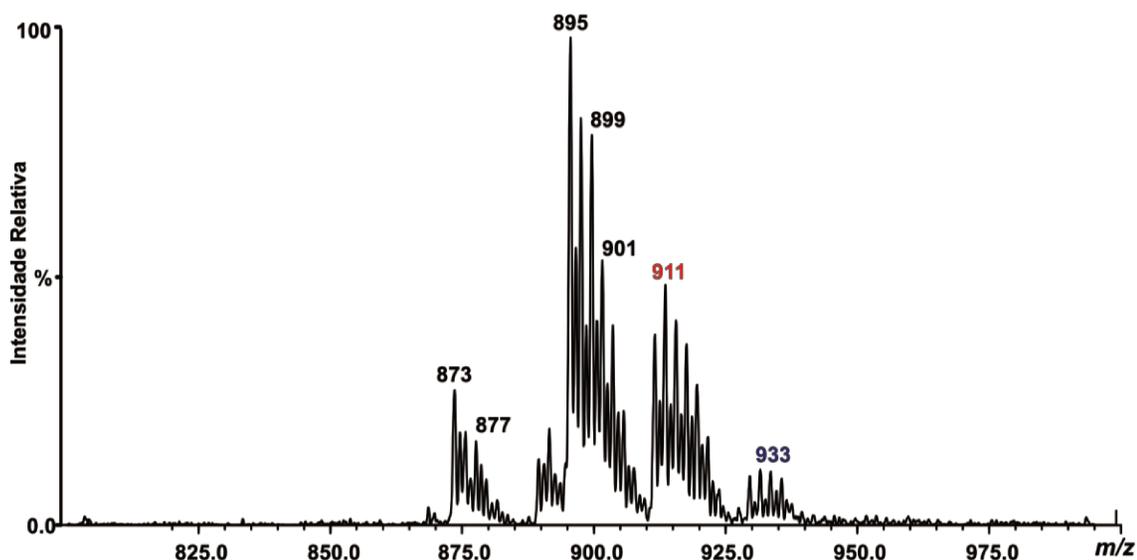
LLO como os óleos de girassol, milho, semente de uva e castanha do Brasil. O íon de  $m/z$  919 corresponde ao TAG com potássio LLO/LnOO. O íon  $m/z$  937 corresponde ao hidroperóxido  $[LOO+OOH+Na]^+$  e o íon de  $m/z$  953 ao mesmo hidroperóxido com potássio que são produtos de oxidação.

**Tabela 13.** Valores encontrados de TAG para o óleo de gergelim.

TAG	$m/z$	%EASI	% Teórica
PPL	853	2,0	0-2,0
PLL	877	6,0	0-8,0
PLO	879	11,3	0-9,0
POO/PLS	881	3,0	0-3,0
LnLL	899	0,7	0-0,5
LLL/LnLO	901	17,0	5,0-20,0
LLO/LnOO	903	28,0	18,0-25,0
LOO/SLL	905	22,0	15,0-20,0
OOO/SLO	907	10,0	4,0-21,0
SOO/SSL	909	5,0	0,5-5,0

#### 4.3.9- Composição de TAG do óleo de linhaça

A **Figura 23** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de linhaça que possui como ácidos graxos principais 6,4% ácido palmítico, 0,5% de ácido palmitoléico, 4,0% de ácido esteárico, 17,0% de ácido oléico, 15,0% de ácido linoléico e um teor de 57,0% de ácido linolênico, esse é o óleo vegetal com maior teor de ácido linolênico estudado. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[TAG + Na]^+$  encontrados por EASI(+) MS, segundo a **Tabela 14**. Tanto os TAG calculados por EASI(+) MS, quanto os teóricos apresentados por Firestone<sup>43</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para LnLnLn, LnLL e LLL/LnLO.



**Figura 23.** Espectro EASI(+) MS do óleo de linhaça.

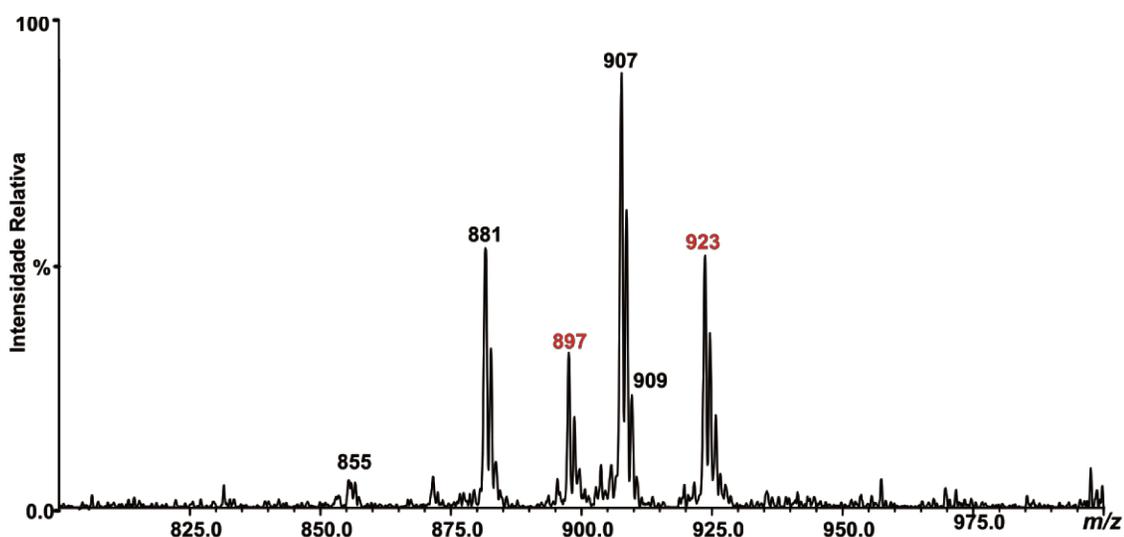
O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de Linhaça, rico em TAG LnLnLn. O íon de  $m/z$  911 corresponde ao TAG com potássio LnLnLn. O íon de  $m/z$  933 corresponde ao hidroperóxido  $[LLL+OOH+Na]^+$  que é um produto de oxidação.

**Tabela 14.** Valores encontrados de TAG para o óleo de linhaça

TAG	$m/z$	% EASI	% Teórica
LnLnPo	871	0,5	1,0
PLnLn	873	8,0	5,0
PLL	877	3,5	3,5
PLO	879	0,8	1,0
POO/PSL	881	0,7	1,0
LnLnLn	895	38,0	32,0
LnLL	899	24,0	22,0
LLL/LnLO	901	19,0	17,0
LLO/LnOO	903	1,0	2,0
LOO/SLL	905	2,0	1,0
OOO/SLO	907	1,8	2,0
SOO/SSL	909	0,7	1,0

#### 4.3.10- Composição de TAG do óleo de buriti

A **Figura 24** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de buriti que possui como ácidos graxos principais 21,6% de ácido palmítico, 2,1% de ácido esteárico, 73,0% de ácido oléico, 1,4% de ácido linoléico e 1,0% de ácido linolênico.



**Figura 24.** Espectro EASI(+) MS do óleo de buriti.

A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[TAG + Na]^+$  encontrados por EASI(+) MS, segundo a **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Valores encontrados de TAG para o óleo de buriti.

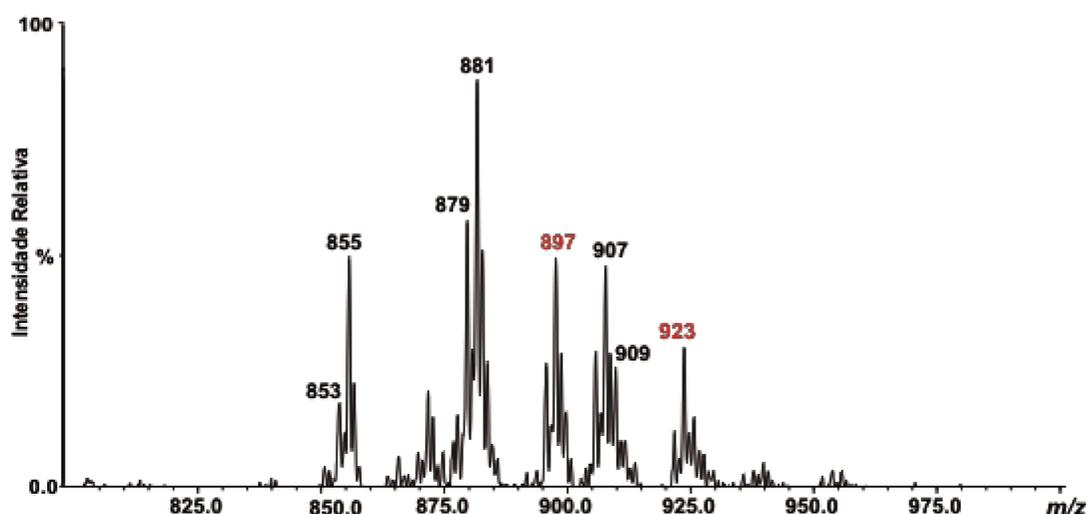
TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% Teórica
PPL	853	1,5	1,0
PPO	855	3,0	5,0
POO/PLS	881	19,4	15,0
LLL/LnLO	901	1,8	1,0
LLO/LnOO	903	0,8	0,5
LOO/SLL	905	0,5	0,8
OOO/SLO	907	69,0	65,0
SOO/SSL	909	4,0	5,0

Tanto os TAG calculados por EASI(+) MS, quanto os teóricos apresentados por Bondar<sup>52</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença

para PPO, POO/PLS e OOO/SLO. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de buriti, rico em TAG OOO como os óleos de canola, avelã e azeite de oliva. O íon de  $m/z$  897 corresponde ao TAG com potássio POO/PLS e o íon de  $m/z$  923 corresponde também a um TAG OOO com potássio.

#### 4.3.11- Composição do TAG do óleo andiroba

A **Figura 25** ilustra a caracterização dos TAG do óleo de andiroba que possui como ácidos graxos principais 27,6% de ácido palmítico, 1,0% de ácido palmitoléico, 8,3% de ácido esteárico, 51,0% de ácido oléico, 10,0% de ácido linoléico e 0,3% de ácido linolênico.



**Figura 25.** Espectro EASI(+)-MS do óleo andiroba.

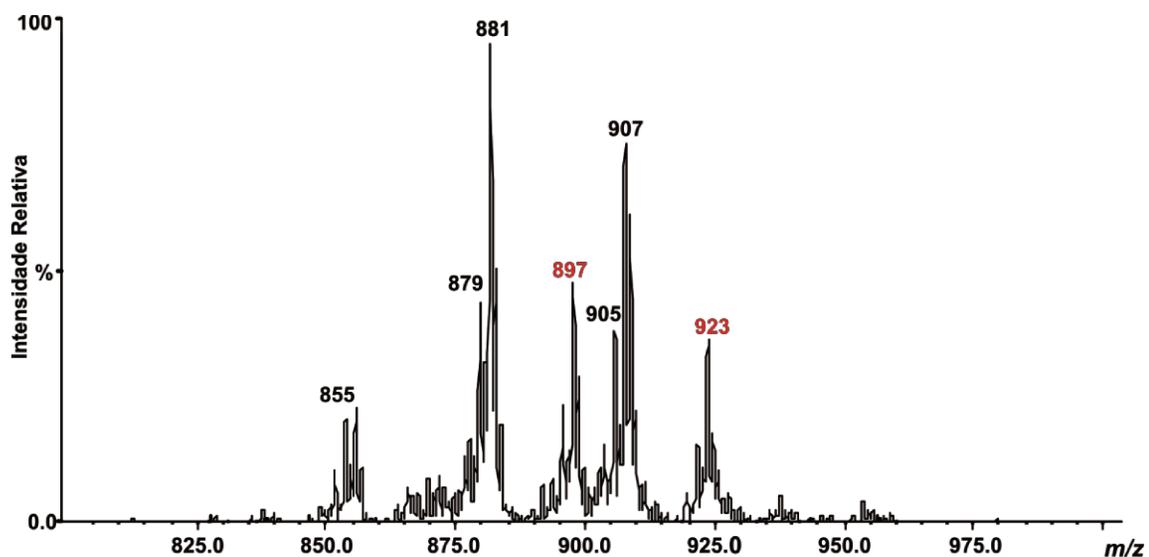
A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[TAG + Na]^+$  encontrados por EASI(+)-MS, segundo a **Tabela 16**. Tanto os TAG calculados por EASI(+)-MS, quanto os teóricos apresentados por Ferraz et al.<sup>54</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para PPO, PLO/PoOO e PSO. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de andiroba, rico em TAG POO como o óleo de açaí, buriti e oliva. O íon de  $m/z$  897 corresponde ao TAG com potássio POO e o íon de  $m/z$  923, também corresponde a um TAG OOO com potássio.

**Tabela 16.** Valores encontrados de TAG para o óleo de andiroba.

TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% Teórica
PPLn	851	1,0	0,8
PPL	853	4,0	5,0
PPO	855	17,0	13,0
PPS	857	2,2	1,8
PLO/PoOO	879	8,2	10,0
POO/PLS	881	23,5	22,0
PSO	883	11,3	8,0
PSS	885	5,0	4,5
LOO/ SLL	905	4,0	3,8
OOO/SLO	907	13,6	13,0
SOO/SSL	909	7,2	7,0
SSO	911	3,0	2,5

#### 4.3.12- Composição de TAG do óleo de açaí

A **Figura 26** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de açaí que possui como ácidos graxos principais 27,0% ácido palmítico, 5,0% de ácido palmitoléico, 1,8% de ácido esteárico, 56,0% de ácido oléico, 9,0% de ácido linoléico e 0,8% de ácido linolênico.



**Figura 26.** Espectro EASI(+)-MS do óleo de açaí.

A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$  encontrados por EASI(+)<sup>MS</sup>, segundo a **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Valores encontrados de TAG para o óleo de açaí.

TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% Teórica
PPO	855	8,0	6,0
PoLnLn	871	2,3	3,0
PLO/PoOO	879	5,5	7,0
POO/PLS	881	36,0	38,0
LLLn	899	1,8	1,0
LLL/LnLO	901	0,9	0,8
LLO/LnOO	903	1,0	3,0
LOO/ SLL	905	8,5	8,0
OOO/SLO	907	26,0	23,0
SOO/SSL	909	10,0	2,0

Tanto os TAG calculados por EASI(+)<sup>MS</sup>, quanto os teóricos apresentados por Rogez<sup>58</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para PPO, POO/PLS e OOO/SLO. O perfil do espectro de massas mostrado por EASI é bem característico para óleo de açaí, contem alto teor do TAG OOO como os óleos de canola, avelã e azeite de oliva, mas se destaca pelo conteúdo do TAG POO, assim como a andiroba, possuindo espectros de EASI(+)<sup>MS</sup> muito semelhantes, diferenciados sutilmente pelo teor do TAG PPO. O íon de *m/z* 897 corresponde ao TAG com potássio POO/PLS e o íon de *m/z* 923 corresponde também a um TAG OOO/SLO com potássio.

#### 4.3.13- Composição de TAG do óleo de castanha do Brasil

A **Figura 27** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de castanha do Brasil que possui como ácidos graxos principais 16,0% de ácido palmítico, 9,2% esteárico, 29,0% de oléico, 44,0% de linoléico e 0,8% de oléico.

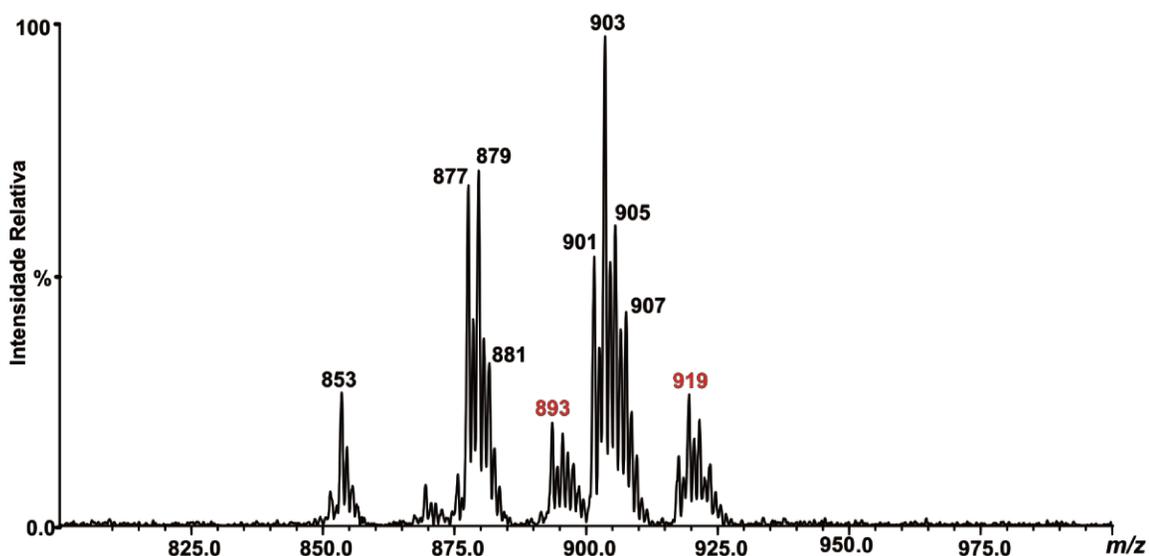


Figura 27. Espectro EASI(+) MS do óleo de castanha do Brasil.

Tanto os TAG calculados por EASI MS, quanto os teóricos apresentados por Correia<sup>51</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para PLL, LLO/LnOO e OOO/SLO.

Tabela 18. Valores encontrados de TAG para o óleo de castanha do Brasil.

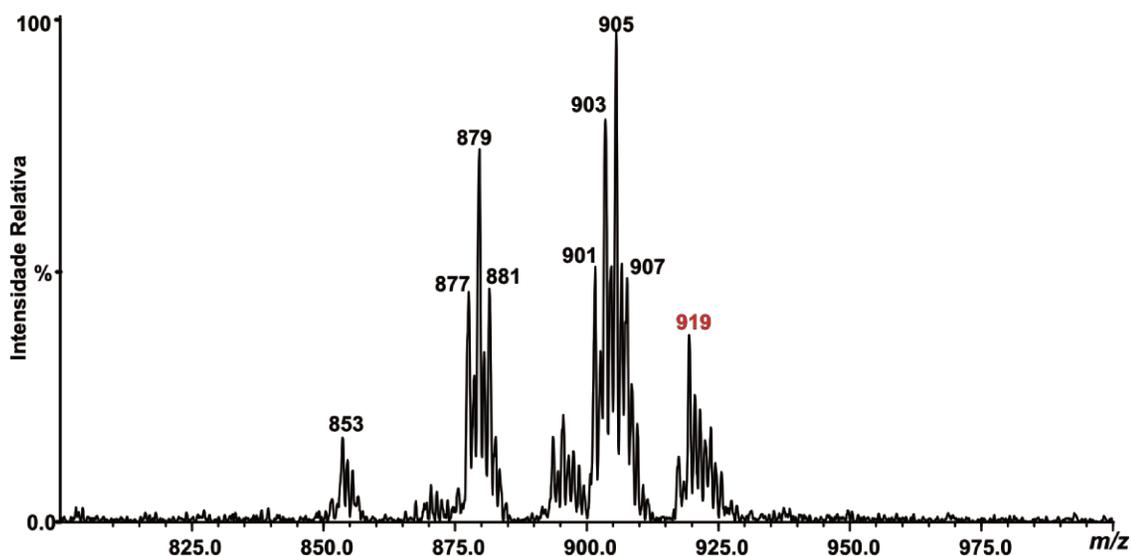
TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% Teórica
PPL	853	7,0	8,0
PPO	855	2,0	3,0
PLL	877	12,0	10,0
PLO	879	16,0	15,0
POO/PLS	881	5,0	6,0
PSO	883	1,6	1,0
LLL/LnLO	901	7,0	7,0
LLO/LnOO	903	25,0	20,0
LOO/SLL	905	13,0	13,0
OOO/SLO	907	8,0	6,0
SOO/SSL	909	3,4	3,0

O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de castanha do Brasil, contém alto teor do TAG LLO como os óleos de milho e gergelim e possuindo espectro de EASI(+) MS muito semelhantes. O íon de *m/z* 893 corresponde

ao TAG com potássio PLL e o íon de  $m/z$  919 corresponde também a um TAG LLO/SLL com potássio.

#### 4.3.14- Composição de TAG do óleo de pinhão manso

A **Figura 28** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de pinhão manso que possui como ácidos graxos principais 8,4% de ácido palmítico, 8,0% de ácido esteárico, 42,0% de ácido oléico, 38,0% de ácido linoléico e 0,2% de ácido linolênico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$  encontrados por EASI(+) MS, segundo a **Tabela 19**.



**Figura 28.** Espectro EASI(+) MS do óleo de pinhão manso.

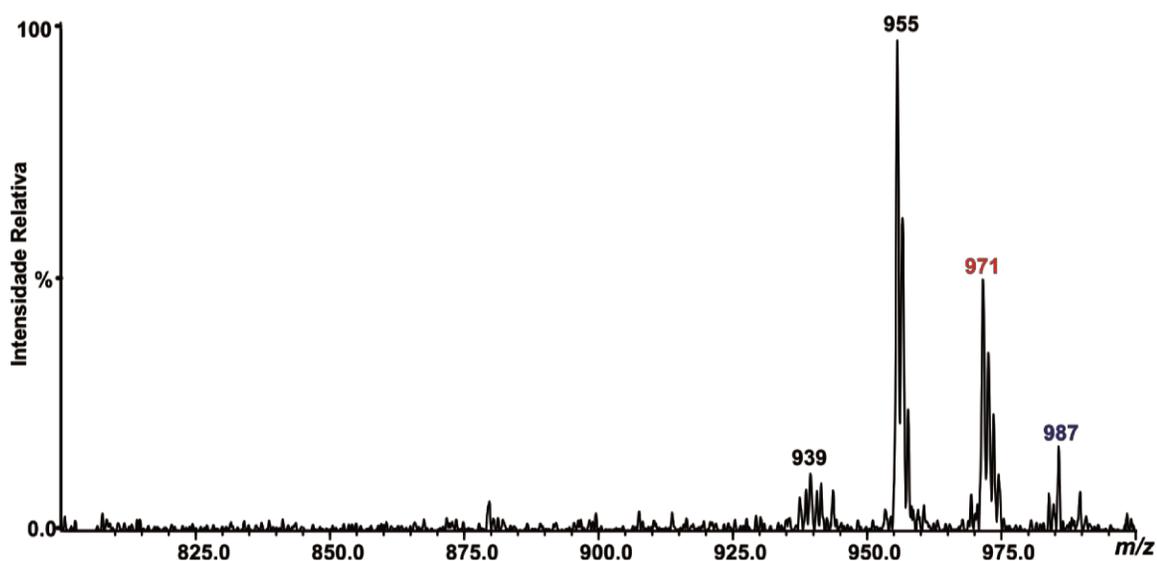
Tanto os TAG calculados por EASI(+) MS, quanto os teóricos apresentados por Firestone<sup>43</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para PLL e LOO/LnOO. O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de pinhão manso, contém alto teor do TAG LOO além de grande quantidade do TAG LLO. O íon de  $m/z$  919 corresponde ao TAG com potássio LLO/LnOO.

**Tabela 19.** Valores encontrados de TAG para o óleo de pinhão manso.

TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% Teórica
PPL	853	4,0	5,0
PPO	855	3,2	3,0
PLL	877	10,8	9,0
PLO	879	15,0	14,0
POO/PSL	881	7,0	8,0
PSO	883	0,6	1,0
LLL/LnLO	901	10,0	9,0
LLO/ LnOO	903	17,0	16,0
LOO/SLL	905	23,0	20,0
OOO/SLO	907	5,0	6,0
LOO/SSL	909	4,4	5,0

#### 4.3.15- Composição de TAG do óleo de mamona

A **Figura 29** apresenta a caracterização dos TAG do óleo de mamona que possui como ácidos graxos principais 1,2% de ácido esteárico, 4,7% de ácido oléico, 6,2% de ácido linoléico, 0,6% de ácido linolênico, 83,1% de ácido ricinoléico e 2,0% de ácido araquídico. A combinação desses ácidos graxos fornece a composição de TAG que pode ser comparada com a intensidade relativa normalizada dos [TAG + Na]<sup>+</sup> encontrados por EASI(+)<sup>+</sup> MS, segundo a **Tabela 20**.



**Figura 29.** Espectro EASI(+)<sup>+</sup> MS do óleo de mamona.

Tanto os TAG calculados por EASI (+) MS, quanto os teóricos apresentados por Beltrão et al.<sup>62</sup> apresentam boa concordância de valores, existindo uma pequena diferença para o TAG RRR.

**Tabela 20.** Valores encontrados de TAG para o óleo de mamona.

TAG	<i>m/z</i>	% EASI	% Teórica
RRO	939	8,3	9,0
ASS	941	6,9	5,0
RRR	955	84,8	77,0

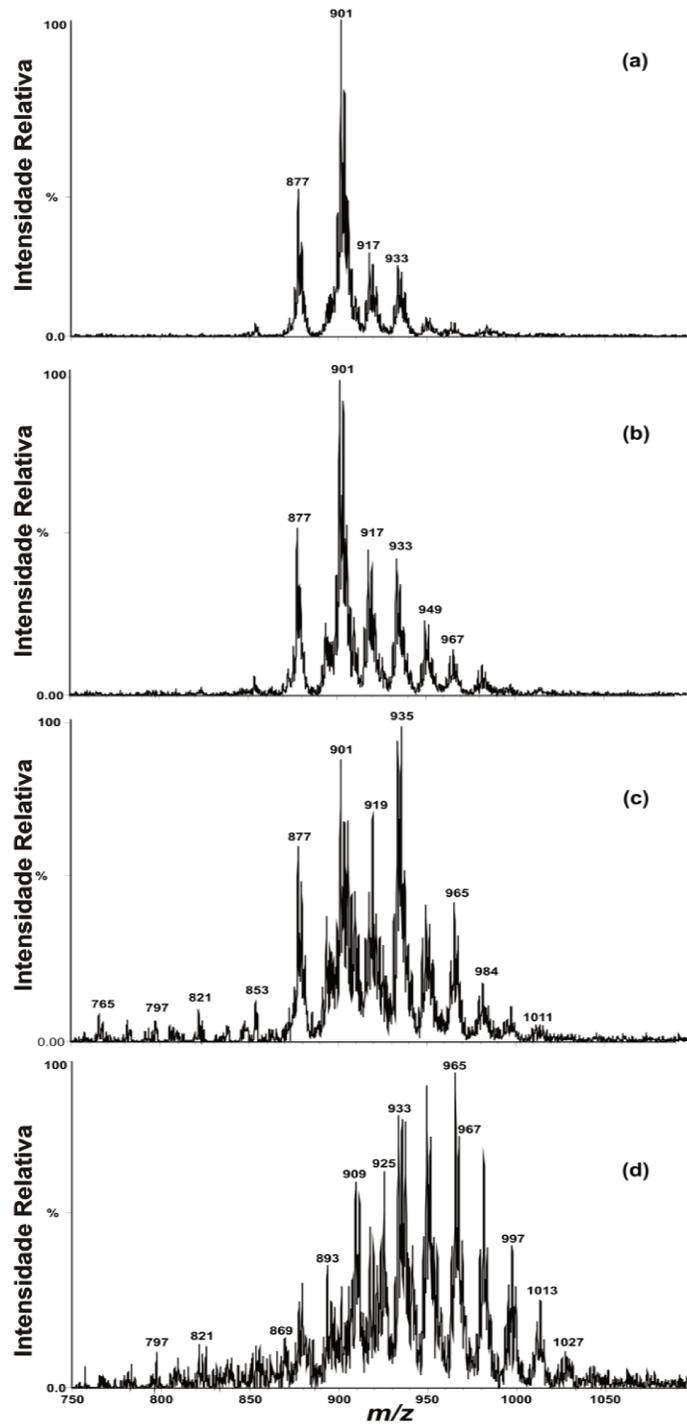
O perfil do espectro mostrado por EASI é bem característico para óleo de mamona, que possui um perfil inconfundível devido ao seu alto teor de TAG RRR. O íon de *m/z* 971 corresponde ao TAG com potássio RRR e o íon de *m/z* 987 corresponde ao hidroperóxido [RRR+OOH+Na]<sup>+</sup> que é um produto de oxidação.

#### 4.4- Caracterização de hidroperóxidos por EASI MS

Os estudos de oxidação foram montados reproduzindo as condições de análise do Rancimat<sup>94</sup>. Foram escolhidos dois óleos que possuem na sua constituição TAG majoritários com níveis de insaturação diferentes, óleo de soja rico em LLL (C18: 2- C18: 2- C18: 2), com seis insaturações e maior velocidade de reação e azeite de oliva que possui grandes quantidades de OOO (C18:1- C18:1- C18:1) com três insaturações.

Durante a caracterização dos óleos vegetais por EASI(+) MS observou-se a presença de íons que não eram TAG, mas sim produtos primários de oxidação desses TAG também chamados de hidroperóxidos. Este fato ocorreu com os óleos de canola, girassol, milho, semente de uva, gergelim, linhaça e mamona.

A **Figura 30** representa os espectros de óleo de soja após a oxidação acelerada, como exemplo, estão sendo mostrados 4 dos 14 espectros adquiridos durante o experimento. O espectro de massas da amostra de óleo de soja mostra no tempo 0h o íon do TAG mais abundante razão *m/z* 901 [LLL+Na]<sup>+</sup> e o íon do primeiro produto de oxidação (**30a**) razão *m/z* 933 [LLL+OOH+Na]<sup>+</sup> entrada de um hidroperóxido na molécula do TAG LLL pela clivagem da primeira insaturação.

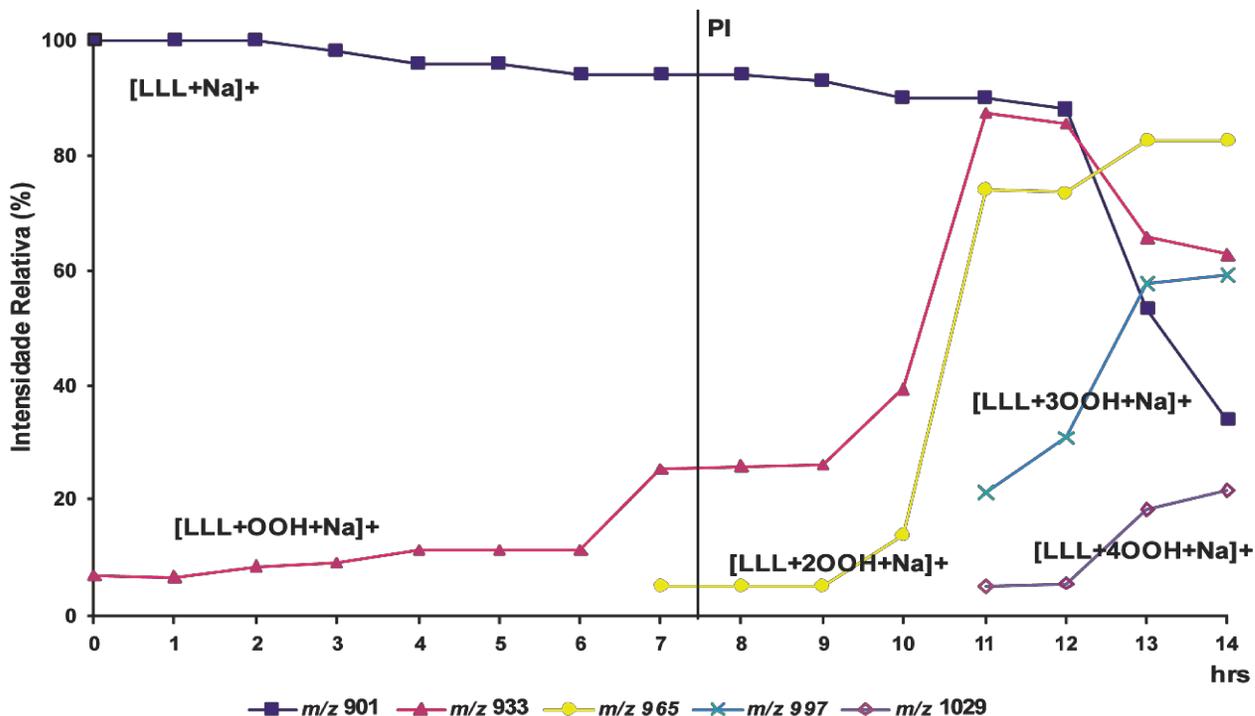


**Figura 30.** Espectros de EASI(+) MS de amostras de óleo se soja analisadas com diferentes tempos de aquecimento. (a) 0 h, (b) 3 h, (c) 7 h e (d) 13 h. Simulação de Rancimat com oxidação acelerada: as amostras foram aquecidas a 110°C , sob fluxo de ar de 20 L h<sup>-1</sup>.

Para melhor compreensão será detalhada apenas a oxidação do TAG majoritário do óleo de soja, o mesmo acontece para os demais TAG e que vai tornando o espectro de massas mais complexo a cada aquisição. Com 3 h de aquecimento o segundo produto de oxidação (**30b**) íon de  $m/z$  965  $[\text{LLL}+2\text{OOH}+\text{Na}]^+$  está no início da sua formação e ocorre aumento do íon de  $m/z$  933. Após 7 h de aquecimento ocorre a inversão nas proporções do íon de  $m/z$  933 com o TAG majoritário (**30c**) íon de  $m/z$  901 e o segundo produto de oxidação íon de  $m/z$  965 aumenta. Após 13 h (**30d**) o íon de  $m/z$  901, já foi ~60% consumido, o íon de  $m/z$  933 começa a diminuir também, provavelmente estão ocorrendo reações de clivagem para a formação de DAG, MAG e reações de polimerização<sup>105</sup>. Pode-se observar também o terceiro hidroperóxido íon de  $m/z$  997  $[\text{LLL}+3\text{OOH}+\text{Na}]^+$  numa concentração relativamente alta e a formação inicial do quarto hidroperóxido íon de  $m/z$  1029  $[\text{LLL}+4\text{OOH}+\text{Na}]^+$ . Como o TAG LLL apresenta seis duplas ligações seria possível observar ainda os hidroperóxidos íons de  $m/z$  1061  $[\text{LLL}+5\text{OOH}+\text{Na}]^+$  e  $m/z$  1093  $[\text{LLL}+6\text{OOH}+\text{Na}]^+$ , entretanto o tempo de aquecimento não foi suficiente.

A **Figura 31** mostra o monitoramento dos produtos de oxidação durante o tratamento de oxidação acelerada transformado em gráfico para melhor visualização. É possível notar que o primeiro hidroperóxido, íon de  $m/z$  933 após 7 h sofreu elevação de concentração, sendo que em 7,5 h ocorreu o período de indução (determinado pelo Rancimat) simultaneamente ao aparecimento do segundo hidroperóxido íon de  $m/z$  965. No monitoramento de 14 h foi possível acompanhar o aparecimento de mais duas espécies íon de  $m/z$  997 e  $m/z$  1029. Após 11 h de aquecimento vai ocorrendo um decaimento suave do íon de  $m/z$  901, até que em 13 h ele começa a decair rapidamente. O mesmo vai ocorrendo para os demais produtos de oxidação primários que estão na fase de iniciação e propagação da auto-oxidação<sup>38</sup>.

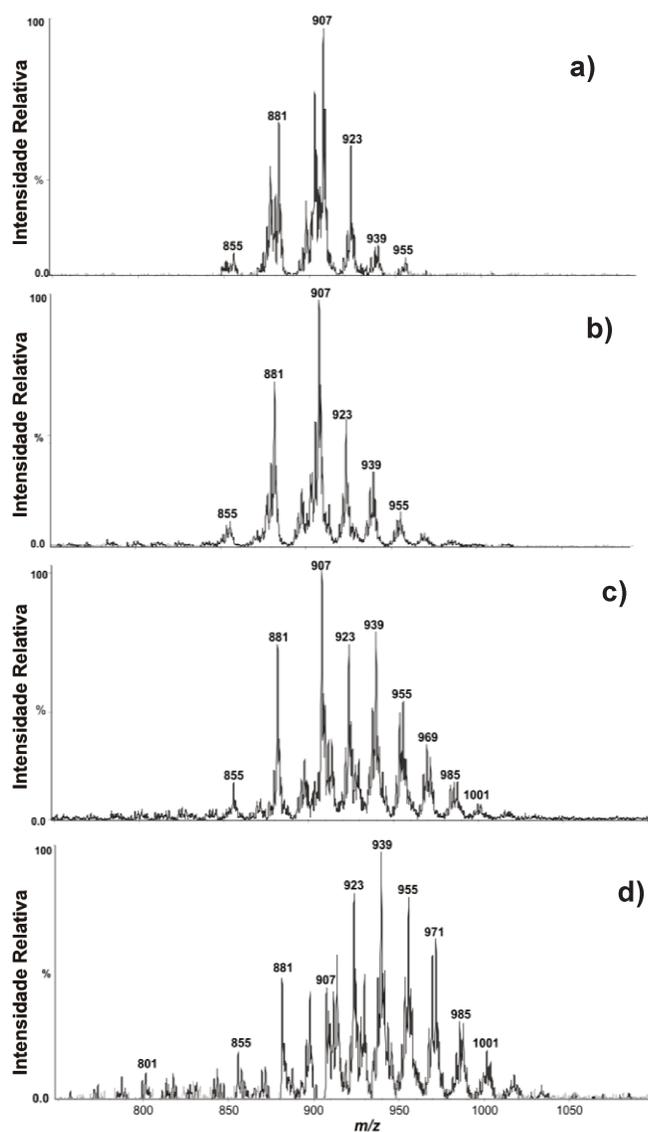
A **Figura 32** mostra espectros de massas do azeite de oliva em diferentes tempos de aquecimento<sup>106</sup>, para efeito de comparação serão considerados os TAG POO íon de  $m/z$  881 e OOO íon de  $m/z$  907. O azeite de oliva é mais estável à oxidação, pois possui TAG com número menor de insaturações do que o óleo de soja. Prova disso é que o período de indução (15 h) é duas vezes maior do que o óleo de soja, ou seja, ele demora mais para formar os hidroperóxidos<sup>107</sup>.



**Figura 31.** Monitoramento da oxidação feita por EASI(+) MS para o TAG LLL do óleo de soja.

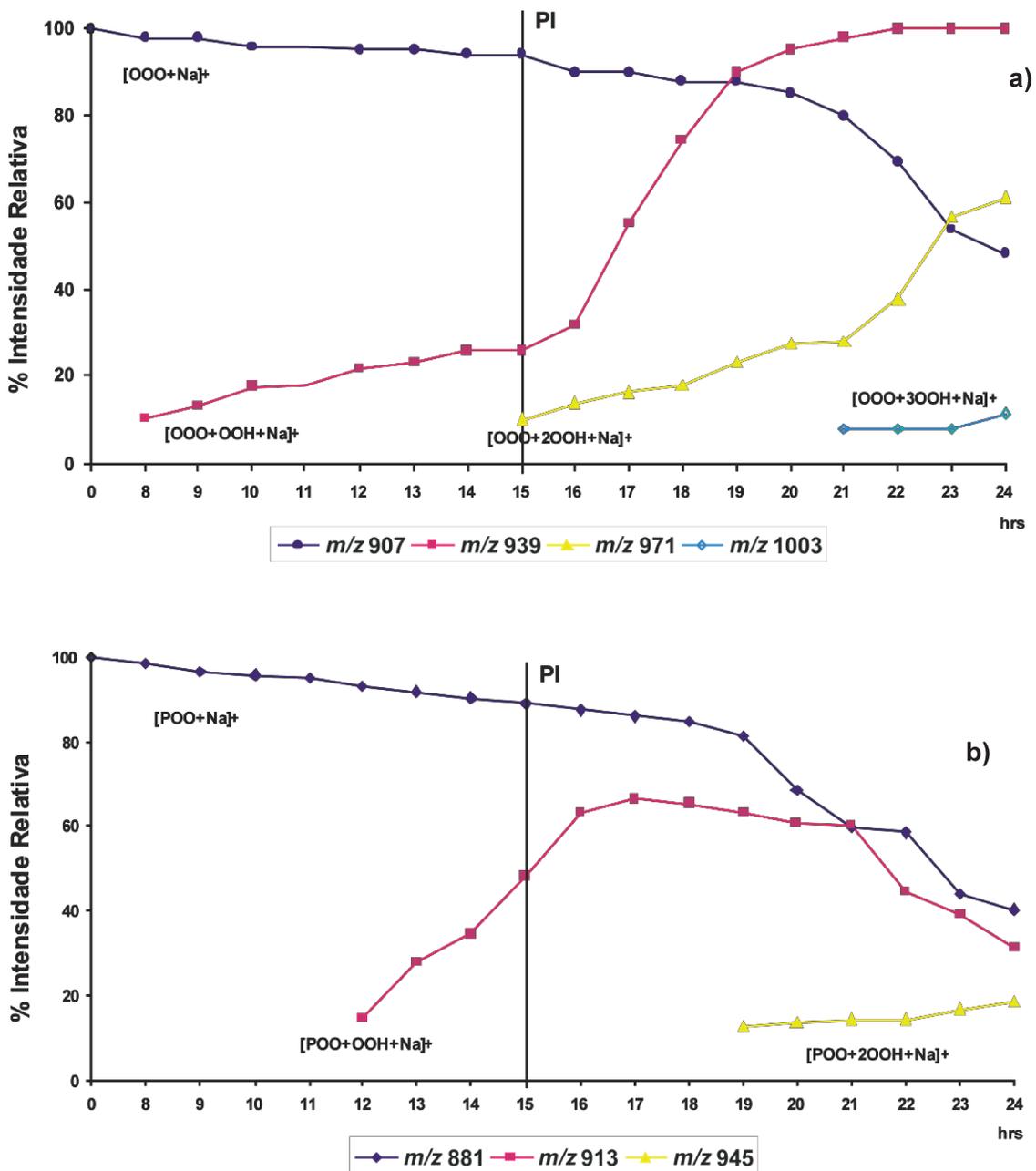
No início do experimento (**32a**) pode-se observar que o TAG OOO, íon de  $m/z$  907  $[OOO+Na]^+$  e uma pequena formação do primeiro produto de oxidação, o íon de  $m/z$  939  $[OOO+OOH+Na]^+$ . Como já era conhecido o período de indução e a idéia era realizar o experimento em um único dia a primeira medida foi feita com 8 h (**32b**) ocorreu pouca evolução do íon de  $m/z$  939. Após 15 h (**32c**), momento em que atinge o período de indução, o segundo produto de oxidação começa a ser formado o íon de  $m/z$  971  $[OOO+2OOH+Na]^+$  e após 21 h (**32d**) ocorre a formação do último produto de oxidação, o íon de  $m/z$  1003  $[OOO+3OOH+Na]^+$ .

A **Figura 33**, mostra a evolução da oxidação dos TAG OOO com 3 insaturações e do TAG POO com 2 insaturações do azeite de oliva. O monitoramento por EASI MS pode medir a velocidade de reação da fase inicial da auto-oxidação já que é possível observar cada espécie formada ao longo do tempo. A oxidação do TAG OOO (**33a**) mostra que enquanto os produtos de oxidação são formados  $[OOO+OOH+Na]^+$ ,  $[OOO+2OOH+Na]^+$  e  $[OOO+3OOH+Na]^+$ , o TAG principal  $[OOO+Na]^+$  vai diminuindo.



**Figura 32.** Espectros de EASI(+) MS de amostras de azeite de oliva analisadas com diferentes tempos de aquecimento. (a) 0 h, (b) 8 h, (c) 15 h e (d) 21 h. Simulação de Rancimat com oxidação acelerada: as amostras foram aquecidas a 110°C e sob fluxo de ar de 20 L h<sup>-1</sup>.

Já a oxidação do TAG POO, íon de  $m/z$  881 [POO+Na]<sup>+</sup> (**33b**) presente no azeite de oliva é mais lenta por apresentar apenas 2 insaturações<sup>107</sup>. Começa em 12 h com o aparecimento do íon de  $m/z$  913 [POO+OOH+Na]<sup>+</sup>, o mesmo comportamento de diminuição do TAG POO majoritário é observado. Após 19 h ocorre o aparecimento do segundo produto de oxidação, o íon de  $m/z$  945 [POO+2OOH+Na]<sup>+</sup>.



**Figura 33.** Monitoramento da oxidação feita por EASI(+) MS para o azeite de oliva, (a) curva para o TAG OOO íon de  $m/z$  907 e (b) curva para o TAG POO íon de  $m/z$  881.

Comparando o TAG OOO com o POO existe uma diferença de 12 h para a formação do primeiro produto de oxidação do POO em relação ao OOO e de 4 h para a formação do segundo produto de oxidação, mostrando na prática a importância do grau de insaturações dos compostos em relação à estabilidade dos óleos vegetais.

## 5.0- CONCLUSÕES

Os espectros de massas para as análises por EASI MS mostraram, sem necessidade da etapa previa de separação como GC ou HPLC, o perfil de TAG que compõe os diferentes óleos vegetais. Enquanto GC e HPLC utilizam corridas de 10 a 50 minutos, gastam solventes orgânicos e necessitam de preparo elaborado de amostras, EASI(+) MS fornece resultados similares em apenas 1 minuto de análise por amostra e sem a necessidade de nenhum preparo. Testes preliminares mostraram que é possível estabelecer uma correlação entre valores obtidos por normalização dos dados de EASI(+) MS com o valor esperado para cada TAG que constitui um determinado óleo vegetal. Além disso, o conhecimento dos ácidos graxos livres obtidos por EASI(-) MS pode ser utilizado tanto em controle de qualidade para verificar a eficiência de processos de refino de óleos vegetais, quanto para verificar o aparecimento de AGL pela elevação da acidez e conseqüente degradação do óleo. A técnica de EASI apresenta a desvantagem de não separar formas isoméricas de TAG como POO e OPO e não identificar TAG de mesma massa molecular como OOO e SLO.

O EASI(+) MS caracteriza também os hidroperóxidos presentes na amostra e sua evolução ao longo do tempo, sendo uma análise discriminatória, pois é possível acompanhar a oxidação de cada TAG que constitui o óleo vegetal em relação aos produtos de degradação formados. É uma metodologia interessante para complementar o Rancimat, testar a eficiência de antioxidantes e variações no processamento de óleos vegetais. A desvantagem dessa técnica para monitorar hidroperóxidos é que à medida que o óleo vai sofrendo polimerização por aquecimento se torna mais viscoso e posteriormente semi-sólido, portanto quando o grau de oxidação está avançado é necessário diluir a amostra em solvente compatível para continuar a análise.

Os resultados obtidos neste trabalho representam a possibilidade de demonstrar na prática, de forma direta toda a teoria de oxidação de óleos vegetais, bem como desenvolver uma nova ferramenta para tipificação quanto a origem e controle de qualidade de óleos vegetais.

## 6.0- PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo principal deste estudo foi identificar o perfil de TAG de óleos vegetais, exemplificado com 15 amostras diferentes. Contudo, é necessário validar a técnica de EASI(+) MS para o cálculo normalizado de TAG empregando GC-FID com um maior número de amostras por espécie de óleo vegetal, pois os dados relatados possuem devido ao alto grau de concordância, mas o número usado é pequeno e por isso não pode ser considerado significativo. Existe também a questão de estabelecer a linearidade da técnica de ionização EASI MS para AGL e TAG contidos nos óleo vegetal. Como a aplicação prática é viável para a quantificação tanto de ácidos graxos quanto de TAG e existe um profundo interesse comercial, torna-se imprescindível que estudos mais aprofundados sejam feitos como perspectivas futuras para tornar a quantificação normalizada por EASI MS para TAG uma realidade. Os estudos de oxidação por EASI MS podem evoluir de oxidação acelerada para modelos de termo-oxidação que são utilizados para a área de fritura, possibilitando o estudo de dímeros e polímeros realizados hoje por cromatografia de exclusão de tamanho, *High-Performance Size-Exclusion Chromatography* (HPSEC), mas que são de grande interesse para a área de alimentos.

# **-CAPÍTULO 3-**

## Caracterização de Petróleo por Espectrometria de Massas de Altíssima Exatidão e Resolução



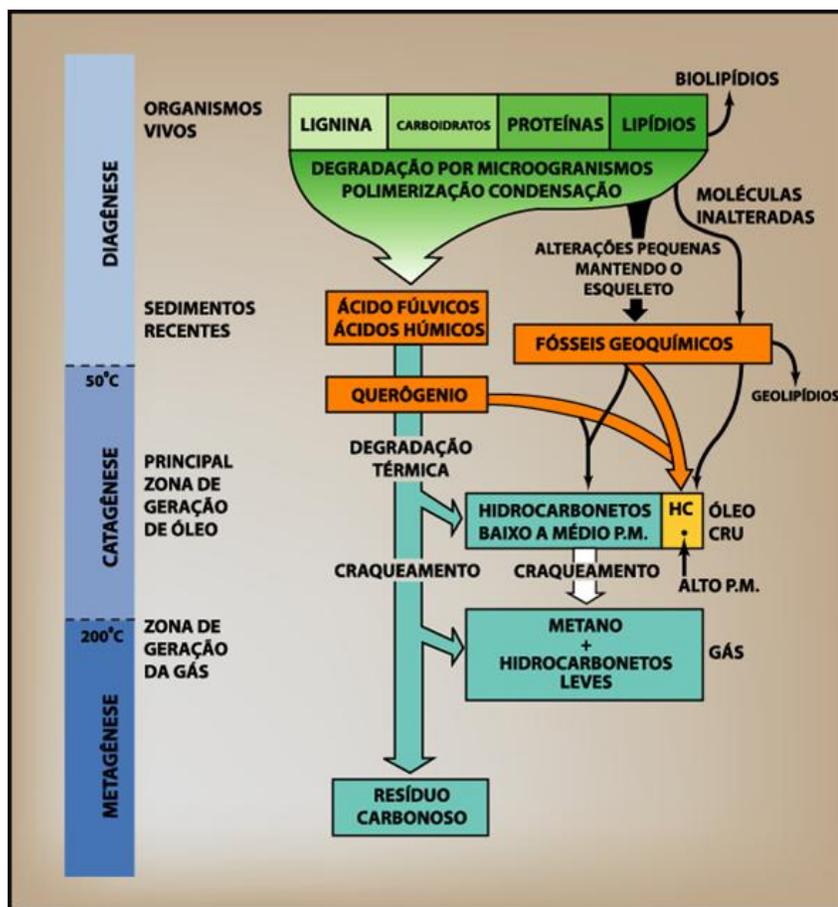
## 1.0- PETRÓLEO: A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE COMPOSTOS POLARES

### 1.1- Composição química e formação do petróleo

O petróleo é definido como um óleo mineral formado por uma mistura complexa de compostos que são classificados em quatro grupos: hidrocarbonetos saturados (cíclicos, acíclicos ou parafinas e naftênicos), hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos. O petróleo apresenta também quantidades significativas de nitrogênio, enxofre e oxigênio além de pequenas quantidades de níquel, vanádio e outros elementos<sup>108,109</sup>.

Atualmente a teoria mais aceita para explicar a formação do petróleo é denominada teoria orgânica moderna, de acordo com a qual o petróleo é formado a partir de matéria orgânica incorporada às rochas sedimentares durante o processo de sedimentação. O termo matéria orgânica refere-se às moléculas orgânicas na forma de monômeros ou polímeros derivados direta ou indiretamente de organismos vivos<sup>108</sup>. O petróleo é formado a partir de uma série de transformações físico-químicas da matéria orgânica depositada nas bacias sedimentares, a qual sofreu soterramento progressivo que podem ser agrupadas de acordo com os seguintes estágios evolutivos: diagênese, catagênese, metagênese (**Figura 34**)<sup>110</sup>.

A diagênese é o processo inicial de alteração química, física ou biológica da matéria orgânica submetida a condições de baixa temperatura e pressão. Essas alterações ocasionam a formação do geopolímero que compreende a transformação dos biopolímeros (proteínas, lipídios, carboidratos e ligninas) da biomassa original. Durante o início da diagênese, um dos principais agentes da transformação da matéria orgânica é a atividade microbiológica. Ao final desse processo a biomassa original é convertida em querogênio, porção da matéria orgânica sedimentar insolúvel em solventes orgânicos<sup>108</sup>.



**Figura 34.** Evolução da matéria orgânica durante a sedimentação e soterramento <sup>110</sup>.

Após um considerável aumento da temperatura e pressão o querogênio é degradado e forma o petróleo, esse estágio é denominado catagênese. Neste estágio a temperatura apresenta-se em torno de 50 a 120°C, o que favorece várias transformações químicas da matéria orgânica, como por exemplo, as reações de craqueamento termocatalítico, isomerização, aromatização e resultando na devida conversão do querogênio em óleo e gases enriquecidos. Esta zona madura também é denominada de “janela” de geração de óleo ou simplesmente “janela de óleo” <sup>108</sup>.

A última fase da evolução da matéria orgânica sedimentar é a metagênese. Neste estágio final de transformação do querogênio e do óleo é produzido metano e ao final do processo restará um carbono residual. Estas transformações ocorrem em uma faixa de temperatura de 150 a 200°C e pressões mais elevadas <sup>108</sup>.

### 1.1.1- Hidrocarbonetos saturados e naftênicos

Os hidrocarbonetos saturados, alcanos entre C1 a C100, são moléculas com cadeias formadas por uma sucessão de átomos de carbonos lineares como o pentano, hexano ou ramificadas como o pristano e o fitano. A concentração de hidrocarbonetos saturados no petróleo depende das condições genéticas, principalmente da natureza e tipo de matéria orgânica do ambiente deposicional <sup>109</sup>. Os hidrocarbonetos naftênicos representam as cicloparafinas que compõem a fração de média a alta massa molecular dos hidrocarbonetos do petróleo e geralmente são formados de cinco a seis anéis de carbono na molécula. Dentre os hidrocarbonetos cíclicos, os esteranos tetracíclicos e os triterpanos pentacíclicos constituem dois subgrupos geoquimicamente muito importantes, chamados de biomarcadores <sup>108</sup>.

### 1.1.2- Hidrocarbonetos aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos ou cíclicos contêm ligações simples e duplas alternadas no mesmo anel. O exemplo mais simples é o benzeno, composto cíclico de seis membros contendo três ligações duplas e três ligações simples localizadas em posições alternadas em um anel plano de seis átomos de carbono <sup>111</sup>. Cada um dos átomos de carbono está também covalentemente ligado a um átomo de hidrogênio. Os hidrocarbonetos aromáticos podem consistir de anéis fundidos entre si, isto é, tendo dois ou mais átomos de carbono em comum, como por exemplo, o naftaleno. Normalmente no petróleo há ocorrência de hidrocarbonetos aromáticos com vários anéis fundidos, denominados polinucleares; hidrocarbonetos aromáticos fundidos com hidrocarbonetos cíclicos chamados de cicloaromáticos e todos estes tipos podem apresentar cadeias alquílicas designados como alquilaromáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos são encontrados no petróleo de todo mundo e determinadas razões envolvendo esses compostos são úteis na classificação do petróleo. Um exemplo é a determinação da origem do petróleo, visto que, petróleos com *input* de matéria orgânica terrestre apresentam alta proporção de compostos aromáticos <sup>108</sup>.

### 1.1.3- Resinas e asfaltenos

As resinas e asfaltenos são constituintes mais pesados do petróleo, geralmente contendo átomos diferentes de carbono e hidrogênio, os chamados heteroátomos. Nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O) são os heteroátomos mais comuns desta classe orgânica, também chamada de compostos NSO<sup>111</sup>, fazem parte da fração mais pesada do óleo e devem ser considerados como os membros finais de alta massa molecular da série aromática e nafteno-aromática, sendo solúveis em solventes polares. Estes compostos são constituídos por estruturas policíclicas aromáticas ou núcleos nafteno-aromáticos. Para as resinas, propõe-se uma estrutura composta por longas cadeias parafínicas ligadas a anéis naftênicos ou também sistemas de anéis aromáticos condensados e naftênicos com heteroátomos distribuídos pela molécula. As resinas apresentam de um a seis anéis na estrutura e possuem substituintes com grande comprimento de cadeia<sup>108</sup>.

### 1.2- Compostos polares (NSO)

Os compostos polares (NSO) contidos na fração aromática variam de 3 a 15% dependendo da origem do petróleo (média ~5%). São considerados impurezas, pois quanto maior é o conteúdo de polares menor é o valor comercial do petróleo. Os processos de refino podem ser tornar mais caros não só pela alteração no perfil de destilação como também pela redução da qualidade dos produtos<sup>108,113</sup>. A caracterização molecular do petróleo combina técnicas de separação e métodos espectroscópicos por ser a mistura orgânica de maior complexidade existente, devido ao número de classes químicas distintas que o compõem<sup>112</sup>, assim a caracterização das frações de petróleo é feita pela combinação de inúmeras técnicas analíticas e a fração polar é determinada por métodos de análise elementar que expressa o teor total em porcentagem de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Dados da literatura apontam que ~90% dos petróleos leves<sup>p</sup> e ~70% dos petróleos pesados<sup>q</sup> são constituídos de

---

<sup>p</sup> O petróleo leve possui API maior que 31 e contém, além de alcanos, uma porcentagem de 15 a 25% de cicloalcanos<sup>112</sup>.

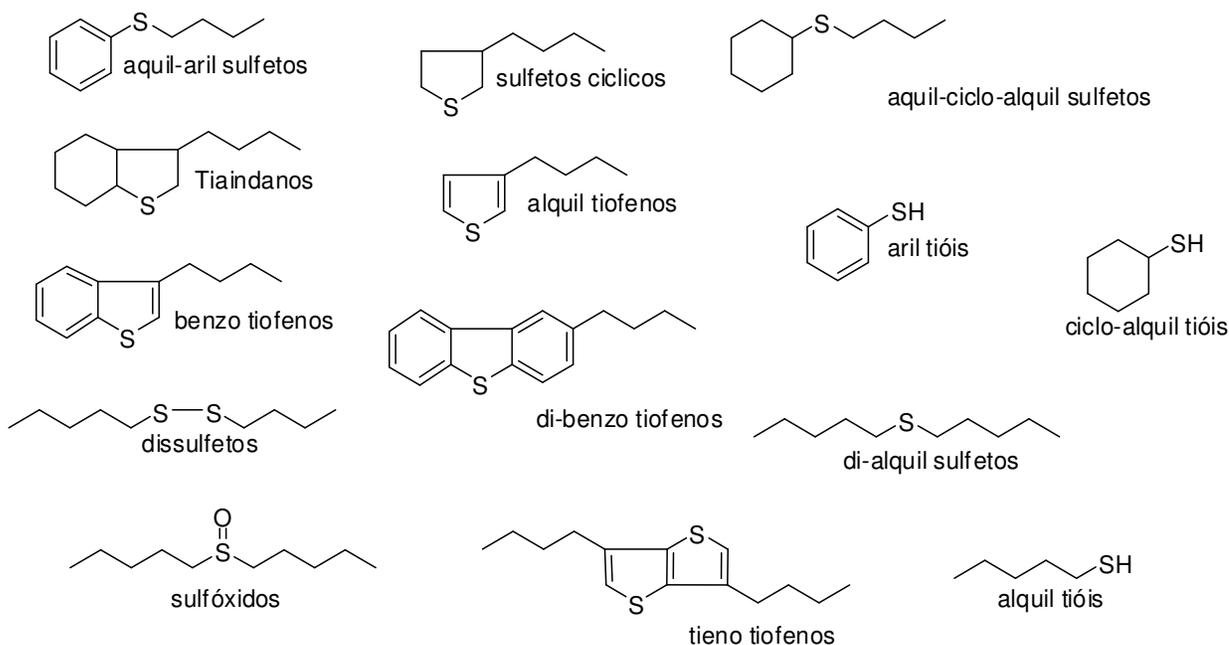
hidrocarbonetos saturados e naftênicos. A fração aromática junto com resinas e asfaltenos correspondem a ~10% e ~30%, respectivamente <sup>113</sup>. A análise dos NSO surge num momento em que a busca por metodologias que permitam entender melhor a composição de polares e permitam também acompanhar a sua eliminação nos processos de refino é de extrema importância no contexto mundial. O momento não poderia ser mais propício, pois o preço do petróleo vem subindo constantemente e o mercado recorre a uso de petróleos mais pesados, mais ácidos e com maior teor de enxofre, visto que as jazidas de petróleo com menos enxofre perfazem os menores volumes das reservas mundiais.

### 1.2.1- Compostos sulfurados (S)

Os compostos de enxofre estão presentes no petróleo na faixa de 0,05 a 14%, em média não excedem 4% <sup>114</sup>, em geral estão distribuídos através de todas as faixas de destilação do petróleo. Os compostos de enxofre são divididos em cinco grandes classes: tióis, sulfetos, dissulfetos, sulfóxidos e tiofenos. As quatro primeiras podem ser divididas em espécies cíclicas e acíclicas (alquil e aril e seus derivados). Os tiofenos apresentam anéis aromáticos como benzo, dibenzo, naftobenzo-tiofenos e outros derivados. As estruturas químicas de alguns compostos de enxofre, chamados também de S-compostos são vistas na **Figura 35**. Apresentam na sua estrutura combinações com outros heteroátomos como N ou O, com espécies do tipo SO, NS, NOS entre outras. A natureza dos S-compostos (e de outros tipos de heteroátomos) pode aumentar muito o ponto de ebulição das frações de petróleo. A classe mais encontrada são os tiofenos e seus derivados. O restante são sulfetos (cíclicos e acíclicos) e sulfóxidos em menor quantidade. Dependendo da natureza da molécula, a redução do enxofre nos processos de tratamento pode se tornar mais fácil devido as suas características químicas <sup>113</sup>.

---

<sup>q</sup> O petróleo pesado possui API entre 14 a 19, é constituído, praticamente, só de hidrocarbonetos aromáticos. Grau API é uma escala hidrométrica idealizada pelo *American Petroleum Institute* - API, juntamente com a *National Bureau of Standards*, utilizada para medir a densidade relativa do petróleo que inversamente proporcional a densidade de líquidos como a água <sup>112</sup>.



**Figura 35.** Exemplos de S-compostos encontrados em petróleo.

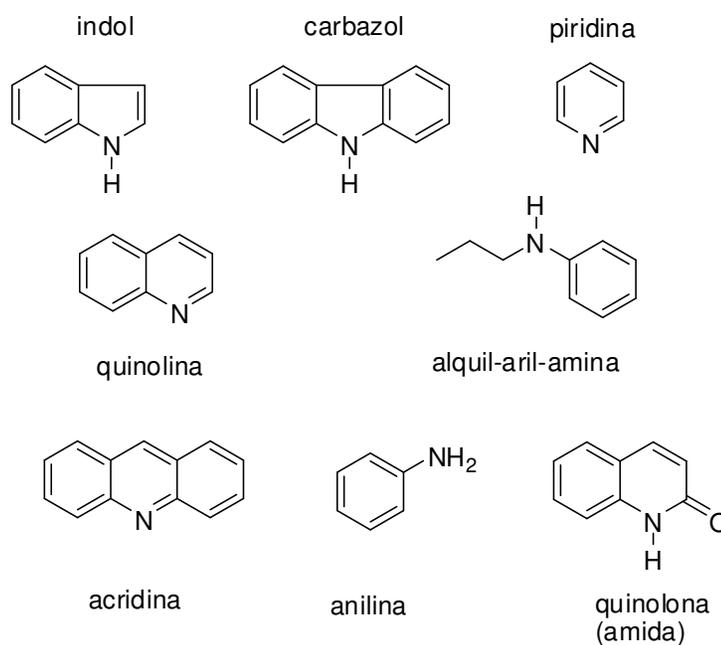
Os compostos de enxofre não tiofênicos são particularmente abundantes em petróleos imaturos. Já o aumento da concentração dos tiofênicos está relacionada ao aumento da maturação e o que se verifica normalmente é a redução da razão entre os bezotiofenos e os dibenzotiofenos com o aumento da maturação<sup>115</sup>. Os S-compostos estão relacionados também com processos de corrosão e de formação de depósito nas linhas de produção da indústria do petróleo<sup>108</sup>.

### 1.2.2- Compostos nitrogenados (N)

Os compostos nitrogenados estão presentes no petróleo em quantidades muito baixas, de 0,01 a 0,8%, em média 0,4%. A concentração dos compostos nitrogenados (N-compostos) aumenta significativamente nas frações destiladas de petróleo após 345°C, aumentando assim a capacidade do óleo em reter água e formar emulsões<sup>113</sup>. Os N-compostos apresentam na sua estrutura combinações com outros heteroátomos como S ou O, com espécies do tipo NO, NS, NOS entre outras.

Existe no petróleo N-compostos de caráter básico ou ácido. Os compostos com caráter básico são os derivados da piridina, alguns pirróis, os azo (bases médias), as aminas primárias (bases fortes), os N-alkil-indóis e alquil-aril-aminas (bases fracas). Os compostos ácidos são os indóis, carbazóis, porfirinas, pirróis e a maior parte das amidas<sup>113</sup>. A **Figura 36** apresenta alguns tipos de N-compostos identificados no petróleo.

A **Tabela 21** mostra os N-compostos presentes em duas faixas de destilação (370-535°C e 535-675°C) de quatro amostras de petróleo diferentes. A faixa de destilação de 535-675°C apresenta maior número de compostos com N básico para os benzo análogos da piridina, os diazo compostos, os derivados pirrólicos e as amidas. Enquanto a faixa de destilação de 370-535°C apresenta maior número de compostos ácidos para os derivados pirrólicos e amidas. Derivados pirrólicos podem apresentar caráter ácido ou básico, sendo que os compostos com N ácidos estão em maior concentração, enquanto que as amidas possuem maior concentração de N básicos.

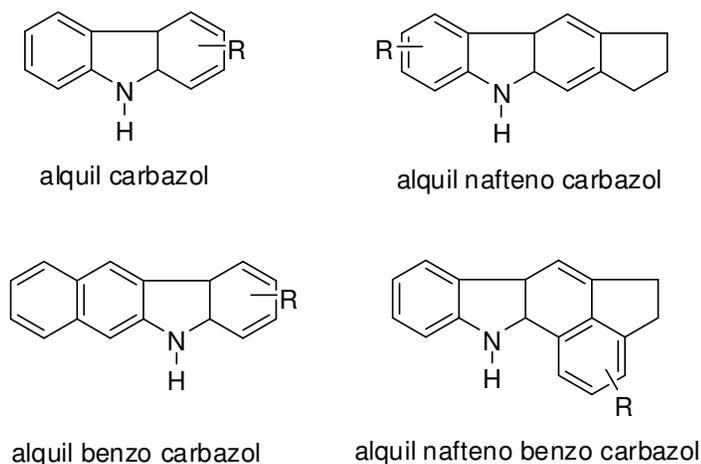


**Figura 36.** Exemplos de N-compostos encontrados em petróleo.

**Tabela 21.** Distribuição de N-compostos de caráter ácido (A) e básico (B) encontrados em frações destiladas de quatro amostras de petróleo <sup>116</sup>.

Petróleo faixa de destilação	% N-compostos					
	Benzo análogos piridina B	Diazo compostos B	Derivados pirrólicos		Amidas	
			B	A	B	A
Wilmington						
370°- 535° C	3,5	1,2	0,5	0,9	1,7	0,1
535°- 675° C	7,2	2,9	0,5		2,0	
Gach Saran						
370°- 535° C	1,2	0,5	0,0	0,5	0,3	0,3
535°- 675° C	3,9	2,6	0,2		2,0	
Recluse						
370°- 535° C	0,5	0,4	0,0	1,0	0,2	0,1
535°- 675° C	1,9	0,9	0,0	1,7	0,5	0,2
Swan Hill						
370°- 535° C	0,7	0,6	0,1	0,8	0,8	0,3
535°- 675° C	2,2	1,3	0,2		0,8	
<b>média 370°- 535° C</b>	<b>5,9</b>	<b>2,6</b>	<b>0,6</b>	<b>3,2</b>	<b>3,0</b>	<b>0,8</b>
<b>média 535°- 675° C</b>	<b>15,2</b>	<b>7,7</b>	<b>0,9</b>	<b>1,7</b>	<b>5,3</b>	<b>0,2</b>

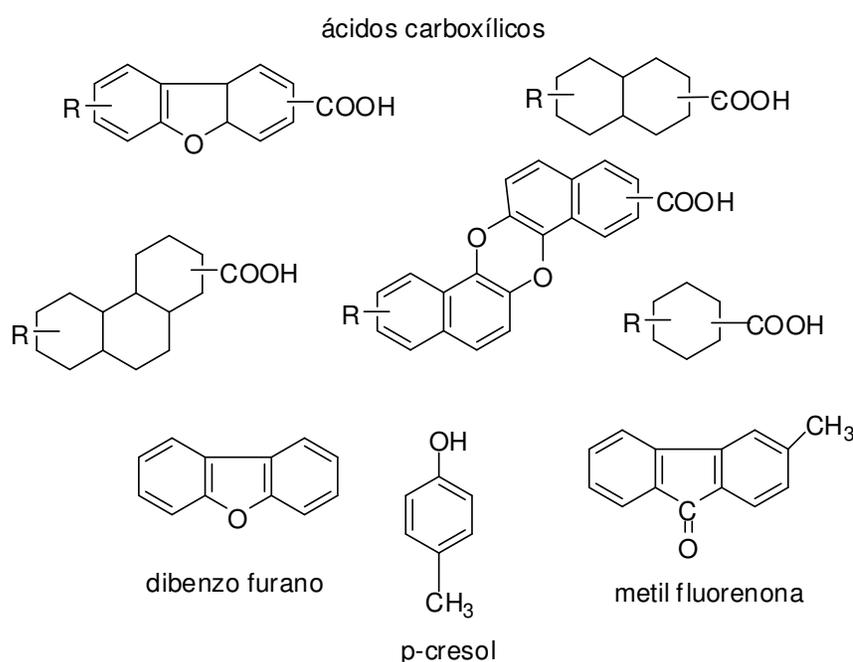
Dentre os N-compostos de caráter ácido, os carbazóis são os mais abundantes (**Figura 37**). É possível afirmar que 70 a 75% dos N-compostos presentes na fração de nafta e gás óleo são N de caráter ácido, a maior parte carbazóis e alguns indóis, o restante é N de caráter básico como piridinas e quinolinas <sup>117</sup>.



**Figura 37.** Exemplos de carbazóis encontrados no petróleo.

### 1.2.3- Compostos oxigenados (O)

Os compostos oxigenados (O-compostos) aparecem no petróleo, principalmente como ácidos carboxílicos e fenóis. Os O-compostos estão presentes no petróleo em quantidade de 0,1 a 2%, o valor médio não excede 1% do seu conteúdo total. São responsáveis pela acidez e coloração (ácidos naftênicos), odor (fenóis) e formação de emulsões, depósitos e corrosividade das frações do petróleo<sup>118</sup>. A **Figura 38** mostra alguns tipos de O-compostos.



**Figura 38.** Exemplos de O-compostos encontrados em petróleo.

Os ácidos são compostos comuns no petróleo imaturo, geralmente são encontrados compostos saturados de C1 a C20 (de um a vinte átomos de carbono) e isoprenóides ácidos<sup>108</sup>. Já foram identificados em petróleo da Venezuela e Califórnia ácidos carboxílicos ciclopentanos e ciclohexanos C6-C20 e ácido ciclopentil acético C8-C10. Alguns ácidos carboxílicos são de origem natural do petróleo (derivados do hopano), mas outros são resultados da degradação do óleo original e de processos químicos e bioquímicos de oxidação<sup>118</sup>.

Os ácidos naftênicos e naftênicos aromáticos são os tipos mais abundantes, acompanhados por outros tipos poliaromáticos e heterocíclicos. Existe um interesse particular em identificar ácidos carboxílicos esteróides, pois podem indicar a contribuição de animais na formação do petróleo<sup>119</sup>. Os ácidos pentacíclicos derivados do hopano são considerados por Ourisson et al.<sup>120</sup> derivados lipídicos de bactérias como o C35 “bacteriohopano tetrol” e outros derivados de membranas de bactérias. Vários fenóis e particularmente os cresóis, são abundantes na fração ácida do petróleo. Outros O-compostos têm sido identificados em menores quantidades como cetonas, alquil ou ciclo fluorenonas e dibenzo furanos<sup>108</sup>. Os O- compostos apresentam também outros heteroátomos formando classes como NO, SO, NO<sub>2</sub>, entre outras.

### **1.3- A importância dos compostos polares na exploração, na produção e no refino de petróleo**

A indústria do petróleo pode ser descrita como um grande processo, composto basicamente pelas seguintes atividades: exploração, produção e refino.

A atividade de exploração envolve a descoberta e a delimitação de reservatórios de petróleo através da perfuração de poços exploratórios<sup>121</sup>.

A atividade denominada desenvolvimento da produção envolve a perfuração de poços de desenvolvimento e a instalação de equipamentos para a produção, processamento, injeção, estocagem e transporte de óleo, gás e água. Esses equipamentos são agrupados em estações de produção em terra (*on shore*) ou em plataformas no mar (*off shore*), ou seja, a produção ocupa-se da operação das estações de produção e plataformas<sup>121</sup>.

O refino do petróleo consiste na série de beneficiamentos pelos quais passa o óleo bruto, para a obtenção de seus derivados. Esses beneficiamentos englobam etapas físicas e químicas de separação que originam as grandes frações de destilação. Cada fração do petróleo é ainda uma mistura de hidrocarbonetos formada por um número menor de substâncias e sua separação só é possível porque as frações

apresentam diferentes pontos de ebulição. Refinar petróleo é, portanto, separar as frações desejadas como gasolina, querosene, óleo diesel, nafta, gás de cozinha, entre tantas outras, processá-las e dar acabamento de modo a se obter produtos de alto valor agregado <sup>122</sup>.

A exploração é o primeiro campo onde compostos polares podem fazer a diferença fornecendo informações valiosas sobre a origem relacionada aos vários ambientes deposicionais das rochas geradoras <sup>123,124</sup>, o grau de evolução térmica dos óleos (maturação) <sup>125</sup> e o nível de biodegradação <sup>126</sup> tornando-se imprescindíveis no estudo de sistemas petrolíferos. A pesquisa por novos indicadores moleculares se faz necessária quando nos defrontamos, por exemplo, com um universo de amostras que apresentam características moleculares mistas, em decorrência da mistura de óleos com diferentes níveis de biodegradação, provenientes de diferentes rochas geradoras ou com diferentes graus de maturação. Como as respostas para a fase de exploração estão na mistura complexa que é o petróleo, obter novos marcadores polares passa a ser uma necessidade. A petroleômica torna-se necessária então, visto que pela inserção direta do petróleo, com altíssima resolução e exatidão tem-se a possibilidade de obter a caracterização de milhares de compostos polares, assim o custo elevado de um equipamento FT-ICR MS e sua manutenção tornam-se um investimento atrativo e necessário no Brasil e no mundo.

A produção que lida com problemas de perfuração de poços, processamento e estocagem enfrenta também como problemática mais séria a formação de emulsões por compostos nitrogenados e ácidos naftênicos <sup>127</sup> causando formação de depósito em dutos de petróleo. Esses são alguns exemplos que abrangem respostas obtidas por caracterização de polares com o uso do ESI FT-ICR MS <sup>128</sup>. Assim é possível monitorar processos que retiram os N-compostos como o hidrotreatamento por ESI FT-ICR MS <sup>129</sup>, verificar a composição e distribuição das classes de oxigenados com altíssima resolução e exatidão <sup>130</sup>, fazer correlações com ácidos naftênicos <sup>131</sup> e outros ácidos do petróleo <sup>132</sup>, entre outras possibilidades que já estão sendo estudadas com muito sucesso em petroleômica.

Os problemas que atingem o refino como o envenenamento de catalisadores, torna necessário a remoção dos NSO que se concentram em determinadas

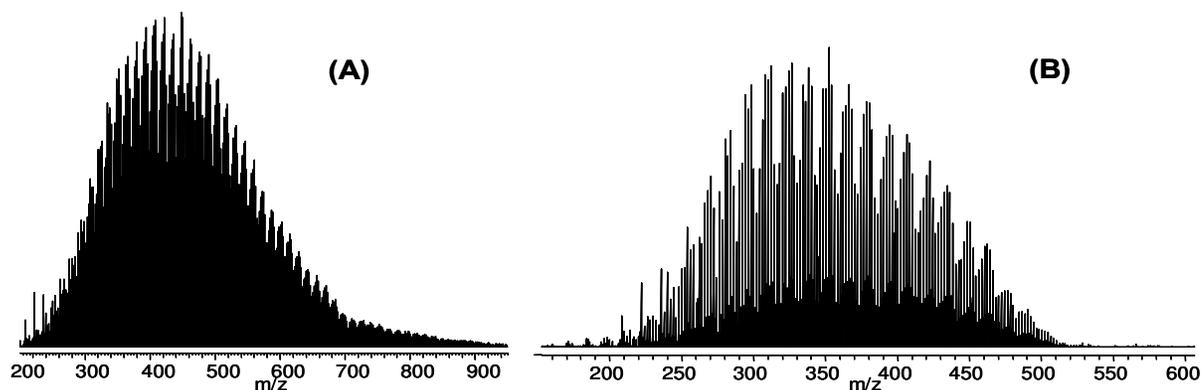
frações<sup>133,134</sup> é essencial para um produto de qualidade assegurada como o querosene de aviação<sup>135</sup>, as corrosões em torres de destilação podem ou não ter correlação com os ácidos do petróleo<sup>136</sup>, mas é necessário pesquisar mais sobre o assunto e todas essas respostas podem ser dadas com a pesquisa dos compostos polares, desde que se tenha um método analítico confiável para sejam feitas afirmações tão relevantes na tentativa de responder perguntas que envolvem toda a indústria do petróleo.

## 2.0- PETROLEÔMICA E SUA FERRAMENTAS

De um modo geral, petroleômica é um novo campo da ciência, em uma designação formal, é um termo utilizado para descrever o estudo de todos os componentes do petróleo e como estes afetam as propriedades e a reatividade de um óleo específico. Possui a capacidade de prever as propriedades do petróleo baseado na elucidação química de constituintes do petróleo. O conhecimento da composição do petróleo é igual a capacidade da companhia de produzir óleo das reservas com maior eficiência e menor custo. Esta necessidade de entender a composição do petróleo é a força por trás de todos os investimentos em análises de petróleo<sup>137</sup>.

A espectrometria de massas desde 1948 era utilizada na análise de petróleo com a ionização por elétrons. Atualmente, com o advento da espectrometria de massas de altíssima resolução e exatidão tornou possível a análise dos compostos polares no petróleo (NSO)<sup>138</sup>. A caracterização na maioria das vezes é realizada por ESI, técnica de ionização mais utilizada em petroleômica por ser de fácil aplicação e por produzir íons com grande eficiência pela adição de um ácido fraco ou uma base fraca<sup>139</sup>. Já a fotoionização à pressão atmosférica, *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI) do petróleo requer a ultra-alta resolução do FT-ICR MS por dois motivos: APPI ioniza uma larga faixa de classes de compostos, desse modo em um espectro contém 5 vezes mais picos que o espectro de ESI; a mesma molécula do analito pode produzir ambos os íons  $M^{+}$  e  $[M + H]^{+}$ , sendo necessário resolver  $M^{+}$  contendo um  $^{13}C$  do  $[M + H]^{+}$  contendo todos  $^{12}C$ , a diferença de massa é somente de 4.5 mDa<sup>140</sup>. Na literatura

também existem trabalhos utilizando FT-ICR MS com APCI<sup>141</sup> e EASI<sup>142</sup> para caracterizar polares em petróleo. A primeira informação obtida em FT-ICR MS é distribuição no espectro de massas que segue um padrão Gaussiano (**Figura 39**).



**Figura 39.** Espectros de massas de uma amostra de petróleo (A) por ESI(+) e (B) por ESI (-).

Os resultados obtidos em petroleômica empregando espectrometria de massas de altíssima exatidão e resolução descrevem as amostras de petróleo por classes de polares encontradas, normalmente utiliza-se sempre a fórmula molecular para identificar os compostos encontrados, atribuídas com erro menor que 1 ppm. Para facilitar a compreensão e como o interesse são os heteroátomos NSO, normalmente as extensas tabelas mais de 1500 compostos atribuídos são transformados em porcentagem de classes de heteroátomos agrupados como nitrogenados (N, N2 e N3), oxigenados (O, O2, O3 e O4) e sulfurados (S e S2), além de classes mistas (NO, NS, OS, SO2, S2O3, N3O2, NOS, NO2, O3S, OS3 entre outras) que são encontradas em modo positivo (**Tabela 22**) ou negativo (**Tabela 23**) de ionização de acordo com as características de cada molécula de composto polar presente no petróleo.

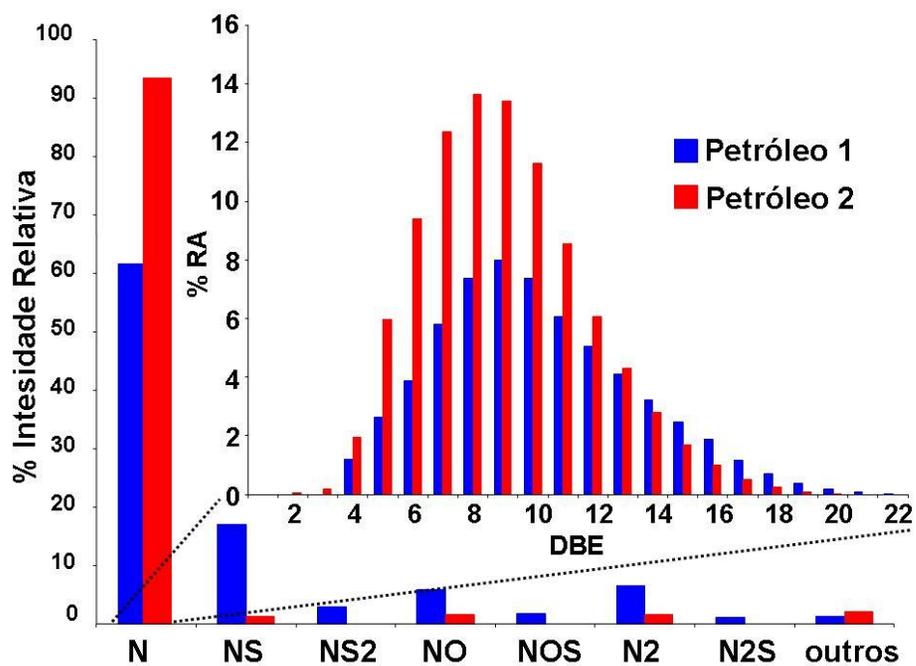
**Tabela 22.** Resultados de polares em petróleo por ESI(+) FT-ICR MS.

Classe	fórmula molecular	m/z	Erro (ppm)	DBE	Intensidade	Resolução
N	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N	200,14375	0,02	7	98	600,000
N	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N	210,12761	-0,17	9	100	602,000
N2	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub>	421,26731	0,22	16	100	405,000
N2	C <sub>42</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub>	591,46189	0,15	15	35	390,000
OS	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> OS	201,13783	-0,10	2	35	620,000
OS	C <sub>31</sub> H <sub>56</sub> OS	477,41102	0,45	4	57	390,000
OS	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> OS	519,45136	0,53	4	34	370,000

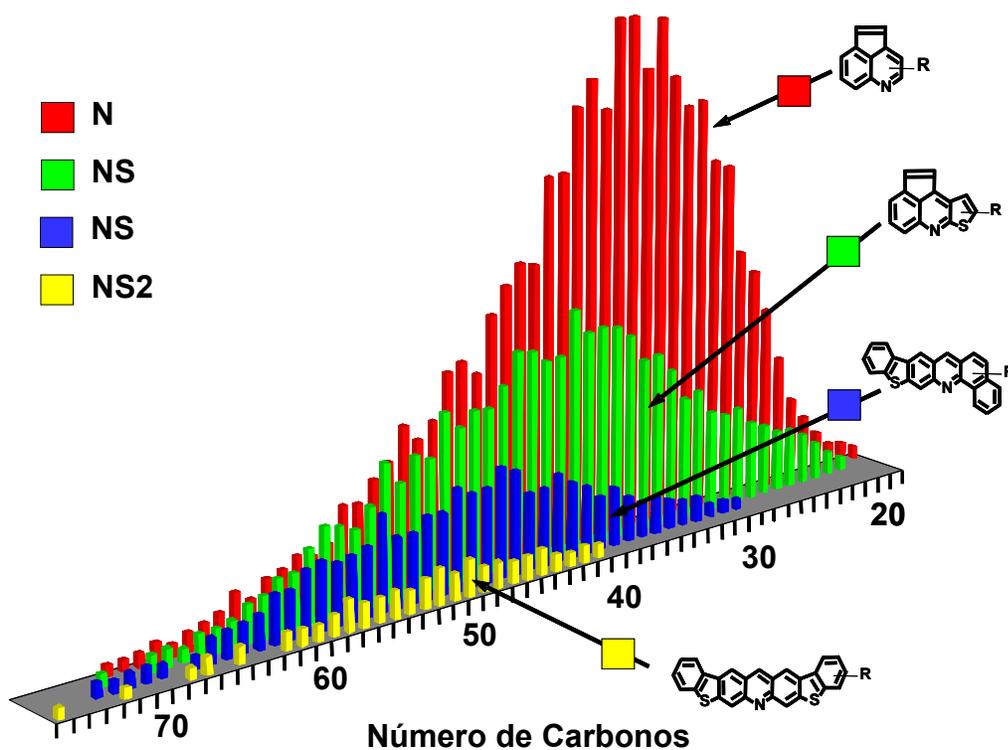
**Tabela 23.** Resultados de polares em petróleo por ESI(-) FT-ICR MS.

classe	fórmula molecular	m/z	Erro (ppm)	DBE	Intensidade	Resolução
N	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> N	256,11387	0,33	13	3	550,000
N	C <sub>67</sub> H <sub>107</sub> N	924,83247	0,14	15	8	300,000
NO	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> NO	388,26433	0,14	11	8	400,000
NO	C <sub>53</sub> H <sub>65</sub> NO	730,49975	-0,05	22	9	370,000
NO2	C <sub>41</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>2</sub>	584,35383	-0,31	19	12	366,000
NO2	C <sub>46</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>2</sub>	672,57291	-0,13	10	7	360,000
N3O2	C <sub>30</sub> H <sub>53</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	486,40767	0,30	6	9	399,000
O	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O	341,19104	-0,05	13	2	450,000
O2	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	425,34238	-0,08	7	7	400,000
O2	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	427,26406	-0,12	13	4	400,000
O3	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	539,35121	0,20	14	8	360,000
O3	C <sub>47</sub> H <sub>88</sub> O <sub>3</sub>	699,66416	0,10	4	4	358,000
O4	C <sub>58</sub> H <sub>88</sub> O <sub>4</sub>	847,65864	0,30	15	1	330,000
O6S	C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub> S	557,39029	0,20	3	3	350,000

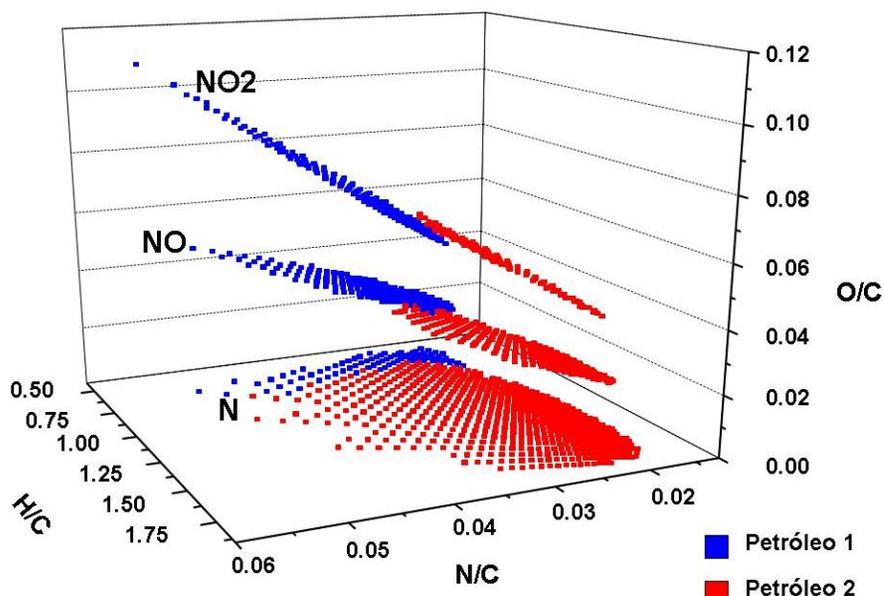
A atribuição de fórmulas estruturais é apenas sugerida de forma ilustrativa, pois são possíveis várias combinações para uma mesma fórmula molecular. A caracterização das amostras é feita comparando porcentagem de classes, intensidades relativas, número de insaturações *Double Bond Equivalent* (DBE), **Figura 40** ou por número de carbono, **Figura 41**.



**Figura 40.** Comparação entre duas amostra de petróleo por ESI(+). Classes vs intensidade relativa e DBE vs intensidade relativa dentro da classe N<sup>128</sup>.



**Figura 41.** Comparação entre quatro classes de uma amostra de petróleo por ESI(+) em relação ao número de carbonos<sup>137</sup>.

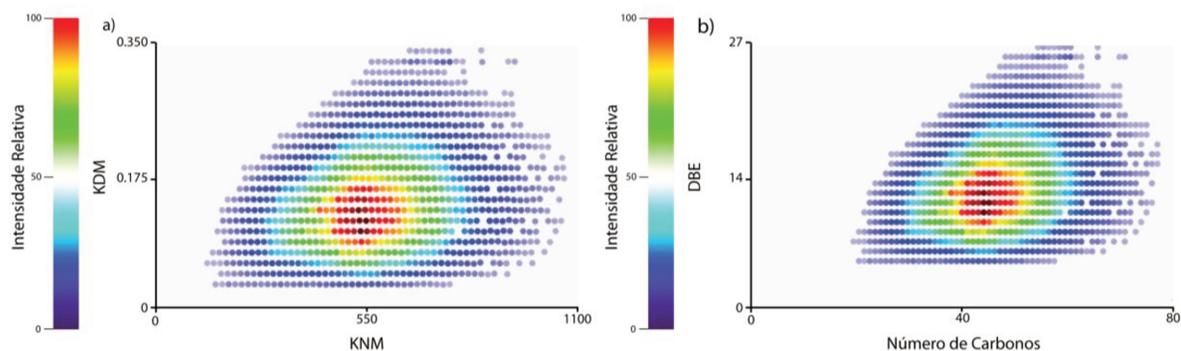


**Figura 42.** Comparação entre duas amostra de petróleo por ESI(+). Relação H/C, N/C e O/C para as classes N, NO e NO<sub>2</sub><sup>143</sup>.

Nos diagramas de van Krevelen (**Figura 42**) a composição elemental dos componentes do petróleo são comparadas pela projeção das razões moleculares como H/C, O/C, e N/C em dois (ou três) eixos. A razão H/C separa compostos de acordo com o grau de insaturação dos mesmos, já a razão O/C ou N/C separa os mesmos em relação ao conteúdo de O ou N nos compostos. Este gráfico fornece, portanto, uma comparação visual das classes em função do tipo de heteroátomo e insaturação, sendo um gráfico clássico utilizado pelos geoquímicos no processamento de dados de petróleo<sup>144</sup>.

Com a finalidade de sumarizar, visualizar e interpretar os dados de petroleômica devido a sua imensa complexidade o gráfico de Kendrick é comumente usado<sup>145</sup>. No gráfico de Kendrick, a massa nominal de Kendrick, *Kendrick Nominal Mass* (KNM) é calculada convertendo a massa de todos os grupos CH<sub>2</sub> de 14.01565 para 14.00000. Deste modo os defeitos de massa das unidades de repetição (CH<sub>2</sub>) são anulados e

séries homólogas<sup>r</sup> terão o mesmo KMN e cairão em uma linha horizontal. As DBE aumentarão o defeito de massa de Kendrick, *Kendrik Defect Mass* (KDM) assim os elementos de uma mesma classe que apresenta diferentes valores de DBE cairão em linhas diferentes separadas por 0.01340 (KDM para dois átomos de H), sendo que quanto maior DBE mais alta será a linha<sup>116</sup>. Na prática o gráfico de Kendrick serve de base para vários gráficos importantes em petroleômica como, por exemplo, número de carbonos por DBE (**Figura 43**).



**Figura 43.** Exemplo de gráfico de Kendrick utilizado em petroleômica. (A) corresponde ao gráfico clássico e (B) corresponde ao gráfico de DBE vs carbono, mais comumente utilizado.

A composição molecular do petróleo é geralmente expressa pela fórmula química  $C_nH_{2n+z}X$ , onde  $n$  é o número de carbonos,  $Z$  é a deficiência de hidrogênio (medida do caráter aromático) e  $X$  é o heteroátomo (NSO) na molécula. A DBE é calculada pela equação abaixo<sup>113</sup>, na prática quanto mais alta é o valor de DBE, mais insaturado é o composto:

$$DBE = C - H/2 + N/2 + 1$$

A piridina tem fórmula molecular  $C_5H_5N$  possui DBE= 4, ou seja:

$$DBE = 5 - (5/2) + (1/2) + 1 = 4$$

<sup>r</sup> Séries homólogas é o nome dado a um determinado número de compostos contendo mesmo número de heteroátomos e números de anéis, mais diferentes DBE e números de unidades de  $CH_2$ .

### 3.0- ESTIMATIVA DE PRECISÃO PARA ANÁLISES DE PETRÓLEO

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É determinada para circunstâncias específicas de medição, as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade <sup>146</sup> (r) e da reprodutibilidade (R), sendo usualmente expressa pelo desvio padrão<sup>147</sup>.

A repetitividade expressa, neste trabalho, a concordância atingível (num grau de confiança de 95%) entre determinações independentes, feitas num mesmo dia, usando a mesma aparelhagem e técnica seguindo a recomendação que avalia a repetitividade do método em termos de determinações independentes pelo mesmo analista. De modo geral, a repetitividade corresponderá ao estudo onde as variáveis são mantidas constantes<sup>148</sup>. Já a reprodutibilidade expressa, também neste trabalho, a concordância atingível (num grau de confiança de 95%) entre determinações feitas em dias diferentes e preparos diferentes. De modo geral, corresponde a estudo onde uma das variáveis é mutável, por exemplo, laboratório, analistas, etc. As equações utilizadas para o cálculo de repetitividade e reprodutibilidade são<sup>149</sup>:

$$r = 2.8 \sqrt{\sigma^2}$$

$$R = 2.8 \sqrt{\sigma^2 + \sigma_{\beta}^2 + \sigma_{\delta}^2}$$

Onde:  $\sigma^2$ ,  $\sigma_{\beta}^2$  e  $\sigma_{\delta}^2$  são a estimativa dos componentes da variância (C Var)

Outro parâmetro a ser calculado é a incerteza da média (U) que estima o desvio dos dados obtidos em relação à média, definindo um intervalo para expressão do resultado. Um método simplificado para estimar a incerteza da média baseia-se na execução de n medições (n ≥ 15), em condições pré-definidas<sup>150</sup>. A incerteza da média é dada por:

$$U_{\bar{x}} = t_{(n-1;0,05)} \cdot \frac{S_T}{\sqrt{n}}$$

Onde:

$U_{\bar{x}}$  = Incerteza na Média;

$S_T$  = desvio-padrão total.

$t_{(n-1;0,05)}$  = variável t de *student* para 95% de confiança em n-1 graus de liberdade;

$n$  = número total de repetições em cada ocasião.

O método de análise de variância (ANOVA) baseia-se em decompor a variância total de uma determinada resposta (variável dependente) em duas partes: a primeira devida ao modelo de regressão e a segunda devida aos resíduos (erros). Se forem efetuadas replicações de determinadas experiências, a ANOVA também permite decompor à variação dos resíduos numa parte relacionada com o erro do modelo e outra parte relacionada com o erro de replicação. A magnitude numérica destas variâncias é comparada formalmente através do teste de Fisher (teste F) ou pelo valor p de probabilidade, fornecido pelos computadores. O teste é geralmente utilizado para comparar variâncias e decidir se são ou não significativamente diferentes. Se p for menor que 0,05% indica a rejeição da hipótese nula, ou seja, há diferença entre as médias. Este método usa-se para verificar a significância do modelo de regressão e analisar o ajuste originado pelo modelo. Também é usado para comparar dois modelos diferentes. O caso mais corrente é verificar se existe melhorias no modelo eliminando algumas variáveis independentes<sup>151,152</sup>.

A avaliação da influência de fatores instrumentais na análise de petróleo e seus derivados por FT-ICR MS foi objeto de estudo no grupo de trabalho do laboratório ThoMSon<sup>153</sup> e permitiu a otimização das condições experimentais. A partir das condições instrumentais otimizadas, a pergunta seguinte foi saber se amostras analisadas em dias diferentes forneceriam as mesmas classes de compostos durante o processamento de dados para que a caracterização fosse feita de maneira confiável e ainda qual a dispersão que esses valores poderiam apresentar dentro do mesmo laboratório e considerando o mesmo operador. E verificar, também, qual a distribuição

de massa média dos compostos, bem como de DBE, pois a caracterização sempre é feita tomando por base a aquisição de um único espectro.

O estudo de precisão foi realizado com base na atribuição de classes de heteroátomos pelo software PetroMS para as diferentes aquisições feitas e para a mesma amostra. Foi utilizado um processamento com *threshold* máximo de 4% para modo de ionização ESI(+) e ESI(-), seguindo como critério a norma ISO 5725-3 para calcular a precisão<sup>149</sup>.

Os conjuntos de dados obtidos foram avaliados quanto à presença de dados dispersos (*outliers*) através dos testes de Dixon e Cochran, seguindo o procedimento recomendado na norma ISO/TR 22971<sup>154</sup> para verificar se os resultados podem ser considerados como fazendo parte de uma mesma população ou se devem ser analisados em maior profundidade para se avaliar a causa de sua ocorrência e necessidade de exclusão. O teste de Dixon avalia a dispersão de resultados individuais, para conjunto de 3 a 40 valores, com grau de significância usado de 5 %, testando-se os valores extremos da série (maior e o menor). Enquanto o teste de Cochran baseia-se no fato que entre as variabilidades dos resultados existem sempre diferenças pequenas e avalia a dispersão dos resultados individuais na sua variabilidade, através dos desvios-padrão ou das amplitudes. As fórmulas para calcular os testes de Dixon e Cochran são mostradas no **anexo 1**.

## **4.0- MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1- Amostras e equipamentos**

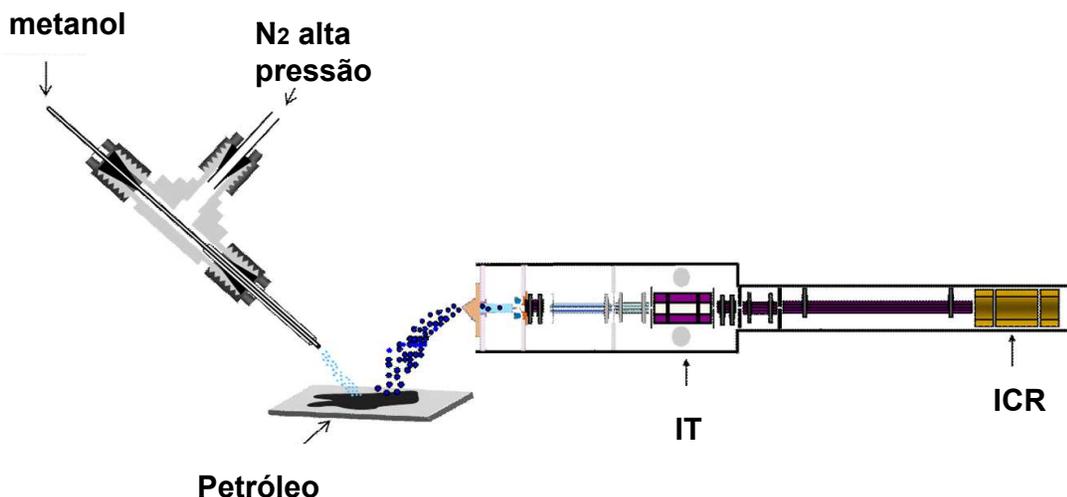
Entre as 120 amostras de petróleo fornecidas pela Petrobras, seis foram selecionadas para a elaboração deste trabalho. Sendo: amostra PD 04 utilizada nos testes de comparação ESI vs EASI, amostra PD 27 utilizada para verificar a precisão do método e amostras PD01, PD02, PD03 e PD06 utilizadas para os estudos comparativos de caracterização empregados em petroleômica. Os equipamentos

utilizados foram espectrômetro de massas FT-ICR MS modelo LTQ FT Ultra 7T (ThermoScientific, Bremen, Germany) e o nano-ESI sistema automatizado (Triversa NanoMate 100 system - Advion BioSciences, Ithaca, NY , USA) e fonte EASI desenvolvida no laboratório.

#### **4.2- Procedimento para aquisição de dados do comparativo entre ESI e EASI**

**A) EASI(±) FT-ICR MS:** Uma gota de petróleo foi colocada sobre uma superfície de polietileno e dessorvida pelo *spray* do EASI. Uma fonte construída no laboratório foi adaptada ao FT-ICR MS (**Figura 44**), utilizando-se como solvente o metanol puro para o modo positivo e com 0,1% (v/v) de hidróxido de amônio como aditivo no EASI modo negativo e sob fluxo de 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  e com *spray* gerado por  $\text{N}_2$  a 100 psi (3 L  $\text{min}^{-1}$ ).

**b) ESI(±) FT-ICR MS.** Dissolveu-se uma amostra de petróleo (2 mg) em 1 mL de tolueno e em seguida, transferiu-se 0,5 mL desta solução para um *vial* de 1 mL e diluindo-se com 0,5 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido fórmico para análises no modo positivo ou 0,1 % (v/v) de hidróxido de amônio para análises no modo negativo. As amostras foram introduzidas no FT-ICR MS, através de um sistema Nanomate automatizado baseado em nano-ESI em modo positivo. As condições de ESI foram: pressão do gás 0,3 psi voltagem aplicada 1,55 kV e fluxo de 250 nL  $\text{min}^{-1}$ . As análises em modo negativo foram feitas por inserção direta, utilizando ESI convencional como descrito em 4.3.



**Figure 44.** Esquema da análise de petróleo por EASI(±) FT-ICR MS<sup>142</sup>.

### 4.3- Procedimento para aquisição de dados em ESI(±) FT-ICR MS utilizados na rotina de petroleômica

Para a fonte ESI utilizou-se voltagem do *spray* de 2,5 a 3,5 kV, voltagem do capilar de 35V, *tube lens* de 10V e *Sheath gas flow rate* de 8 L min<sup>-1</sup>. Para as análises de MS no *ion trap* linear utilizou-se fragmentação na fonte de 30 a 80V. Os espectros de massas foram adquiridos de *m/z* 200 a 1000 e tempo máximo de injeção no *ion trap* linear entre 0,1 a 10 ms. Para as análises no ICR utilizou-se a mesma fragmentação na fonte e a mesma faixa de aquisição do *ion trap* linear, tempo máximo de injeção no ICR de 10 a 100 ms. Cada espectro de FT-ICR MS representa a somatória de 100  $\mu$ scan. A população de íons na cela de ICR foi controlada de modo a obter os valores ESI(+) de  $8,00 \times 10^5$  íons com *max inject time* de 4 ms e ESI(-)  $9,00 \times 10^5$  com *max inject time* de 12 ms. O tempo total de aquisição de um espectro varia de 6 a 18 minutos, sendo a média ~12 minutos e a resolução utilizada foi de ~400000 na *m/z* 400. As amostras foram preparadas como descrito no item 4.2 (b) e utilizou-se inserção direta com bomba de seringa interna do equipamento para adquirir os espectros de massas tanto em modo positivo quanto em modo negativo de ionização por ESI com o controle automático de ganho ligado.

#### 4.4- Software para tratamento de dados

Foram utilizados os softwares Xcalibur 2.0 (*ThermoScientific*), PetroMS (software desenvolvido no laboratório) e *Excel* 2003 (*Microsoft*) para o tratamento de dados apresentados neste trabalho.

### 5.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma série de amostras e misturas já foram analisadas por técnicas de dessorção/ionização em condições ambiente por MS, mas não há nenhum relato da utilização de ionização ambiente para caracterização do petróleo. Baseando-se nesses aspectos, relata-se neste trabalho os primeiros dados de análise de petróleo por EASI FT-ICR MS, já publicados na literatura<sup>142</sup> e sua comparação com ESI FT-ICR MS.

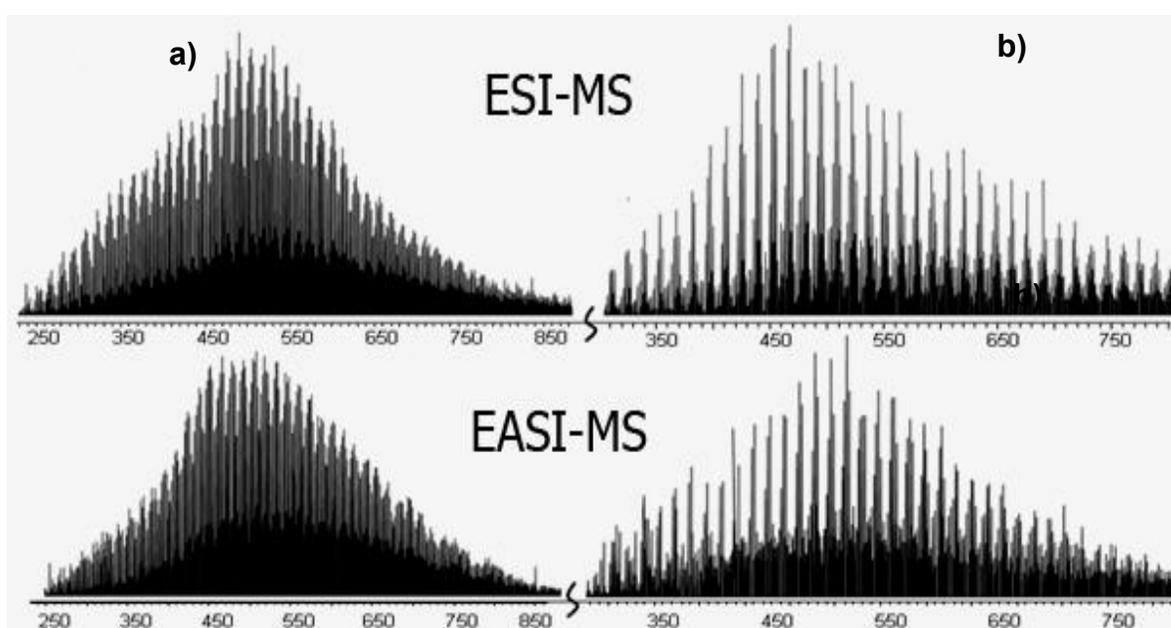
É apresentado também um estudo inicial da precisão para o método de ESI FT-ICR MS empregado na análise de petróleo com as discussões dos principais aspectos relevantes. A idéia é propor uma forma de discutir a repetitividade e a reprodutibilidade do procedimento desenvolvido para os modos positivo e negativo de ionização por ESI avaliando a influência de diferentes dias e diluição de amostra utilizando o equipamento em funcionamento na UNICAMP. Para posteriormente apresentar alguns dados de caracterização em ESI ( $\pm$ ) FT-ICR MS.

#### 5.1- Comparativo entre ESI e EASI para análise de petróleo

A **Figura 45** compara os espectros de petróleo obtidos através dos métodos de ionização EASI e ESI nos modos positivo e negativo. É possível observar numa simples inspeção visual que espectros apresentam boa similaridade. Esta é uma descoberta interessante, pois ainda não existem estudos consistentes que façam uma comparação sobre o que pode ocorrer durante a dessorção e ionização por EASI em relação aos dados obtidos por ESI. As gotas carregadas produzidas pelo *spray* sônico da solução de metanol realizaram, portanto, o trabalho de “apanhar” os milhares constituintes do

petróleo em um pequeno tempo de contato com a superfície do filme de petróleo por meio de um mecanismo similar ao que acontece em DESI<sup>23</sup>.

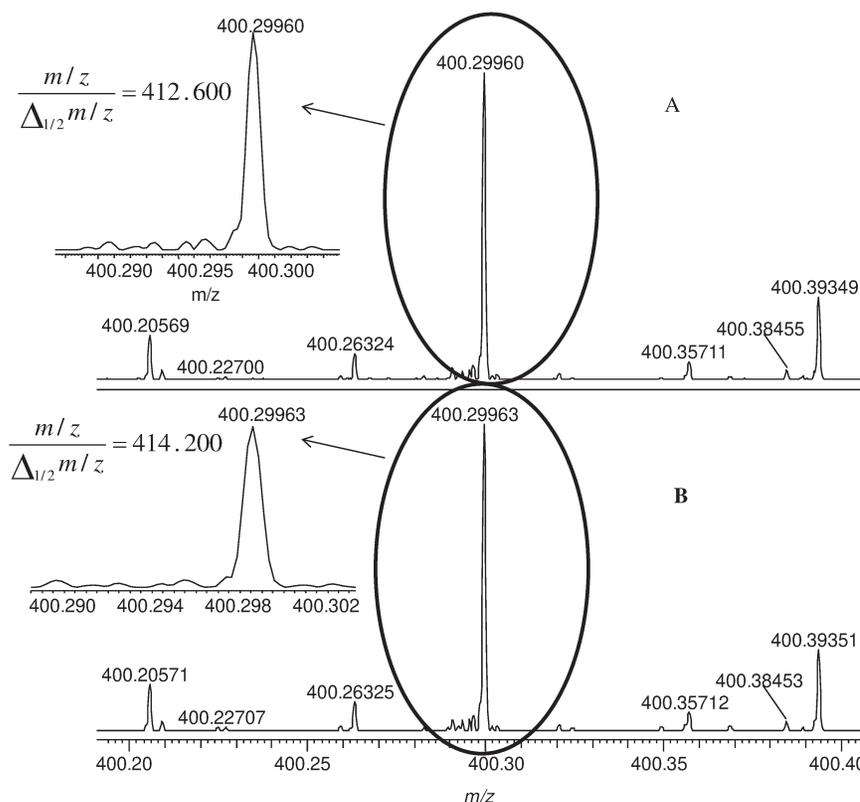
A **Figure 46** ilustra uma expansão em torno da  $m/z$  400 para os espectros adquiridos por EASI FT-ICR MS e ESI FT-ICR MS, o que permite avaliar performance de ambas técnicas. Nas expansões, uma excelente qualidade foi observada, com resolução muito semelhante (412600 para ESI e 414200 para EASI), mesma relação sinal-ruído e mesma quantidade de sinais resolvidos.



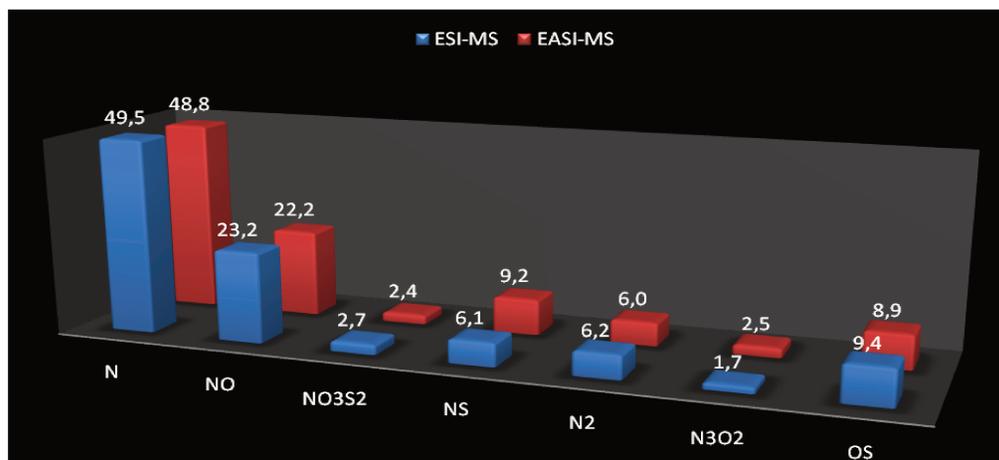
**Figura 45.** ESI( $\pm$ ) FT-ICR MS e EASI( $\pm$ ) FT-ICR MS. Modo positivo de ionização (a) e modo negativo de ionização (b) para amostra PD04 de petróleo<sup>142</sup>.

Os dados foram processados para atribuição de fórmulas aos valores de  $m/z$  medidos utilizando um algoritmo desenvolvido especialmente para processamento de espectros de petróleo que é o software PetroMS<sup>155</sup>.

A **Figura 47** mostra as distribuições relativas destes componentes nas classes de heteroátomos identificadas. É possível perceber que o perfil é similar para maioria das classes dos constituintes polares do petróleo, confirmando a habilidade de EASI( $\pm$ ) em reproduzir os perfis de ESI( $\pm$ )<sup>156</sup> e que apenas uma pequena diferença de 3,1% é observada para as classes NS.



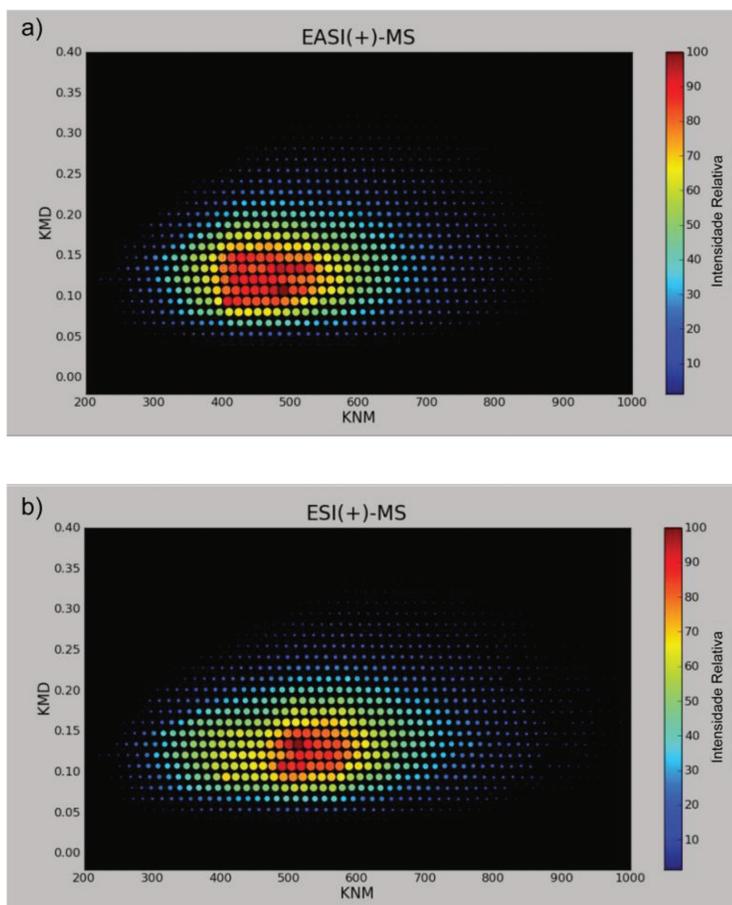
**Figura 46.** Expansão do (a) ESI(+) e (b) EASI(+) ilustrando resolução e sinal-ruído similares em ambos os espectros<sup>142</sup>.



**Figura 47.** Porcentagem das classes majoritárias dos componentes do petróleo obtidas por ESI(+) FT-ICR MS e EASI(+) FT-ICR MS<sup>142</sup>.

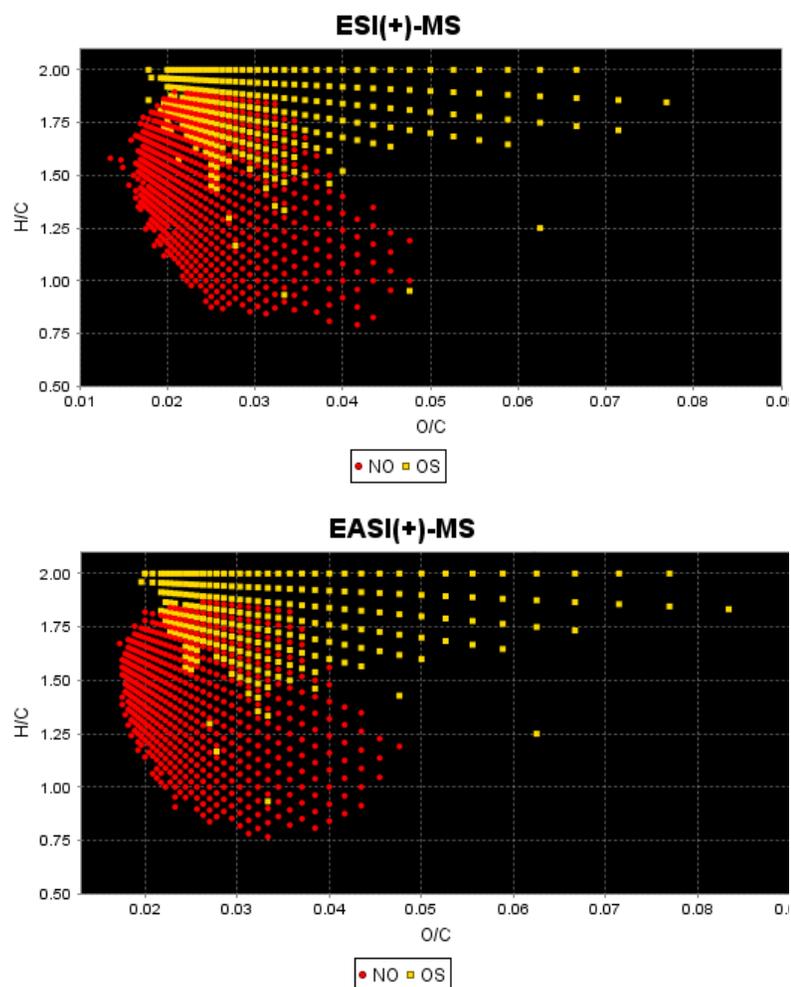
As **Figuras 48 e 49** comparam gráficos de Kendrick e os diagramas de van Krevelen utilizados em petroleômica, obtidos a partir dos espectros de massas por

EASI(+) e ESI(+). Nos dois casos os perfis são semelhantes para ambas as técnicas. Essas comparações indicam que a ionização por EASI é tão eficiente para petróleo quanto à ionização por ESI<sup>142</sup>.



**Figura 48.** Gráfico de Kendrick para classe N dos constituintes polares obtidos a partir dos dados de EASI(+) FT-ICR MS (superior) e ESI(+) FT-ICR MS (inferior)<sup>142</sup>.

Apesar da enorme quantidade de componentes que devem ser retirados da superfície do petróleo em um tempo curto de contato a ionização EASI(+) e EASI(-) mostraram uma excelente performance de dessorção/ionização para amostras de petróleo. Contudo, os dados de EASI( $\pm$ ) FT-ICR MS necessitaram de um tempo maior de aquisição (12 minutos contra 6 minutos para o ESI), para fornecer perfis similares de constituintes polares com qualidade comparável, quando comparado ao sistema automatizado de ESI como exemplificado pelos gráficos utilizados para o tratamento de dados em petrolômica.



**Figura 49.** Diagrama de van Krevelen (H/C vs N/C) para classe N dos constituintes polares obtidos a partir dos dados de ESI(+) FT-ICR MS (superior) e EASI(+) FT-ICR MS (inferior)<sup>142</sup>.

EASI é baseado no SSI<sup>19</sup> o qual é conhecido por ser uma das técnicas mais brandas de ionização, depositando menor quantidade de energia no íon que ESI. O mais importante é que os dados de EASI(±) FT-ICR MS são obtidos diretamente de uma gota de petróleo eliminando, portanto, quaisquer riscos associados a manipulação da amostra como contaminação por solventes ou qualquer distúrbio que possa ocorrer durante os protocolos de preparo de amostra. Em contradição ao ESI(±) a EASI(±) não faz o uso tanto de aquecimento quanto de voltagem, assim são eliminados os riscos de interferências térmicas, eletroquímicas ou processos redox que podem ocorrer durante a ionização por ESI<sup>142</sup>.

## 5.2- Comparativo da estimativa de precisão para as análises de petróleo

### 5.2.1- Repetitividade e reprodutibilidade para ESI(+) FT-ICR MS

O estudos foram realizados no laboratório ThoMSon com  $n$  de 16 repetições da mesma amostra (PD27), com o mesmo operador fazendo duas medidas consecutivas de quatro preparos de amostra, com diferentes diluições e em dois dias diferentes. Contudo, essa é apenas uma proposta de estudo, pois a aplicação de ferramentas como a ANOVA requer um número maior de replicatas e o estudo de reprodutibilidade ideal deve ser feito em laboratórios diferentes, na maioria dos casos. A **Tabela 24** mostra as porcentagens das classes obtidas por ESI(+) FT-ICR MS.

**Tabela 24.** Resultados em % para as classes obtidas no estudo de precisão ESI(+) FT-ICR MS.

DIA	PREPARO	N	N2	NO
1	1	66,3	20,6	13,0
1	1	66,3	20,2	13,2
1	2	65,4	20,4	13,1
1	2	65,2	20,3	13,6
1	3	65,2	20,7	13,3
1	3	66,3	20,1	13,1
1	4	66,0	20,2	12,8
1	4	65,9	20,0	12,9
2	1	66,3	20,8	13,2
2	1	66,5	20,3	13,7
2	2	66,1	20,8	13,6
2	2	65,2	20,6	13,3
2	3	65,6	20,6	13,0
2	3	65,0	20,2	13,4
2	4	65,4	20,4	13,1
2	4	66,3	20,9	12,9

Foi aplicado os testes de Dixon e Cochran nos valores obtidos para o estudo de precisão para ESI(+) para verificar a presença de dados dispersos. Os valores obtidos são mostrados na **Tabela 25**.

**Tabela 25.** Avaliação de dispersos pelo teste de Dixon e Cochran por ESI(+) FT-ICR MS.

Modo	Classes	Teste de Dixon Q crítico = 0,569		Teste de Cochran C crítico = 0,680
		Q <sub>M</sub>	Q <sub>m</sub>	C
ESI(+)	N	0,154	0,154	0,369
	N2	0,143	0,250	0,283
	NO	0,125	0,125	0,284

Como não houve valores acima dos limites críticos as medidas, indicam uma homogeneidade de população, podendo assim ser aplicada a ANOVA.

A ANOVA foi calculada levando em consideração dois fatores de variabilidade (preparo e dias) por isso, foi escolhido o modo de fator duplo com repetição. Os cálculos para as três classes encontradas no modo positivo de ionização são demonstrados no **anexo 2** e os resultados obtidos são resumidos na **Tabela 26**.

**Tabela 26.** Resumo da ANOVA de fator duplo para os resultados de ESI(+) FT-ICR MS.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	C. Var
CLASSE N ESI(+)							
Preparo	1,97	3	0,657	3,21	0,0833	4,07	0,657
Dia	0,00250	1	0,00250	0,0122	0,915	5,32	0,000
Prep + Dia	0,342	3	0,114	0,557	0,658	4,07	0,101
MQD	1,64	8	0,205				0,205
Total	3,96	15					
CLASSE N2 ESI(+)							
Preparo	0,0569	3	0,0190	0,239	0,867	4,07	0,00173
Dia	0,276	1	0,276	3,47	0,0994	5,32	0,266
Prep + Dia	0,172	3	0,0573	0,722	0,567	4,07	0,523
MQD	0,635	8	0,0794				0,0794
Total	1,14	15					
CLASSE NO ESI(+)							
Preparo	0,485	3	0,162	2,94	0,0990	4,07	0,156
Dia	0,0900	1	0,0900	1,64	0,237	5,32	0,0831
Prep + Dia	0,0650	3	0,0217	0,394	0,761	4,07	0,0182
MQD	0,440	8	0,0550				0,0550
Total	1,08	15					

Os valores encontrados para U foram:

- 0,274% para classe N;
- 0,147% para classe N2;
- 0,143% para classe NO.

Para os dados apresentados na **Tabela 26**, com nível de significância de 5%, valores de  $F_{0.05, 3,8} = 4,07$  e  $F_{0.05, 1,8} = 5,32$ , afirma-se para as classes N, N2 e NO que:

- Não existe diferença significativa entre o preparo,  $F < 4,07$ ;
- Não existe diferença significativa entre os dias,  $F < 5,32$ .
- Não existe diferença significativa entre a interação do preparo da amostra com os dias,  $F < 4,07$ .

A estimativa de repetitividade (r) para a classe N é de 1,27% e a reprodutibilidade (R) é de 2,75%; a estimativa de r para a classe N2 é de 0,789% e a R é de 1,77% e a estimativa de r para a classe NO é de 0,657% e a R 1,56%.

Os valores de massa média por classes e faixa de DBE são informados na **Tabela 27**. É possível verificar que durante as aquisições a flutuação de massa média variou 1 Da para a classe N, 19 Da para a classe N2 e 20 Da para classe NO durante as 8 medidas feitas com preparo e dias diferentes. O padrão de distribuição das DBE se manteve a mesma para todas as aquisições.

**Tabela 27.** Resumo dos valores de massa média e DBE para as classes da amostra de petróleo por ESI(+) FT-ICR MS.

classe	faixa de massa média (Da)	faixa de DBE
N	582-583	4-25
N2	585-604	10-20
NO	620-640	10-22

### 5.2.2- Repetitividade e reprodutibilidade para ESI(-) FT-ICR MS

O estudo para modo de ionização negativo seguiu o mesmo planejamento feito para o modo de ionização positivo, portanto o estudo no modo negativo também é

preliminar e necessita ser aperfeiçoado. A **Tabela 28** mostra as porcentagens das classes obtidas por ESI(-) FT-ICR MS.

**Tabela 28.** Resultados em % para as classes obtidas no estudo de precisão ESI(-) FT-ICR MS.

DIA	PREPARO	N	O	O2	NO	NO2
1	1	26,8	15,7	28,4	20,6	8,4
1	1	27,8	15,9	27,6	20,8	8,0
1	2	28,6	16,9	26,9	20,2	7,4
1	2	28,1	17,1	27,0	20,2	7,6
1	3	28,8	20,7	28,0	20,7	6,2
1	3	28,4	16,1	27,6	21,0	6,9
1	4	28,8	16,8	27,9	20,8	5,7
1	4	28,0	16,8	26,6	20,9	7,7
2	1	27,5	16,1	27,7	20,5	8,8
2	1	28,1	16,7	27,1	20,8	7,4
2	2	27,8	16,7	26,8	20,7	8,0
2	2	28,4	17,8	26,2	20,7	6,9
2	3	28,8	19,7	26,1	19,7	5,7
2	3	27,8	15,9	27,6	20,8	8,0
2	4	28,1	16,9	27,1	20,2	7,7
2	4	28,1	17,1	27,0	20,2	7,6

Foi aplicado também os testes de Dixon e Cochran no estudo de precisão para ESI(-) e os valores obtidos são mostrados na **Tabela 29**.

O teste de Dixon mostra que o valor 20,7 (valor de QM=0,604) está disperso na classe O e o teste de Cochran mostra que os valores em relação a medida de amplitude da duplicata 3 do segundo dia, estão dispersos para a classe NO (valor de C = 0,840). Como durante o andamento da análise não foram observadas razões que levassem ao descarte dos *outliers* das classes O e NO durante o cálculo da ANOVA, os mesmos serão mantidos para verificar se terão influência significativa que comprometa a análise estatística.

**Tabela 29.** Avaliação de dispersos pelo teste de Dixon e Cochran por ESI(-) FT-ICR MS.

Modo	Classes	Teste de Dixon		Teste de Cochran
		Q crítico = 0,569		C crítico = 0,680
		Q <sub>M</sub>	Q <sub>m</sub>	C
ESI (-)	N	0,000	0,500	0,265
	O	0,604	0,095	0,567
	O2	0,278	0,278	0,411
	NO	0,250	0,455	0,840
	NO2	0,308	0,217	0,402

A ANOVA foi calculada levando também em consideração os dois fatores de variabilidade (preparo e dias). Os cálculos para as cinco classes encontradas no modo negativo de ionização são demonstrados no **anexo 3** e os resultados obtidos são resumidos na **Tabela 30**.

Os valores encontrados para U foram:

- 0,283% para classe N;
- 0,723% para classe O;
- 0,343% para classe O2;
- 0,188% para classe NO;
- 0,477% para classe NO2.

Para o nível de significância de 5%, com  $F_{0.05, 3,8} = 4,07$  e  $F_{0.05, 1,8} = 5,32$ , afirma-se para as classes N, O, O2, NO e NO2 que:

- Não existe diferença significativa entre o preparo,  $F < 4,07$ ;
- Não existe diferença significativa entre os dias,  $F < 5,32$ .
- Não existe diferença significativa entre a interação do preparo da amostra com os dias,  $F < 4,07$ .

Os resultados da ANOVA apesar de terem sido calculados com alguns valores apontados como dispersos pelos testes de Dixon e Cochran não apresentaram variação significativa, apenas o valor de incerteza da média (U) para a classe O se mostrou mais alto que os demais devido ao valor 20,7% estar muito disperso do valor médio 17,1%.

A estimativa de repetitividade (r) para a classe N é de 1,36% e a reprodutibilidade (R) é 2,79%; a estimativa de r para a classe O é de 4,27% e a R é 6,35%; a estimativa

de r para a classe O2 é de 1,64% e a R é 4,12%; a estimativa de r para a classe NO é de 0,840% e a R é 2,03% e a estimativa de r para a classe NO2 é de 2,54% e a R é 4,57 %.

**Tabela 30.** Resumo da ANOVA de fator duplo para os resultados de ESI(-) FT-ICR MS.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	C. Var
classe N ESI(-)							
Preparo	1,85	3	0,616	2,61	0,123	4,07	0,614
Dias	0,0306	1	0,0306	0,130	0,728	5,32	0,00117
Preparo+Dias	0,462	3	0,154	0,653	0,603	4,07	0,139
MQD	1,89	8	0,236				0,236
Total	4,22	15					
classe O ESI(-)							
Preparo	8,13	3	2,71	1,16	0,382	4,07	2,71
Dias	0,0506	1	0,0506	0,0217	0,886	5,32	0,000
Preparo+Dias	0,772	3	0,257	0,110	0,952	4,07	0,111
MQD	18,6	8	2,33				2,33
Total	27,6	15					
classe O2 ESI(-)							
Preparo	1,97	3	0,655	1,91	0,206	4,07	0,579
Dias	1,21	1	1,21	3,53	0,0970	5,32	1,17
Preparo+Dias	0,295	3	0,098	0,287	0,834	4,07	0,0769
MQD	2,74	8	0,342				0,342
Total	6,21	15					
classe NO ESI(-)							
Preparo	0,105	3	0,0350	0,389	0,764	0,0250	0,025
Dias	0,160	1	0,160	1,78	0,219	0,149	0,124
Preparo+Dias	0,875	3	0,292	3,24	0,0815		0,286
MQD	0,720	8	0,0900				0,0900
Total	1,86	15					
classe NO2 ESI(-)							
Preparo	4,43	3	1,48	1,79	0,226	4,07	1,46
Dias	0,303	1	0,303	0,368	0,561	5,32	0,200
Preparo+Dias	0,702	3	0,234	0,285	0,835	4,07	0,183
MQD	6,58	8	0,823				0,823
Total	12,0	15					

Os valores de massa média por classes e faixa de DBE são informados na **Tabela 31**. É possível verificar que durante as aquisições a flutuação de massa média variou 12 Da para a classe N, 10 Da para a classe O, 11 Da para classe O2, 10 Da para a classe NO e 17 Da para a classe NO2 durante as 8 medidas feitas com preparo e dias diferentes. O padrão de distribuição das DBE se manteve o mesmo para todas as aquisições.

**Tabela 31.** Resumo dos valores de massa média e DBE para as classes da amostra de petróleo por ESI(-) FT-ICR MS.

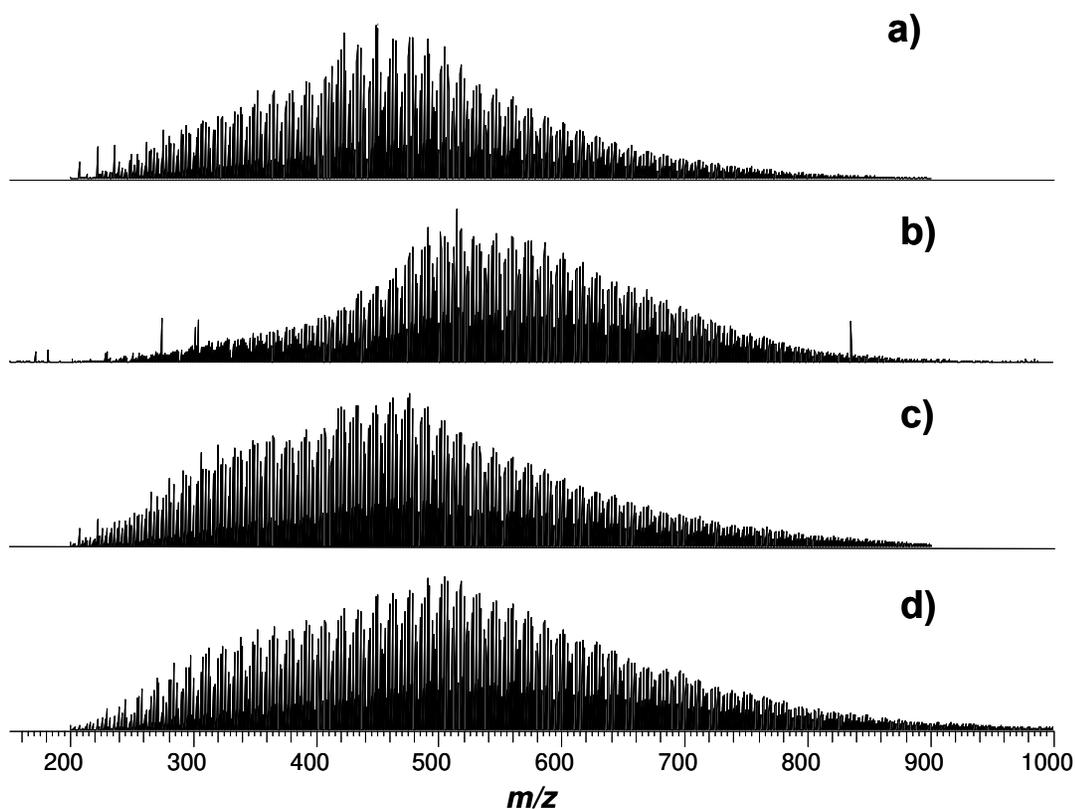
classe	faixa de massa média (Da)	faixa de DBE
N	502-514	9-25
O	545-555	4-17
O2	545-556	1-17
NO	545-555	10-25
NO2	611-628	10-20

### 5.3-Characterização de amostras de petróleo

O petróleo, como já comentado, apresenta uma grande diversidade de compostos polares. Com o objetivo de demonstrar o potencial da técnica de FT-ICR MS em discriminar compostos polares em petróleo, quatro amostras foram analisadas com ionização por ESI(+) e ESI(-). Sendo possível caracterizá-las por distribuição da porcentagem de classes, número de carbonos e insaturações (DBE), usadas para as mais diferentes formas de comparativo com propriedades estabelecidas e a resolução de problemas geoquímicos relevantes como, por exemplo, correlacionar polares com grau API para estudar evolução térmica. Observar os dados de caracterização isolados demonstra apenas as diferenças entre as amostras, mas associar essa caracterização a problemas relevantes da indústria do petróleo constitui a principal inovação proposta nos estudos de petroleômica.

### 5.3.1- Caracterização por ESI (+) FT-ICR MS

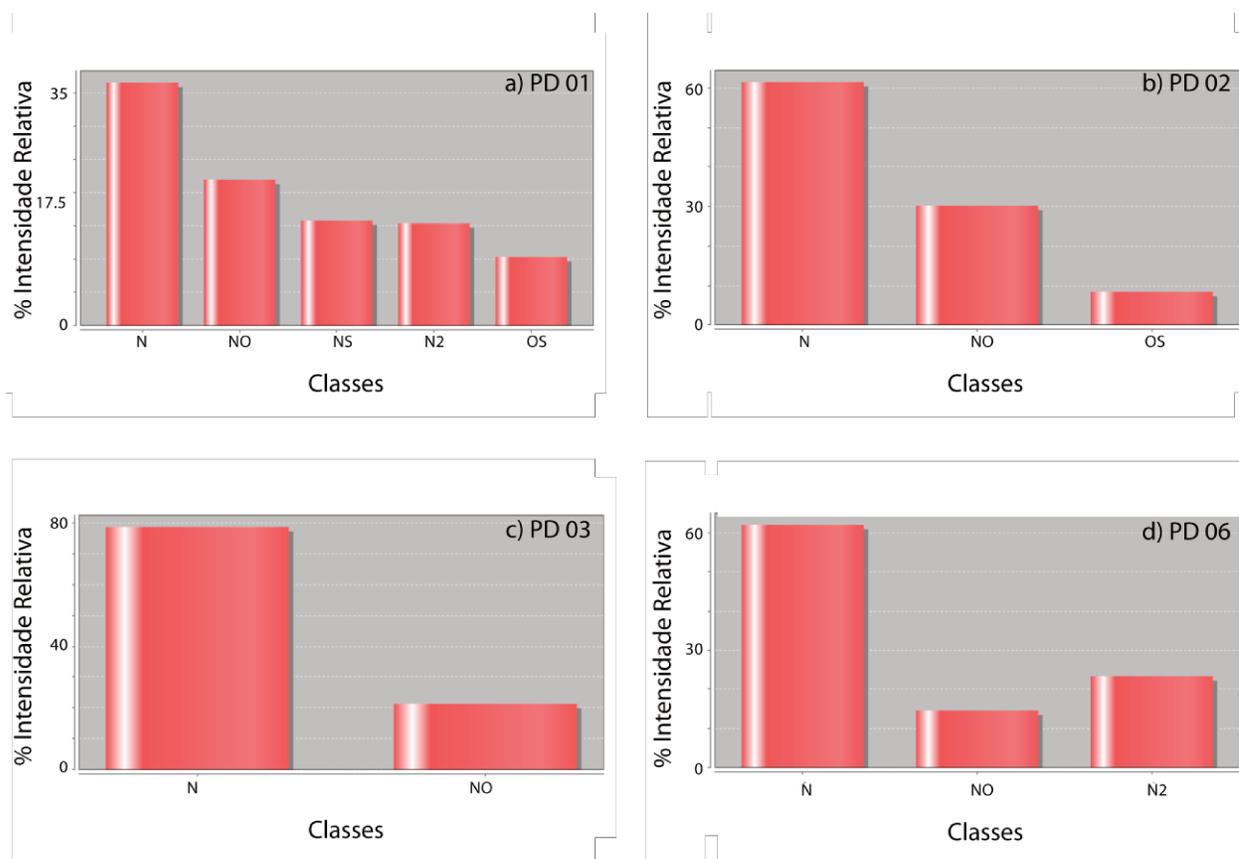
A **Figura 50** mostra os espectros de massas das quatro diferentes amostras de petróleo utilizados na caracterização por ESI(+) FT-ICR MS.



**Figura 50.** Espectros de massas de petróleo obtidos por ESI(+) FT-ICR MS. Amostra (a) PD01, amostra (b) PD02, amostra (c) PD03 e amostra (d) PD06.

As classes encontradas em ESI(+) estão descritas na **Figura 51**. Na amostra PD 01 **(a)** foram atribuídas cinco classes, um total de 1404 compostos identificados com erro menor que 1ppm. A classe N representa 36,6% dos compostos identificados, a classe NO 21,9%, a classe NS 15,8%, a classe N2 15,4% e a classe OS 10,3%. Na amostra PD 02 **(b)** foram atribuídas três classes e 1434 compostos polares identificados com erro menor que 0,6 ppm. A classe N representa 61,4% de compostos identificados, a classe NO 30,4% e a classe OS 8,2%. Na amostra PD 03 **(c)** foram atribuídas apenas

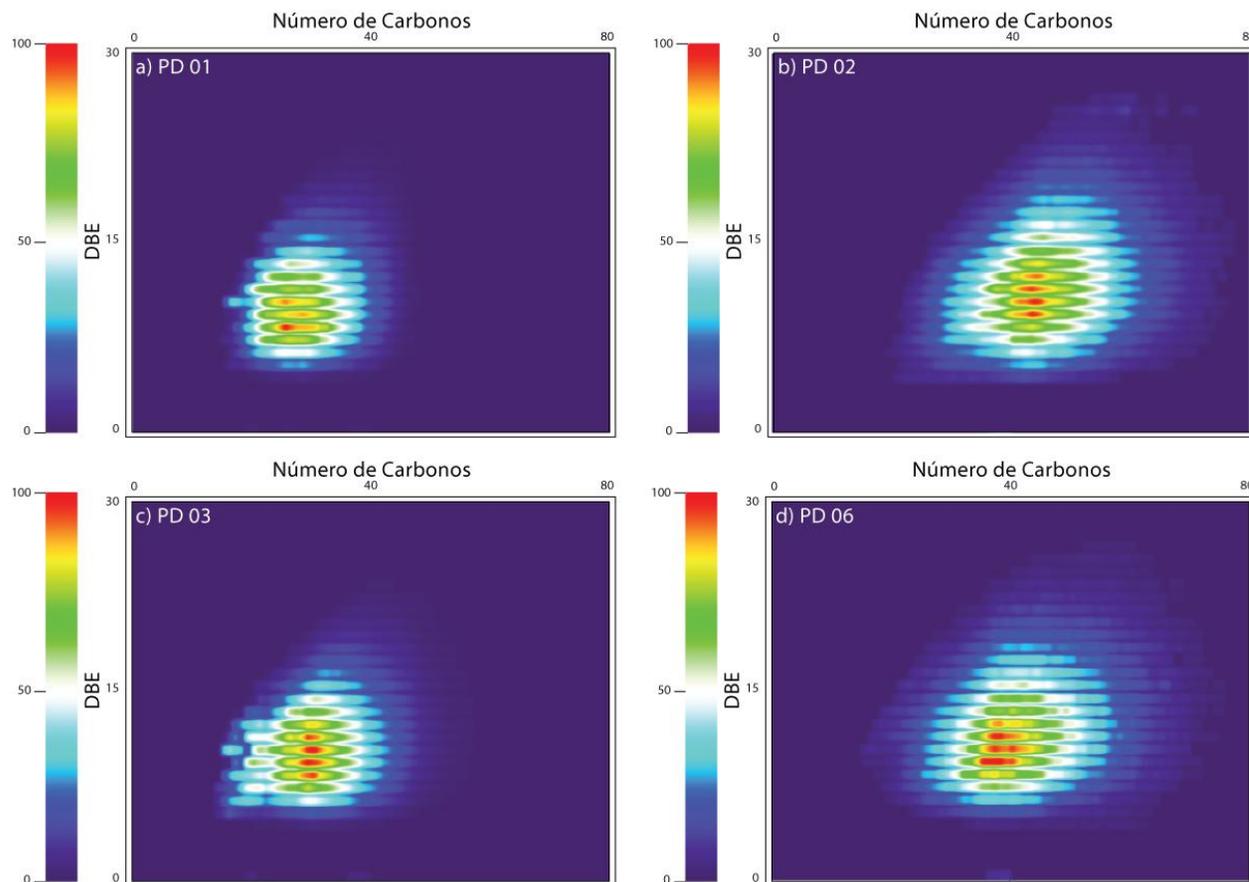
duas classes, com 809 compostos identificados e erro menor que 1 ppm. A classe N representa 78,2% de compostos e a classe NO 21,8%. Já considerando a amostra PD 06 **(d)** foram identificados 1532 compostos polares com erro menor que 0,8 ppm, divididos em três classes, a classe N representa 62% dos compostos, a classe NO 14,6% e a classe N2 23,4%.



**Figura 51.** Classes das amostras de petróleo obtidas por ESI(+) FT-ICR MS.

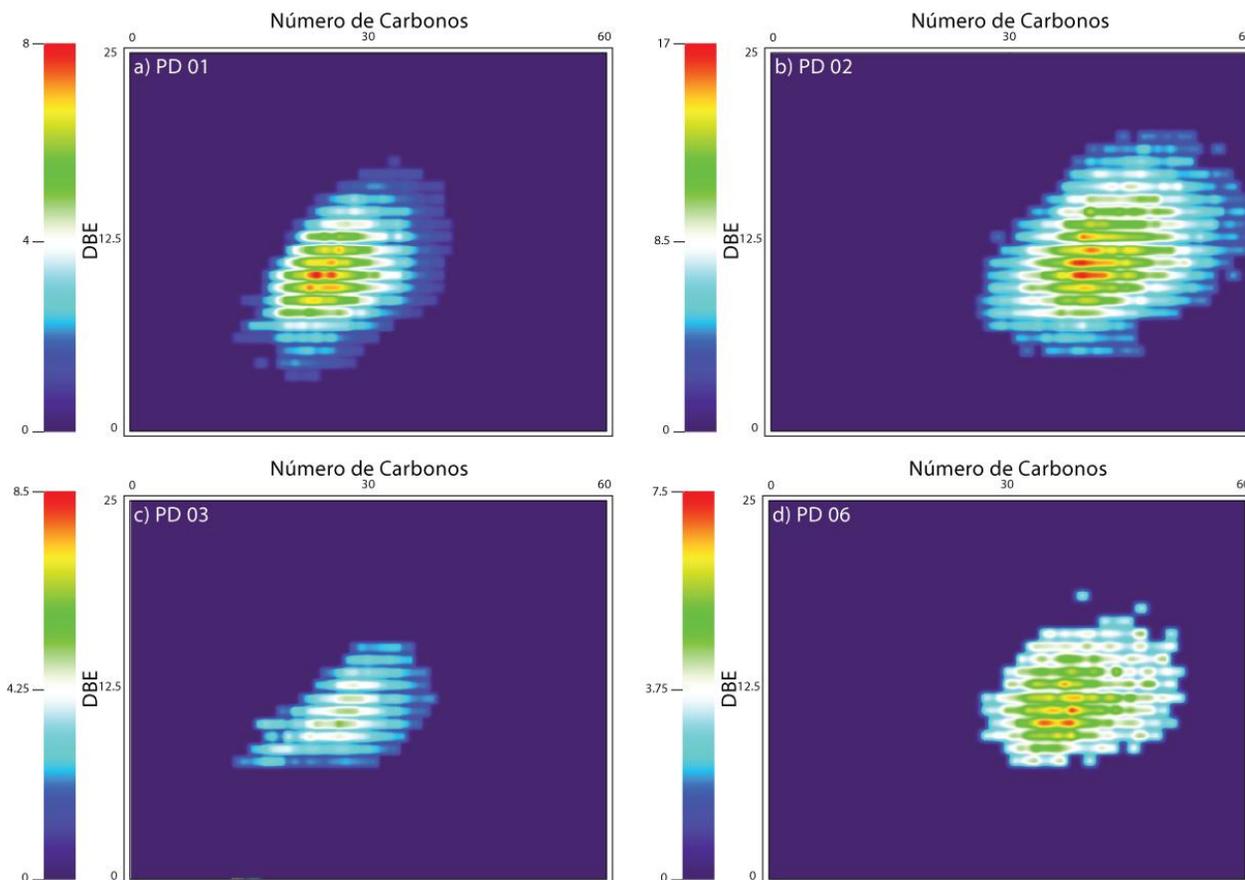
A **Figura 52** descreve os gráficos de número de carbonos vs DBE para a classe N, presente em todas as amostras. A amostra PD 01 **(a)** apresenta compostos com 14 a 47 carbonos e com insaturações de 5 a 23, o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C24 a C28 para as DBE 8-10. Amostra PD 02 **(b)** possui compostos de C11 a C78, com DBE de 5 a 28, o máximo de intensidade relativa aparece para os compostos de C42-C47 e com DBE de 8-14. A Pd 03 **(c)** apresenta compostos de C14 a C55, com DBE de 5 a 26, máximo de intensidade em C35-C38 e DBE 8-12. A amostra PD 06 **(d)** é semelhante a PD 02 na distribuição dos compostos nitrogenados,

a faixa de número de carbonos vai de C15 a C74, com DBE de 5 a 26, o máximo de intensidade está entre C35 a C45 e nas DBE 9-13.



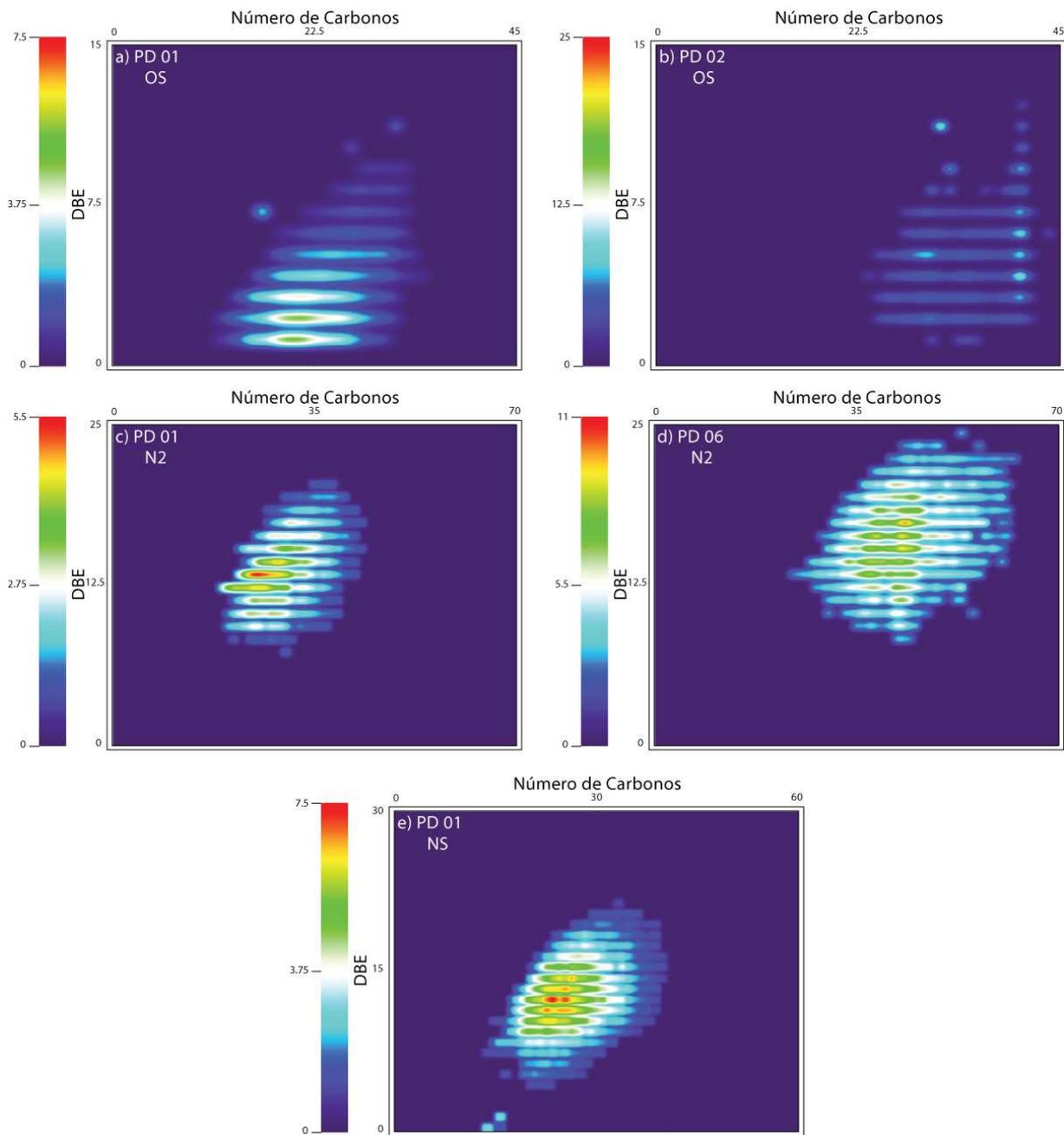
**Figura 52.** Comparativo das classes N obtidas por ESI(+) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.

A **Figura 53** compara as classes NO obtidas para as quatro amostras de petróleo. A amostra PD 01 **(a)** apresenta número de carbonos de C14 a C42, com DBE de 5 a 21, o máximo de intensidade está de C23 a C27 e nas DBE 9-11. A amostra PD 02 **(b)** apresenta número de carbonos de C28 a C60, com DBE de 8 a 23, a intensidade máxima está em C41-C45 e com DBE de 10-13. A amostra PD 03 **(c)** possui compostos de C20 a C40, DBE de 9 a 18, essa é amostra que apresenta compostos com menores valores de intensidade relativa se comparadas às outras classes NO. A amostra PD 06 **(d)** apresenta DBE de 9 a 22, C29 a C55, a intensidade máxima está entre C38-C41 e nas DBE 10-12.



**Figura 53.** Comparativo das classes NO obtidas por ESI(+) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.

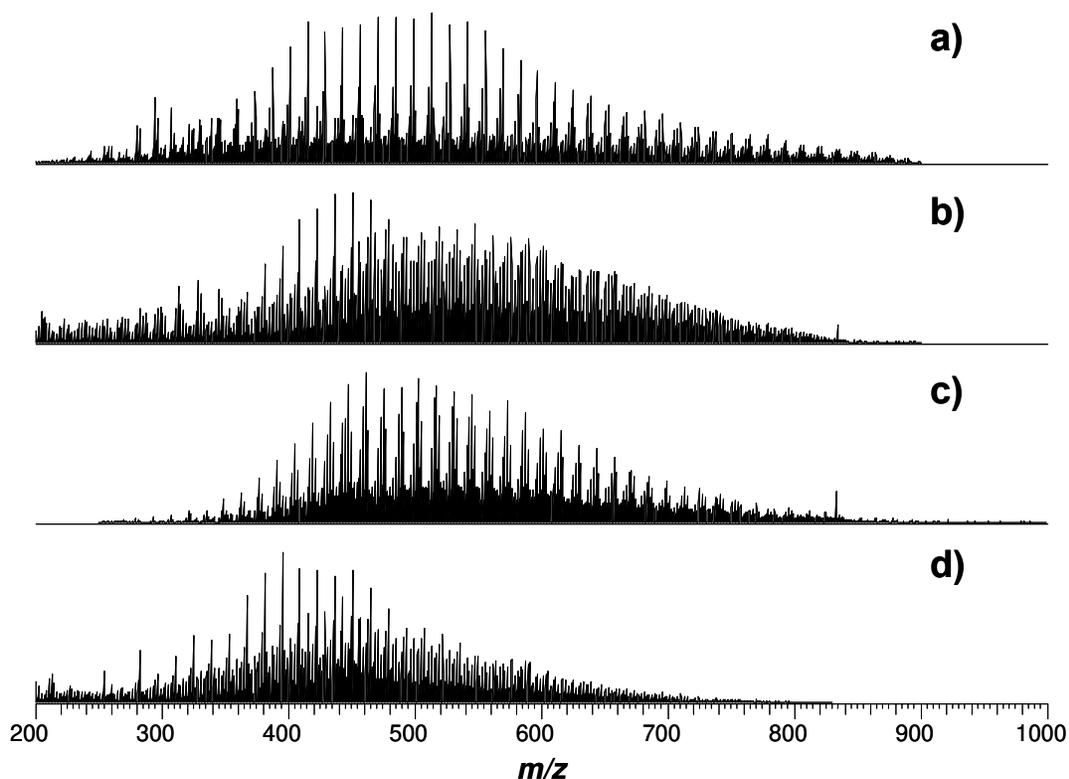
A **Figura 54** ilustra os comparativos entre as classes OS e N2 presente em duas amostras e apresenta também a classe NS identificada apenas na amostra PD01. A classe OS é comum para a PD01 e PD02, na amostra PD01 **(a)** os valores de DBE para a classe OS vão de 1 a 12, o número de carbonos está entre C11 a C35, a amostra PD 02 **(b)** apresenta para mesma classe, DBE de 1 a 13 e número de carbonos de C23 a C43. Comparando-se as classes N2 para PD01 e PD06, é possível notar que na amostra PD 01 **(c)** o número de carbonos vai de C18 a C43, com DBE de 7 a 20, enquanto na amostra PD 06 **(d)** o número de carbonos vai de C23 a C63 e as DBE estão entre 8 e 24. Já a amostra PD 01 **(e)** para classe NS apresenta DBE de 6 a 18 e número de carbonos de C13 a C40, os pontos visto nos carbonos 6-7, com DBE entre 0 e 1 são contaminantes da amostra.



**Figura 54.** Comparativo das classes OS, N2 e NS obtidas por ESI(+) FT-ICR MS nas amostras PD 01 (OS, N2 e NS), PD 02 (OS), PD 06 (N2).

### 5.3.2- Caracterização por ESI (-) FT-ICR MS

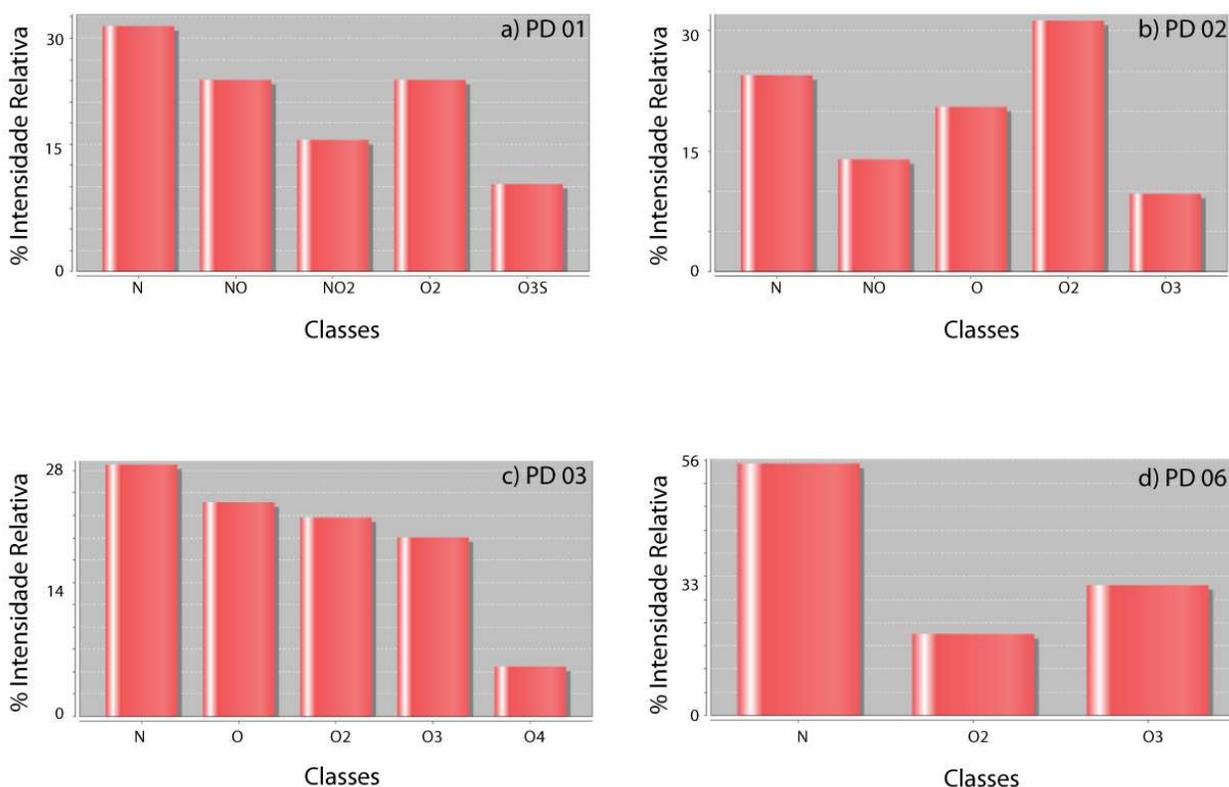
Os espectros de massas obtidos por ESI(-) FT-ICR MS para as quatro diferentes amostras de petróleo são mostrados na **Figura 55**.



**Figura 55.** Espectros de petróleo obtidos por ESI(-) FT-ICR MS. Amostra (a) PD01, amostra (b) PD02, amostra (c) PD03 e amostra (d) PD06.

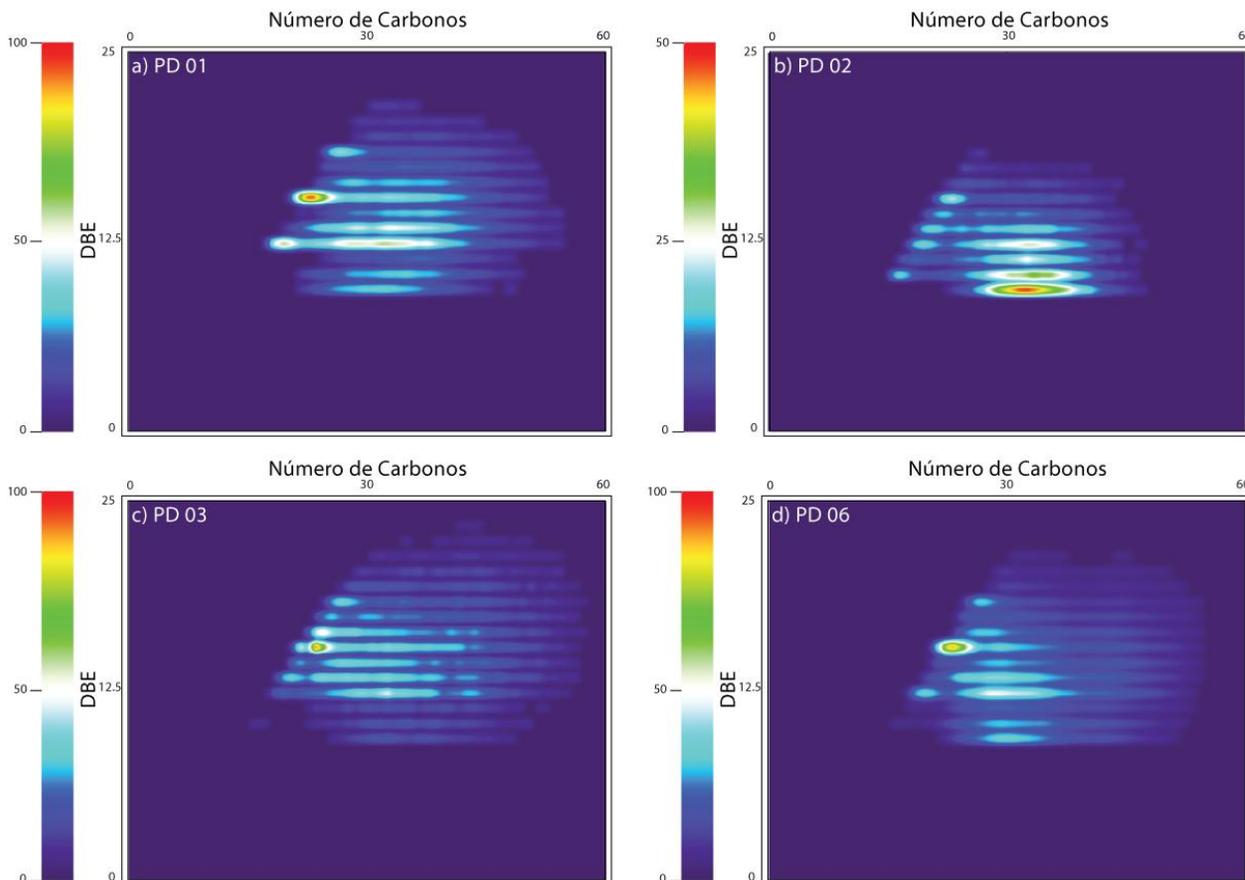
A **Figura 56** apresenta as classes de compostos polares atribuídas para quatro amostras de petróleo. Foram identificadas na amostra PD 01 **(a)** cinco classes de compostos para ESI(-), um total de 1172 compostos polares atribuídos com erro menor que 0,6 ppm. Sendo que a classe N representa 28,9%, a classe NO 22,6%, a classe NO2 15,6%, a classe O2 22,6% e a classe O3S 10,3%. A amostra PD02 **(b)** apresenta 915 compostos atribuídos com erro menor que 1 ppm também para cinco classes, das quais a classe N representa 24,5%, a classe NO 14%, a classe O 20,5%, a classe O2 31,3 % e a classe O3 9,7%. Foram identificados para a amostra PD 03 **(c)** o mesmo

número de classes da PD 02, com 1523 compostos atribuídos, cuja composição para N representa 28, 2%, classe O 24%, classe O2 22,3%, classe O3 19,9%, classe O4 5,6% e com erro de 1 ppm. Já na amostra PD 06 **(d)** foram atribuídas três classes, com erro de 0,8 ppm para os 729 compostos identificados, sendo 54,3% da classe N, 17,6% da classe O2 e 28,1% da classe O3.



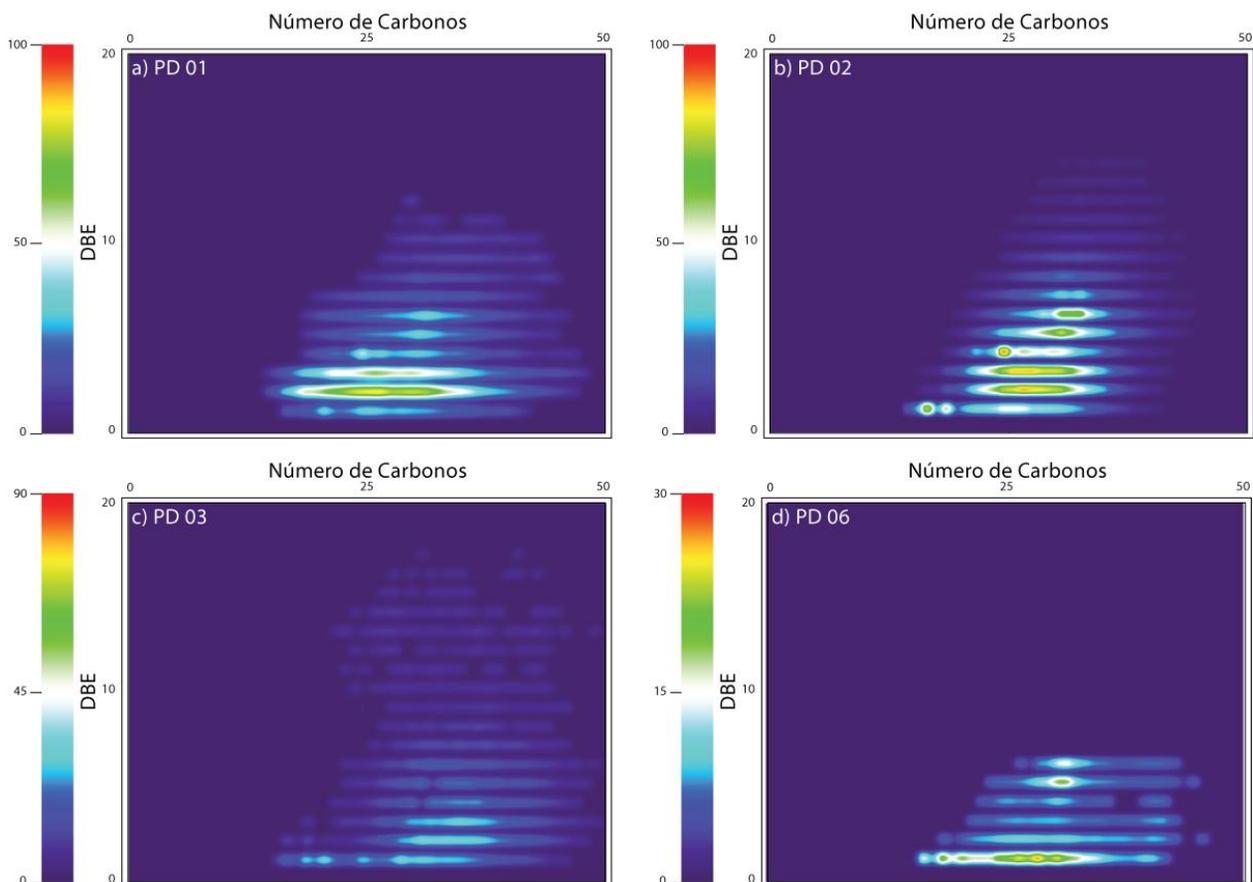
**Figura 56.** Classes das amostras de petróleo obtidas por ESI(-) FT-ICR MS.

A **Figura 57** compara as quatro amostras analisadas por ESI(-) FT-ICR MS para a classe N. A amostra PD 01 **(a)** é formada por compostos com número de carbonos entre C15 a C55 e DBE de 10 a 20. A amostra PD 02 **(b)** apresenta compostos de C13 a C46 e DBE de 10 a 18. Para a amostra PD03 **(c)** o número de carbonos vai de C14 a C57 e as DBE de 10 a 23. Já amostra a amostra PD 06 **(c)** apresenta compostos de C13 a C49, com DBE de 10 a 21.



**Figura 57.** Comparativo das classes N obtidas por ESI(-) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.

Também comum a todas as amostras, a classe O2 é mostrada na **Figura 58** que compara a composição de número de carbono vs DBE para as quatro amostras analisadas. A amostra PD 01 **(a)** apresenta número de carbonos de C12 a C47 e DBE de 1 a 12. A amostra PD 02 **(b)** apresenta número de carbonos de C13 a C42 e com DBE de 1 a 15. A amostra PD 03 **(c)** com DBE entre 1 e 18, apresenta número de carbonos de C13 a C49. Enquanto a amostra PD 06 **(d)** apresenta compostos de C15 a C45, com DBE de 1 a 8.

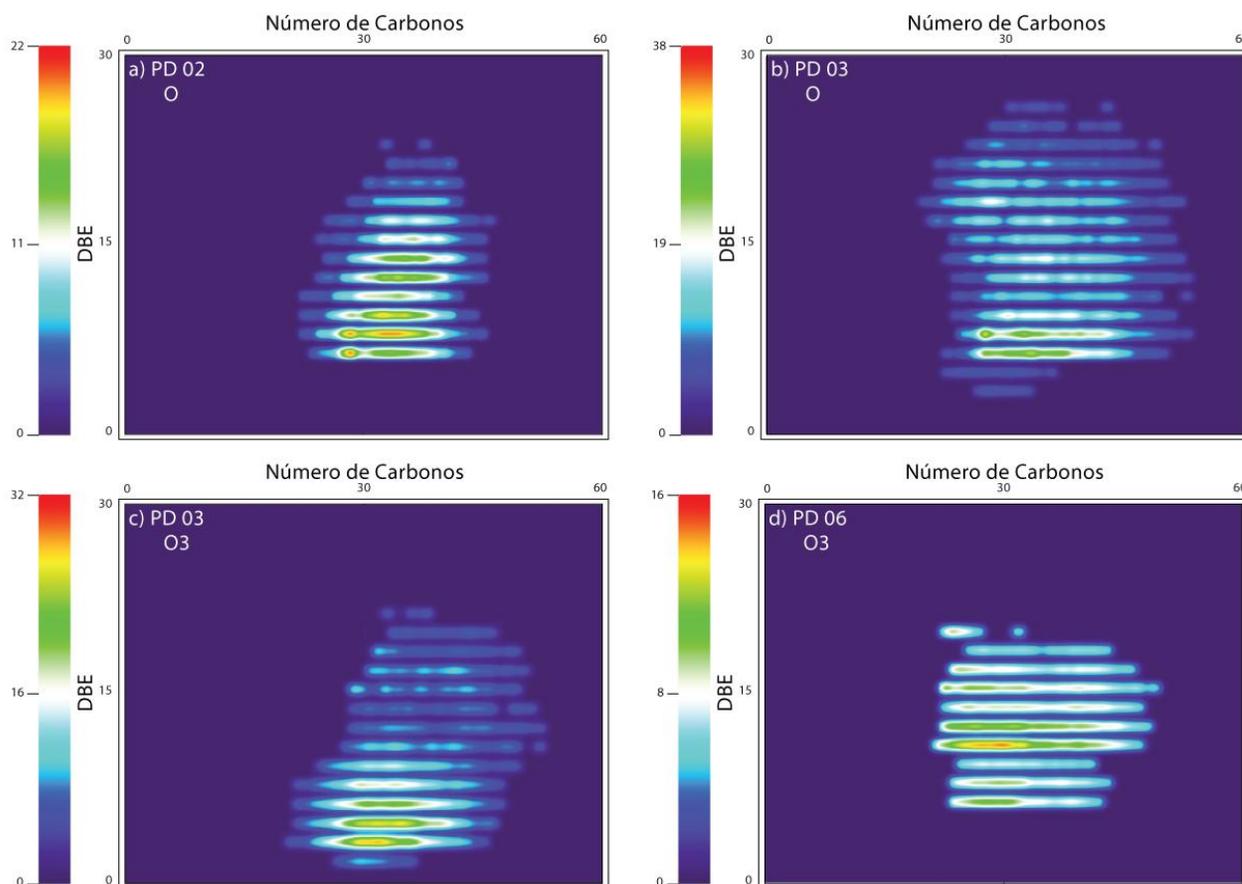


**Figura 58.** Comparativo das classes O2 obtidas por ESI(-) FT-ICR MS em quatro amostras diferentes de petróleo.

A **Figura 59** compara a classe O para as amostras PD 02 **(a)** e PD 03 **(b)** e a classe O3 para as amostras PD 03 **(c)** e PD 06 **(d)**. A amostra PD 02 apresenta DBE de 3 a 26, com número de carbonos de C21 a C50, já amostra PD 03 possui compostos de C21 a C56 e DBE de 2 a 28 para a classe O. Observando a classe O3, a amostra PD 03 é formada por número de carbonos que vão de C20 a C48, com DBE de 1 a 26, enquanto a amostra PD 06 apresenta DBE 3 a 23 e número de carbonos de C20 a C53.

A **Figura 60** compara a classe NO para as amostras PD 01 **(a)** e PD 02 **(b)**, além disso, mostra a distribuição de número de carbonos vs DBE para a classe NO2 da amostras PD 01 **(c)**, a classe O3S para a amostra PD 01 **(d)** e a classe O4 para a amostra PD 03 **(e)**. A amostra PD 01 possui classes NO com número de carbonos de C16 a C51 e com DBE de 8 a 23, já a amostra PD 02 apresenta DBE de 5 a 16 e

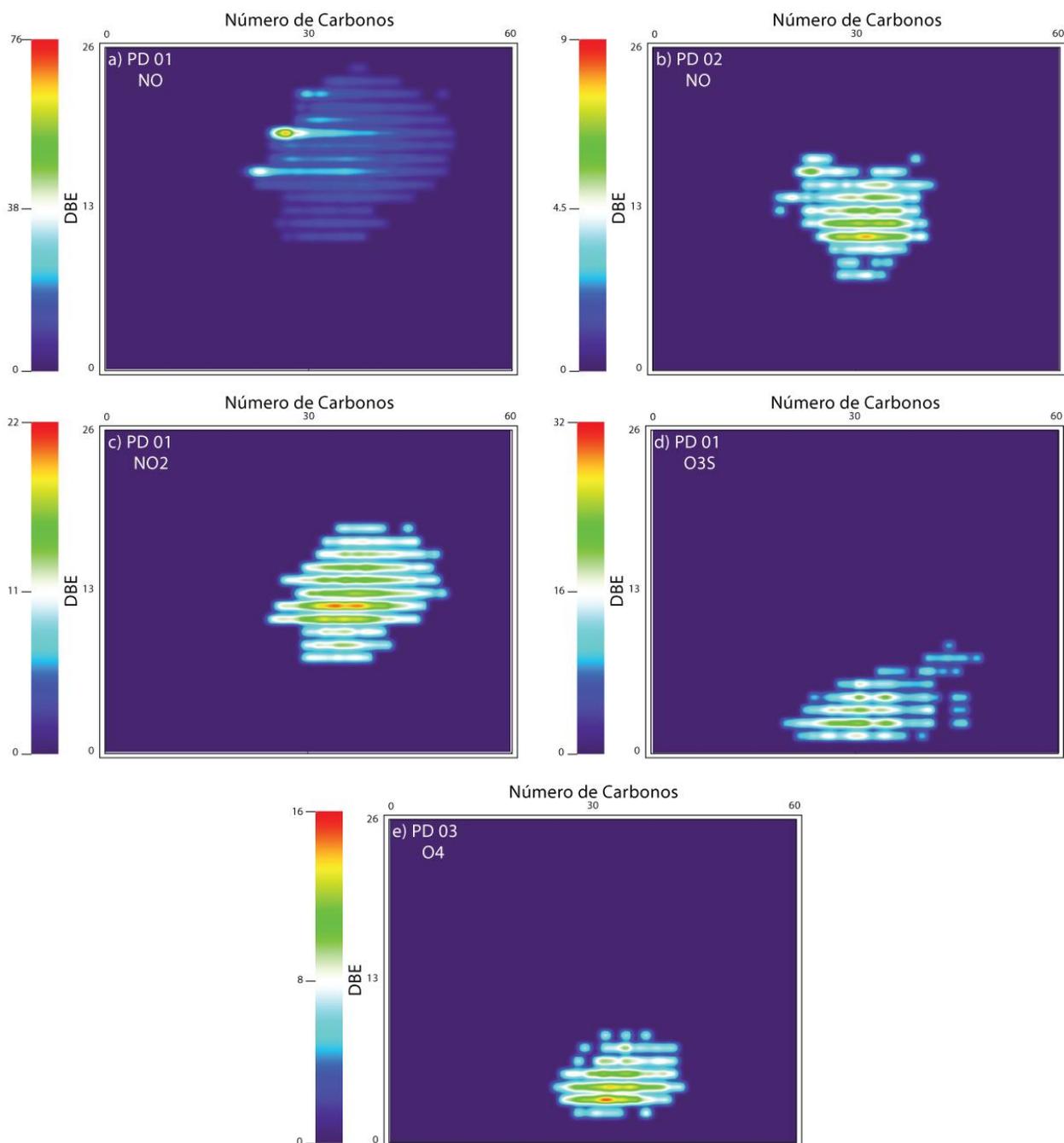
número de carbonos de C16 a C41. A amostra PD 01 apresenta a classe NO2 de C23 a C54 com DBE de 5 a 16 e classe O3S de C 14 a C49, com DBE de 1 a 7. A amostra PD 03 possui classe O4 com número de carbonos de 23 a 43 e DBE de 1 a 8.



**Figura 59.** Comparativo das classes O e O3 obtidas por ESI (-) FT-ICR MS. A classe O está presente nas amostras PD 02 (a) e PD 03 (b). A classe O3 está presente na amostra PD 03 e PD 06.

Todas as amostras apresentadas possuem semelhanças e diferenças na porcentagem de classes, número de DBE e número de carbonos dos seus compostos polares. Essa caracterização primária é feita com objetivo de empregar métodos quimiométricos como *Principal Component Analysis* (PCA) e *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) para extrair informações geoquímicas que levem a novos indicadores moleculares do petróleo. A base de caracterização exploratória dos dados de polares

em petróleo é o que torna a petroleômica MS o mais novo campo de estudos que vai do poço ao posto.



**Figura 60.** Comparativo das classes NO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>S e O<sub>4</sub> obtidas por ESI(-) FT-ICR MS. A classe NO está presente nas amostras PD 01 (a) e PD 02 (b). A classe NO<sub>2</sub> (c) e O<sub>3</sub>S (d) estão presentes na amostra PD 01. A classe O<sub>4</sub> (e) está presente na amostra PD 03.

## 6.0- CONCLUSÕES

A espectrometria de massas utilizando ionização por eletrospray e ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS), cuja característica principal é a altíssima resolução e exatidão na medida de massa, permite a identificação de milhares de constituintes polares do petróleo. A comparação de ESI com EASI constitui uma possibilidade para eliminar possíveis interferentes que são associados aos solventes utilizados para diluir as amostras de petróleo, EASI mostra que é possível analisar polares em petróleo em condições ambiente e sem nenhum preparo de amostra.

O estudo preliminar de precisão para o método de análise de polares, embora necessite ser avaliada com um número maior de matrizes, evidencia a boa concordância dos dados em termos de repetitividade e reprodutibilidade analítica, além de atender a critérios de distribuição de massa média e DBE, importantes na avaliação da composição de polares no petróleo. O método analítico é considerado bom quando apresenta valores de repetitividade e reprodutibilidade menores do que 20%, neste estudo obtivemos valores menores que 10% que enfatizam a tendência para obter uma metodologia com valores ótimos de precisão analítica.

A caracterização de polares em petróleo constitui sua impressão digital e representa a sua composição química em NSO compostos. A tecnologia é promissora e seu custo embora considerado inicialmente alto, tem como perspectiva prover a médio e longo prazo informações que já a colocam como uma ferramenta de enorme potencial nos estudos para a caracterização de petróleo. A petroleômica MS já faz parte da rotina das empresas que exploram, produzem e refinam petróleo no mundo todo.

## 7.0- PERSPECTIVAS FUTURAS

A aplicação da técnica de ESI FT-ICR MS com inserção direta de amostras de petróleo e caracterização das diversas classes de compostos polares, tem como perspectivas futuras obter resultados que vão auxiliar nos estudos de origem, evolução térmica e hidrotreamento de petróleos e seus derivados, através da aplicação do método analítico apresentado neste trabalho de doutorado. Existem vários trabalhos sendo realizados em petroleômica no laboratório ThoMSon de espectrometria de massas, em colaboração com a Rede de Geoquímica da Petrobras que utiliza a caracterização feita com altíssima resolução e exatidão como base para solucionar problemas relevantes.

A validação da metodologia será complementada utilizando um maior número de matrizes de diferentes petróleos e a aplicação de cartas de controle com amostras representativas de forma a poder conhecer sua faixa de variação e de se estabelecer critérios de aceitação para cada classe dentro da sua faixa de medida.

Os estudos em Petroleômica MS vão avançar cada dia mais e a caracterização de polares em petróleo é apenas o primeiro passo para obter informações tão significativas quanto às de caracterização de hidrocarbonetos, já consagradas e utilizadas pela a indústria do petróleo no Brasil e no mundo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] Dass C (2007) Fundamental of contemporary mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons.
- [2] Watson JT, Parkman OD (2007) Introduction to mass spectrometry: instrumentation, application and strategies for data interpretation. West Sussex: John Wiley & Sons.
- [3] Ham BM (2008) Even electron mass spectrometry with biomecules applications. Hoboken: John Wiley & Sons.
- [4] Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray ion source. another variation on the free-jet theme. J Phys Chem. 88: 4451-4459.
- [5] Cole RB (1997) Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals instrumentation and applications. New York: John Wiley & Sons.
- [6] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246:64-71.
- [7] Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F (1985) Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. Anal Chem. 57: 2935–2939.
- [8] Karas M, Bahr U, Giebmann U (1991) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Mass Spectrom Rev. 10:335-357.
- [9] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T (1988) Protein and polymer analysis up to  $m/z$  100.000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2:151-153.
- [10] Harris GA, Nyadong L, Fernandez FM (2008) Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. Analyst 133:1297-1301.
- [11] Chen H, Gamez G, Zenobi R (2009) What can we learn from ambient ionization techniques? J Am Soc Mass Spectrom. 20:1947-1963.
- [12] Takats Z, Wiseman JM, Cooks RG (2005) Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. J Am Soc Mass Spectrom. 40:1261-1275.
- [13] Haefliger OP, Jeckelman N (2007) Direct mass spectrometric analysis of flavors and fragrances in real applications using DART. Rapid Commun Mass Spectrom. 21:1361-1366.

- 
- [14] McEwen C, Gutteridge S (2007) Analysis of the inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the atmospheric solids analysis probe (ASAP) method. *J Am Soc Mass Spectrom.* 18:1274-1278.
- [15] Sampson JS, Hawkridge AM, Muddiman DC (2006) Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 17:1712-1716.
- [16] Haddad R, Sparrapan R, Eberlin MN (2006) Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20:2901-2905.
- [17] Haddad R, Sparrapan R, Kotiaho T, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization-membrane introduction mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. *Anal Chem.* 80:898-903.
- [18] Haddad R, Milagres HMS, Catharino RR, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Anal Chem.* 80:2744-2750.
- [19] Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H (1994) Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 66:4557-4559.
- [20] Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H (1995) Sonic spray mass spectrometry. *Anal Chem.* 67:2878-2882.
- [21] Cooks RG, Ouyang Z, Takáts Z, Wiseman JM (2006) Ambient mass spectrometry. *Science* 311:1566-1570.
- [22] Cotter RJ (1984) Lasers and mass spectrometry. *Anal Chem.* 56:485-504.
- [23] Alberici RM, Simas RC, Sanvido GB, Romão W, Lalli PM, Benassi M, Cunha IBS, Eberlin MN (2010) Ambient Mass Spectrometry: Bringing MS into the Real World. *Anal Bioanal Chem.* 398:265-294.
- [24] Hirabayashi A, Hirabayashi Y, Sakairi M, Koizumi H (1996) Multiply-charged ion formation by sonic spray. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 10:1703-1705.
- [25] Leary JJ, Schmidt RL (1996) Quadrupole mass spectrometers: intuitive look at the math. *J Chem Edu.* 73:1141-1144.
- [26] Miller PE, Denton MB (1986) The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *J Chem Edu.* 63:617-623.

- 
- [27] Stephens W (1946) A Pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Phys Rev.* 69: 691-695.
- [28] Hoffmann E, Stroobant V (2007) *Mass spectrometry: principles and applications.* London: John Wiley & Sons.
- [29] Marshall AG, Hendrickson CL, Ernmetta MR, Rodgers RP, Blakney GT, Nilsson CL (2007) Fourier transform ion cyclotron resonance: state of the art. *Eur J Mass Spectrom.* 13:57-59.
- [30] Deng W, Gomez A (2007) Influence of space charge on the scale-up of multiplexed electrospray. *J Aero Sci.* 38:1062-7078.
- [31] Eldin AK (2006) *Eur J Lipid Sci Technol.* 58:1051-1081.
- [32] Barreira JCM, Casal S, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP, Pereira JA (2009) Nutritional, fatty acid and triacylglycerol profiles of castanea sativa mill cultivars: A compositional and chemometric approach. *J Agri Food Chem.* 57: 2836-2842.
- [33] Campanella A, Rustoy E, Baldessari A, Baltanas MA (2010) Lubricants from chemically modified vegetable oils. *J BioTechnol.* 101:245-254.
- [34] Rahate AR, Nagarkar JM (2007) Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic surfactants for cosmetic applications. *J Disp Sci Technol.* 28: 1077-1080.
- [35] Menendez S, Falcon L, Simon DR, Landa N (2002) Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses* 45: 329-332.
- [36] La Rovere EL, Avzaradel AC, Monteiro JMG (2009) Potential synergy between adaptation and mitigation strategies: production of vegetable oils and biodiesel in northeastern Brazil. *Climate Reserch* 40:233-239.
- [37] Nazir N, Ramli N, Mangunwidjaja D, Hambali E, Setyaningsih D, Yuliani S, Yarmo MA, Salimon J (2009) Extraction, transesterification and process control in biodiesel production from *Jatropha curcas*. *Eur J Lip Sci Technol.* 111:1185-1200.
- [38] Gunstone FD (2002) *Vegetable oils in food technology composition, properties and uses.* Canada: CRC Press LLC.
- [39] Fils JM (2000) *The production of oils in edible oil processing.* Sheffield: Academic Press.
- [40] Timms RE (2003) *Confectionery fats handbook.* Bridgwater: The oil press Lipid Library.

- 
- [41] Akoh CC, Min D (1997) Nomenclature and classification of lipids. New York: Marcel Dekker Inc.
- [42] Swern D (1979) Baileys industrial oil and fat products. New Jersey: John Wiley & Sons.
- [43] Firestone D (2006) Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes. Washington DC: AOAC Press.
- [44] USDA-NASS (2000) Agricultural statistics. <http://www.usda.gov/nass/pubs.htm>
- [45] Gunstone FD (2001) Soybeans dominante global oiseed. Inform. 12:737-740.
- [46] Oueslati I, Taamalli W, Haddada FM, Manai H, Trigui A, Zarrouk M (2009) Improving the fatty acid composition of virgin olive oil through clonal selection. J Hortic Sci Biotech. 84:155:160.
- [47] Fedeli, E (1996) Olive oil extraction technology and preservation, in world olive encyclopaedia. Internat Oli Oil Concil. 253-291.
- [48] Ackman RG (1983) Chemical composition of rapessed oil, in high and low erucico acid rapeseed oil. Toronto: Academic Press.
- [49] Antoniassi R, Esteves W, Meirelles AJD (1998) Pretreatment of corn oil for physical refining. J Am Oil Chem Soc. 75:1411-1415.
- [50] Hicks KB, Moreau RA (2001) phytosterol and phytanos: Functional food cholesterol. Food Technol. 55:63-67.
- [51] Correia MP (1984) Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa nacional.
- [52] Bondar JS (1964) Palmeiras do Brasil. São Paulo: Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.
- [53] Albuquerque MLS, Guedes I, Alcantara P, Moreira SGC (2003) Infrared absorption spectra of buriti (*Mauritia flexuosa*) oil. Vibrational Spectroscopy 33:127-131.
- [54] Ferraz IDK, Camargo JLC, Sampaio PTB (2002) Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procena* D.C): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. Acta Amaz. 32: 647-661.
- [55] Lorenzi H (1992) Árvores Brasileiras - Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum.

- 
- [56] Qi SH, Wu DG, Zhang S, Luo XD (2004) Constituents of *Carapa guianensis* aubl. (*Meliaceae*). *Pharma*. 59: 488-490.
- [57] Nogueira OL, Carvalho C, Muller C, Galvão E, Silva H, Rodrigues J, Oliveira M, Carvalho Neto JO, Nascimento W, Calvazarra BA (1995) Cultura do açaí. Brasília: Embrapa/Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia oriental.
- [58] Rogez H (2000) Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação. Belém: EDUFPA.
- [59] Arruda FP, Beltrão NEM, Andrade AP, Pereira WE, Severino LS (2004) Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L) como alternativa para o semi-árido nordestino. *Rev Oleag Fibr*. 8:789-799.
- [60] Rovere ELL, Obermaier M (2009) Alternativa Sustentável. *Sci Am Brasil*. 32:68-75.
- [61] Macedo LR, Wagner WJ (1984). Revisão bibliográfica sobre a cultura da mamona. Belém: SUDAM/DSP.
- [62] Beltrão NE, Silva LC (1999) Os múltiplos usos do óleo da mamoneira (*Ricinus communis* L) e a importância do seu cultivo no Brasil. *Fib Óleos*. 31:7-12.
- [63] Dobarganes MC, Pérez-camino MC, Marquez-Ruiz G (1989) Determinación de compuestos polares en aceites y grasas de fritura. *Grasas y Aceites* 1:35-38.
- [64] Kowalski B (1990) Evaluation of the stability of some antioxidants for fat-based foods. *Thermochem Acta* 177:9-14.
- [65] Gomes T, Caponio F, Delcuratolo D (2003) Fate of oxidized triglycerides during refining of seed Oils. *J Agric Food Chem*. 51:4647-4651.
- [66] Azuma G, Kimura N, Hosokawa M, Miyashita K (2009) Effect of droplet size on the oxidative stability of soybean oil TAG and fish oil TAG in oil-in-water emulsion. *J Ole Sci*. 58: 329-338.
- [67] Aparicio R, Aparicio-Ruiz R (2000) Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J Chromatogr A* 881:93-104.
- [68] Bereau D, Benjelloun-Mlayah B, Banoub J, Bravo R (2003) FA and unsaponifiable composition of five Amazonian palm kernel oils. *JAOCS* 80:49-53.
- [69] Tang TS (2002) FA fatty acid composition of edible oils in the Malaysian market, with special reference to trans fatty acids *J Palm Oil Res*.14:1-8.

- 
- [70] Gamazo JV, Falcón MSG, Gándara JS (2002) Comparative analysis of different plant oil by HPLC-APCI mass spectrometry. *J Chromatogr A* 976:255-263.
- [71] Mlaya BB, Bereau D, Banoub J, Bravo R (2003) Fatty acid and unsaponifiable composition of five Amazonian palm kernel oils. *JAACS* 80:49-53.
- [72] Palmer JA, Palmer FJ (1989) Rapid analysis of TAG using high-performance liquid chromatography with light scattering detection. *J Chromatogr A* 465: 369-377.
- [73] Fasciotti M, Pereira Netto AD (2010) Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS/MS. *Talanta* 81:1116-1125.
- [74] Lisa M, Holcapek M, Rezanka T, Kabátová N (2007) High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection characterization of delta-polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils. *J Chromatogr A* 1146:67-77.
- [75] Kobayashi T, Kato YH, Tsukamoto M, Ikuta K, Sakudo A (2009) Portable visible and near-infrared spectrophotometer for triglyceride measurements. *Int J Mol Med*. 23:75-79.
- [76] Vlahov G (2009) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopic detection of the adulteration of extra virgin olive oils extracted from different cultivars with cold-pressed hazelnut oil. *JOACS* 92:1747-1754.
- [77] Lin JT, Arcinas A (2008) Analysis of regiospecific triacylglycerols by electrospray ionization-mass spectrometry of lithiated adducts. *J Agric Food Chem*. 56:4909-4915.
- [78] Law WS, Chen HW, Balabin R, Berchtold C, Meier L, Zenobi R (2010) Rapid fingerprinting and classification of extra virgin olive oil by microjet sampling and extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 135:773-778.
- [79] Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IB, Sawaya AC, Eberlin MN (2005) Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration and aging. *Anal Chem*. 77:7429-7433.
- [80] Chapagain BP, Wiesman Z (2009) MALDI-TOF/MS fingerprinting of TAG in olive oils produced in the Israeli Negev desert. *J Agric Food Chem*. 57:1135-1142.
- [81] Kaufman M, Wiesman Z (2007) Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J Agric Food Chem*. 55:1405-1413.
- [82] Lay JO Jr, Liyanage R, Durham B, Brooks J (2006) Rapid characterization of edible oils by direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis using triacylglycerols. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 20:952-958.

---

[83] Saraiva AS, Cabral EC, Eberlin MN, Catharino RR (2009) Amazon vegetable oils and fats: Fat typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS fingerprinting. *J Agri Food Chem.* 57:4030-4034.

[84] Akoh C (2001) Oxidative stability of fat substitutes and vegetable oils by the oxidative stability index method. *JAOCS* 71:211-216.

[85] AOCS (2004) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. Champaign: AOCS.

[86] Dysseler P, Dieffenbacher A (2000) The importance of analytical data fat technology. In: IUPAC workshop on fats, oils and oilseed analysis. Rio de Janeiro: EMBRAPA.

[87] Neff WE, Byrdwell WC (1998) Characterization of model triacylglycerol (triolein, trilinolein and trilinolenin) autoxidation products via high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 818:169-186.

[88] Sjovall O, Kuksis A, Kallio H. (2001) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tertbutyl hydroperoxide oxidation products of unsaturated triacylglycerols. *J Chromatogr A* 905:119-132.

[89] Frankel EM, Neff WE, Miyashita K (1998) Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols and Trilinolenoylglycerol. *Lipids* 25:40-47.

[90] Hartvigsen K, Hansen LF, Lund P, Bukhave K, Holmer G (2000) Determination of neutral lipid hydroperoxides by size exclusion HPLC with fluorometric detection application to fish oil enriched. *J Agric Food Chem.* 48:5842-5849.

[91] Bauer-Plank C, Steenhoorst-Slikkerveer L (2000) Analysis of triacylglyceride hydroperoxides in vegetable oils by nonaqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *JAOCS* 77:477-482.

[92] Akasaka K, Ohruji H, Meguro H (1998) Normal phase High Performance Liquid Chromatography of hydroperoxides with a fluorometric post column detection system for lipid hydroperoxides. *J Chromatogr A* 628:31-35.

[93] Song JH, Chang CO, Terão J, Park DK (1993) Electrochemical detection of triacylglycerol Hydroperoxydes by RP-HPLC. *Biosci Biotech Biochem.* 57:476-480.

[94] Coppin EA, Pike OA (2001) Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in light-exposed soybean oil. *JAOCS* 78:13-18.

- 
- [95] Gordon MH, Mursi E (2006) A comparison of oil stability based on the method rancimat with storage at 20°C. JAOCS 71:649-651.
- [96] Antoniosi Filho NR, Mendes OL, Lanças FM (1995) Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. Chromat. 40:557-562.
- [97] Hartman L, Lago C (1973) A rapid preparation of fatty acids methyl esters from lipids. Laboratory Practice 22:457-477.
- [98] AOCS (2001) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society: Fatty acid composition by GC. AOCS Ce:1-62.
- [99] Doerschuck AP, Daubert BF (1948) Low temperature solvent fractionation of corn and calculations of its glyceride structure. JAOCS 25:425-433.
- [100] Eckey EW (1954) Vegetable fats and oils. New York: Reinhold Publishing.
- [101] Simas RC, Catharino RR, Cunha IBS, Cabral EC, Barrera-Arellano D, Eberlin MN, Alberici RM (2010) Characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Analyst 135:738-744.
- [102] Lalli PM, Sanvido GB, Garcia JS, Haddad R, Cosso RG, Maia DRJ, Zacca JJ, Maldaner AO, Eberlin MN (2010) Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Analyst 138: 745-750.
- [103] Moraes MC, Lago CL (2003) Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. Química Nova 4:556-563.
- [104] Dorsa R (2004) Tecnologia de óleos vegetais. Campinas: Westafilia separador do Brasil.
- [105] Barrera-Arellano D, Ruiz-Mendes V, Ruiz GM, Dobarganes C (1999) Loss of tocopherols and formation of degradation compounds in triacylglycerol model systems heated at high temperature. J Sci Food Agri. 79:1923-1928.
- [106] Fennema OR (2000) Química de los alimentos. Zaragoza: Acríbia.
- [107] Meltzer JB, Frankel EN, Bessler TR (2005) Analysis of thermally abused soybean oils for cyclic monomers. JAOCS 58:779-784.
- [108] Tissot BP, Welte DH (1984) Petroleum formation and occurrence. Berlin: Springer-Verlag.

- 
- [109] Restlé A (1984) O Petróleo. Tradução e adaptação de Mello RM, Hessel MH, Soldan AL. Rio de Janeiro: PETROBRAS/ CENPES.
- [110] Peters KE, Moldowan JM (1993) The biomarker guide: interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. New Jersey: Prentice-Hall.
- [111] Waples D W (1981) Organic geochemistry for explorations Geologists.USA: publishing company.
- [112] Speight JC (2001) Handbook of petroleum analysis. New York: John Wiley and Sons.
- [113] Altgelt KHB, Bonduszynski MM (1994) Composition and analysis of heavy petroleum fractions. New York: Marcel Dekker.
- [114] Orr WL, Sinnenghe Damste JSS (1990) Geochemistry of sulfur in petroleum systems. ACS Symposium series 429. Washington: ACS.
- [115] Ho TY, Rogers MA, Drushel HV, Koons CB (1974) Evolution of the sulfur compounds in crude oils. Am Assoc Pet Geol Bull. 58:2338-2348.
- [116 ] Homes AS (1986) Nitrogen functional groups in Utah tar sand bitumen and produced oils. AOSTRA J Res. 2:167-175.
- [117] Seifert WK, Howells WG (1969) Interfacially active acids in a California crude oil. Isolation of carboxylic acids and phenols. Anal Chem. 41:554-562.
- [118] Seifert WK (1975) Carboxylic acids in petroleum and sediments. Fort Chem Org Nat. 32:1-49.
- [119] Seifert WK (1973) Steroid acids in petroleum animal contribution to the origin of petroleum in: chemistry in evolution and systematics. London: Butterworths.
- [120] Ourisson G, Albrecht P, Rohmer M (1979) The hopanoids. Paleochemistry and biochemistry of group of natural products. Pure Appl Chem. 51:709-729.
- [121 ] Junior Milani A (2005) Processo decisório na exploração e produção de petróleo. ver Prod *online*. 5:1-20.
- [122] Meyers RA (1986) Handbook of petroleum refining processes. New York: Mc Graw Hill.
- [123] Mello MR, Hessel MH (1998) Biological marker and paleozoological characterization of the early marine incursion in the lacustrine sequences of the Campos Basin, Brazil (abs): AAPG Annual convention.

- 
- [124] Didyk BM, Simoneit BRT, Brassell SC (1978) Organic geochemical indicators of environmental conditions of sedimentation. *Nature* 272:216-222.
- [125] Mackenzie AS, Ouirke JME, Maxwell JR, Vandenbroucke M, Durand B (1980) Molecular parameters of maturation. *Geochem Cosmochem Acta* 44:1709-1721.
- [126] Bailey NJL, Jobson AM, Rogers MA (1973) Bacterial degradation of crude oil: comparison of field and experimental data. *Chem Geol.* 11:203-221.
- [127] Mapolelo MM, Stanford LA, Rodgers RP, Yen AT, Debord JD, Asomaning S, Marshall AG (2009) Chemical speciation of calcium and sodium naphthenate deposits by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Energ Fuels* 23:349-355.
- [128] Shi Q, Xu C, Zhao S, Chung KH, Zhang Y, Gao W (2010) Characterization of basic nitrogen species in coker gas oils by positive-ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energ Fuels* 24:563-569.
- [129] Klein GC, Rodgers RP, Marshall AG (2006) Identification of hydrotreatment resistant heteroatomic species in a crude oil distillation cut by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Fuels* 80:2071-2080.
- [130] Lu X, Shi Q, Zhao S, Gao J, Zhang Y, He J (2008) Composition and distribution of acidic compounds in Duba crude oil extracts: Revealed by negative electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry. *Chinese J Anal Chem.* 36:614-618.
- [131] Barrow MP, McDonnell LA, Feng X, Walker J, Derrick PJ (2003) Determination of the nature of naphthenic acids present in crude oils using nanospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: The continued battle against corrosion. *Anal Chem.* 75: 860–866.
- [132] Hughey CA, Rodgers RP, Marshall AG, Qian K, Robbins WK (2002) Identification of acidic NSO compounds in crude oils of different geochemical origins by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Org Geochem.* 33:743-759.
- [133] Nagai M, Masunaga T (1988) Hydrodenitrogenation of a mixture of basic and non-basic polynuclear aromatic nitrogen-compounds. *Fuels* 67:771-774.
- [134] Rodgers RP, White FM, Hendrickson CL, Marshall AG, Andersen KV (1998) Resolution, elemental composition, and simultaneous monitoring by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of organosulfur species before and after diesel fuel processing. *Anal Chem.* 70:4743-4750.
- [135] Williamson M (1995) Worldwide refining. *J Oil Gas* 93:47-49.

---

[136] Slavcheva E, Shone B, Turnbull (1999) Review of naphthenic acid corrosion in oil refining. *Br Corrosion J.* 34:125-131.

[137] Marshall AG, Rodgers RP (2004) Petroleomics: The next grand challenge for chemical analysis. *Accounts Chem Res.* 37: 53-59.

[138] Guan S, Marshall AG, Scheppele SE (1996) Resolution and chemical formula identification of aromatic hydrocarbons containing sulfur, nitrogen and oxygen in crude oil distillates. *Anal Chem.* 68: 46-71.

[139] Zhan D, Fenn JB (1999) Electrospray mass spectrometry of fossil fuels. *Inter J Mass Spectrom.* 194:197-208.

[140] Purcell JM, Hendrickson CL, Rodgers RP, Marshall AG (2006) Atmospheric pressure photoionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for complex mixture analysis. *Anal Chem.* 78:5906-5912.

[141] Kim YH, Kim S (2010) Improved abundance sensitivity of molecular ions in positive-ion APCI MS analysis of petroleum in toluene. *J A Soc Mass Spectrom.* 21:386-392.

[142] Corilo YE, Vaz BG, Simas RC, Nascimento HDL, Klitzke CF, Pereira RCL, Bastos WL, Santos Neto EV, Rodgers RP, Eberlin MN (2010) Petroleomics by EASI( $\pm$ ) FT-ICR MS. *Anal Chem.* 82:3990-3996.

[143] Wu Z, Rodgers RP, Marshall AG (2004) Two and three-dimensional van Krevelen diagrams: A graphical analysis complementary to the Kendrick mass plot for sorting elemental compositions of complex organic mixtures based on ultrahigh-resolution broadband fourier transform ion cyclotron resonance mass measurements. *Anal Chem.* 76:2511-2516.

[144] Kim S, Kramer RW, Hatcher PG (2003) Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic Matter, the van Krevelen diagram. *Anal Chem.* 75:5336-5344.

[145] Hughey AC, Hendrickson CL, Rodgers RP and Marshall AG (2001) Kendrick mass defect spectrum: a compact visual analysis for ultra-high resolution broadband mass Spectrom *Anal Chem.* 73:4676-4681.

[146] VIM (1995) Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia.

---

[147] DOQ-CGCRE-008 (2003) Orientações de validação de métodos de ensaios químicos.

[148] ABNT NBR 14597:2000 (2001) Precisão de métodos analíticos: determinação da repetitividade e reprodutibilidade de métodos para ensaios de produtos químicos – estudo intralaboratorial. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas.

[149] ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results part 3- intermediate measures of precision of a standard measurement method.

[150] NATA (1997) Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods.

[151] Miller JN, Miller J (2005) Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Endinburgh gate: Pearson Education Limited.

[152] Massart DL, Dijkstra A, Kaufman L (1978) Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. Amsterdam: Elsevier scientific publishing company.

[153] Simas RC, Nascimento HD, Vaz BG, Corilo YE, Klitzke CF, Cardoso RLP, Bastos WL, Eberlin MN (2010) Fatorial design and optimization of the petroleomic MS analysis: accessing data for precision evaluation. Presented at the 58th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics May 2010 Salt Lake City, USA.

[154] ISO/TR 22971:2005(E) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Practical guidance for the use of ISO 5725-2:1994 in designing, implementing and statistically analyzing interlaboratory repeatability and reproducibility results.

[155] Corilo YE, Vaz BG, Lalli FM, Simas RC, Nascimento HDL, Klitzke CF, Pereira RCL, Bastos WL, Eberlin MN (2010) PetroMassSpec: simplifying petroleomic data analysis via software processing and graphics. Presented at the 58th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics May 2010 Salt Lake City, USA.

[156] Almeida R, Mosoarca C, Chirita M, Udrescu V, Dinca N, Vukelić Z, Allen M, Zamfir AD (2008) Coupling of fully automated chip-based electrospray ionization to high-capacity ion trap mass spectrometer for ganglioside analysis. *Anal Biochem.* 378: 43-52.

---

## ANEXO 1- Cálculos para os testes de Dixon e Cochran

As equações utilizadas para o teste de Dixon estão descritas a seguir:

Organiza-se o conjunto de dados (Z) em ordem numérica crescente, do menor ao maior, convencionando-se de 1 até H (1 o menor valor e H o maior). De acordo com o número de resultados (H), realiza-se o cálculo do critério de Dixon (Q), conforme indicado na tabela a seguir, considerando-se o resultado maior (H) e o menor (1).

**Tabela 32.** Tabela esquemática para o teste de Dixon.

H	Teste Estatístico	
	para o menor resultado (Qm)	para o maior resultado (QM)
3 a 7	$Q_{10} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H) - Z(1)}$	$\frac{Z(H) - Z(H - 1)}{Z(H) - Z(1)}$
8 a 12	$Q_{11} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H - 1) - Z(1)}$	$\frac{Z(H) - Z(H - 1)}{Z(H) - Z(2)}$
13 ou mais	$Q_{22} = \frac{Z(3) - Z(1)}{Z(H - 2) - Z(1)}$	$\frac{Z(H) - Z(H - 2)}{Z(H) - Z(3)}$

Onde:

Z = valor do resultado na ordem H, por exemplo: Z(1) equivale ao valor do menor resultado (ou seja, do primeiro resultado em ordem numérica crescente);

Z(H) = valor do maior resultado em ordem numérica crescente de H valores;

Z(H-1) = valor do penúltimo resultado da série de h em ordem numérica crescente;

QM = Q para o maior valor;

Qm = Q para o menor valor.

---

O valor de Q obtido é comparado com o valor tabelado, com significância de 5%. Se o valor obtido for maior que o Q crítico tabelado, o resultado é considerado disperso, ou suspeito e sua exclusão ou não é avaliada dentro do contexto do teste.

Para obter o índice de Cochran, calcula-se as amplitudes W para cada conjunto de 2 repetições em p dias e organiza-se em ordem numérica crescente de magnitude (W1 a Wp), observando-se qual é o valor de W ( $W=|R1 - R2|$ ) mais alto.

O cálculo do critério de Cochran (C) é obtido conforme a equação abaixo:

$$C = \frac{W_p^2}{\sum_{i=1}^p W_i^2}$$

Onde:

Wp = Valor máximo de amplitude dentro de p dias.

Compara-se o valor de C com o crítico tabelado. Se o valor obtido no cálculo for maior que o tabelado, a amplitude observada (W maior) é considerada dispersa.

## ANEXO 2: Cálculo da ANOVA para o estudo de repetitividade e reprodutibilidade em ESI(+) FT-ICR MS

**Tabela 33.** ANOVA de dois fatores para classe N (ESI+).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	133	133	265			
Média	66,3	66,4	66,4			
Variância	0,00	0,0200	0,0100			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	131	131	262			
Média	65,3	65,7	65,5			
Variância	0,0200	0,405	0,183			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	132	131	262			
Média	65,8	65,3	65,5			
Variância	0,605	0,180	0,329			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	132	132	264			
Média	66,0	65,9	65,9			
Variância	0,00500	0,405	0,140			
<b>Total</b>						
Contagem	8	8				
Soma	527	526				
Média	65,8	65,8				
Variância	0,239	0,326				
<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C. Var</i>
Preparo	1,97	3	0,657	3,21	0,0833	0,657
Dia	0,00250	1	0,00250	0,0122	0,915	0,000
Preparo+Dia	0,342	3	0,114	0,557	0,658	0,101
MQD	1,64	8	0,205			0,205
Total	3,96	15				

**Tabela 34.** ANOVA de dois fatores para classe N2 (ESI+).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	40,8	41,1	81,9			
Média	20,4	20,6	20,5			
Variância	0,0800	0,125	0,0758			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	40,7	41,4	82,1			
Média	20,4	20,7	20,5			
Variância	0,00500	0,0200	0,0492			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	40,8	40,8	81,6			
Média	20,4	20,4	20,4			
Variância	0,180	0,0800	0,0867			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	40,2	41,3	81,5			
Média	20,1	20,7	20,4			
Variância	0,0200	0,125	0,149			
<i>Total</i>						
Contagem	8	8				
Soma	163	165				
Média	20,3	20,6				
Variância	0,0584	0,0650				
<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C.Var</i>
Preparo	0,0569	3	0,0190	0,239	0,867	0,00173
Dias	0,276	1	0,276	3,47	0,0994	0,266
Preparo+Dias	0,172	3	0,0573	0,722	0,567	0,0523
MQD	0,635	8	0,0794			0,0794
Total	1,14	15				

**Tabela 35.** ANOVA de dois fatores para classe NO(ESI+).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	26,2	26,9	53,1			
Média	13,1	13,5	13,3			
Variância	0,0200	0,125	0,0892			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	26,7	26,9	53,6			
Média	13,4	13,5	13,4			
Variância	0,125	0,0450	0,0600			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	26,4	26,4	52,8			
Média	13,2	13,2	13,2			
Variância	0,0200	0,0800	0,0333			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	25,7	26,0	51,7			
Média	12,9	13,0	12,9			
Variância	0,00500	0,0200	0,0158			
<b>Total</b>						
Contagem	8	8				
Soma	105	106				
Média	13,1	13,3				
Variância	0,0621	0,0793				
<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C.Var.</i>
Preparo	0,485	3	0,162	2,94	0,0990	0,156
Dias	0,0900	1	0,0900	1,64	0,237	0,0831
Preparo+Dias	0,0650	3	0,0217	0,394	0,761	0,0182
MQD	0,440	8	0,0550			0,0550
Total	1,08	15				

### ANEXO 3: Cálculo da ANOVA para o estudo de repetitividade e reprodutibilidade em ESI(-) FT-ICR MS

**Tabela 36.** ANOVA de dois fatores para classe N(ESI-).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	54,6	55,6	110			
Média	27,3	27,8	27,6			
Variância	0,500	0,180	0,310			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	56,7	56,2	112,9			
Média	28,35	28,1	28,225			
Variância	0,125	0,18	0,1225			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	57,2	56,6	114			
Média	28,6	28,3	28,5			
Variância	0,0800	0,500	0,223			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	56,8	56,2	113			
Média	28,4	28,1	28,3			
Variância	0,32	0	0,137			
<b>Total</b>						
Contagem	8	8				
Soma	225	225				
Média	28,2	28,1				
Variância	0,440	0,159				
<b>ANOVA</b>						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C.Var.</i>
Preparo	1,85	3	0,616	2,61	0,123	0,614
Dias	0,0306	1	0,0306	0,130	0,728	0,00117
Preparo+Dias	0,462	3	0,154	0,653	0,603	0,139
MQD	1,89	8	0,236			0,236
Total	4,22	15				

**Tabela 37.** ANOVA de dois fatores para classe O(ESI-).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	31,6	32,8	64,4			
Média	15,8	16,4	16,1			
Variância	0,0200	0,180	0,187			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	34,0	34,5	68,5			
Média	17,0	17,3	17,1			
Variância	0,0200	0,605	0,229			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	36,8	35,6	72,4			
Média	18,4	17,8	18,1			
Variância	10,6	7,22	6,05			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	33,6	34	67,6			
Média	16,8	17	16,9			
Variância	0,0	0,0200	0,02			
<b>Total</b>						
Contagem	8	8				
Soma	136	137				
Média	17,0	17,1				
Variância	2,50	1,44				
<b>ANOVA</b>						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C.Var.</i>
Preparo	8,13	3	2,71	1,16	0,382	2,71
Dias	0,0506	1	0,0506	0,0217	0,886	0,00
Preparo+Dias	0,772	3	0,257	0,110	0,952	0,111
MQD	18,6	8	2,33			2,33
Total	27,6	15				

**Tabela 38.** ANOVA de dois fatores para classe O2 (ESI-).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	56	54,8	111			
Média	28,0	27,4	27,7			
Variância	0,320	0,180	0,287			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	53,9	53	107			
Média	27,0	26,5	26,7			
Variância	0,00500	0,180	0,129			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	55,6	53,7	109			
Média	27,8	26,9	27,3			
Variância	0,0800	1,13	0,703			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	54,5	54,1	109			
Média	27,3	27,1	27,2			
Variância	0,845	0,00500	0,297			
<b>Total</b>						
Contagem	8	8				
Soma	220	216				
Média	28	27				
Variância	0,38	0,334				
<b>ANOVA</b>						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C. Var.</i>
Preparo	1,97	3	0,655	1,91	0,206	0,579
Dias	1,21	1	1,21	3,53	0,0970	1,17
Preparo+Dias	0,295	3	0,098	0,287	0,834	0,0769
MQD	2,74	8	0,342			0,342
Total	6,21	15				

**Tabela 39.** ANOVA de dois fatores para classe NO (ESI-).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total				
<b>Preparo 1</b>							
Contagem	2	2	4				
Soma	41,4	41,3	82,7				
Média	20,7	20,65	20,7				
Variância	0,0200	0,0450	0,0225				
<b>Preparo 2</b>							
Contagem	2	2	4				
Soma	40,4	41,4	81,8				
Média	20,2	20,7	20,5				
Variância	0,000	0,000	0,0833				
<b>Preparo 3</b>							
Contagem	2	2	4				
Soma	41,7	40,5	82,2				
Média	20,9	20,3	20,6				
Variância	0,0450	0,605	0,337				
<b>Preparo 4</b>							
Contagem	2	2	4				
Soma	41,7	40,4	82,1				
Média	20,9	20,2	20,5				
Variância	0,00500	0	0,143				
<b>Total</b>							
Contagem	8	8					
Soma	165	164					
Média	20,7	20,5					
Variância	0,0914	0,151					
<b>ANOVA</b>							
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>C. Var.</i>	
Preparo	0,105	3	0,0350	0,389	0,764	0,0250	
Dias	0,160	1	0,160	1,78	0,219	0,124	
Preparo+Dias	0,875	3	0,292	3,24	0,0815	0,286	
MQD	0,720	8	0,0900			0,0900	
Total	1,86	15					

**Tabela 40.** ANOVA de dois fatores para classe NO2 (ESI-).

RESUMO	DIA 1	DIA 2	Total			
<b>Preparo 1</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	16,4	16,2	32,6			
Média	8,20	8,10	8,15			
Variância	0,0800	0,980	0,357			
<b>Preparo 2</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	15,0	14,9	29,9			
Média	7,50	7,45	7,48			
Variância	0,0200	0,605	0,209			
<b>Preparo 3</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	13,1	13,7	26,8			
Média	6,55	6,85	6,70			
Variância	0,245	2,65	0,993			
<b>Preparo 4</b>						
Contagem	2	2	4			
Soma	13,4	15,3	28,7			
Média	6,70	7,65	7,18			
Variância	2,00	0,00500	0,969			
<b>Total</b>						
Contagem	8	8				
Soma	57,9	60,1				
Média	7,24	7,51				
Variância	0,837	0,836				
<b>ANOVA</b>						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Preparo	4,43	3	1,48	1,79	0,226	1,46
Dias	0,303	1	0,303	0,368	0,561	0,200
Preparo+Dias	0,702	3	0,234	0,285	0,835	0,183
MQD	6,58	8	0,823			0,823
Total	12,0	15				