

MARCOS ALBIERI PUDENZI

PETROLEÔMICA POR FT-ICR MS: AVALIANDO A EFICIÊNCIA DA IONIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POLARES DE PETRÓLEO

CAMPINAS 2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

MARCOS ALBIERI PUDENZI

PETROLEÔMICA POR FT-ICR MS: AVALIANDO A EFICIÊNCIA DA IONIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POLARES DE PETRÓLEO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR MARCOS ALBIERI PUDENZI, SOB ORIENTAÇÃO DO PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

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

 Pudenzi, Marcos Albieri, 1990-Petroleômica por FT-ICR MS: avaliando a eficiência da ionização dos compostos polares de petróleo / Marcos Albieri Pudenzi. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.
Orientador: Marcos Nogueira Eberlin. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
1. Espectrometria de massa. 2. Petróleo. 3. Petroleômica. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Petroleomics by FT-ICR MS: evaluating the crude oil polar compounds ionization efficiency Palavras-chave em inglês: Mass Spectrometry Crude Oil Petroleomics Área de concentração: Química Orgânica Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica Banca examinadora: Marcos Nogueira Eberlin [Orientador] Débora de Almeida Azevedo Anita Jocelyne Marsaioli Data de defesa: 29-01-2015 Programa de Pós-Graduação: Química

CITAÇÃO

O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é entendimento. **Provérbios 9:10**

O que as suas mãos tiverem que fazer, que o façam com toda a sua força, pois na sepultura, para onde você vai, não há atividade nem planejamento, não há conhecimento nem sabedoria. **Eclesiastes 9:10**

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus pela força, energia, inteligência, amor e direcionamento dados a mim nesses anos por meio de Jesus Cristo.

A minha esposa pelo auxílio e encorajamento que me permitiu passar pelas dúvidas e problemas, sempre com amor e graça.

A todos aqueles que possibilitaram a realização deste trabalho e que me deram forças para continuar em frente em meio a dificuldades e obstáculos. Cito Heliara D. L. Nascimento, Rosineide C. Simas, Yuri E. Corilo, Clécio F. Klitzke, Eduardo M. Schmidt, Renan S. Galaverna, Jandyson M. Santos, mas são muitos outros. A todos do grupo de pesquisa do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

Agradeço ao Professor Marcos N. Eberlin pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa durante todos esses anos e pela confiança depositada em minha pessoa para a realização deste e de outros trabalhos. E finalmente agradeço a ANP pelo apoio financeiro concedido através da empresa Petrobrás e da rede Geoquímica.

Curriculum Vitae

Marcos Albieri Pudenzi

Formação Acadêmica

2012 – 2015

Mestrado em Química Orgânica. Título da Dissertação: *Petroleômica por FT-ICR MS: avaliando a eficiência da ionização dos compostos polares de petróleo*

2008 – 2012 Bacharel em Química – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

Experiência Profissional

07/2011-08/2011

Instituto de Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) Estagiário na área de óleos e biocombustíveis Carga horária: 36h/semana, Regime: Dedicação exclusiva.

Iniciação Científica

Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas 01/2010 - 07/2012

Área: Química Orgânica.

Título: "Novos Métodos de Caracterização Rápida e Abrangente de Petróleo Bruto e Seus Derivados Via Espectrometria de Massas FT-MS de Altíssima Resolução" Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Bolsista da: Fundação de Desenvolvimento da Unicamp em parceria com PETROBRAS

Produção Científica

Apresentações de Trabalho

Pudenzi, M. A.; Santos, V. G.; Fasciotti, M.; Schmidt, E. M.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Vaz, B. G.; Morais, E. T.; Santos Neto, E. V.; Cerqueira, J. R.; Eberlin, M. N. Petroleum Thermal Evolution Assessment Using MALDI-MS and Chemometric Analysis of Asphaltenes. Apresentação Oral e Pôster no XIII Alago Congress, 2012.

Curriculum Vitae(CONT.)

- **Pudenzi, M. A.**; Schmidt, E. M.; Santos, V. G.; Jara, J. L. P.; Tessaro, E.; Nascimento, H. L.; Bastos, W. L.; Pereira, R. C. L.; Eberlin, M. N. Design of Experiment and Standard Analysis as Tool to Understand Crude Oil Ionization. Poster no V Congresso da BrMass, 2013.
- Pudenzi, M. A.; Jara, J. L. P.; Nascimento, H. D. L.; Tessaro, E.; Santos, V. G.; Vendramini, P. H.; Schmidt, E. M.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Batezelli, A.; Eberlin, M. N. Crude Oil Transformation during rock migration via FTICR-MS: From Source Rock to Reservoir. Apresentação de Poster na 62nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2014

Publicações em Revistas Indexadas

- Fasciotti, M.; Lalli, P. M.; Klitzke, C. F.; Corilo, Y. E.; Pudenzi, M. A.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Daroda, R. J.; Eberlin, M.N. Petroleomics by Traveling Wave Ion Mobility - Mass Spectrometry using CO2 as drift gas. *Energy & Fuels*, v. 27, p. 7277-7286, 2013.
- Pereira, R. C. L.; Simas, R. C.; Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Klitzke, C. F.; Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Silva, R. M. C. F.; Moraes, E. T.; Bastos, W. L.; Eberlin, M. N.; Nascimento, H. D. L. Precision in Petroleomics via Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy & Fuels*, v. 27, p. 7208-7216, **2013**.

Prêmios e Títulos

Award for the Best MS Solver, 1st International Mass Spectrometry School.
3° colocado na prova de interpretação de espectros de massas

RESUMO

PETROLEÔMICA POR FT-ICR MS: AVALIANDO A EFICIÊNCIA DA IONIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POLARES DE PETRÓLEO. Essa dissertação de Mestrado tem como objetivo conhecer e avaliar a ionização dos compostos polares no petróleo utilizando Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de lons com Transformada de Fourier (FT-ICR MS do inglês *Fourier* Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry), relacionando-a com parâmetros experimentais e características intrínsecas das moléculas. No Capítulo 1, o tipo de amostra de interesse (petróleo) é abordado, tanto em suas características quanto em sua análise, definindo petroleômica e sua função. A espectrometria de massas é apresentada, então, como ferramenta de grande utilidade nos estudos da petroleômica, em especial aquela de ultra alta resolução como FT-ICR MS acoplada a fonte de ionização *eletrospray* (ESI). No Capítulo 2, a ferramenta estatística do planejamento de experimentos é apresentada e utilizada em uma amostra real de petróleo, de forma a relacionar os parâmetros operacionais da fonte de ESI com respostas avaliadas comumente em petroleômica. Aspectos interessantes das relações parâmetro-resposta surgem durante o estudo, mostrando que a análise de petróleo por ESI-FT-ICR MS, apesar de largamente utilizada na literatura, não é trivial e precauções devem ser tomadas durante a otimização dos parâmetros experimentais. No Capítulo 3, as técnicas de APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) e APPI (Atmospheric Pressure Photolonization) são abordadas e utilizadas, paralelamente à ESI, para avaliar a ionização de padrões de compostos similares àqueles encontrados nas principais classes de compostos polares do petróleo. A análise pelas técnicas que ionizam de forma mais abrangente os compostos apresentaram comportamentos que tornam tais análises inviáveis. Uma reação de metilação que melhora a ionização de compostos sulfurados também foi realizada em duas condições. Conhecendo a ionização desses compostos padrões, é possível entender a petroleômica de forma mais ampla, dando maior confiabilidade para estabelecer as relações composição-comportamento do petróleo.

xiii

ABSTRACT

PETROLEOMICS BY FT-ICR MS: EVALUATING THE CRUDE OIL POLAR COMPOUNDS IONIZATION EFFICIENCY. The aim of this work is to know and evaluate the crude oil polar compounds ionization through Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR MS), relating this ionization with experimental parameters and intrinsic characteristics of molecules. On Chapter 1, the sample of interest (crude oil) is addressed, both in its characteristics and its analysis, where it is defined petroleomics and its function. Mass spectrometry is then presented as a tool of great utility in petroleomic studies, in special the ultrahigh resolution one as FT-ICR MS coupled to Eletrospray Ionization (ESI). On Chapter 2, the design of experiment statistic tool is presented and used in a real crude oil sample in order to relate operational parameters of ESI source to commonly evaluated responses in petroleomics. Interesting aspects regarding parameter-response relationships arises during the study, showing that the crude oil analysis using ESI-FT-ICR MS, while it is largely used in literature, it is not trivial and precautions have to be taken during the optimization of experimental parameters. On Chapter 3, APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) and APPI (Atmospheric Pressure Photolonization) technics are addressed and used, along with ESI, to evaluate the ionization of standard compounds similar to those polar compounds found in crude oil. Analysis using sources that ionizes in the most comprehensive way has shown such behavior that makes analysis unviable. A methylation reaction that improves the ionization of sulfur compounds was also made on two conditions. By knowing the ionization of these standard compounds it is possible to understand the petroleomics in a much comprehensive way, providing reliability to stablish composition-behavior relations of crude oil.

LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xiii
1. Capítulo 1 - Introdução geral	1
1.1. Introdução	1
1.1.1. Petróleo	1
1.1.2. Petroleômica	3
1.1.3. O Papel da Espectrometria de Massas	3
1.1.4. Fundamentos de FT-ICR MS	6
1.1.5. Fundamentos de ESI	8
1.1.6. Justificativa do Trabalho	9
2. Capítulo 2 – Planejamento experimental de condições da fonte de íons electrosprav para análise direta de petróleo	. 11
2.1. Introducão	. 11
2.1.1. Planeiamento de Experimentos	. 11
2.2. Objetivos	. 12
2.3. Parte Experimental	. 12
2.4. Resultados e Discussão	. 16
2.5. Conclusões	. 41
3. Capítulo 3 – Análise de padrões como ferramenta para relacionar ionização com características intrínsecas dos compostos polares presentes no petróleo	. 43
3.1. Introdução	. 43
3.1.1. Fundamentos de APCI e APPI	. 43
3.2. Objetivos	. 46
3.3. Parte Experimental	. 47
3.4. Resultados e Discussão	. 51
3.4.1. Análise de padrões	. 51
3.4.2. Reação de metilação utilizando iodeto de metila	. 68
3.5. Conclusões	. 79
4. Conclusões Gerais	. 81
Referências Bibliográficas	.83

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

- °C Graus Celsius
- Δm diferença de massa
- μL Microlitros
- µL/min Microlitros por minuto
- ωc Frequência Ciclotrônica
- **APCI Atmospheric Pressure Chemical Ionization**
- APPCI Atmospheric Pressure Photo and Chemical Ionization
- APPI Atmospheric Pressure Photo Ionization
- B Campo Magnético
- CRM- Charge Residue Model
- Da *Dalton*
- DBE Double Bond Equivalent
- ESI Ionização por Electrospray
- ESI(-) Electrospray no modo de íons negativos
- ESI(+) Electrospray no modo de íons positivos

ESI-FT-ICR MS - Electrospray Ionization coupled to Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

eV - Electronvolts

FT-ICR MS - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

- GC-MS Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
- ICR Ion Cyclotron Resonance
- IEM Ion Evaporation Model
- kV kilo Volts = 1000 Volts
- LTQ FT Ultra Linear Trap Quadrupole Fourier Transform Ultra

LISTA DE ABREVIATURAS (cont.)

- m Massa
- *m/z* Razão massa sobre carga
- MS Mass Spectrometry
- NL Normalized Level
- PETROBRAS Petróleo Brasileiro S/A
- R Resolução
- RF Radiofrequência
- SID Source Induced Dissociation
- T Tesla
- TOF Time-of-flight
- V Volts

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VALORES VARIADOS NOS PARÂMETROS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	
FATORIAL COMPLETO ($2^7 = 128 + 2$ VALORES CENTRAIS = 130 EXPERIMENTOS)	. 12
TABELA 2: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA OS EXPERIMENTOS COM ESI(-) UTILIZADAS NA FIGURA 7	. 18
TABELA 3: CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA OS EXPERIMENTOS COM ESI(+) UTILIZADAS NA FIGURA 8	. 20
TABELA 4: CONDIÇÕES DOS ESPECTROS OBTIDOS PARA A FIGURA 20 (B) E (C)	. 39
TABELA 5: DEZ MELHORES RESULTADOS DADOS PELA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS	
ORDENADOS POR NÍVEL DE DESEJABILIDADE PARA ESI(+). PARÂMETROS MARCADOS COM (*) NÃO	
INFLUENCIAM NOS RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO	. 39
TABELA 6: DEZ MELHORES RESULTADOS DADOS PELA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS	
ORDENADOS POR NÍVEL DE DESEJABILIDADE PARA ESI(-). PARÂMETROS MARCADOS COM (*) NÃO	
INFLUENCIAM NOS RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO	. 40
TABELA 7: RESUMO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA ANÁLISE DE PETRÓLEO POR ESI-LTQ-FT ULTRA	
(THERMO SCIENTIFIC, BREMEN, ALEMANHA)	. 42
TABELA 8: EXEMPLOS DE COMPOSTOS QUE SÃO (EM VERMELHO) OU NÃO (EM PRETO) IONIZADOS PELA	
LÂMPADA DE CRIPTÔNIO UTILIZADA EM APPI	. 46
TABELA 9: FÓRMULA MOLECULAR E GRAU DE PUREZA DOS PADRÕES ADQUIRIDOS	. 48
TABELA 10: INTENSIDADES RELATIVAS OBTIDAS PARA CADA ÍON NO MODO POSITIVO NOS DIFERENTES	
MODOS DE IONIZAÇÃO. ÍONS COM O ASTERISCO (*) FORAM DETECTADOS, TAMBÉM, NO MODO	
NEGATIVO	. 54
TABELA 11: INTENSIDADES RELATIVAS OBTIDAS PARA CADA ÍON NO MODO NEGATIVO NOS DIFERENTES	
MODOS DE IONIZAÇÃO. ÍONS COM O ASTERISCO (*) FORAM DETECTADOS, TAMBÉM, NO MODO POSITI	VO
	. 55
TABELA 12: INTENSIDADES RELATIVAS DOS ÍONS (EM %) DE ACORDO COM SUA CLASSE E DBE NO MODO	
POSITIVO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO. N(BAS) E N(NEU) SE REFEREM A COMPOSTOS	
NITROGENADOS CONSIDERADOS BÁSICOS E NEUTROS EM ESCALA DE ACIDEZ ^[1]	. 59
TABELA 13: INTENSIDADES RELATIVAS DOS ÍONS (EM %) DE ACORDO COM SUA CLASSE E DBE NO MODO	
NEGATIVO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO. N(NEU) SE REFERE A COMPOSTOS	
NITROGENADOS CONSIDERADOS NEUTROS EM ESCALA DE ACIDEZ ^[1]	. 59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: EXEMPLO DE ESPECTRO DE PETRÓLEO POR ESI-FT-ICR MS MOSTRANDO SUA COMPLEXIDADE EM TERMOS DE COMPOSIÇÃO, EM QUE CADA SINAL CORRESPONDE A UMA FÓRMULA MOLECULAR
DIFERENTE
FIGURA 2: ESPECTROS OBTIDOS DA MESMA AMOSTRA DE PETRÓLEO SOBREPOSTOS E AMPLIADOS NA M/Z
368 em duas resoluções: 100.000 (vermelho) e 400.000 (preto), ambas as resoluções em
RELAÇÃO À M/Z 400. OBSERVA-SE A DIFERENÇA NA QUANTIDADE DE ESPÉCIES RESOLVIDAS NA
REGIÃO DE M/Z $368,331$ QUANDO NAS DUAS CONDIÇÕES ${\sf R}$ SE REFERE À RESOLUÇÃO REAL EM CADA
M/Z5
FIGURA 3: ESQUEMA SIMPLIFICADO DO FUNCIONAMENTO DE UMA CELA DE ICR. NA EQUAÇÃO M/Z É A RAZÃO
MASSA/CARGA; B É O CAMPO MAGNÉTICO E Ω C É A FREQUÊNCIA DE ROTAÇÃO DOS ÍONS[21]7
FIGURA 4: ESQUEMA DO PROCESSO DE DESSOLVATAÇÃO E TRANSPORTE DOS ÍONS PARA FASE GASOSA
POR ELECTROSPRAY[26]
FIGURA 5: ESPECTROS DE MASSAS DA AMOSTRA ESTUDADA, OBTIDOS EM OUTRO ESTUDO NOS MODOS
NEGATIVO (ACIMA) E POSITIVO (ABAIXO). DESTAQUE PARA BAIXO VALOR DE INTENSIDADE MOSTRADO
PELO NL (NORMALIZED LEVEL) ABAIXO DOS USUAIS 104, E PARA A ALTA ENERGIA DE DISSOCIAÇÃO NA
FONTE (SID – SOURCE INDUCED DISSOCIATION)
FIGURA 6: ILUSTRAÇÃO SITUANDO OS PARÂMETROS DA FONTE DE ESI VARIADOS NO PLANEJAMENTO DE
EXPERIMENTOS
FIGURA 7: EXEMPLOS DE PERFIS ENCONTRADOS NO MODO NEGATIVO NO PLANEJAMENTO DE
EXPERIMENTOS. ÍONS EM AZUL SÃO ATRIBUÍDOS, EM VERDE SÃO ISOTOPÓLOGOS DE 13C DOS
ATRIBUÍDOS E EM VERMELHO NÃO FORAM ATRIBUÍDOS A UMA SÉRIE HOMÓLOGA DE COMPOSTOS
POLARES DO PETRÓLEO
FIGURA 8: EXEMPLOS DE PERFIS ENCONTRADOS NO MODO POSITIVO NO PLANEJAMENTO DE
EXPERIMENTOS. ÍONS EM AZUL SÃO ATRIBUÍDOS, EM VERDE SÃO ISOTOPÓLOGOS DE 13C DOS
ATRIBUÍDOS E EM VERMELHO NÃO FORAM ATRIBUÍDOS A UMA SÉRIE HOMÓLOGA DE COMPOSTOS
POLARES DO PETRÓLEO
FIGURA 9: HALF-NORMAL PLOT DE (A) MASSA MÉDIA (B) INTENSIDADE TOTAL E (C) NÚMERO DE CLASSES.
OS PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM NESSAS RESPOSTAS PARA ESI MODO POSITIVO SE
DESTACAM DA LINHA DE TENDÊNCIA. NOTA-SE MAIOR INFLUÊNCIA DO ERRO (TRIÂNGULOS VERDES) DO
QUE DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS NA INTENSIDADE TOTAL, INVALIDANDO ESSE RESULTADO 21
FIGURA 10: HALF-NORMAL PLOT DE (A) MASSA MÉDIA (B) INTENSIDADE TOTAL E (C) NÚMERO DE CLASSES
OS PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM NESSAS RESPOSTAS PARA ESI MODO NEGATIVO SE
DESTACAM DA LINHA DE TENDÊNCIA
FIGURA 11: EXEMPLOS DE ONE FACTOR PLOT MOSTRANDO QUE COM A DIMINUIÇÃO DA (A) TEMPERATURA
DO CAPILAR E AUMENTO DO (B) SHEATH GAS CRESCE A MASSA MÉDIA NO MODO POSITIVO E QUE COM
O ALIMENTO DO (C) SWEEP GAS ALIMENTA O NÚMERO DE CLASSES NO MODO NEGATIVO
FIGURA 12: INFLUÊNCIA DE TODOS OS PARÂMETROS NAS PRINCIPAIS RESPOSTAS NO MODO POSITIVO
OLIANDO VARIADOS LINILATERALMENTE PARA A AMOSTRA DE PETRÓLEO ESTUDADA EM GERAL
CONDIÇÕES MAIS DRÁSTICAS RESULTARAM EM ESPECTROS MAIS INTENSOS E DE MAIOR MASSA MÉDIA
FIGURA 13: INFLUÊNCIA DE TODOS OS PARÂMETROS NAS PRINCIPAIS RESPOSTAS NO MODO NEGATIVO
OLIANDO VARIADOS LINILATERALMENTE PARA AMOSTRA DE PETRÓLEO ESTUDADA EM GERAL
CONDICÕES MAIS DRÁSTICAS RESULTARAM EM ESPECTROS MAIS INTENISOS E DE MAIOD MASSA MÉDIA
NESSE MODO

FIGURA 27: ESTRUTURAS DE RESSONÂNCIA PARA OS COMPOSTOS DA CLASSE NO, EXPLICANDO AS DIFERENÇAS NAS EFICIÊNCIAS DE IONIZAÇÃO ENTRE ELES, COM BASE NO NÚMERO DE FORMAS

CANÔNICAS DE RESSONÂNCIA E NA ESTABILIZAÇÃO DE CARGA POR EFEITO INDUTIVO DOS GRUPOS
FIGURA 28: ESPECTROS AMPLIADOS DE APOTIMODO NEGATIVO (ACIMA) E APPTIMODO POSITIVO (ABAIXO)
DOS PADROES ISOLADOS, MOSTRANDO ESPECIES COM DIFERENTES NUMEROS DE HIDROGENIOS EM
RELAÇÃO AS MOLECULAS DESPROTONADAS (MODO NEGATIVO) OU PROTONADAS (MODO POSITIVO) . 60
FIGURA 29: ESPECTROS DA MISTURA DE PADROES OBTIDOS POR APCI (+) EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE
I UBE LENS (DE CIMA PARA BAIXO): 0V; 40V;100V; 160V; 240V
FIGURA 30: EXEMPLOS DE ESPECTROS AMPLIADOS DOS PADROES ANALISADOS ISOLADAMENTE EM MODO
NEGATIVO: (A) C11H12O2 EM ESI E (B) EM APPCI; (C) C12H9N EM ESI E (D) EM APPI. OBSERVAM-
SE AS ESPÉCIES COM DIFERENÇAS DE HIDROGÊNIO EM APPCI E APPI, MAS NÃO EM ESI63
FIGURA 31: NÚMERO DE ESPÉCIES ENCONTRADAS PARA (A) CADA COMPOSTO NO MODO POSITIVO E (B)
CADA COMPOSTO NO MODO NEGATIVO. O TOTAL DE COMPOSTOS ANALISADOS FOI DE 1564
FIGURA 32: RESUMO COM NÚMERO DE ÍONS SOMADOS PARA CADA MODO DE IONIZAÇÃO, MOSTRANDO UM
NÚMERO DE ESPÉCIES ALTO PARA APCI, APPI E APPCI. O TOTAL DE COMPOSTOS ANALISADOS FOI
DE 15
FIGURA 33: EXEMPLO DE ESPECTRO DA 2-ETILPIRIDINA NO MODO POSITIVO POR (A) ESI COM REGIÃO
ABAIXO DA <i>M/Z</i> 108 AMPLIADA 100 VEZES E (B) APCI. OBSERVA-SE MAIOR INTENSIDADE DOS ÍONS DE
DIFERENÇAS DE HIDROGÊNIO EM RELAÇÃO À MOLÉCULA PROTONADA DE <i>M/Z</i> 106 E 107, SENDO
CONSIDERÁVEL PARA APCI E MENOR QUE 1% PARA ESI66
FIGURA 34: ESPECTRO DE ESI(+)-FTICR MS DA MISTURA EQUIMOLAR DE PADRÕES (A) ANTES (B) E
DEPOIS DA REAÇÃO DE METILAÇÃO. ACENTUAM-SE AS INTENSIDADES DOS COMPOSTOS DA CLASSE N,
NO E, PRINCIPALMENTE, S; (C) ESPECTRO DE ESI(+)-FTICR MS DA MISTURA EQUIMOLAR DE
PADRÕES SULFURADOS, MOSTRANDO A ACENTUAÇÃO OS COMPOSTOS SULFURADOS, TANTO
METILADOS QUANTO NA FORMA DE CÁTION RADICALAR. EM DESTAQUE, UMA AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE
130 A 155 DA, MOSTRANDO A FORMA METILADA DO BENZOTIOFENO, ALÉM DE SEU CÁTION RADICALAR.
AMBOS EM BAIXAS INTENSIDADES
FIGURA 35: (A) ESPECTRO DE ESI(+)-FTICR MS. DIAGRAMAS DE DBE EM FUNCÃO DE NÚMERO DE
CABBONOS PABA AS CLASSES (B) S. (C) OS E (D) N. E (E) GRÁFICOS DE PORCENTAGEM DE CLASSES
DO PETRÓ E O APÓS BEACÃO DE METILAÇÃO EM DICLOBOMETANO 72
FIGURA 36: (A) ESPECTRO DE ESI(+)-ETICE MS (B) DIAGRAMA DE DE EM EUNCÃO DE NÚMERO DE
CABBONOS PARA A CLASSE S E (C) GRÁFICO DE PORCENTAGEM DE CLASSES DO PETRÓLEO APÓS
REACÃO DE METILAÇÃO EM DICI OBOETANO
FIGURE 37: (a) ESPECTRO DE ESI($_{1}$)-ETICE MS, diacedamas de DRE em Elinção de Númedo de
FIGURA 57. (A) ESPECTRO DE ESI(+)-FITOR MIS, DIAGRAMAS DE DEL EM FUNÇÃO DE NÚMERO DE CARRONOS RARA AS CLASSES (D) OS E (O) N E (D) ORÁFICOS DE DORCENTACEM DE CLASSES NO
CARBONOS PARA AS CLASSES (B) OS E (C) IN, E (D) GRAFICOS DE PORCENTAGEM DE CLASSES NO
FIGURA 38: ESTRUTURAS SUGERIDAS COMUNS AOS COMPOSTOS SULFURADOS COM DBES 6, 9, TU E TT
FIGURA 39: (A) AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO MOSTRANDO A SERIE DE COMPOSTOS SULFURADOS COM
NUMERO IMPAR DE HIDROGENIOS, CORRESPONDENTE AOS COMPOSTOS METILADOS; (B-F) ESPECTRO
DO PETROLEO APOS METILAÇÃO AMPLIADO EM FAIXAS DE MASSA CRESCENTES, COMPARANDO COM
ESPECTROS TEORICOS DE COMPOSTOS SULFURADOS DE NÚMERO PAR DE HIDROGÊNIOS. HÁ UM
AUMENTO DA INTENSIDADE DESSES ÍONS COM A M/Z, QUE SÃO OBTIDOS PELA RETIRADA DE UM
ELÉTRON PELA AÇÃO DA PRATA

1. Capítulo 1 - Introdução geral

1.1. Introdução

1.1.1. Petróleo

O ciclo do carbono está entre os ciclos fundamentais para a vida no planeta, no qual o carbono apresenta-se em diferentes formas, em diversos processos. Por exemplo: <u>fotossíntese</u>, na qual entra como CO₂, sai como glicose e, seguindo o metabolismo dos organismos fotossintetizante, transforma-se em lipídeos, proteínas e carboidratos; <u>alimentação</u>, na qual essas moléculas fundamentais são transformadas por outros organismos; além da <u>degradação</u> da matéria orgânica por microorganismos que devolvem a carga de carbono na forma de gases, como o CO₂ e CH₄. Para a formação do petróleo, contudo, outra rota para o carbono orgânico foi tomada, na qual a matéria orgânica não foi degradada, mas sim, preservada de tais transformações de rápida ocorrência. Apesar disso, transformações ao longo de um grande período de tempo devem ocorrer para que o petróleo seja formado como produto final^[1].

Essas transformações posteriores, de acordo com as teorias mais aceitas, decorrem de pressões e temperaturas elevadas nas quais a matéria orgânica é submetida, devido ao seu soterramento durante algumas eras geológicas. Essa matéria orgânica soterrada provém de fauna e flora anteriores às atuais, desde o período Pré-Cambriano (4600-570 milhões de anos atrás) com cianobactérias e bactérias fotossintéticas, passando pelo surgimento de plantas superiores entre os períodos Siluriano (435-400 milhões de anos atrás) e Devoniano (400-360 milhões de anos atrás), que se tornaram a principal classe geradora de matéria orgânica, chegando à formação de animais mais desenvolvidos no período Devônico e superiores, que contribuíram muito pouco para a formação do petróleo^[1].

A formação do petróleo como temos hoje pode ser dividida em três etapas: Diagênese, Catagênese e Metagênese. Simplificadamente, a Diagênese consistiu na alteração (e gradual soterramento) da matéria orgânica por microorganismos, mas principalmente por reações de quebra de policondensados como proteínas em moléculas menores, que se reagrupam e sofrem reações em baixa temperatura (cerca de 50°C)^[2] como a perda de oxigênio, enxofre e nitrogênio, resultando em um geopolímero conhecido como querogênio, liberando também metano (CH₄) e outras substâncias como CO₂ e H₂O. Prosseguindo com o soterramento pela deposição de mais sedimentos, a matéria orgânica chega a regiões de maior pressão e temperatura, etapa denominada Catagênese. Assim, com condições mais severas o querogênio sofre quebras de ligações produzindo petróleo, "gás úmido" (ou seja, hidrocarbonetos gasosos acima de C₂) e "gás seco" (metano e etano, CH_4 e C_2H_6 , respectivamente). Ao aumentar a profundidade pelo maior soterramento, tanto temperatura guanto pressão sobem, o que leva a uma maior transformação da matéria orgânica produzindo majoritariamente metano. Tal etapa é denominada **Metagênese**^[1, 2].

Seja como fonte energética, seja como matéria prima para indústria petroquímica, o petróleo adquiriu grande utilidade, principalmente a partir do século XX quando as tecnologias de exploração permitiram a retirada de grande volume dos reservatórios^[2]. A composição do petróleo afeta em muito sua exploração e processamento, já que fatores como acidez e deposições podem gerar problemas como deposição e corrosão no processo^[3]. Assim, desde o começo de sua exploração a análise detalhada do óleo bruto tem sido fundamental, pois sua composição se diferencia, entre outros fatores, dependendo de sua matéria orgânica de origem, ambiente deposicional e condições físico-químicas de tal ambiente^[1, 4].

2

1.1.2. Petroleômica

Desde o início da indústria do petróleo, técnicas como GC-MS (*Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) e pirólise, além de técnicas mais simples, como determinação de grau API e análise elementar, têm sido utilizadas para a caracterização do petróleo e seus derivados^[5]. A GC-MS é bem consolidada para diversos estudos como avaliação de biodegradação, origem e rochas geradoras, entre outros^[6-8]. Contudo, ela analisa somente a parcela mais leve do óleo, por depender da volatilidade dos compostos de interesse. A parcela mais pesada (de maior ponto de ebulição) até pouco tempo não era muito explorada no nível molecular, o que corresponde a uma perda considerável de informação, já que ela pode atribuir <u>características</u> ao petróleo dependendo de sua <u>composição</u>. Isso torna mais fácil a adaptação da exploração, refino e processamento a cada óleo. A petroleômica corresponde ao estudo dessa relação <u>composição-comportamento</u> de forma abrangente, visando auxiliar toda a cadeia produtora^[4, 9].

1.1.3. O Papel da Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a medição da razão massa/carga (m/z) dos compostos presentes em uma amostra. A capacidade de separar dois íons de m/z próximos (resolução de massas) é de grande interesse, principalmente na análise de matrizes químicas e bioquímicas complexas, nas quais vários compostos com massas muito próximas estão presentes. Além disso, a espectrometria de massas se destaca por ser uma técnica que pode ser utilizada com mínimo preparo de amostras, além de possuir alta velocidade de análise e sensibilidade. Entre os analisadores de massas para análise de tais matrizes, destacam-se os TOFs^[10-13] (*Time-of-Flight*) e os

3

equipamentos com Transformada de Fourier (FT): *Orbitraps*^[14-16]e ICRs (*Ion Cyclotron Resonance*) ^[4, 17], devido às suas altas resoluções de massas e exatidões (atribuição de massa experimental com baixo erro em relação à massa teórica do composto). O petróleo, como uma das misturas mais complexas existentes^[9], gera espectros ricos em íons (**Figura 1**) com séries homólogas de compostos de uma mesma classe. Para qualquer classe de compostos existem duas séries homólogas: uma com diferenças de 2,01510 Da que corresponde a diferenças de H₂ entre os compostos; a outra diferença se refere a 14,01510 Da, ou seja, CH₂ que corresponde a um aumento na cadeia carbônica. Devido a essa complexidade nos espectros de massas, tornam-se necessárias altíssimas resoluções de massa (resoluções acima de 100.000; em inglês, *Ultra-High Resolution*) para identificar separadamente cada íon, com diferenças de *m/z* podendo chegar abaixo de 0,001Da.



Figura 1: Exemplo de espectro de petróleo por ESI-FT-ICR MS mostrando sua complexidade em termos de composição, em que cada sinal corresponde a uma fórmula molecular diferente

Essa necessidade de resolução é geralmente exemplificada na petroleômica pela diferença de massa (△m) de 0,0034 Da entre dois compostos:

um possuindo 3 átomos de carbono (C₃) a mais em relação a outro que, por sua vez, possui um átomo de enxofre e quatro hidrogênios a mais em relação ao primeiro (SH₄). A fórmula que define resolução mínima necessária para separação de dois compostos é R=2 Δ m/m. Usando Δ m=0,0034 e m=370 Da nessa fórmula, obtemos R=220.000. Na **Figura 2** são mostrados dois espectros sobrepostos, obtidos no mesmo equipamento trabalhando em duas resoluções diferentes. O dublete C₃xSH₄ só poderia ser separado na condição em vermelho, pois a resolução excede os 220.000 necessários. Vemos que compostos de outras classes, como O₃, são resolvidos quando a resolução aumenta de 100.000 para 400.000 na *m/z* 400 (diferença entre espectro em vermelho e o espectro em preto)..



Figura 2: Espectros obtidos da mesma amostra de petróleo sobrepostos e ampliados na m/z 368 em duas resoluções: 100.000 (vermelho) e 400.000 (preto), ambas as resoluções em relação à m/z 400. Observa-se a diferença na quantidade de espécies resolvidas na região de m/z 368,331 quando nas duas condições R se refere à resolução real em cada m/z

Além da resolução, uma alta exatidão é necessária para análises petroleômica. A exatidão pode ser definida como a capacidade do analisador de massas de medir uma massa próxima à massa exata do composto, e está relacionada a um erro (medido em parte por milhão – ppm). Na **Figura 2** vemos, para o composto $C_{26}H_{42}N$, exatidões diferentes para a condição em preto, com erro abaixo de 1ppm, e para a condição em vermelho, com erro de 1,2ppm. Isso significa que a atribuição de fórmula para a condição em preto é mais confiável que para a condição em vermelho.

A partir das informações obtidas com um equipamento de altíssima resolução e exatidão, podem-se confeccionar gráficos clássicos na interpretação de dados na análise petroleômica, como:

- número de carbono em função do DBE (do inglês, *Double Bond Equivalent* = C + H/2 + N/2 +1, em que C, H e N corresponde ao número de carbonos, hidrogênios e nitrogênios na molécula, respectivamente),
- diagramas de van Krevelen^[4, 18] (que relacionam frações entre átomos em seus eixos, por exemplo: O/C vs H/C) e
- Kendrick^[4, 19, 20] (em que massas são transformadas em uma nova escala, na qual se vê mais facilmente séries homólogas).

1.1.4. Fundamentos de FT-ICR MS

Entre os espectrômetros de massas citados para análise de petróleo foi usado, nesse trabalho, o FT-ICR. Esse analisador utiliza o movimento circular de íons sob campos magnéticos, registrando as correntes induzidas pela passagem dessas nuvens de íons próximas a placas de detecção, em função do tempo (transiente). Converte-se do domínio de tempo para o domínio de frequência por meio de um algoritmo matemático, a Transformada de Fourier, e em seguida converte-se para m/z, por meio de uma equação simples, resultando em um espectro de massas^[17] conforme ilustra a **Figura 3**.





A análise de matrizes complexas não depende somente de analisadores de massas modernos, mas também de técnicas de ionização que possam gerar íons e/ou dessolvatá-los com eficiência. Com a introdução das técnicas de ionização a pressão atmosférica (APIs, *Atmospheric Pressure Ionization*), especialmente ESI (*Electrospray Ionization*)^[22-24], esse tipo de análise sofreu grande avanço, já que a ionização é branda (ou seja, com fragmentação mínima ou ausente). Além disso, ela geralmente resulta em uma relação de um sinal para cada íon, o que possibilita a análise com pouca complexidade no espectro de misturas multicomponentes, como é o caso do petróleo^[4].

1.1.5. Fundamentos de ESI

A técnica de ESI se baseia no desbalanceamento e dessorção das cargas (íons) presentes em solução. Inicialmente, aplica-se voltagem em um capilar pelo qual a amostra flui, de forma a neutralizar parte das cargas de um sinal, levando a um excesso de cargas de sinal oposto. Há muita discussão sobre qual é o mecanismo real do ESI e, atualmente, duas principais teorias são descritas na literatura:

(1) ocorre o cisalhamento do solvente utilizado no ESI, levando a formação de gotas que diminuem de tamanho pela vaporização do solvente. As cargas de mesmo sinal se aproximam na gota gerando repulsão suficiente para que elas transponham o limite de Rayleigh, barreira em que a repulsão entre as cargas é igual à tensão superficial. Isso leva à ejeção dos íons a partir das gotas (modelo IEM, do inglês *Ion Evaporation Model*);

(2) o solvente vai evaporando e as gotas vão se dividindo pela repulsão entre as cargas (fenômeno chamado explosão Coulômbica), até a completa vaporização do solvente. As cargas restantes são, então, transferidas para as moléculas (modelo CRM, do inglês C*harge Residue Model*)^[22, 25].

A **Figura 4** ilustra esses mecanismos descritos acima. Sugere-se na literatura que o modelo IEM ocorreria para moléculas pequenas, enquanto que o CRM para moléculas maiores^[25].

8



Figura 4: Esquema do processo de dessolvatação e transporte dos íons para fase gasosa por *electrospray*^[26]

1.1.6. Justificativa do Trabalho

Apesar da maior abrangência de compostos ionizados guando outras técnicas de ionização como APCI e APPI são utilizadas, já que estas ionizam compostos apolares além de alguns polares, ESI tem sido mais largamente aplicada. Isso mostra que os compostos mais polares (ionizados por ESI) geram informações úteis sobre o petróleo e suas características, importantes a área de petroleômica. Apesar de vários trabalhos publicados utilizando a espectrometria de massas nessa área, especialmente ESI-FT-ICR MS, poucos deles buscam conhecer quais os fatores que alteram os resultados obtidos, de forma a expressar a confiabilidade da técnica. Recentemente^[27], nosso grupo estabeleceu condições experimentais ótimas, em termos do analisador, para um equipamento comercial 7.2 T LTQ FT Ultra (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). Com esse trabalho obteve-se qual resolução e número de transientes somados resultam numa melhor caracterização de óleos brutos através desse equipamento. Além disso, foi observada a repetibilidade e reprodutibilidade de tal técnica^[28]. Contudo. as condições da fonte de ionização não foram estudadas. Esse trabalho tem como objetivo estudar as condições de fonte próprias para esse tipo de análise, bem

como estudar a relação entre intensidades dos íons observados e sua eficiência de ionização.

Capítulo 2 – Planejamento experimental de condições da fonte de íons *electrospray* para análise direta de petróleo

2.1. Introdução

2.1.1. Planejamento de Experimentos

Uma importante estratégia para o conhecimento das variáveis fundamentais em um experimento qualquer, além do entendimento das inter-relações entre tais variáveis e suas otimizações, é o planejamento de experimentos fatorial 2ⁿ. Esse planejamento se faz selecionando os parâmetros que se desejam variar. Montase, então, uma tabela de 2ⁿ condições a serem testadas, sendo n = número de parâmetros. Assim, no caso de 4 parâmetros a serem variados n=4, 2⁴=16 experimentos, pois são 4 parâmetros variando entre dois valores: mínimo (ou baixo) e máximo (ou alto). Além disso, podem ser adicionados experimentos de pontos centrais, ou seja, valores entre o mínimo e o máximo podem ser utilizados para tornar o modelo mais confiável^[29]. Utilizando essa ferramenta estatística é possível, assim, visualizar alterações nas respostas dos dados frente a variações nesses parâmetros de forma a gerar relações parâmetro/resposta.

A visualização dos resultados pode ser feita através de gráficos seminormais (*Half-Normal Plots*), em que temos a probabilidade seminormal em função do efeito dos parâmetros sobre as respostas. Essa probabilidade seminormal se refere aos efeitos se eles se comportassem idealmente como uma meia distribuição gaussiana, não dependendo, portanto, dos dados do planejamento de experimentos. Assim, os parâmetros que têm pouca influência sobre a resposta (ou seja, tem efeito sobre elas próximo de zero) se agrupam em uma linha de tendência, que corresponde à distribuição seminormal, e aqueles que têm efeito importante sobre as respostas são destacados e, assim, identificados. Quanto mais distante dessa linha, maior a importância de um parâmetro.^[29]

11
2.2. Objetivos

Empregando o planejamento de experimentos fatorial, essa etapa do trabalho visou entender as relações entre parâmetros experimentais de fonte de ionização *electrospray* e respostas no espectro de massas de petróleo, buscando compreender quais são os parâmetros de maior influência na análise em petroleômica. A influência dos parâmetros foi avaliada em termos de fatores como Massa Média, Intensidade Total e Porcentagem das Classes, as quais variaram com os parâmetros experimentais.

2.3. Parte Experimental

Foi realizado um planejamento fatorial completo com 7 parâmetros da fonte de ionização por *eletrospray* (2^7 =128 + 2 pontos centrais = 130 experimentos) para cada modo (positivo e negativo) segundo **Tabela 1**.

Tabela 1: Valores	variados nos	parâmetros	s utilizados no	planejamento	de
experimentos fatorial	completo (2 ⁷	=128 +2 val	ores centrais	= 130 experim	entos)

Parâmetro	Voltagem do Capilar (V)	Temperatura do Capilar (°C)	Tube Lens (V)	∣Voltagem <i>Spray</i> ∣ (kV)	Sheath Gas (arb)	<i>Auxiliary Gas</i> (arb)	Sweep Gas (arb)			
Modo Positivo										
Valor Baixo	0	160	0	2,8	0	0	0			
Valor Central	70	280	115	4,2	10	10	10			
Valor Alto	140	400	230	5,5	20	20	20			
Modo Negativo										
Valor Baixo	-80	160	-150	3,6	0	0	0			
Valor Central	-40	280	-100	4,3	10	10	10			
Valor Alto	0	400	-50	5	20	20	20			

Uma amostra de petróleo foi selecionada devido a sua baixa eficiência de ionização, tornando mais significativas as conclusões obtidas (amostra cedida gentilmente pela Petrobras). Como representa o pior cenário possível, as conclusões, então, se aplicam para amostras que tem maior eficiência de ionização. Em geral, uma amostra de petróleo apresenta nível normalizado de íons (NL – *normalized level*) acima de 10⁴. O baixo valor de NL do espectro de massas da amostra em estudo (~10²) (ver **Figura 5**) e a aplicação de altos valores de energia de fragmentação na fonte (SID – *source induced dissociation*) (foram utilizados entre 40 e 65V), mostram essa baixa eficiência de ionização. No preparo da amostra, 1 mg foi diluído em 0,5mL de tolueno, seguido pela adição de mais 0,5mL de metanol, levando a uma solução final de concentração 1mg.mL⁻¹.



Figura 5: Espectros de massas da amostra estudada, obtidos em outro estudo nos modos negativo (acima) e positivo (abaixo). Destaque para baixo valor de intensidade mostrado pelo NL (*normalized level*) abaixo dos usuais 10⁴, e para a alta energia de dissociação na fonte (SID – *source induced dissociation*)

A Figura 6 mostra onde cada parâmetro variado no estudo se situa. A Voltagem do Spray refere-se à voltagem aplicada a agulha da fonte de ESI de forma a desbalancear as cargas da solução, a fim de obter mais íons de um sinal de carga em relação ao outro (os valores na Tabela 1 estão em módulo). A Voltagem e a Temperatura do Capilar referem-se às condições aplicadas no capilar de entrada do equipamento, após a formação do spray e dessolvatação da amostra. A voltagem do Tube Lens se refere à voltagem aplicada às primeiras lentes eletrostáticas de condução de íons no equipamento. Além disso, temos aplicação de nitrogênio (N2) em três posições possíveis: Sheath e Auxiliary (ou Aux) Gas (gás de bainha e Auxiliar, respectivamente) que se referem à aplicação do gás a favor e coaxial ao fluxo de solvente. O Sheath Gas se localiza mais próximo do fluxo de solvente, auxiliando sua nebulização, e o Aux Gas mais externo a esse fluxo, facilitando a dessolvatação dos analitos. Temos ainda o Sweep Gas (gás de contracorrente), um fluxo de N₂ contrário ao fluxo de solvente advindo do cone de entrada no equipamento, que auxilia na dessolvatação, na quebra de agregados iônicos no spray e na remoção de moléculas neutras.



Figura 6: Ilustração situando os parâmetros da fonte de ESI variados no planejamento de experimentos

Os espectros foram obtidos no LTQ FT Ultra (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) de nosso laboratório numa faixa de massa de 100-2000Da no modo positivo e 200-1200Da no modo negativo, com resolução nominal configurada de 400.000 na *m/z* 400, com fluxo de 5µL.min⁻¹. Foram somados 100 transientes para cada *scan*, resultando em espectros com maior razão sinal/ruído. Os espectros de cada condição experimental foram exportados em modo de texto (.txt) e tratados pelo software de tratamento de dados desenvolvido em nosso laboratório, o PetroMS^[30], o qual permite a atribuição de classes de heteroátomos para uma determinada amostra de petróleo. São atribuídas tanto as massas monoisotópicas, ou seja, "a massa exata de um íon ou molécula calculada a partir da massa do isótopo de ocorrência natural mais abundante de cada elemento constituinte"^[31], quanto seus isotopólogos, que são "íons que diferem somente pela composição isotópica de um ou mais átomos constituintes"^[31]. Dos dados

tratados, foram retirados os parâmetros Massa Média, Limites Inferior e Superior de m/z, Erro Médio das Atribuições de Massa, Soma das Intensidades Absolutas de Todos os Íons e porcentagem de cada uma das classes de compostos. Esses parâmetros foram, então, inseridos como resposta no software Design Expert 6.0 em que os resultados foram avaliados (para a porcentagem de classes somente as de maior intensidade foram avaliadas).

2.4. Resultados e Discussão

Foram adquiridos 130 espectros para cada modo (positivo e negativo) variando as condições experimentais. Houve grande variação nos perfis encontrados como observado nas **Figuras 7 e 8** (com suas respectivas condições experimentais mostradas nas **Tabelas 2 e 3**), mostrando que há grande dependência dos resultados obtidos com as condições utilizadas. Isso implica em conclusões equivocadas quando as condições mais abrangentes possíveis não são utilizadas.



Figura 7: Exemplos de perfis encontrados no modo negativo no planejamento de experimentos. Íons em azul são atribuídos, em verde são isotopólogos de ¹³C dos atribuídos e em vermelho não foram atribuídos a uma série homóloga de compostos polares do petróleo.



Figura 7 (continuação): Exemplos de perfis encontrados no modo negativo no planejamento de experimentos. Íons em azul são atribuídos, em verde são isotopólogos de ¹³C dos atribuídos e em vermelho não foram atribuídos a uma série homóloga de compostos polares do petróleo.

Tabela 2: Condições experimentais para os experimentos com ESI(-) utilizadas na**Figura 7**

	PL_EXP_6	PL_EXP_11	PL_EXP_12
Voltagem do Capilar (V)	-80	-40	0
Temperatura do Capilar (°C)	160	280	160
Tube Lens (V)	-50	-100	-50
Voltagem do Spray (kV)	5	4.3	3.6
Sheath Gas (arb)	20	20	0
Aux Gas (arb)	0	20	20
Sweep Gas (arb)	0	20	20



Figura 8: Exemplos de perfis encontrados no modo positivo no planejamento de experimentos. Íons em azul são atribuídos, em verde são isotopólogos de ¹³C dos atribuídos e em vermelho não foram atribuídos a uma série homóloga de compostos polares do petróleo.



Figura 8 (continuação): Exemplos de perfis encontrados no modo positivo no planejamento de experimentos. Íons em azul são atribuídos, em verde são isotopólogos de ¹³C dos atribuídos e em vermelho não foram atribuídos a uma série homóloga de compostos polares do petróleo.

Tabela 3: Condições experimentais para os experimentos com ESI(+) utilizadasna Figura 8

Parâmetros	PL_EXP_117	PL_EXP_91	PL_EXP_128
Voltagem do Capilar (V)	0	70	0
Temperatura do Capilar (°C)	400	280	400
Tube Lens (V)	230	115	230
Voltagem do Spray (kV)	2.8	4.2	2.8
Sheath Gas (arb)	20	10	0
Aux Gas (arb)	ux Gas (arb) 20		0
Sweep Gas (arb)	0	10	0

Para avaliar melhor a influência de cada um dos 7 parâmetros nas respostas propostas, foram desenhados gráficos do tipo "*Half Normal Plot*" e "*One Factor Plot*" mostrados nas **Figuras 9 a 11**.



Figura 9: *Half-Normal Plot* de (a) Massa Média (b) Intensidade Total e (c) Número de Classes. Os principais fatores que influenciam nessas respostas para ESI modo positivo se destacam da linha de tendência. Nota-se maior influência do erro (triângulos verdes) do que dos parâmetros experimentais na intensidade total, invalidando esse resultado





Figura 10: *Half-Normal Plot* de (a) Massa Média (b) Intensidade Total e (c) Número de Classes Os principais fatores que influenciam nessas respostas para ESI modo negativo se destacam da linha de tendência.

É possível observar para a intensidade total no modo positivo (**Figura 9b**) que o erro, representado pelos triângulos verdes, se mostra de maior efeito na resposta que os próprios parâmetros experimentais. Assim, nesse caso, não se podem considerar os parâmetros identificados como importantes^[32]. Avaliando todos os "*Half-Normal Plots*", observou-se que os parâmetros que se destacaram no maior número de respostas, tendo maior importância em geral, foram:

POSITIVO:	NEGATIVO:
Temperatura Capilar (B)	Temperatura Capilar (B)
 Tube Lens (C) 	 Tube Lens (C)
 Voltagem do Spray (D) 	 Voltagem do Spray (D)
Sheath Gas (E)	 Sweep Gas (G)

É possível observar que **B-Temperatura do Capilar**, **C-***Tube Lens* e **D-Voltagem do Spray** são importantes tanto para modo positivo quanto para negativo.

Sabendo quais são os parâmetros de fonte de ionização mais importantes para petroleômica, deseja-se conhecer qual é a alteração das respostas frente à alteração nesses parâmetros. Para isso desenharam-se "*One Factor Plots*", por meio dos quais, fixando os outros parâmetros em seus valores médios, avalia-se a influência de cada parâmetro isoladamente nas respostas. Exemplos de gráficos "*One Factor Plots*" estão desenhados na **Figura 11**.



(a)



(b)

Figura 11: Exemplos de *One Factor Plot* mostrando a influência de (a) Temperatura do Capilar e (b) Sheath Gas sobre a Massa Média no modo positivo e (c) Sweep Gas sobre Número de Classes no modo negativo



(C)

Figura 11 (continuação): Exemplos de *One Factor Plot* mostrando que com a diminuição da (a) Temperatura do Capilar e aumento do (b) *Sheath Gas* cresce a Massa Média no modo positivo e que com o aumento do (c) *Sweep Gas* aumenta o Número de Classes no modo negativo

Observando os *One Factor Plots* da **Figura 11** podem-se notar algumas tendências, como a diminuição da Massa Média com o aumento da Temperatura do Capilar no modo positivo, o aumento da Massa Média com o aumento do fluxo do *Sheath Gas* também no modo positivo, e o aumento do Número de Classes com o aumento do *Sweep Gas* no modo negativo. Entretanto, para uma observação mais acessível de todos os resultados dos *One Factor Plots* eles foram transformados em gráficos de coluna, mostrados nas **Figuras 12 e 13**.



Figura 12: Influência de todos os parâmetros nas principais respostas no modo positivo, quando variados unilateralmente para a amostra de petróleo estudada. Em geral, condições mais drásticas resultaram em espectros mais intensos e de maior massa média nesse modo



Figura 13: Influência de todos os parâmetros nas principais respostas no modo negativo, quando variados unilateralmente para amostra de petróleo estudada. Em geral, condições mais drásticas resultaram em espectros mais intensos e de maior massa média nesse modo Podemos observar um aumento de intensidade, massa média e da porcentagem das classes de maior intensidade relativa em condições menos brandas: maior Temperatura do Capilar, maior voltagem do *Tube Lens* para o modo positivo e menor para o modo negativo, maior fluxo de *Sheath* e *Sweep Gas,* para os modos positivo e negativo respectivamente. Vê-se um comportamento contrário para a Temperatura do Capilar no modo positivo em relação à massa média e intensidade total, e Voltagem do *Spray* no modo negativo para todas as respostas monitoradas, ou seja, quando maior esses valores, menor as respostas estudadas. O comportamento para intensidade total não pode ser considerada devido ao erro encontrado no gráfico seminormal.

Vale ressaltar que há interações entre os parâmetros de fonte, ou seja, a relação parâmetro/resposta se altera quando outro parâmetro é variado. Um exemplo disso está mostrado na **Figura 14**. Pode-se observar que aumentando a Voltagem do *Spray* a influência da Temperatura do Capilar sobre a massa média diminui, ou seja, com a voltagem alta (linha vermelha **Figura 14a**), ao aumentar a temperatura, a Massa Média não aumenta na mesma proporção de quando a voltagem está baixa (linha preta **Figura 14a**). No caso da porcentagem da classe N no modo positivo, observa-se que a influência da Temperatura do Capilar é invertida com o aumento da *Tube Lens*. Assim, com o valor da Voltagem do *Tube Lens* baixo (linha preta **Figura 14b**), aumentando a Temperatura do Capilar a porcentagem da classe N também cresce. Entretanto, com o *Tube Lens* alto (linha vermelha **Figura 14b**), o aumento da Temperatura do Capilar resulta numa diminuição na porcentagem da classe N.

27







(b)

Figura 14: Gráficos de interação entre parâmetros mostrando a interdependência entre: (a) Temperatura do Capilar e Voltagem do *Spray* na Massa Média no modo negativo e (b) Temperatura do Capilar e Voltagem da *Tube Lens* na Porcentagem da Classe N do modo positivo

A classe NOS apresentou um comportamento interessante, já que na rotina de análises observou-se que ela se concentra em uma distribuição gaussiana de massa mais alta que a gaussiana principal dos polares. Além disso, essa distribuição não é mais detectada quando aplicamos uma energia de colisão na fonte, normalmente utilizada para retirar interferentes de fácil fragmentação, mantendo a gaussiana principal intacta (**Figura 15**).







Figura 15: Espectros da mesma amostra (a) com 0 V e (b) 35 V de energia de fragmentação na fonte, mostrando que a classe NOS, atribuída na distribuição gaussiana de maior massa que a distribuição principal, não é mais detectada indo a maiores energias

Observando os resultados dessa classe na **Figura 16** vê-se que ela sofre grande influência da Temperatura do Capilar e Voltagem do *Tube Lens*. Observase também que sob temperaturas altas (400°C), a Voltagem do *Tube Lens* não altera a porcentagem dessa classe. Sob altas voltagens de *Tube Lens*, a Temperatura do Capilar também não influencia nessa porcentagem que, em ambos os casos, é zero.



(a)

Figura 16: (a) *Half Normal Plot* mostrando que Temperatura do Capilar e Voltagem da *Tube Lens* são os parâmetros que mais afetam na Porcentagem da Classe NOS no modo positivo; (b) gráfico de interação entre esses parâmetros mostrando 0% dessa classe sob condições de Temperatura de Capilar e/ou *Tube Lens* altos



⁽b)

Figura 16 (continuação): (a) *Half Normal Plot* mostrando que Temperatura do Capilar e Voltagem da *Tube Lens* são os parâmetros que mais afetam na Porcentagem da Classe NOS no modo positivo; (b) gráfico de interação entre esses parâmetros mostrando 0% dessa classe sob condições de Temperatura de Capilar e/ou *Tube Lens* altos

Injetou-se soluções da mesma amostra em três concentrações diferentes, 0,5, 1 e 10mg.mL⁻¹ em metanol:tolueno 1:1, e a proporção entre as intensidades das classes N e NOS foi avaliada. Visualmente, a intensidade da classe NOS sobe com o aumento da concentração, enquanto que a classe N se mantêm (**Figura 17a**). Assim, a proporção N/NOS (no gráfico, multiplicada por 10 para melhor visualização) aumenta com a concentração da solução de petróleo. O mesmo ocorre para o número de íons (**Figura 17b**).



Intensidade Relativa

(a)



⁽b)

Figura 17: (a) Intensidade Relativa e (b) Número de íons atribuídos para as classes N, NOS e da razão N/NOS (multiplicada por 10 aqui para melhor visualização) para a mesma amostra em diferentes concentrações: em azul 0,5mg.mL⁻¹, em vermelho 1,0mg.mL⁻¹ e em verde 10mg.mL⁻¹. Nota-se um aumento da classe NOS em relação à classe N com o aumento da concentração.

Com base nessas constatações sugere-se que a classe NOS não seja de fato uma classe de polares isolada presente no petróleo. Essa classe seria um agregado da combinação das classes contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre (seja N + O + S, ou NO + S, ou N + OS, ou NS + O), com menor estabilidade frente a condições da fonte que favorecem decomposição.

Para avaliar quais classes participam desse agregado, uma amostra foi analisada variando somente a energia de fragmentação na fonte (**Figura 18**). Mais uma vez observa-se a diminuição na distribuição gaussiana de maior massa, relativa à classe NOS.



Figura 18: Espectros de massas da amostra de petróleo estudada, destacando a variação de intensidade da distribuição gaussiana de maior *m/z*, que contém a classe NOS, com as seguintes energias de fragmentação na fonte (SID, do inglês *Source Induced Dissociation*): (a)0V, (b)15V, (c)20V, (d)25V, (e)30V e (f)35V



Figura 18 (continuação): Espectros da amostra de petróleo estudada, destacando a variação de intensidade da distribuição gaussiana de maior *m/z*, que contém a classe NOS, com as seguintes energias de fragmentação na fonte (SID, do inglês *Source Induced Dissociation*): (a)0V, (b)15V, (c)20V, (d)25V, (e)30V e (f)35V

Os espectros foram processados e o número de íons atribuídos para cada classe, em função da energia aplicada na fonte, é apresentado na **Figura 19**.







(b)

Figura 19: Número de íons (a) para cada classe e (b) para soma de classes nas diferentes energias de fragmentação na fonte (SID): 0V,10V, 20V, 25V, 30V e 35V. O número constante de íons da soma N+NOS+NO sugere que as classes N e NO participam do agregado NOS

Aumentando a energia de fragmentação, vemos uma diminuição na classe NOS, acompanhado de um aumento nas classes N, NO e N₂. Ao observar o comportamento da curva das classes N e NOS somadas (em laranja na **Figura 19**), é possível observar que o número de íons atribuídos para essas duas classes

somadas se mantém praticamente constante, ao aplicar 10V de energia de dissociação na fonte. Porém, com a aplicação de maiores energias esse valor diminui, mostrando que a classe N não é a única a contribuir com os átomos de nitrogênio da classe NOS. Ao observar a curva [N + NOS + NO] (curva em vermelho), é possível observar que o número de íons atribuídos se mantém próximo de 1000, independentemente da energia de fragmentação. Isso indica que essas classes, N e NO, participam do agregado NOS. Em contrapartida, as curvas $[N + NOS + NO + N_2]$ e $[N + NOS + N_2]$ (curvas em rosa e preto, respectivamente) sobem de número de íons com o aumento da energia de fragmentação, mostrando que a classe N2 não deve participar desse agregado. Apesar da curva [NOS + NO + N_2] se manter próximo de 600 íons, a classe N_2 não deve participar do agregado, além do motivo acima, já que possui dois átomos de nitrogênio, enquanto que o agregado possui somente um átomo. Para complementar o agregado NOS, possivelmente as classes OS e S se adicionariam às classes N e NO respectivamente, já que um agregado N + O + S seria improvável devido a grande instabilidade de um agregado de três moléculas.

Outro comportamento interessante é o da classe CH no modo positivo (**Figura 20**). A porcentagem dessa classe depende das condições de Voltagem do *Spray* e de *Tube Lens*, sendo muito mais dependente da Voltagem do *Spray*, já que para haver ionização de hidrocarbonetos por ESI uma voltagem alta tem que ser aplicada. Em voltagens de *Tube Lens* altas pouco dessa classe é vista, devido à fragmentação. Essa fragmentação é vista, por exemplo, na condição da **Figura 20c** em que a distribuição de íons entre 10 a 60 carbonos da **Figura20b** é fragmentada a 10 a 30 carbonos, mantendo, contudo, a faixa de DBE (condições mostradas na **Tabela 4**). A ionização dessa classe é prejudicada devido à baixa basicidade (para modo positivo) e baixa acidez (para modo negativo) dos hidrocarbonetos em solução, sendo necessárias condições drásticas de Voltagem de *Spray* para ocorrer.

No modo negativo, quando é possível observar a classe CH, ela ocorre com perfil semelhante à **Figura 20c**, ou seja, decorrente somente da fragmentação de

outros compostos. Essa distribuição de fragmentação se estende a relações DBE/número de carbonos entre 0,5 e 0,8, com um valor DBE/número de carbonos médio de 0,72, levando em conta a intensidade dos íons. Esses valores são típicos de estruturas poliaromáticas (por exemplo, antraceno ($C_{10}H_8$) e benzopireno ($C_{20}H_{12}$) que possuem razões DBE/número de carbonos de 0,7 e 0,75 respectivamente). A diminuição do número de carbonos mantendo faixa de DBE similar pode ser explicada devido à fragmentação das cadeias alquílicas saturadas que são mais lábeis, mantendo os núcleos aromáticos das moléculas.



Figura 20: (a) Gráfico de interação entre Voltagem da *Tube Lens* e do *Spray* na Porcentagem da Classe CH do modo positivo, mostrando aumento de intensidade dessa classe quando a diferença entre *Tube Lens* e Voltagem de *Spray* aumenta (maior Voltagem do *Spray* e menor *Tube Lens*), (b) e (c) Gráficos de *Carbon Number vs* DBE da classe CH em duas diferentes condições (**Tabela 4**), mostrando diminuição na faixa de número de carbonos de (b) para (c), devido a fragmentação das cadeias alquílicas com aumento do *Tube Lens*

(b)

(C)

Número do Experimento	Voltagem Capilar	Temp Capilar	Tube Lens	Voltagem <i>Spray</i>	Sheath Gas	Aux Gas	Sweep Gas
92	140	400	230	5.5	0	0	20
94	0	400	0	5.5	0	0	20

Tabela 4: Condições dos espectros obtidos para a Figura 20(b) e (c)

Finalmente, o software utilizado permite obter condições ótimas dos parâmetros estudados de acordo com as respostas obtidas. Para essa otimização, o software foi configurado de forma a maximizar a intensidade total, obter o número máximo de íons detectados e atribuídos, e maximizar o número de classes. Foi considerado o mesmo peso para as quatro respostas e as condições obtidas foram ordenadas em níveis de desejabilidade. Assim, obtiveram-se as seguintes condições para modo positivo e negativo (Tabelas 5 e 6):

Tabela 5: Dez melhores resultados dados pela otimização dos parâmetros experimentais ordenados por nível de desejabilidade para ESI(+). Parâmetros marcados com (*) não influenciam nos resultados da otimização

	POS											
Ordem	Volt Cap (V)*	Temp Cap (°C)	Tube Lens (V)	Volt <i>Spray</i> (kV)	Sheath Gas (arb)	Aux Gas (arb)*	<i>Sweep Gas</i> (arb)	Intensidade Total	Íons detectados	Íons Atribuídos	Classes	Desejabilidade
1	124,79	161,27	219,54	5,49	19,99	20,00	14,43	7,29E+06	9936	3010	9	0,39
2	85,46	160,90	192,03	5,50	19,94	20,00	11,63	6,80E+06	9936	3008	9	0,39
3	136,25	168,25	201,34	5,50	15,34	19,99	19,82	6,97E+06	10038	2866	9	0,38
4	19,46	160,00	212,18	5,50	17,79	15,82	4,97	7,17E+06	10007	2833	9	0,38
5	39,09	160,00	230,00	5,50	5,61	20,00	8,89	7,50E+06	10382	2636	9	0,38
6	55,88	160,00	225,08	5,50	20,00	8,75	10,98	7,41E+06	9939	2709	9	0,38
7	36,31	206,83	207,96	5,50	20,00	7,00	0,00	7,09E+06	9684	2789	9	0,38
8	0,02	221,81	193,05	5,50	19,94	1,60	0,43	6,81E+06	9605	2757	9	0,37
9	140,00	300,81	229,78	5,40	16,58	20,00	0,03	7,36E+06	9285	2910	8	0,37
10	20,09	160,01	229,77	5,50	3,87	8,97	20,00	7,50E+06	10436	2310	9	0,37

NEG												
Ordem	Volt Cap (V)*	Temp Cap (°C)	Tube Lens (V)	Volt <i>Spray</i> (kV)	Sheath Gas (arb)	Aux Gas (arb)*	<i>Sweep</i> Gas (arb)	Intensidade Total	Íons detectados	Íons Atribuídos	Classes	Desejabilidade
1	-16,60	400,00	-136,76	3,60	0,00	10,64	15,43	5,91E+06	20126	6347	20	0,66
2	-57,43	400,00	-149,94	3,60	0,00	15,74	12,59	5,91E+06	19927	6342	20	0,66
3	-7,20	400,00	-147,48	3,60	0,00	13,01	11,58	5,91E+06	19715	6287	20	0,65
4	-17,43	400,00	-89,78	3,60	0,00	7,72	13,84	5,91E+06	18940	5936	20	0,64
5	-0,36	400,00	-116,39	3,60	0,00	6,79	5,68	5,91E+06	18144	5839	19	0,62
6	-50,81	400,00	-110,39	3,60	0,02	20,00	3,79	5,90E+06	17717	5725	19	0,61
7	-17,43	399,99	-74,29	3,61	3,33	20,00	20,00	4,95E+06	18961	6024	21	0,61
8	-65,57	400,00	-85,84	3,61	2,09	19,99	0,01	5,28E+06	16149	5369	18	0,56
9	-80,00	346,40	-51,35	3,60	0,00	0,02	11,20	4,59E+06	14254	4398	16	0,48
10	-77,15	400,00	-106,09	4,04	0,00	19,99	0,02	4,09E+06	13454	4080	14	0,44

Tabela 6: Dez melhores resultados dados pela otimização dos parâmetrosexperimentais ordenados por nível de desejabilidade para ESI(-). Parâmetrosmarcados com (*) não influenciam nos resultados da otimização

A **Tabela 5** mostra que os melhores resultados para o modo positivo se obtém com temperaturas do capilar próximas a 160°C, voltagem do *Tube Lens* entre 190 e 230 V, voltagem do *Spray* de 5,5kV, gás de bainha (*Sheath Gas*) ao redor de 20 unidades e gás de contracorrente (*Sweep Gas*) ao redor de 10 unidades (havendo bastante variação nesse parâmetro).

Para o modo negativo (**Tabela 6**), os melhores resultados são esperados com uso de temperaturas do capilar próximas a 400°C, voltagens do Tube Lens entre -110 e -150V, voltagem do Spray de 3,6kV, fluxo de gás de bainha (Sheath Gas) próximo de 0, e gás de contracorrente (Sweep Gas) entre 10 e 15 unidades (havendo bastante variação nesse parâmetro). Tanto voltagem do capilar, quanto fluxo do gás auxiliar não influenciaram nos resultados da otimização nos dois modos.

2.5. Conclusões

Por meio do planejamento de experimentos, com auxílio de gráficos seminormais, de interação e gráficos do comportamento de um fator (*"One-Factor Plots"*), determinaram-se os principais parâmetros de influência para ionização dos compostos polares de petróleo por ESI e como eles influenciam os resultados. Quatro parâmetros se mostraram de maior influência na ionização do petróleo para o modo positivo, e quatro para o modo negativo: <u>Temperatura do Capilar</u>, <u>Voltagem do *Tube Lens* e <u>Voltagem do *Spray*</u> são importantes para ambos os modos, adicionando-se a eles <u>Sheath Gas (gás de bainha)</u> para o modo positivo e <u>Sweep Gas (gás de contracorrente)</u> para o modo negativo. Foi observado que para ambos os modos, em condições mais severas dos parâmetros, tanto intensidade quanto massa média são aumentadas. Mostrou-se que há interações entre esses parâmetros, tornando a análise mais complexa.</u>

A classe NOS do modo positivo foi estudada utilizando-se uma amostra em diferentes concentrações, mostrando que ela não é uma classe de compostos polares presente no petróleo, mas sim um agregado de classes. Ao utilizar a energia de fragmentação na fonte foi mostrado que as classes que participam desse agregado são N (+OS) e NO (+S).

O planejamento de experimentos mostrou quais são os principais parâmetros de ionização que influenciam no espectro de petróleo e, consequentemente, nas características atribuídas às amostras. Contudo, não há um espectro que possa servir de referência para ajustar os parâmetros e otimizá-los, já que qualquer espectro de FT-ICR MS foi adquirido em alguma condição desses parâmetros. Portanto, foi utilizada a ferramenta de otimização, na qual os parâmetros foram configurados matematicamente para melhores resultados. Um resumo das condições ideais é mostrado na **Tabela 7**.

41

Tabela 7: Resumo de condições ótimas para análise de petróle	eo por ESI-LTQ-FT
Ultra (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha)

Modo	Temp Cap (°C)	Tube Lens (V)	Volt <i>Spray</i> (kV)	<i>Sheath Gas</i> (arb)	Sweep Gas (arb)
POS	160	entre 190 e 230	5,5	20	10
NEG	400	entre -110 e -150	3,6	0	entre 10 e 15

 Capítulo 3 – Análise de padrões como ferramenta para relacionar ionização com características intrínsecas dos compostos polares presentes no petróleo

3.1. Introdução

3.1.1. Fundamentos de APCI e APPI

As técnicas de APCI e APPI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* e *Atmospheric Pressure Photo Ionization*) também são utilizadas, mas em menor extensão na área de petróleo^[33-35]. Isso porque geram espectros de maior complexidade, pois podem levar, para uma mesma molécula, à formação de espécies protonadas/desprotonadas, radicalares, além de adutos, implicando em uma maior dificuldade no tratamento dos dados. A aplicação dessas técnicas geralmente tem como alvo compostos mais apolares, que são alcançados por seus diferentes mecanismos de ionização em relação a ESI. Ambas as técnicas se baseiam em uma ionização durante a dessolvatação dos analitos, utilizando fluxos de gases aquecidos (geralmente nitrogênio).

Em APCI (**Figura 21**), a mistura solvente/analito passa por uma descarga corona (uma agulha de metal sob um potencial elétrico elevado), o que provoca ionização do gás de dessolvatação. O gás, por sua vez transfere carga para o analito através de reações envolvendo o solvente. No modo positivo, a carga é transferida geralmente na forma de uma protonação do analito, podendo ainda haver perda de hidreto^[36, 37]. No modo negativo, quatro formas de ionização podem ocorrer dependendo da afinidade eletrônica e acidez ou basicidade dos componentes da mistura:

1) <u>Captura de elétrons</u> em que o analito captura elétron do solvente ionizado;

43

(2) <u>Captura de elétrons dissociativa</u> em que a captura de elétrons precede a dissociação de um grupo lábil da molécula;

(3) <u>Transferência de Prótons</u> em que o analito doa um próton para o solvente ionizado e

(4) <u>Aduto com Ânions</u> em que um composto presente na solução doa um ânion (em geral, um haleto) formando um aduto carregado negativamente com o analito^[38].



Figura 21: Mecanismo de ionização de APCI no modo positivo, exemplificada com água como solvente^[39]

No APPI (**Figura 22**), as moléculas são ionizadas pela interação direta ou indireta a uma radiação. No modo positivo, a radiação pode retirar um elétron diretamente do analito, gerando um cátion radicalar (M⁺), ou retirar tal elétron do solvente ou de um dopante (substância inserida na solução para absorver melhor a radiação e transferir carga)., Então, a espécie ionizada recebe um elétron do analito ou transfere próton para o analito através de reações similares a APCI. No modo negativo, a ionização pode ocorrer das mesmas quatro maneiras que APCI^[40].





Figura 22: Mecanismo de ionização de APPI no modo positivo^[41]

Essa técnica, por se basear em ionização por radiação, favorece a detecção de moléculas aromáticas e insaturadas em geral, já que possuem elétrons π que são ionizados com menor energia que elétrons σ .^[42] A lâmpada mais utilizada para gerar a radiação ionizante é a de Criptônio, que possui máximos de emissão em 10.0 e 10.6 eV. Tal energia é suficiente para ionizar compostos poliaromáticos, como antraceno e fluoranteno (**Tabela 8**), compostos esses semelhantes àqueles encontrados no petróleo. Além disso, ioniza o tolueno, que então trabalha como um dopante, além de ser solvente das amostras de petróleo.

Tabela 8: Exemplos de compostos que são (em vermelho) ou não (em preto)ionizados pela lâmpada de criptônio utilizada em APPI

Potencial de Ioni	zação	Potencial de ionização de Solventes				
Antraceno	7.4eV	Tolueno	8.82eV			
Fluoranteno	7.8eV	Acetona	9.70eV			
Cafeína	8.0eV					
4-Nitrotolueno	9.5eV					
10.000		Metanol	10.85eV			
		Acetonitrila	12.19eV			
		Água	12.61eV			

Criptônio 10.0 eV, 10.6 eV

3.2. Objetivos

Essa etapa do trabalho busca, por meio da análise de padrões comerciais, investigar a ionização de compostos polares similares aos encontrados no petróleo, por diferentes técnicas de ionização: ESI, APCI e APPI. Procurou-se entender as relações entre as classes principais, N, NO, O, O₂ e S, e também entre compostos dentro da mesma classe, para cada técnica de ionização.

3.3. Parte Experimental

3.3.1. Análise de padrões

Alguns padrões similares a compostos encontrados no petróleo^[1] (**Tabela 9** e **Figura 23**) foram adquiridos (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Uma mistura equimolar deles na concentração de $7x10^{-5}$ mol.L⁻¹ em metanol:tolueno 1:1 foi preparada e injetada por meio de uma seringa no LTQ FT Ultra. Foram utilizadas as fontes de ionização ESI, APCI, APPI e um modo em que as fontes de APCI e APPI operam simultaneamente, que chamaremos de APPCI (*Atmospheric Pressure Photo and Chemical Ionization*). As análises por intermédio da fonte de ESI foram realizadas de duas formas: sem nenhum aditivo à solução e adicionando 0,1% (v/v) de ácido fórmico para modo positivo e hidróxido de amônio para modo negativo (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA). Os espectros foram adquiridos com a soma de 100 transientes por *scan*, com resolução de 100.000 na *m/z* 400 para maior rapidez nas análises, na faixa de 100-200 Da, com fluxo de 5µL.min⁻¹ para ESI e 20 µL.min⁻¹ para APCI, APPI e APPCI com as seguintes condições:

- ESI positivo: Voltagem do Spray: 3.6kV, Voltagem do Capilar: +12V, Temperatura do Capilar: 280°C e Voltagem dos Tube Lens: +85V, gases desligados;
- ESI negativo: Voltagem do Spray: 3.6kV, Voltagem do Capilar: -50V, Temperatura do Capilar: 280°C e Voltagem dos Tube Lens: -123V, gases desligados;
- APCI positivo: Temperatura do Capilar: 280°C, Voltagem do Capilar: +48V, *Tube Lens*: +105V, *Sheath Gas*: 20 (unidades arbitrárias), *Auxiliary Gas*: 5 (unidades arbitrárias) e *Sweep Gas* desligado, Corrente da Descarga Corona: 5μA;
- APCI negativo: Mesmas condições que APCI positivo exceto: Voltagem do Capilar: -35V e *Tube Lens*: -125V;
- APPI positivo e negativo: mesmas condições que APCI positivo e negativo respectivamente, exceto Corrente de Descarga Corona desligada e Lâmpada de APPI (Criptônio) ligada;
- **APPCI positivo e negativo:** mesmas condições que APCI positivo e negativo, respectivamente, exceto Lâmpada de APPI (Criptônio) ligada.

Classe	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Pureza	
S	Benzotiofeno	C ₈ H ₆ S	≥95.0%	
	Dibenzotiofeno	C ₁₂ H ₈ S	Padrão analítico	
	Carbazol	C ₈ H ₉ N	Padrão analítico	
N (neu)	Indolina	$C_{12}H_9N$	≥99.0%	
0	Flurenona	C ₁₃ H ₈ O	98.00%	
0	Naftalen-1-ol	C ₁₀ H ₈ O	99.00%	
02	Ácido 3-ciclopentilpropanóico	C ₈ H ₁₄ O ₂	98.00%	
	Ácido 5,6,7,8-tetrahidronaftaleno-2- carboxílico	$C_{11}H_{12}O_2$	98.00%	
	Ácido ciclohexano carboxílico	$C_7H_{12}O_2$	98.00%	
NO	Quinolin-8-ol	C ₉ H ₇ NO	Padrão analítico	
	6-metilpiridin-2-ol	C ₆ H ₇ NO	97%	
	2,6,-piridin-4-ol	C ₇ H ₉ NO	Padrão analítico	
N (bas)	Quinolina	C ₉ H ₇ N	≥97%	
	2-etilpiridina	C ₇ H ₉ N	97%	
	2-propilpiridina	C ₈ H ₁₁ N	98%	

Tabela 9: Fórmula molecular e grau de pureza dos padrões adquiridos



Figura 23: Fórmula estrutural dos padrões comerciais adquiridos



quinolin-8-ol Fórmula Molecular: C₉H₇NO Massa Exata: 145.05276



6-metilpiridin-2-ol Fórmula Molecular: C₆H₇NO Massa Exata: 109.05276



2,6-dimetilpiridin-4-ol Fórmula Molecular: C₇H₉NO Massa Exata: 123.06841



quinolina Fórmula Molecular: C₉H₇N Massa Exata: 129.05785



2-etilpiridina Fórmula Molecular: C₇H₉N Massa Exata: 107.07350



2-propilpiridina Fórmula Molecular: C₈H₁₁N Massa Exata: 121.08915

Figura 23 (continuação): Fórmula estrutural dos padrões comerciais adquiridos

3.3.2. Reação de metilação utilizando iodeto de metila

Uma reação de metilação foi realizada adaptando-se o procedimento encontrado na literatura^[43], em que 3.10⁻⁵ mols dos padrões sulfurados (benzo e dibenzotiofeno) foram diluídos em 5mL de dicloroetano. Adicionou-se a essa solução 20µL de iodeto de metila (CH₃I) e 5µL de uma solução 20µg.mL⁻¹ de tetrafluorborato de prata (AgBF₄) em dicloroetano. A mistura foi para banho ultrassônico por 20 minutos e, em seguida, deixada para reagir por 70h sob agitação. O precipitado (AgI) foi retido por filtração em papel de filtro e lavado com dicloroetano. A solução obtida foi secada em um fluxo de nitrogênio, diluída em 10mL de tolueno:metanol 1:1 e injetada no espectrômetro de massas. O mesmo procedimento foi realizado para a mistura dos 15 padrões adquiridos e para a amostra de petróleo utilizada no planejamento de experimentos do Capítulo 2. Foram utilizadas 2 alíquotas de 50mg da amostra de petróleo e o mesmo procedimento realizado para os padrões foi repetido; contudo, para uma alíquota

foi utilizado dicloroetano e para outra ele foi substituído por diclorometano para comparação. Todos os solventes e reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e utilizados sem purificação.

As análises foram realizadas no FT-ICR MS (LTQ FT Ultra) por *eletrospray* no modo positivo (ESI+) nas seguintes condições: Voltagem do *Spray* de 3.6kV, Voltagem do Capilar de +35V, Temperatura do Capilar de 275°C, Voltagem dos *Tube Lens* de +110V e gases desligados. Os espectros foram adquiridos com a soma de 100 transientes por *scan*, com resolução de 400.000 na m/z 400 para os padrões e para o óleo, na faixa de 100-200 Da para os padrões e 150-2000 Da para as análises de petróleo, com fluxo de inserção de amostra de 5 μ L.min⁻¹.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Análise de padrões

No estudo de ionização com o uso de padrões foram obtidos espectros para os modos positivo e negativo nas 4 técnicas de ionização disponíveis no equipamento LTQ FT Ultra (ESI, APCI, APPI e APPCI). A diferença entre os espectros é visível, como pode ser observado comparando ESI e APPCI em modo positivo (**Figura 24a e b**) e em modo negativo (**Figura 24c e d**).



Figura 24: Espectros da mistura dos padrões das classes de compostos polares do petróleo utilizando (a) ESI sem aditivo e (b) APPCI no modo positivo; (c) ESI sem aditivo e (d) APPCI no modo negativo. Observa-se a maior complexidade no espectro de APPCI



Figura 24 (continuação): Espectros da mistura dos padrões das classes de compostos polares do petróleo utilizando (a) ESI sem aditivo e (b) APPCI no modo positivo; (c) ESI sem aditivo e (d) APPCI no modo negativo. Observa-se a maior complexidade no espectro de APPCI

As diferenças no espectro são esperadas devido às diferenças nos mecanismos de ionização em cada técnica, já que a técnica de ESI se baseia na ionização dos compostos em solução e as outras durante a dessorção dos compostos. Além disso, na ESI a ionização ocorre devido a um desbalanceamento de cargas pela aplicação de um potencial à solução, em APPI pela aplicação de uma radiação e por APCI ocorrer por meio de uma descarga elétrica. Para melhor visualização, as intensidades absolutas de cada íon foram divididas pela soma das intensidades dos íons, gerando intensidades relativas que estão organizadas nas **Tabelas 10 e 11** (modo positivo e negativo, respectivamente). Alguns desses íons foram detectados em ambos os modos de APCI, APPI e APPCI, já que essas técnicas de ionização não dependem da protonação ou desprotonação em solução, ou seja, acidez ou basicidade de Brönsted-Lowry, mas sim de interações íon-molécula que geram troca de prótons ou elétrons.

Tabela 10: Intensidades relativas obtidas para cada íon no modo positivo nos diferentes modos de ionização. Íons com o asterisco (*) foram detectados, também, no modo negativo

	ESI	ESI+aditivo	APCI	APPI	APPCI
C ₇ H ₉ N	2,1	2,2	0,7	0,2	0,0
C ₈ H ₉ N	0,0	0,0	1,9	1,7	1,7
$C_8H_{11}N$	10,8	9,2	0,7	0,5	0,3
C ₉ H ₇ N	12,3	31,9	12,4	9,0	6,0
$C_{12}H_9N^*$	0,0	0,0	48,0	41,8	42,9
C ₆ H ₇ NO*	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0
C ₇ H ₉ NO*	65,8	45,6	5,5	3,9	2,8
C ₉ H ₇ NO*	8,2	8,3	5,4	3,4	2,3
$C_{10}H_8O^*$	0,0	0,0	4,0	2,8	2,8
C ₁₃ H ₈ O*	0,5	2,3	8,8	6,5	7,8
C ₈ H ₆ S	0,0	0,0	1,7	4,0	3,8
$C_{12}H_8S$	0,0	0,0	10,8	26,0	29,6

Tabela 11: Intensidades relativas obtidas para cada íon no modo negativo nosdiferentes modos de ionização. Íons com o asterisco (*) foram detectados,
também, no modo positivo

	ESI	ESI+aditivo	APCI	APPI	APPCI
$C_7H_{12}O_2$	4,5	4,4	1,8	2,8	4,3
C ₈ H ₁₄ O ₂	13,8	7,0	3,4	4,7	4,9
$C_{11}H_{12}O_2$	58,6	81,5	25,5	37,5	42,3
C ₁₂ H ₉ N*	2,4	0,6	36,8	25,6	17,9
C ₇ H ₉ NO*	0,0	0,0	4,7	7,0	7,2
C ₉ H ₇ NO*	0,0	0,0	12,9	3,7	4,1
C ₁₀ H ₈ O*	20,7	6,4	11,1	15,0	15,5
C ₁₃ H ₈ O*	0,0	0,0	3,8	3,7	3,9

As intensidades relativas de íons de mesma classe foram somadas para discriminação dos íons por classe de heteroátomos, e os resultados estão mostrados nas **Figuras 25 e 26**.



Figura 25: Distribuição da porcentagem relativa das classes dos compostos polares de petróleo no modo positivo para todas as técnicas de ionização (ESI_ac se refere ao *eletrospray* realizado na presença de ácido fórmico a 0,1%).
 Destaque para classe S, não detectada na análise por *eletrospray*, aparecendo na ionização por APCI, APPI e APPCI



Figura 26: Distribuição da porcentagem relativa das classes dos compostos polares de petróleo no modo negativo para todas as técnicas de ionização (ESI_NH4OH se refere ao *eletrospray* realizado na presença de hidróxido de amônio a 0,1%). Destaque para classe NO, não detectada na análise por *eletrospray* nesse modo, e ionizada por APCI, APPI e APPCI

Pode-se observar uma predominância de algumas classes no ESI, suprimindo o sinal das outras: N e NO para o modo positivo e O_2 no modo negativo. Isso se dá pela competição das moléculas por um ácido ou base <u>em solução</u>, a qual privilegia as moléculas com maior ou menor pKa (logaritmo do inverso da constante de dissociação ácida), respectivamente. Tal efeito também pode ser observado dentro das classes, dependendo da acidez ou basicidade de cada molécula. Na classe NO no modo positivo, por exemplo, a ordem decrescente de intensidades relativas $C_7H_9NO>C_9H_7NO>C_6H_7NO$ se dá na ordem de maior estabilização da carga positiva após a protonação, tanto por ressonância quanto por indução dos grupos metil (**Figura 27**).



Figura 27: Estruturas de ressonância para os compostos da classe NO, explicando as diferenças nas eficiências de ionização entre eles, com base no número de formas canônicas de ressonância e na estabilização de carga por efeito indutivo dos grupos metila.

O 2,6-dimetilpiridin-4-ol (C₇H₉NO) possui cinco estruturas de ressonância, sendo que em duas delas a carga positiva está vizinha ao grupo metil, o que estabiliza essa carga por efeito hiperconjugativo, e em outra a carga se localiza no átomo de oxigênio. No caso do composto quinolin-8-ol (C₉H₇NO), mesmo não havendo grupos metil para contribuir com efeito hiperconjugativo e a carga não se localizando sobre o átomo de oxigênio em nenhuma estrutura do híbrido, esse híbrido é composto por seis formas canônicas, o que melhor estabiliza a carga quando comparado ao 6-metilpiridin-2-ol (C₆H₇NO). Esse último composto, apesar

de receber contribuição da carga sobre o oxigênio em uma de suas cinco formas canônicas de ressonância, sofre menor efeito de grupo metil na estabilização da carga, já que essa molécula só possui um desses grupos.

Os compostos da classe S (benzo e dibenzotiofeno) não foram detectados utilizando ESI, já que possuem pKa altos (cerca de 22 para ambos^[44]), tendo suas formas ionizadas em concentrações muito baixas na solução. Assim, apesar de largamente utilizada em espectrometria de massas e em petroleômica, a técnica de ESI não atinge todos os compostos heteroatômicos do petróleo. Além disso, os compostos alcançados têm intensidades com diferença considerável em relação a suas concentrações reais, devido à alta dependência dessa técnica com a acidez ou basicidade desses compostos. Esse efeito é amplificado quando na presença do aditivo, já que os compostos mais ácidos e básicos são os que preferencialmente doam ou capturam prótons dos aditivos. As técnicas de APCI, APPI e APPCI apresentam ionização mais balanceada de todas as classes. Reorganizando as **Tabelas 10 e 11** em termos de DBE (*Double Bond Equivalent* = C - H/2 + N/2 + 1) nas **Tabelas 12 e 13**, pode-se extrair delas que essas técnicas em geral ionizaram preferencialmente compostos com maior número de insaturações e anéis, ou seja, elétrons π , conforme esperado. Observa-se, por exemplo, um aumento de até oito vezes na intensidade relativa dentro da classe dos sulfurados (S) quando passamos de DBE 6 a 9, e até quatorze vezes na classe dos ácidos naftênicos (O₂) guando passamos de DBE 2 a 6, especialmente em APCI.

58

Tabela 12: Intensidades relativas dos íons (em %) de acordo com sua classe e DBE no modo positivo das diferentes técnicas de ionização. **N(bas)** e **N(neu)** se referem a compostos nitrogenados considerados básicos e neutros em escala de acidez^[1]

POS	DBE	ESI	ESI+aditivo	APCI	APPI	APPCI
N(bas)	4	2,1	2,2	0,7	0,2	0
	4	10,8	9,2	0,7	0,5	0,3
	7	12,3	31,9	12,4	9	6
N(neu)	5	0	0	1,9	1,7	1,7
	9	0	0	48	41,8	42,9
NO	4	0,8	0,6	0	0	0
	4	65,8	45,6	5,5	3,9	2,8
	7	8,2	8,3	5,4	3,4	2,3
0	7	0	0	4	2,8	2,8
	10	0,5	2,3	8,8	6,5	7,8
S	6	0	0	1,7	4	3,8
	9	0	0	10,8	26	29,6

Tabela 13: Intensidades relativas dos íons (em %) de acordo com sua classe e DBE no modo negativo das diferentes técnicas de ionização. **N(neu)** se refere a compostos nitrogenados considerados neutros em escala de acidez^[1]

NEG	DBE	ESI	ESI_NH4OH	APCI	APPI	APPCI
02	2	4,5	4,4	1,8	2,8	4,3
	2	13,8	7	3,4	4,7	4,9
	6	58,6	81,5	25,5	37,5	42,3
N(neu)	9	2,4	0,6	36,8	25,6	17,9
NO	4	0	0	4,7	7	7,2
	7	0	0	12,9	3,7	4,1
0	7	20,7	6,4	11,1	15	15,5
	10	0	0	3,8	3,7	3,9

Para a classe O_2 no modo negativo, vê-se que é favorecida a ionização de compostos que melhor estabilizam a carga (seja por efeito indutivo, quanto ressonância). Para a classe O, do mesmo modo, a ionização depende mais da acidez dos grupos funcionais dos compostos do que da DBE, já que os dois compostos comparados possuem grupos funcionais diferentes: um com grupo cetônico e o outro com grupo fenólico.

Um aspecto interessante encontrado nos espectros de APCI, APPI e APPCI é a presença de íons com diferenças de hidrogênios em relação às fórmulas moleculares dos padrões. Alguns exemplos desses íons estão presentes na **Figura 28**.



Figura 28: Espectros ampliados de APCI modo negativo (acima) e APPI modo positivo (abaixo) dos padrões isolados, mostrando espécies com diferentes números de hidrogênios em relação às moléculas desprotonadas (modo negativo) ou protonadas (modo positivo)

De acordo com Gao *et. al.*^[37], quando em presença de hidrocarbonetos e utilizando APCI, cadeias carbônicas podem ser ionizadas por perda de hidreto. Contudo, as diferenças de dois ou mais hidrogênios é um fenômeno descrito por Purcell *et. al.*^[45] como fragmentação devido a condições drásticas na fonte de ionização. Tomando a mistura de padrões fixou-se as outras condições (como voltagem do capilar, que foi fixada em 43V) e foi variada, então, somente a voltagem do *Tube Lens* para avaliar tal fragmentação. Alguns exemplos de espectros tomados de 100-200 Da são mostrados na **Figura 29**.



Figura 29: Espectros da mistura de padrões obtidos por APCI (+) em diferentes condições de *Tube Lens* (de cima para baixo): 0V; 40V;100V; 160V; 240V

A formação desses compostos com diferença de hidrogênios mostrou dependência das condições da fonte, como é denotado na **Figura 29**. O íon de massa exata 168,08078 Da e fórmula molecular $C_{12}H_{10}N$ tem intensidade diminuída em detrimento do íon de massa exata 167,07295 Da e fórmula molecular $C_{12}H_9N$ (ambos provenientes do carbazol) quando aumentada a voltagem de *Tube Lens*.

Para melhor explorar esses compostos, os padrões foram injetados também separadamente na concentração de 7.10⁻⁵ mol.L⁻¹ em metanol:tolueno 1:1, e analisados tanto por ESI, quanto pelas outras técnicas. Alguns exemplos de

61

espectros estão mostrados na **Figura 30.** É possível observar os íons adjacentes nas **Figuras 30(b)** e (d) que correspondem às técnicas de APPCI e APPI, respectivamente, e que esses íons não estão visíveis no ESI, **Figuras 30(a) e (c)**.



Figura 30: Exemplos de espectros ampliados dos padrões analisados isoladamente em modo negativo: (a) C₁₁H₁₂O₂ em ESI e (b) em APPCI; (c) C₁₂H₉N em ESI e (d) em APPI. Observam-se as espécies com diferenças de hidrogênio em APPCI e APPI, mas não em ESI



Figura 30 (continuação): Exemplos de espectros ampliados dos padrões analisados isoladamente em modo negativo: (a) C₁₁H₁₂O₂ em ESI e (b) em APPCI; (c) C₁₂H₉N em ESI e (d) em APPI. Observam-se as espécies com diferenças de hidrogênio em APPCI e APPI, mas não em ESI



O número de espécies encontradas foi contabilizado e mostrado nas Figuras 31 e 32.

(a)



Figura 31: Número de espécies encontradas para (a) cada composto no modo positivo e (b) cada composto no modo negativo. O total de compostos analisados foi de 15



Figura 32: Resumo com número de íons somados para cada modo de ionização, mostrando um número de espécies alto para APCI, APPI e APPCI. O total de compostos analisados foi de 15

Para ESI, o número de espécies encontradas para cada composto está, em geral, entre 1 e 3, mostrando que, de fato, o espectro é mais simples utilizando essa técnica. Investigando a intensidade relativa dos íons adjacentes ao íon principal em cada espectro (**Figura 33**), pode-se observar que, para essa técnica de ionização, os íons próximos estão abaixo de 0,5%, ou seja, em quantidades não significativas. Ao comparar com as outras técnicas de ionização observa-se que o número de espécies varia entre 3 e 17 por íon, a maioria estando acima de 1%. Isso mostra que a maioria das espécies encontradas para cada composto é artefato das técnicas APCI, APPI e APPCI.



Figura 33: Exemplo de espectro da 2-etilpiridina no modo positivo por (a) ESI com região abaixo da *m/z* 108 ampliada 100 vezes e (b) APCI. Observa-se maior intensidade dos íons de diferenças de hidrogênio em relação à molécula protonada de *m/z* 106 e 107, sendo considerável para APCI e menor que 1% para ESI

Na **Figura 29**, encontra-se também compostos da classe CH. Quando a voltagem do *Tube Lens* está baixa, poucos compostos da classe CH são encontrados no espectro. Aumentando a voltagem do *Tube Lens* os compostos vão aumentando em intensidade e variedade, chegando a ser majoritários em espectros obtidos com voltagem acima de 160V. O espectro obtido com a diferença entre voltagem do capilar e *Tube Lens* de 60V (*Tube Lens* 100V nesse caso) já provoca o aparecimento dos íons em questão, o que explica o fato de encontrar tais íons nos espectros da **Figura 24b**. Tais íons parecem ser provenientes da fragmentação dos íons devido a esse surgimento em altas energias de transferência.

É possível observar que apesar da maior gama de compostos analisados por APCI, APPI e APPCI, essas técnicas geram para um mesmo composto diversas espécies com intensidades significativas. Como o petróleo se trata de um contínuo de compostos^[46, 47], a intensidade dos artefatos seria somada a intensidade da ionização de compostos reais que estão adjacentes, gerando uma intensidade artificial no espectro. Para uma atribuição correta da intensidade de cada composto seria necessário conhecer as intensidades de cada artefato gerado por cada composto, e então deconvoluir cada sinal de acordo com essas intensidades. Num espectro de petróleo com, aproximadamente, 20.000 íons de diferentes classes em cada modo, tal conhecimento e tratamento seria inviável. Desse modo, ESI se mostra mais útil e prático na análise de petróleo (e possivelmente de misturas complexas em geral), pois leva a uma proporção de somente um sinal por composto.

A derivatização de compostos menos polares, dificilmente ionizados por ESI tais como os compostos sulfurados tiofênicos, ganha importância, já que se propõe a ionizar tais compostos mantendo a relação um sinal por composto.

67

3.4.2. Reação de metilação utilizando iodeto de metila

As soluções obtidas após a reação de metilação, filtração, secagem e solubilização em metanol:tolueno foram analisadas e os resultados estão mostrados nas **Figuras 34 a 37**.



Figura 34: Espectro de ESI(+)-FTICR MS da mistura equimolar de padrões (a) antes (b) e depois da reação de metilação. Acentuam-se as intensidades dos compostos da classe N, NO e, principalmente, S; (c) Espectro de ESI(+)-FTICR MS da mistura equimolar de padrões sulfurados, mostrando a acentuação dos compostos sulfurados, tanto metilados quanto na forma de cátion radicalar. Em destaque, uma ampliação da região de 130 a 155 Da, mostrando a forma metilada do benzotiofeno, além de seu cátion radicalar, ambos em baixas intensidades.



(C)

Figura 34 (continuação): Espectro de ESI(+)-FTICR MS da mistura equimolar de padrões (a) antes (b) e depois da reação de metilação. Acentuam-se as intensidades dos compostos da classe N, NO e, principalmente, S; (c) Espectro de ESI(+)-FTICR MS da mistura equimolar de padrões sulfurados, mostrando a acentuação os compostos sulfurados, tanto metilados quanto na forma de cátion radicalar. Em destaque, uma ampliação da região de 130 a 155 Da, mostrando a forma metilada do benzotiofeno, além de seu cátion radicalar, ambos em baixas intensidades.

Comparando as Figuras 34(a) e (b), é possível observar que a metilação ocorre não somente em compostos sulfurados, mas também em compostos das classes N e NO. Surgem ions como os de m/z 136,11194 (C₉H₁₄N), 138,09118 (C₈H₁₂NO), 144,08061 (C₁₀H₁₀N), 160,07552 (C₁₀H₁₀NO), além do composto de m/z 199,05733 (C₁₃H₁₁S), provenientes da metilação dos compostos C₈H₁₁N, C₇H₉NO, C₉H₇N, C₉H₇NO e C₁₂H₈S, respectivamente. Esses ions sofreram um aumento de intensidade que variou entre 4 e 11 vezes. Além disso, o dibenzotiofeno é ionizado nesse modo, e não ser detectado antes da reação. Os compostos metilados dos compostos C₆H₇NO e C₇H₉N, que são C₇H₁₀NO e $C_8H_{12}N$, respectivamente, possuem mesma fórmula molecular, e, portanto, mesma m/z que a forma protonada de C₇H₉NO e C₈H₁₁N, que são compostos presentes na mistura. É possível observar um aumento nas intensidades do íon de m/z 122,09629 (C₈H₁₂N) e a manutenção de uma alta intensidade do íon de m/z124,07555 (C₇H₁₀NO), indicando que esses sinais não devem ser devidos somente às moléculas protonadas, mas recebem contribuição das moléculas metiladas.

Os compostos sulfurados, que estavam ausentes no espectro antes da reação de metilação, são encontrados após a reação, apesar do benzotiofeno $(C_8H_6S m/z 149,04181 metilado)$ se apresentar em baixa intensidade e somente na mistura dos compostos sulfurados (**Figura 34 (c)**). Curiosamente, após a reação também surgem os íons de m/z 134,01845 e 184,03385 que correspondem a C_8H_6S e $C_{12}H_8S$, respectivamente, que são as formas do benzotiofeno e dibenzotiofeno sem protonação ou metilação (**Figura 34 (b)** e **(c)**). Tais íons podem são cátions radicalares formados devido à ação da prata, conforme descrito na literatura^[48, 49].

Comparando-se os espectros de amostra de petróleo após reação em diclorometano e dicloroetano (**Figuras 35 e 36**, respectivamente), é possível observar o melhor rendimento na metilação de compostos sulfurados quando em dicloroetano. A classe S se destaca no dicloroetano, representando mais de 90% da intensidade relativa dos íons, enquanto que, em diclorometano, ela atinge

70

somente 22%. Isso leva a detecção de compostos de outras classes que estiveram presentes na amostra sem reagir (**Figura 37**) (N e OS) em maior intensidade que a classe S. Já na amostra após reação em dicloroetano essas classes não aparecem. Isso confirma que, para as condições utilizadas, a reação de metilação de compostos sulfurados em dicloroetano é mais eficaz que a realizada em diclorometano.



Figura 35: (a) Espectro de ESI(+)-FTICR MS, diagramas de DBE em função de número de carbonos para as classes (b) S, (c) OS e (d) N, e (e) gráficos de porcentagem de classes do petróleo após reação de metilação em diclorometano



Figura 36: (a) Espectro de ESI(+)-FTICR MS, (b) diagrama de DBE em função de número de carbonos para a classe S e (c) gráfico de porcentagem de classes do petróleo após reação de metilação em dicloroetano









Figura 37: (a) Espectro de ESI(+)-FTICR MS, diagramas de DBE em função de número de carbonos para as classes (b) OS e (c) N, e (d) gráficos de porcentagem de classes no petróleo sem reagir

Na **Figura 36b** é possível observar que os íons de maior intensidade na classe S estão localizados em DBEs 6, 9, 10 e 11, o que representa derivados do benzotiofeno (DBE 6), dibenzotiofeno (DBE 9) e similares (**Figura 38**). Para os compostos de mesmo DBE, mas diferentes números de carbonos altera-se somente o comprimento da cadeia alquílica ligada a esses núcleos heteroaromáticos. Tais compostos são encontrados em maior quantidade que outros compostos sulfurados no petróleo, o que leva a altas intensidades no espectro^[1, 2, 43].



Figura 38: Estruturas sugeridas comuns aos compostos sulfurados com DBEs 6, 9, 10 e 11^[43]

Observando as séries de compostos sulfurados, encontram-se em maior intensidade as moléculas com número ímpar de hidrogênios (**Figura 39a**), que correspondem aos compostos metilados. Os compostos não metilados possuem número par de hidrogênios, sejam pertencentes à classe dos tiofenos, tióis ou sulfetos. Nas massas pares, encontram-se compostos com número par de hidrogênios, sendo gerados devido à ação da prata, possuindo menor intensidade em relação aos metilados. É possível observar nas **Figuras 39b-f** que em menores massas esses íons não são encontrados, mas com o aumento de *m/z* esses íons vão ganhando intensidade e até sobrepondo íons atribuídos como hidrocarbonetos (ou HPAs, hidrocarbonetos poliaromáticos, assim atribuídos pelo alto DBE). Essa sobreposição ocorre pela falta de resolução, já que no FT-ICR MS

a resolução diminui com o aumento da m/z. O aumento da intensidade dos íons com número par de hidrogênios com o aumento de DBE se dá pelo aumento no número de elétrons nas nuvens π da molécula, que tem maior energia em relação aos elétrons σ e, portanto, são mais facilmente abstraídos pela ação da prata (semelhantemente a ionização por perda ou ganho de elétrons por APPI^[50]).



(a)

Figura 39: (a) Ampliação do espectro mostrando a série de compostos sulfurados com número ímpar de hidrogênios, correspondente aos compostos metilados; (b-f) espectro do petróleo após metilação ampliado em faixas de massa crescentes, comparando com espectros teóricos de compostos sulfurados de número par de hidrogênios. Há um aumento da intensidade desses íons com a *m/z*, que são obtidos pela retirada de um elétron pela ação da prata.



Figura 39 (continuação): (a) Ampliação do espectro mostrando a série de compostos sulfurados com número ímpar de hidrogênios, correspondente aos compostos metilados; (b-f) espectro do petróleo após metilação ampliado em faixas de massa crescentes, comparando com espectros teóricos de compostos sulfurados de número par de hidrogênios. Há um aumento da intensidade desses íons com a *m/z*, que são obtidos pela retirada de um elétron pela ação da prata.



Figura 39 (continuação): (a) Ampliação do espectro mostrando a série de compostos sulfurados com número ímpar de hidrogênios, correspondente aos compostos metilados; (b-f) espectro do petróleo após metilação ampliado em faixas de massa crescentes, comparando com espectros teóricos de compostos sulfurados de número par de hidrogênios. Há um aumento da intensidade desses íons com a *m/z*, que são obtidos pela retirada de um elétron pela ação da prata.



Figura 39 (continuação): (a) Ampliação do espectro mostrando a série de compostos sulfurados com número ímpar de hidrogênios, correspondente aos compostos metilados; (b-f) espectro do petróleo após metilação ampliado em faixas de massa crescentes, comparando com espectros teóricos de compostos sulfurados de número par de hidrogênios. Há um aumento da intensidade desses íons com a m/z, que são obtidos pela retirada de um elétron pela ação da prata.

Conclui-se, então, que apesar de dois íons serem encontrados para cada composto na análise por FT-ICR MS de compostos sulfurados metilados, esses íons não se sobrepõem entre si, levando a um espectro simples.

3.5. Conclusões

Este capítulo apresentou e discutiu os testes que foram realizados empregando técnicas de ionização comumente utilizadas na análise de petróleo por espectrometria de massas. Foi mostrado que entre as técnicas utilizadas aquela que une APCI e APPI, o que chamamos de APPCI, é a mais abrangente,

ionizando compostos não alcançadas por ESI e ionizadas tanto por APCI quanto por APPI. Apesar disso, essa técnica (bem como APCI e APPI) gera maior complexidade no espectro, gerando íons radicalares, protonados (ou desprotonados) e com perda de hidreto, além de formar artefatos com diferenças de hidrogênio entre os compostos. Isso ocasiona uma maior dificuldade no tratamento de dados e atribuição das intensidades de cada íon, pois um mesmo composto é encontrado em mais de uma forma no espectro.

Com uma reação simples de metilação, classes menos polares, como S e CH, foram detectadas por ESI, em uma relação de dois sinais por composto, o que não complica a análise pelo fato dos sinais não se sobreporem.

Dessa forma, ESI ainda se mostra como a técnica mais adequada para uma análise abrangente dos compostos de petróleo, já que gera espectros mais simples e de maior facilidade de processamento.

4. Conclusões Gerais

Essa dissertação mostrou que a ionização do petróleo na análise direta por espectrometria de massas possui diversas facetas, sendo necessária a identificação de artefatos e agregados das técnicas de ionização e a distinção desses em relação aos sinais reais obtidos. As condições experimentais de uma análise por ESI foram otimizadas. estabelecendo-se relacões parâmetros/respostas durante o processo. Essa avaliação e otimização, inéditas até esse trabalho, tornam os resultados obtidos em análises futuras mais sólidos e de melhor qualidade. Quando os alvos da análise são os compostos mais apolares, outras técnicas de ionização são utilizadas. Foram estabelecidas, então, relações da eficiência de ionização por diferentes técnicas, com as características intrínsecas, como acidez/basicidade е aromaticidade, dos compostos heteroatômicos mais comumente encontrados no petróleo. Como resultado, a técnica de ESI se manteve como a mais adequada para uma análise abrangente e confiável de amostras de petróleo, com a utilização de uma reação de metilação prévia à análise como estratégia para favorecer a ionização dos compostos mais apolares.

Referências Bibliográficas

- 1. Tissot, B.P. and D.H. Welte, *Petroleum formation and occurrence*. 2nd, rev. and enl. ed. 1984, Berlin ; New York: Springer-Verlag. xxi, 699 p.
- 2. Hunt, J.M., *Petroleum geochemistry and geology*. A Series of books in geology. 1979, San Francisco: W. H. Freeman. xx, 617 p.
- 3. Seifert, W.K., *Carboxylic acids in petroleum and sediments.* Fortschr Chem Org Naturst, 1975. **32**: p. 1-49.
- 4. Rodgers, R.P., T.M. Schaub, and A.G. Marshall, *Petroleomics: MS returns to its roots.* Analytical Chemistry, 2005. **77**(1): p. 20a-27a.
- 5. Pimmel, A., and Claypool, G. Introduction to shipboard organic geochemistry on the JOIDES Resolution. 2001; ODP Tech. Note, 30 [Online]. Available from World Wide Web: <<u>http://www-odp.tamu.edu/publications/tnotes/tn30/INDEX.HTM>]</u>.
- 6. Petersen, H.I., et al., *Geochemistry of Crude Oils, Seepage Oils and Source Rocks from Belize and Guatemala: Indications of Carbonate-Sourced Petroleum Systems.* Journal of Petroleum Geology, 2012. **35**(2): p. 127-163.
- 7. Sundararaman, P., et al., *Vanadylporphyrins, Indicators of Kerogen Breakdown and Generation of Petroleum.* Geochimica Et Cosmochimica Acta, 1988. **52**(9): p. 2337-2341.
- 8. Wang, Z., M. Fingas, and K. Li, *Fractionation of a Light Crude Oil and Identification and Quantitation of Aliphatic, Aromatic, and Biomarker Compounds by GC-FID and GC-MS, Part I.* Journal of Chromatographic Science, 1994. **32**(9): p. 361-366.
- 9. Marshall, A.G. and R.P. Rodgers, *Petroleomics: The next grand challenge for chemical analysis.* Accounts of Chemical Research, 2004. **37**(1): p. 53-59.
- 10. Stephens, W.E., *A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion.* Physical Review, 1946. **69**(11-1): p. 691-691.
- 11. Wiley, W.C. and I.H. Mclaren, *Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution.* Review of Scientific Instruments, 1955. **26**(12): p. 1150-1157.
- 12. Cotter, R.J., *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research.* 1997, Washington D.C.: ACS.
- 13. Klitzke, C.F., et al., *Petroleomics by Ultrahigh-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry.* Energy & Fuels, 2012. **26**(9): p. 5787-5794.
- 14. Hu, Q.Z., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer.* Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(4): p. 430-443.
- Michalski, A., et al., Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. 11(3).
- Pomerantz, A.E., et al., Orbitrap Mass Spectrometry: A Proposal for Routine Analysis of Nonvolatile Components of Petroleum. Energy & Fuels, 2011. 25(7): p. 3077-3082.
- 17. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer.* Mass Spectrometry Reviews, 1998. **17**(1): p. 1-35.
- Wu, Z., R.P. Rodgers, and A.G. Marshall, 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. Analytical Chemistry, 2004. **76**(9): p. 2511-2516.
- 19. Hughey, C.A., et al., *Kendrick mass defect spectrum: A compact visual analysis for ultrahigh-resolution broadband mass spectra.* Analytical Chemistry, 2001. **73**(19): p. 4676-4681.
- 20. Kendrick, E., A Mass Scale Based on Ch2=14.0000 for High Resolution Mass Spectrometry of Organic Compounds. Analytical Chemistry, 1963. **35**(13): p. 2146-&.
- 21. <u>http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/fticr-massspec.html</u>. [cited 2014 03/10].
- 22. Fenn, J.B., et al., *Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules.* Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
- 23. Yamashita, M. and J.B. Fenn, *Electrospray Ion-Source Another Variation on the Free-Jet Theme.* Journal of Physical Chemistry, 1984. **88**(20): p. 4451-4459.
- 24. Zhan, D.L. and J.B. Fenn, *Electrospray mass spectrometry of fossil fuels.* International Journal of Mass Spectrometry, 2000. **194**(2-3): p. 197-208.
- 25. Konermann, L., et al., *Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization.* Analytical Chemistry, 2012. **85**(1): p. 2-9.
- 26. <u>http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html</u>. [cited 2014 03/10].
- 27. Klitzke, C.F., Aplicações da Espectrometria de Massas de Altíssima Resolução e da Mobilidade lônica acoplada a Espectrometria de Massas em estudos de Geoquímica Orgânica, in Química Orgânica. 2012, Universidade Estadual de Campinas: Campinas. p. 136.
- 28. Pereira, R.C.L., et al., *Precision in Petroleomics via Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry.* Energy & Fuels, 2013. **27**(12): p. 7208-7216.
- 29. Barros Neto, B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2002: Editora da Unicamp.
- 30. Corilo, Y.E., Petroleômica por espectrometria de massas de altíssima resolução e exatidão: informação química precisa e seletiva através de novas estratégias de processamento e visualização de dados. 2011, Universidade Estadual de Campinas: Campinas. p. 92.
- 31. Vessecchi, R., et al., *Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa.* Química Nova, 2011. **34**: p. 1875-1887.
- 32. Stat-Ease, Handbook for Experimenters. 2005.
- Chiaberge, S., et al., *Classification of crude oil samples through statistical analysis of APPI FTICR mass spectra.* Fuel Processing Technology, 2013.
 106: p. 181-185.

- 34. Gaspar, A., et al., *Impact of Different Ionization Methods on the Molecular Assignments of Asphaltenes by FT-ICR Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry, 2012. **84**(12): p. 5257-5267.
- 35. Mohammed, M.A. and K.S. Sorbie, *Naphthenic acid extraction and characterization from naphthenate field deposits and crude oils using ESMS and APCI-MS.* Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2009. **349**(1-3): p. 1-18.
- Carroll, D.I., et al., Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry -Corona Discharge Ion-Source for Use in Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical System. Analytical Chemistry, 1975. 47(14): p. 2369-2373.
- 37. Gao, J.S., et al., HPLC/APCI Mass Spectrometry of Saturated and Unsaturated Hydrocarbons by Using Hydrocarbon Solvents as the APCI Reagent and HPLC Mobile Phase. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(5): p. 816-822.
- Song, L.G., et al., Negative ion-atmospheric pressure photoionization: Electron capture, dissociative electron capture, proton transfer, and anion attachment. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. 18(10): p. 1789-1798.
- 39. <u>http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apci-ionisation.html</u>. [cited 2014 03/10].
- 40. McEwen, C.N. and B.S. Larsen, *Ionization Mechanisms Related to Negative Ion APPI, APCI, and DART.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(8): p. 1518-1521.
- 41. <u>http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization-appi.html</u>. [cited 2014 03/10].
- 42. Hanold, K.A., et al., *Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS.* Analytical Chemistry, 2004. **76**(10): p. 2842-2851.
- 43. Müller, H., J.T. Andersson, and W. Schrader, *Characterization of High-Molecular-Weight Sulfur-Containing Aromatics in Vacuum Residues Using Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry, 2005. **77**(8): p. 2536-2543.
- 44. <u>http://epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp</u>. [cited 2014 03/11].
- 45. Purcell, J., et al., Speciation of nitrogen containing aromatics by atmospheric pressure photoionization or electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(7): p. 1265-1273.
- 46. Boduszynski, M.M., Composition of heavy petroleums. 1. Molecular weight, hydrogen deficiency, and heteroatom concentration as a function of atmospheric equivalent boiling point up to 1400.degree.F (760.degree.C). Energy & Fuels, 1987. 1(1): p. 2-11.
- 47. Boduszynski, M.M. and K.H. Altgelt, *Composition of heavy petroleums. 4. Significance of the extended atmospheric equivalent boiling point (AEBP) scale.* Energy & Fuels, 1992. **6**(1): p. 72-76.
- 48. Takino, M., et al., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using

silver nitrate as a post-column reagent. Journal of Chromatography A, 2001. **928**(1): p. 53-61.

- 49. Ghislain, T., P. Faure, and R. Michels, *Detection and Monitoring of PAH and Oxy-PAHs by High Resolution Mass Spectrometry: Comparison of ESI, APCI and APPI Source Detection.* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2012. **23**(3): p. 530-536.
- 50. Purcell, J., et al., Atmospheric pressure photoionization proton transfer for complex organic mixtures investigated by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007. **18**(9): p. 1682-1689.