



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ROSANE ALVES FONTES

**ESTUDO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DE BIOMARCADORES
ÁCIDOS E HIDROCARBONETOS PRESENTES EM ÓLEOS DA
BACIA POTIGUAR**

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

**ORIENTADOR: PROF^a DR^a LUZIA KOIKE
CO-ORIENTADOR: DR EUGENIO VAZ DOS SANTOS NETO**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR ROSANE ALVES
FONTES E ORIENTADA PELA PROF^a DR^a LUZIA KOIKE.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

F737e Fontes, Rosane Alves (1973-).
Estudo qualitativo e quantitativo de biomarcadores ácidos e hidrocarbonetos presentes em óleos da Bacia Potiguar / Rosane Alves Fontes. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Luzia Koike.
Coorientador: Eugenio Vaz dos Santos Neto.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biomarcadores ácidos. 2. Petróleo. 3. *Orbitrap*.
I. Koike, Luzia. II. Santos Neto, Eugenio Vaz dos.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Qualitative and quantitative study of acidic and hydrocarbon biomarkers of oil from the Potiguar Basin

Palavras-chave em inglês:

Acidic biomarkers

Petroleum

Orbitrap

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Luzia Koike [Orientador]

Luiz Antônio Freitas Trindade

Marco Edílson Freire de Lima

Paulo Mitsuo Imamura

Sebastião Ferreira Fonseca

Data de defesa: 07/12/2011

Programa de pós-graduação: Química

Ouçá meu bom conselho
Que eu te dou de graça
Inútil dormir que a dor uá passa
Espere sentado
Ou você se causa
Está provado, quem espera nunca alcança

Venha, meu amigo
Deixe esse resaca
Briúque com meu fogo
Venha se queimar
Faça como eu digo
Faça como eu faço
Aja duas vezes antes de pensar

Corro atrás do tempo
Viem de uá sei onde
Devagar é que uá se vai Loufe
Eu sou o vento na minha cidade
Vou pra ma e bebo a tempestade.

Bom Conselho
(Chico Buarque, 1972)

Você tem que perguntar às crianças e aos
pássaros qual é o gosto dos morangos”

J. W. Goethe

Dedico este trabalho aos amores da minha vida:

Victor, Arthur e Yuri Garin.

E também aos meus cãezinhos:

Maggie Bell e Floyd Peterson.

AGRADECIMENTOS

Ao meu papai, José Soares Fontes, e à minha mamãe, Maria Helena Alves Fontes, muito obrigada pelo amor, carinho e educação que sempre me deram, e principalmente, pelos valores que norteiam meus caminhos: o da ética e do respeito acima de tudo.

À minha amada irmã, Tina, minha amiga, sempre ao meu lado nos momentos mais felizes e tristes da vida. Meus anjinhos: Gabriel, Lucas e Patita, que moram no meu coração.

Muito obrigada à vovó Zelma e tia Zul, que cuidaram dos meus tesouros, com todo amor e carinho, nas minhas idas e vindas, Galeão-Viracopos x Viracopos-Galeão.

Prof^a Dr^a Luzia Koike, muito obrigada pela orientação para realização deste trabalho, e, sobretudo pela confiança e respeito a mim depositadas.

Ao Dr. Eugenio Vaz dos Santos Neto, pela co-orientação deste trabalho e generosidade pelos inúmeros ensinamentos no nosso convívio diário dentro da Petrobras.

Ao Dr. Luiz Antônio Freitas Trindade, pelo incentivo e apoio irrestritos para execução deste doutorado e, acima de tudo, pelo carinho e respeito com que sempre me tratou durante os anos em que foi o meu gerente; inspira e transpira respeito ao próximo.

À Prof^a Dr^a Rosane Nora Castro, minha orientadora vitalícia e amiga, sempre ao meu lado, com paciência inesgotável me ensinando o bê-á-bá da química orgânica, meu muitíssimo obrigada.

Aos Prof^s Dr^s Marco Edilson Freira Lima, Paulo Imamura e Sebastião Ferreira Fonseca, que aceitaram o convite para participar da banca examinadora deste trabalho e agradeço também ao Prof. Dr. Francisco de Assis Machado Reis e à Prof^a Dr^a Anita Jocelyne Marsaioli que integram o grupo de pesquisas em geoquímica orgânica da UNICAMP, no qual este trabalho também está inserido.

Minha parceira, Dr^a Regina Binotto, tem uma capacidade de trabalho extraordinária, mistura o sal e o doce como poucos sabem fazer, sou muito grata a ti, estamos juntas...

À minha colega de turma do doutorado, “turma de duas”, minha querida amiga Rosana Cardoso Lopes Pereira, sou muito grata por tudo que você tem feito por mim. Você é a minha *Brazilian Idol*, estou as suas ordens.

Taíssa, Juliana e Luciene, que se revelam a cada dia, cada dia mais brilhantes, muito grata pelas assistências geo-químico-psicológicas. É uma honra tê-las como minhas amigas.

Muito obrigada aos amigos do Laboratório de fisiologia orgânica da UFRJ, em especial ao Prof. Dr. João Graciano Mendonça Filho e Dr^a Taís Freitas da Silva pelas discussões e sugestões dadas neste trabalho.

Às minhas amigas do peito: Kate, Nick, Dani, Carminha, Sueli e Mara.

Mr. Willkinson, meu querido amigo e mestre, muito obrigada por tudo.

Dr. Boniek e Dr. Silvino, muitíssimo obrigada pela revisão e ajuda na interpretação dos dados de RMN.

Agradeço muito a todos os funcionários e estagiários do Laboratório de síntese orgânica_Grupo de Geoquímica Orgânica da UNICAMP, que contribuíram efetivamente para o desenvolvimento deste trabalho: Maria Angélica, Rafael Caldato, Luiz Bonato, Paulo César, Luiz Fernando, Luiz Felipe, Nayara Inoue, Aline, Denise e Renan e especialmente a Dr^a Flávia Aioldi que conduziu todos os ensaios no Orbitrap, com grande paciência, atenção e competência, mil beijos a todos da RAF. Agradeço também a presteza e atenção de todos integrantes da secretaria de pós graduação da Unicamp, em especial à Bel, Gabi e Miguel.

Obrigada a todos os integrantes da Gerência de Geoquímica Orgânica do Cenpes, que certamente foram fundamentais para eu atingir esta meta, especialmente ao meu time de primeira categoria: Luciene, Michele Pires, Beth, Verinha e Dudu. Ao atual gerente Mário Duncan Rangel, e meus demais companheiros de luta diária: Helô, Ricardo, Lígia, Sandra Brandão, Michelle Gama, Patrícia, Mazé, Fatinha, Jefferson, Cosme, Orlani, Jussara, Débora, Eraldo, Silvia, Dionísio, Keila, Eduardo, Damaris, Priscila, Beatriz, Veloso, Alexandre Jonas, Gilberto, Rodrigo, Elinete, Amanda, Tiago, Rafael, Túlio, Carbonezi, Jorge, Marcia, Maurílio, Ralph, Cerqueira, Jarbas, Pellon, Dennis, Maria Regina, Carla, Igor, Luiz Felipe, Henrique, Baltazar, Alfredo, entre tantos outros, MUITO OBRIGADA!

À PETROBRAS por permitir que eu cresça profissionalmente e possa compartilhar de novos conhecimentos, contribuindo efetivamente para o sucesso da equipe em que trabalho e da empresa.

SÚMULA CURRICULAR

Rosane Alves Fontes, natural do Rio de Janeiro, concluiu o curso de Engenharia Química na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 1997. Durante a graduação, trabalhou com síntese de compostos organofosforados e síntese de compostos com atividade anti-tumoral, sendo bolsista de iniciação científica do CNPq no Departamento de Química. No final da graduação, foi trabalhar na Assessoria de Pesquisas Fitoquímicas da Indústria Química e Farmacêutica Merck. Durante os cinco anos em que esteve nesta empresa, isolou alguns compostos inéditos com atividade farmacológica (Patentes: WO2005/054222-A2; EP1689734-B1; DE10357004-A1). É Mestre em ciências pela UFRRJ (2001), cuja dissertação foi intitulada “Protonação diastereosseletiva de alquil-aril cetenos na síntese de intermediários para a preparação de piretróides”. Em 2002 ingressou no curso de Químico de Petróleo da Petrobras e desde então atua na área de geoquímica orgânica do Centro de Pesquisas da Empresa (CENPES). Atualmente, coordena o Laboratório de Cromatografia Gasosa da Gerência de Geoquímica, onde desenvolve e acompanha projetos de pesquisa na área de Exploração da Companhia.

RESUMO

ESTUDO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DE BIOMARCADORES ÁCIDOS E HIDROCARBONETOS PRESENTES EM ÓLEOS DA BACIA POTIGUAR

Neste trabalho foram sintetizados quatro biomarcadores ácidos, a saber: ácido 5 β (H) colânico (**2**), 5 α (H) homopregnânico (**4**), 8,13-tetraidrocopálico (**6**) e 15-isocopálico (**7**). Para tanto, foram utilizadas matérias primas comerciais (ácido litocólico e estigmasterol) e o ácido copálico (extraído e purificado a partir de bálsamo de copaíba). Também foi preparado o biomarcador hidrocarboneto 5 β (H) colano (**8**). Estas moléculas foram sintetizadas com o objetivo de serem utilizadas como padrões de referência na quantificação de biomarcadores ácidos e hidrocarbonetos presentes em dois conjuntos de óleos provenientes da Bacia Potiguar. O conjunto I contém cinco óleos de diferentes origens, sendo dois lacustres (**LC-1** e **LC-2**), um marinho evaporítico (**ME**) e dois mistos (**M-1** e **M-2**) e o conjunto II contém quatro óleos de mesma evolução térmica e mesma origem (**ME-a**, **ME-b**, **ME-c** e **ME-d**), todos marinho evaporíticos. O que os distingue são os diferentes níveis de biodegradação. Utilizou-se também o isocopalano (**9**), previamente preparado e cedido pelo Dr. Imamura (2011), na quantificação de biomarcadores terpanos. Os resultados das análises quantitativas dos biomarcadores terpanos e esteranos, quantificados com os padrões de referência **9** e **8**, respectivamente, mostraram que quando se utiliza somente o **8** como padrão referência para quantificação de todos os biomarcadores saturados, a quantidade de hopanos fica subestimada em quase 60% quando comparada a quantificação dos mesmos utilizando-se **9**. No entanto, isto não significa que este seja um padrão mais adequado a quantificação de todos os terpanos. Quanto às análises dos extratos ácidos de petróleo utilizando-se a técnica de espectrometria de massas seqüencial Trap Linear-Quadrupolo/Orbitrap (LTQ-Orbitrap), observou-se que os resultados foram satisfatórios contribuindo com informações qualitativas úteis para distinção de origem e biodegradação quando relacionadas às distribuições dos ácidos carboxílicos, de acordo com o grau de insaturação destas moléculas. Os perfis moleculares encontrados para os extratos ácidos são muito similares aos que se obtinham com os métodos convencionais de análises de ácidos carboxílicos de petróleo, quando convertidos a ésteres metílicos ou reduzidos a hidrocarbonetos e analisados por CG-EM. A principal vantagem da utilização do Orbitrap na análise qualitativa de ácidos carboxílicos está na redução drástica do tempo de análise atrelada à dispensa de reações de derivatização. Contudo, apesar da altíssima resolução de massas (100.000) o Orbitrap não é capaz de distinguir íons moleculares de estereoisômeros, os quais são altamente difundidos entre os biomarcadores de petróleo. Deste modo, no presente trabalho não foi possível realizar as análises quantitativas dos biomarcadores ácidos. Evidentemente, as técnicas convencionais de análise de biomarcadores ácidos, como CG-EM, permanecem altamente relevantes para estudos geoquímicos. Com relação aos estudos realizados de EM² com os padrões de biomarcadores ácidos, sintetizados neste trabalho, foi observado que existe uma correlação direta entre as suas estruturas químicas e os fragmentos gerados a partir da dissociação induzida por colisão dos mesmos. Isto revela o grande potencial desta técnica para obtenção de fragmentos diagnósticos de famílias de biomarcadores ácidos presentes em petróleos a partir da análise direta de extratos ácidos.

ABSTRACT

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDY OF ACIDIC AND HYDROCARBON BIOMARKERS OF OILS FROM THE POTIGUAR BASIN

Four acidic biomarkers were synthesized in this work, namely: 5 β (H) Cholanic acid (**2**), 5 α (H) homopregnanic acid (**4**), 8,13-tetrahydrocopalic acid (**6**) and 15-isocopalic acid (**7**). For this purpose, were used commercial raw materials (lithocolic acid and stigmasterol) and copalic acid (extracted and purified from copaiba balsam). It was also assembled a hydrocarbon biomarker 5 β (H) Colane (**8**). These molecules were synthesized in order to be used as reference standards in the quantification of acids and hydrocarbons biomarkers present in two sets of oils from the Potiguar Basin. The set I contains five oils from different sources, two lacustrine (**LC-1** and **LC-2**), a marine evaporitic (**ME**) and two mixed (**M-1** and **M-2**) and set II contains four oils from the same source (**ME-a**, **ME-b**, **ME-c** and **ME-d**), all marine evaporitic and the same thermal evolution. What distinguishes them are the biodegradation levels. We also used the isocopalane (**9**), previously prepared and given by Imamura (2011) in the quantification of terpanes biomarkers. The results of quantitative analysis of terpanes and steranes biomarkers, quantified with reference standards **9** and **8**, respectively, showed that when using only the **8** as the reference standard for quantification of all saturated biomarkers, the amount of hopanes is underestimated by almost 60 % when compared to quantification using **9**. However, this does not mean that it is a more appropriate standard to quantify all terpanes. Concerning acidic biomarkers analysis using sequential mass spectrometry Linear-Quadrupole/Orbitrap (LTQ-Orbitrap) the results were satisfactory, contributing with qualitative useful information for distinction of origin and the of biodegradation levels. Results are very similar to that obtained with conventional methods of analysis of carboxylic acids from oil, when converted to methyl esters, or reduced to hydrocarbons and analyzed by GC-MS. The main advantage of using the Orbitrap, in the qualitative analysis of acids biomarkers, is the drastic reduction in the time consumed of analysis linked to absence of derivatization reactions. However, despite the very high mass resolution (100,000), Orbitrap is not able to distinguish molecular stereoisomers, which are highly disseminated among the biomarkers of oil. Thus, it was impossible to carry out the quantitative analysis of acidic biomarkers. Of course, conventional techniques of analyses of acidic biomarkers, such as GC-MS, remain highly relevant to geochemical studies. With regard to studies of MS² with standard acidic biomarkers, synthesized in this work, the results showed that there is a direct correlation between their chemical structures and fragments generated from the collision induced dissociation. This shows the great potential of this technique to obtain diagnostic fragments of biomarker families present in oils from the direct analysis of acidic extracts.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxv
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MOTIVAÇÃO	1
1.2. OBJETIVOS	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. GEOQUÍMICA ORGÂNICA DO PETRÓLEO.....	10
2.1.1. <i>Tipos de Matéria Orgânica.....</i>	12
2.1.2. <i>Classificação do querogênio</i>	14
2.1.3. <i>Estágios de Evolução da Matéria Orgânica</i>	15
2.1.4. <i>Condições básicas para formação de um sistema petrolífero.....</i>	17
2.2. ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EM PETRÓLEO	19
2.2.1. <i>Ácidos n-alcanóicos</i>	26
2.2.2. <i>Ácidos isoprenóides acíclicos</i>	28
2.2.3. <i>Ácidos terpanóicos tricíclicos e pentacíclicos.....</i>	30
2.2.4. <i>Ácidos esteranóicos</i>	35
2.2.5. <i>Métodos de Análise de Ácidos Graxos.....</i>	36
2.3. ORBITRAP: TÉCNICA E APLICAÇÕES.....	39
2.4. ASPECTOS GEOLÓGICOS DA BACIA POTIGUAR E SELEÇÃO DE AMOSTRAS	46
2.4.1. <i>Características moleculares dos óleos da Bacia Potiguar.....</i>	49
2.4.1.1. <i>Óleos Gerados pela Formação Pendência.....</i>	49
2.4.1.2. <i>Óleos Gerados pela Formação Alagamar</i>	50
2.4.1.3. <i>Óleos Mistos.....</i>	50
3. PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1. PROTOCOLO ANALÍTICO.....	52
3.2. ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO (δ_{13C}).....	55
3.3. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À DETECÇÃO POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG-DIC).....	57
3.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE MÉDIA PRESSÃO (CLMP)	58
3.5. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	59
3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO ÁCIDO	61
3.7. <i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	63
3.8. ORBITRAP.....	65
3.8.1. <i>Condições de trabalho para análise dos extratos ácidos no Orbitrap ..</i>	66
3.8.2. <i>Experimentos EM-EM com padrões biomarcadores ácidos 2, 4, 6 e 7</i>	66
3.9. SÍNTESE DE BIOMARCADORES ÁCIDOS E HIDROCARBONETO.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1. SÍNTESE DE BIOMARCADORES ÁCIDOS E HIDROCARBONETO.....	68
4.1.1. <i>Obtenção do ácido 5β(H)colânico (2) e 5β(H) colano (8)</i>	68
4.1.2. <i>Obtenção do ácido 5α(H) homopregnânico (4)</i>	71
4.1.3. <i>Obtenção dos ácidos 8,13-tetraidrocopálico (6) e 15-isocopálico (7)...</i>	73

4.2. CARACTERIZAÇÃO GEOQUÍMICA DOS ÓLEOS ESTUDADOS	75
4.3. ANÁLISE QUANTITATIVA DE BIOMARCADORES SATURADOS: UTILIZAÇÃO DO ISOCOPALANO (9) COMO PADRÃO DE REFERÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE TERPANOS	89
4.3.1. Cálculo da recuperação dos padrões isocopalano (9) e 5 β (H) colano (8)	90
4.3.2. Comparação entre fatores de resposta do isocopalano, 5 β (H) colano, hopano (H ₃₀) e D4-colestano.....	98
4.3.3. Comparação da quantificação dos hopanos com isocopalano e 5 β (H) colano e impacto na razão entre as concentrações HOPANOS/ESTERANOS	101
4.4. CARACTERIZAÇÃO GEOQUÍMICA DOS EXTRATOS ÁCIDOS DOS ÓLEOS ESTUDADOS	103
4.4.1. Obtenção dos extratos ácidos.....	103
4.4.2. Análise dos ésteres metílicos por CG-EM (Conjunto II)	105
4.4.3. Orbitrap: Aplicação em extratos ácidos de petróleo.....	107
4.5. ESTUDO DA FRAGMENTAÇÃO DE PADRÕES DE BIOMARCADORES ÁCIDOS UTILIZANDO LTQ-ORBITRAP	131
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	145
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
ANEXO I.....	159
I.1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO LITOCÓLICO (1-B).....	161
I.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO 3-CETO LITOCÓLICO (1-B).....	167
I.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO 5 β (H) COLÂNICO (1-C).....	173
I.4. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO 5 β (H) COLÂNICO (2)	179
I.5. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO 5 β (H) COLANOL (1-D)	185
I.6. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO 5 β (H) COLANO TOSIL (1-E).....	190
I.7. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO 5 β (H) COLANO (8).....	195
ANEXO II.....	201
II-1. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 3-CETO-4,22 DIENESTIGMASTENONA (3-A)	202
II.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 3-CETO-22 ESTIGMASTENONA (3-B)	207
II.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ÁCIDO-3-CETO-5A(H) HOMOPREGNÂNICO (3-C)	214
II.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO 3-CETO-5 α (H) HOMOPREGNÂNICO (3-D)	215
II.4. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INTERMEDIÁRIO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO-5 α (H)HOMOPREGNÂNICO (3-E)	221
II.5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÁCIDO 5 α (H) HOMOPREGNÂNICO (4).....	226
ANEXO III.....	231
III.1. ESTERIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ÁCIDA DO ÓLEO DE COPAÍBA	232

III.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÉSTER METÍLICO DO ÁCIDO COPÁLICO (5-A)	233
III.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO 12-ISOCOPALEN-15-OATO DE METILA (5-B)	239
III.4. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE 15-ISOCOPALANOATO DE METILA (5-C) ..	245
III.5. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 15-ISOCOPÁLICO (7) ..	251
III.6. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 8,13-TETRAIDROCOPÁLICO (6) ..	251
ANEXO IV ..	252
ANEXO V ..	271
ANEXO VI ..	290
ANEXO VII ..	300

LISTA DE ABREVIATURAS

AE-EMRI – análise elementar acoplada à espectrometria de massas para medição de razão isotópica

APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) – ionização química à pressão atmosférica

° API (*American Petroleum Institute*) – escala hidrométrica para medir a densidade relativa de líquidos

ARO – hidrocarbonetos aromáticos

ASTM (*American Society for Testing and Materials*) – Sociedade americana que desenvolve e publica normas técnicas para uma ampla gama de materiais, produtos, sistemas e serviços

CAD (*collisionally activated dissociation*) – dissociação ativada por colisão

CCDA – cromatografia em camada delgada analítica

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CG – cromatografia em fase gasosa

CG-DIC – cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama

CGxCG/TDV-EM – cromatografia em fase gasosa bi-dimensional acoplada a espectrometria de massas - tempo de voo

CG-EM – cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

CI (*chemical ionization*) – ionização química

CID (*collision-induced dissociation*) – dissociação induzida por colisão

CL – cromatografia líquida

CLMP – cromatografia líquida de média pressão

DBE (*double bond equivalent*) – número equivalente de insaturações

DEPT (*distortionless enhanced polarization transfer*) – incremento sem distorção por transferência de polarização

Dwell-time (tempo de permanência) – tempo gasto na mesma posição, área ou estágio de um processo

EM = MS – espectrometria de massas

EM² = EM-EM = MSⁿ = MS-MS – espectrometria de massas sequencial

ESI (*electrospray ionization*) – ionização por *electrospray*

FAME (*Fatty Acids Methyl Ester*) – ésteres metílicos de ácidos carboxílicos

FT (*Fourier transform*) - Transformada de Fourier

FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) – ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier

HAs – ácidos hopanóicos

H/C - razão atômica de hidrogênio/carbono

HCD (*High Collision Dissociation*) – dissociação de alta colisão
IE – ionização por elétrons
IPC – índice de Preferência de Carbono
IR – índice de refração
IS (*Internal standard*) – padrão interno
IV – espectroscopia no infravermelho
LTQ - Orbitrap (Linear íon trap-Quadrupole – orbitrap) - armadilha de íons quadrupolo linear – armadilha de íons *Orbitrap*
MSI – monitoramento seletivo de íons
 m/z – relação massa-sobre-carga
NSO – compostos contendo heteroátomos como nitrogênio, enxofre e oxigênio, usualmente denominados resinas e asfaltenos ou compostos polares
O/C - razão atômica de oxigênio/carbono
pA – pico ampere
PCC – Clorocromato de piridínio
PMI (Peters & Moldowan *Indice*) – índice de biodegradação de Peters & Moldowan
ppm – partes por milhão
RMN ^{13}C - ressonância magnética nuclear do carbono 13
RMN ^1H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio
Ro % - reflectância vitrinita
SAT – hidrocarbonetos saturados
SPE (*solid phase extraction*) – extração em fase sólida
TAN (*Total Acid Number*) – quantidade de ácidos totais
TDV – analisador de massas por tempo de voo
UCM (*Unresolved Complex Mixture*) – mistura complexa não resolvida
UV – radiação ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e Desvantagens do espectrômetro de massas Orbitrap.....	41
Tabela 2: Programação de temperatura do forno do CG-DIC	57
Tabela 3: Programação de temperatura do forno do CG-EM para análise dos biomarcadores hidrocarbonetos.....	59
Tabela 4: Íons monitorados para análise de biomarcadores hidrocarbonetos.....	60
Tabela 5: Programação de temperatura do forno do CG-EM para análise dos biomarcadores ácidos convertidos a ésteres metílicos	60
Tabela 6: Íons monitorados para análise de biomarcadores ácidos convertidos a ésteres metílicos	60
Tabela 7: Massa de óleo utilizada para obtenção do extrato ácido.	61
Tabela 8: Massa de extrato ácido utilizada para obtenção de fração ácida purificada utilizando-se SPE.....	64
Tabela 9: Porcentagem em massa das frações de hidrocarbonetos saturados (SAT), hidrocarbonetos aromáticos (ARO) e compostos polares (NSO) dos nove óleos estudados (análises feitas utilizando-se CLMP em triplicata).....	77
Tabela 10: Algumas das razões de biomarcadores hidrocarbonetos obtidas através da análise qualitativa das frações de hidrocarbonetos saturados utilizando CG-EM (MSI).....	84
Tabela 11: Resultados do ensaio de recuperação do padrão isocopalano.....	93
Tabela 12: Resultados do ensaio de recuperação do padrão 5 β (H) colano.....	95
Tabela 13: Comparação entre a razão de biomarcadores hopanos/esteranos calculada a partir das massas obtidas com dois padrões.....	102
Tabela 14: Recuperação percentual de extrato ácido utilizando sílica gel/KOH.	104
Tabela 15: Resultados da limpeza da fração de ácidos por SPE.....	104
Tabela 16: Resultados limpeza dos ésteres metílicos utilizando-se CDDP.....	105
Tabela 17: Razão A/C e %API dos óleos do conjunto II.....	122
Tabela 18: Íons pesquisados no Orbitrap e moléculas neutras correspondentes (terpanos)-LC-1.	124
Tabela 19: Íons pesquisados no Orbitrap e moléculas neutras correspondentes (esteranos)-LC-1.	126
Tabela 20: Resultados da pesquisa da massa exata de alguns biomarcadores, com seus respectivos erros de exatidão de massa em ppm.....	127
Tabela 1-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (1-a) obtidos neste trabalho comparados aos dados da literatura de atribuição de RMN ^{13}C para ácido litocólico (1) (Waterhous <i>et al.</i> , 1985).....	162
Tabela 2-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 3-ceto litocólico (1-b).....	168
Tabela 3-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 5 β (H) colânico (1-c).....	174
Tabela 4-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 5 β (H) colânico (2).....	180

Tabela 5-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colanol (1-d).....	186
Tabela 6-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano tosil (1-e).....	191
Tabela 7-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano (8).....	196
Tabela 8-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-4,22 dienestigmastenona (3-a).....	203
Tabela 9-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b).....	209
Tabela 10-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto- 5α (H) homopregnânico (3-d).....	216
Tabela 11-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido $5\alpha(\text{H})$ homopregnânico (3-e).....	222
Tabela 12-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido $5\alpha(\text{H})$ homopregnânico (4).....	227
Tabela 13-III: Resultados referentes às extrações de 5-a das placas preparativas.....	233
Tabela 14-III: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (5-a).....	234
Tabela 15-III: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopaleno-15-oato de metila (5-b).....	240
Tabela 16-III: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 15-isocopalanoato de metila (5-c).....	246

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substratos que foram utilizados e moléculas sintetizadas neste trabalho.....	3
Figura 2: Principais fragmentos de esteranos (10), hopanos (11), terpanos tricíclicos (12) e gamacerano (13).	4
Figura 3: Diagramas Van Krevelen (razões atômicas H/C <i>versus</i> O/C), (a) Diferença composicional entre os grupos de macerais do querogênio, e (b) Tipos de querogênio, I, II e III. (Modificado de Tissot & Welte, 1984)	15
Figura 4: Esquema geral para geração de hidrocarbonetos em função da profundidade e da temperatura. As escalas de temperatura e profundidade assumem um gradiente geotérmico de 40°C por km. (Modificado de Tissot & Welte, 1984).	16
Figura 5: Correlação entre valores de TAN e razão entre ácidos alifáticos acíclicos/cíclicos (Extraído e modificado de Fafet <i>et al.</i> , 2008).....	21
Figura 6: (A) Grau de biodegradação (escala de Peters e Moldowan, 1993) vs. TAN; (B) Grau de biodegradação (escala de Peters e Moldowan, 1993) vs. concentração de ácidos carboxílicos (µg/g óleo) excluindo misturas de óleos. (Extraído de Meredith <i>et al.</i> , 2000). Amostras de óleos <i>offshore</i> de UK, Itália e Califórnia.	22
Figura 7: Cromatograma de massas do íon <i>m/z</i> 191 para ácidos terpanóicos (como metil ésteres) de um óleo E e F. A série homóloga dos ácidos tricíclicos estão indicados como C ₂₀ , C ₂₁ , C ₂₄ , C ₂₆ S e R. I.S.=padrão interno; HAs=ácidos hopanóicos (Extraído de Jaffé e Gallardo, 1993).....	25
Figura 8: Estruturas dos ácidos palmítico (14) e esteárico (15).....	27
Figura 9: Estruturas dos ácidos pristanóico (16) e fitanóico (17).....	29
Figura 10: Isoprenóides acíclicos.	29
Figura 11: Estruturas de um ácido carboxílico tricíclico tipo queilantano (C ₂₆) (18)	30
Figura 12: Estrutura do ácido hopanóico (17β(H), 21β(H), 22R-C ₃₂) (19).....	31
Figura 13: Estruturas dos ácidos C ₃₂ hopanóicos β,α-R (20), α,β-R (21) e α,β-S (22).	32
Figura 14: Estrutura da família de ácidos identificados por Pan e Philp, 2006. (13,21-secohopanóicos (23); 25-norhopanóicos (24) e 28-norhopanóicos (25).....	34
Figura 15: Estruturas de ácidos esteranóicos 5α-pregnano-20-carboxílico (26) e 5α-colânico-C ₃₄ (27).....	35
Figura 16: Diagrama esquemático do LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific).....	40
Figura 17: Esquema tridimensional da célula Orbitrap (Extraído de Pomerantz <i>et al.</i> , 2011)	41
Figura 18: Distribuição das classes medidas por FT-ICR e Orbitrap (Pomerantz <i>et al.</i> , 2011)	43
Figura 19: Distribuição das DBE para as espécies C _c H _h O ₂ medidas por FT-ICR e Orbitrap (Pomerantz <i>et al.</i> , 2011).....	43

Figura 20: Distribuição das DBE para as espécies $C_cH_hO_2$ medidas por ESI (-) LTQ XL Orbitrap das frações ácidas dos petróleos P1, P2, P3, P4 e P5 (Modificado de Angolini <i>et al.</i> , 2011).....	45
Figura 21: Carta Estratigráfica da Bacia Potiguar (Extraída de Pessoa Neto <i>et al.</i> , 2007).....	47
Figura 22: Mapa de localização das amostras de óleos (Conjuntos I e II) selecionadas para o estudo (Bacia Potiguar) (Modificado de Santos Neto <i>et al.</i> , 1990).....	48
Figura 23: Técnicas analíticas empregadas na realização deste trabalho	54
Figura 24: Coluna cromatográfica/sistema de extração contínua para obtenção da fração ácida dos petróleos	62
Figura 25: Fluxograma da metodologia desenvolvida para limpeza da fração ácida usando SPE.....	63
Figura 26: Diagrama ternário das frações de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos polares (NSO) dos dois conjuntos de óleos estudados (valores médios retirados da Tabela 9).....	76
Figura 27: Cromatogramas dos óleos totais (CG-DIC). Os eixos x e y são respectivamente: tempo de análise, em minutos, na faixa entre 5-120 min e abundância relativa, em pico ampere (pA), na faixa entre 0-300 pA. Estes cromatogramas encontram-se ampliados no ANEXO IV.....	78
Figura 28: Principais efeitos observados em óleos tipicamente maduros com diferentes níveis de biodegradação (Extraído e modificado de Peters & Moldowan, 1993).....	80
Figura 29: Classificação dos óleos do conjunto II quanto aos diferentes níveis de biodegradação, segundo índice PMI.	81
Figura 30: Análise $\delta_{13}C$ do óleo original e das frações de ácidos carboxílicos e residual ao processo de extração dos ácidos.....	82
Figura 31: Gráficos relacionando parâmetros geoquímicos moleculares utilizados para avaliação de origem.	85
Figura 32: Gráficos utilizando parâmetros geoquímicos moleculares relacionados ao grau de evolução térmica dos óleos estudados.....	86
Figura 33: Gráfico utilizando parâmetros geoquímicos relacionados à biodegradação.....	86
Figura 34: Cromatogramas de íons das frações de hidrocarbonetos saturados dos óleos estudados no m/z 191. Os eixos x e y são respectivamente: tempo de análise, em minutos, na faixa entre 20-120 min e abundância relativa na faixa entre 0-400 pA. Estes cromatogramas de íons encontram-se ampliados no ANEXO IV.	87
Figura 35: Cromatogramas de íons das frações de hidrocarbonetos saturados dos óleos estudados no m/z 217. Os eixos x e y são respectivamente: tempo de análise, em minutos, na faixa entre 20-120 min e abundância relativa na faixa entre 0-400 pA. Estes cromatogramas de íons encontram-se ampliados no ANEXO IV.	88
Figura 36: Curva analítica para o padrão isocopalano, com sua respectiva equação e coeficiente de determinação (r^2).....	91

Figura 37: Curva analítica para o padrão 5 β (H) colano, com sua respectiva equação e coeficiente de determinação (r^2).....	94
Figura 38: Recuperação dos padrões isocopalano e 5 β (H) colano.	96
Figura 39: Cromatogramas de íons de uma das amostras de hidrocarbonetos saturados analisadas no CG-EM para visualização dos tempos de retenção dos padrões internos (isocopalano e 5 β (H) colano) adicionados aos óleos antes da separação cromatográfica no CLMP.	97
Figura 40: Razões entre as áreas do D4colestano/C ₃₀ hopano, 5 β (H) colano/C ₃₀ hopano e isocopalano/C ₃₀ hopano.....	99
Figura 41: Cromatograma de íons totais da mistura de padrões.	99
Figura 42: Espectros APCI (-) dos extratos ácidos conjunto I (Orbitrap).	107
Figura 43: Espectros APCI (-) dos extratos ácidos conjunto II (Orbitrap).	108
Figura 44: A) Espectro APCI (-) de extrato ácido de petróleo (Extraído de Mohammed & Sorbie, 2009) e B) Espectro ESI (-) de extrato ácido do óleo Maya (Extraído de Rudzinski <i>et al.</i> , 2002).....	109
Figura 45: Percentual da classe O2 nos extratos ácidos purificados dos óleos lacustres (LC-1 e LC-2), óleo misto (M-1) e óleos marinho evaporíticos (ME, ME-a, ME-b, ME-c e ME-d).....	111
Figura 46: Percentual da classe O2 x DBE nos extratos ácidos purificados dos óleos lacustres (LC-1 e LC-2).....	112
Figura 47: a) Espectros de APCI (-) dos extratos ácidos de LC-1 e LC-2; b) CGDIC do óleo total de LC-1 e LC-2.....	113
Figura 48: Resultados das análises CG-EM (m/z 74) de extratos ácidos de petróleos da Bacia Potiguar convertidos a ésteres metílicos. A: óleo lacustre água doce; E: óleo misto (Extraído de Silva, 2008).....	114
Figura 49: Percentual da classe O2 x DBE no extrato ácido purificado do óleo misto (M-1).....	115
Figura 50: Percentual da classe O2 x DBE nos extratos ácidos purificados dos óleos marinho evaporíticos (ME, ME-a, ME-b, ME-c e ME-d).	116
Figura 51: Histograma dos ácidos carboxílicos acíclicos (DBE=1,5, classe O2) extraídos dos espectros APCI (-) dos extratos ácidos dos óleos do conjunto II e cromatograma de íons dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos carboxílicos dos óleos do conjunto II (CG-EM, m/z 74).	117
Figura 52: Resultados das análises CG-EM de extratos ácidos de petróleos da Bacia Potiguar reduzidos a hidrocarbonetos (A) (Extraído de Fafet <i>et al.</i> , 2010) e extratos ácidos de petróleos marinho evaporíticos da Bacia Potiguar convertidos a ésteres metílicos (B) (Extraído de Silva, 2008).	118
Figura 53: Percentual da classe O2 x DBE no extrato ácido purificado do óleo misto (M-1).....	119
Figura 54: Correlação entre DBE1,5+2,5 <i>versus</i> DBE5,5+6,5 para os extratos ácidos LC-1,M-1 e ME.	120
Figura 55: a) Razão A/C x PMI e b) TAN x Razão A/C x °API (Petróleos analisados em ESI(-) FT-ICR) (Extraído de Kim <i>et al.</i> , 2005).	121
Figura 56: Razão A/C das amostras do conjunto II.	122
Figura 57: Expansão de parte do cromatograma de íons (m/z 191) da fração hidrocarbonetos saturados da amostra LC-1.....	124

Figura 58: Expansão de parte do cromatograma de íons (m/z 217) da fração de hidrocarbonetos saturados da amostra LC-1.....	125
Figura 59: Distribuição dos ácidos carboxílicos pentacíclicos pesquisados nas amostras do conjunto I.....	128
Figura 60: Distribuição dos ácidos carboxílicos tetracíclicos pesquisados nas amostras do conjunto I.....	129
Figura 61: Distribuição dos ácidos carboxílicos pentacíclicos e tetracíclicos pesquisados nas amostras do conjunto II.	129
Figura 62: Ácidos pentacíclico/tetracíclicos (Orbitrap) <i>versus</i> hopanos/esteranos (CG-EM).	130
Figura 63: Espectro APCI (-) dos padrões de biomarcadores ácidos 6, 7, 4 e 2.....	131
Figura 64: Mecanismos para formação dos íons m/z 191 e 217 a partir da ionização de moléculas com esqueleto básico dos hopanos e esteranos, respectivamente, via CG-EM (IE).	132
Figura 65: a) Representação de algumas das moléculas analisadas; b) Resultado de ESI(-) EM-EM do ácido 5 β colânico (Extraído de Rudzinski <i>et al.</i> , 2002).	134
Figura 66: Espectros APCI (-) EM-EM dos padrões estudados.	136
Figura 67: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão 2.....	137
Figura 68: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão 4.....	139
Figura 69: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão 6.....	141
Figura 70: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão 7.....	142
Figura 1-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido litocólico (1-a).	163
Figura 2-I: Espectro de massas do éster metílico do ácido litocólico (1-a).....	163
Figura 3-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do éster metílico do ácido litocólico (1-a).	164
Figura 4-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (1-a).	164
Figura 5-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (1-a) ampliado na faixa entre 10 e 75 ppm.	165
Figura 6-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (1-a).	165
Figura 7-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (1-a).	166
Figura 8-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b).....	169
Figura 9-I: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b)	169
Figura 10-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b).....	170
Figura 11-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b).	170
Figura 12-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.	171
Figura 13-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b).	171

Figura 14-I: Espectro de RMN ¹³ C, DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl ₃) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b).	172
Figura 15-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c).	175
Figura 16-I: Espectro de massas do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c).	175
Figura 17-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c).	176
Figura 18-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c).	176
Figura 19-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.	177
Figura 20-I: Espectro de RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c).	177
Figura 21-I: Espectro de RMN ¹³ C, DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl ₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (1-c).	178
Figura 22-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do ácido 5β(H) colânico (2).	181
Figura 23-I: Espectro de massas do ânion correspondente ao ácido 5β(H) colânico (2) obtido por infusão direta no APCI (-) e detecção no Orbitrap na faixa de m/z entre 95 e 700 com resolução de 100.000.	181
Figura 24-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do ácido 5β(H) colânico (2).	182
Figura 25-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do ácido 5β(H) colânico (2) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.	182
Figura 26-I: Espectro de RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) do ácido 5β(H) colânico (2).	183
Figura 27-I: Espectro de RMN ¹³ C, DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl ₃) do ácido 5β(H) colânico (2).	184
Figura 28-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do 5β(H) colanol (1-d).	187
Figura 29-I: Espectro de RMN ¹³ C (64,5 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colanol (1-d).	187
Figura 30-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colanol (1-d) ampliado na faixa entre 8 e 66 ppm.	188
Figura 31-I: Espectro de RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colanol (1-d).	188
Figura 32-I: Espectro de RMN ¹³ C, DEPT 135 e 90 (64,5 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colanol (1-d).	189
Figura 33-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do 5β(H) colano tosil (1-e).	192
Figura 34-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colano tosil (1-e).	192
Figura 35-I: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colano tosil (1-e) ampliado na faixa entre 4 e 75 ppm.	193
Figura 36-I: Espectro de RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) do 5β(H) colano tosil (1-e).	193

Figura 37-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do 5 β (H) colano tosil (1-e).....	194
Figura 38-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do 5 β (H) colano (8)..	197
Figura 39-I: Espectro de massas do éster metílico do 5 β (H) colano (8).....	197
Figura 40-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do 5 β (H) colano (8).	198
Figura 41-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 5 β (H) colano (8).	198
Figura 42-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 5 β (H) colano (8) ampliado na faixa entre 10 e 55 ppm.	199
Figura 43-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 5 β (H) colano (8).....	199
Figura 44-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do 5 β (H) colano (8).	200
Figura 45-II: Cromatograma total de íons da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (3-a).	204
Figura 46-II: Espectro de massas da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (3-a)....	204
Figura 47-II: Espectro de absorção na região do Infravermelho da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (3-a).	205
Figura 48-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-4,22-dienestigmastenona (3-a).....	205
Figura 49-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-4,22-dienestigmastenona (3-a) ampliado na faixa entre 0 e 80 ppm.	206
Figura 50-II: Cromatograma total de íons do éster metílico da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b).	210
Figura 51-II: Espectro de massas de íons da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b)...	210
Figura 52-II: Espectro de absorção na região do Infravermelho da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b).	241
Figura 53-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b).	211
Figura 54-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b) apliado na faixa entre 10 e 60 ppm.	212
Figura 55-II: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b).....	212
Figura 56-II: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (3-b).	213
Figura 57-II: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d).	217
Figura 58-II: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d).	217
Figura 59-II: Espectro de absorção na região do infravermelho do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d).	248
Figura 60-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d).....	218
Figura 61-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d) ampliado na faixa entre 4 e 60 ppm.....	219
Figura 62-II: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d)	219

Figura 63-II: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d)	220
Figura 64-II: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (3-e).	223
Figura 65-II: Espectro de massas do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (3-e).	223
Figura 66-II: Espectro de absorção na região do infravermelho do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (3-e).	224
Figura 67-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (3-e).....	224
Figura 68-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (3-e) ampliado na faixa entre 10 e 58 ppm.....	225
Figura 69-II: Espectro de absorção na região do infravermelho do ácido 5 α (H) homopregnânico (4).	228
Figura 70-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido 5 α (H) homopregnânico (4).	228
Figura 71-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido 5 α (H) homopregnânico (4) ampliado na faixa entre 10 e 58 ppm.	229
Figura 72-II: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 5 α (H) homopregnânico (4)	229
Figura 73-II: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido 5 α (H) homopregnânico (4)	230
Figura 74-III: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido copálico (5-a).	235
Figura 75-III: Espectro de massas do éster metílico do ácido copálico (5-a).....	235
Figura 76-III: Espectro de absorção na região do infravermelho do éster metílico do ácido copálico (5-a).	236
Figura 77-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (5-a).....	236
Figura 78-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (5-a) ampliado na faixa entre 15 e 70 ppm.....	237
Figura 79-III: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (5-a).....	237
Figura 80-III: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (5-a).....	238
Figura 81-III: Cromatograma total de íons do 12-isocopalen-15-oato de metila (5-b).	241
Figura 82-III: Espectro de massas do 12-isocopalen-15-oato de metila (5-b).....	241
Figura 83-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopalen-15-oato de metila (5-b).	242
Figura 84-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopalen-15-oato de metila (5-b) ampliado na faixa entre 8 e 65 ppm.	242
Figura 85-III: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do 12-isocopalen-15-oato de metila (5-b).	243
Figura 86-III: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopalen-15-oato de metila (5-b).....	244

Figura 87-III: Cromatograma total de íons do 15-isocopalanoato de metila (5-c).	247
Figura 88-III: Espectro de massas do 15-isocopalanoato de metila (5-c).	247
Figura 89-III: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do 15-isocopalanoato de metila (5-c).	248
Figura 90-III: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do 15-isocopalanoato de metila (5-c) ampliado na faixa entre 10 e 70 ppm.	248
Figura 91-III: Espectro de RMN ¹ H (250 MHz, CDCl ₃) do 15-isocopalanoato de metila (5-c).	249
Figura 92-III: Espectro de RMN ¹³ C (62,5 MHz, CDCl ₃) do 15-isocopalanoato de metila (5-c).	250
Figura 93-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra LC-1.	253
Figura 94-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total LC-1.	254
Figura 95-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra LC-2.	255
Figura 96-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total LC-2.	256
Figura 97-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra M-1.	257
Figura 98-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total M-1.	258
Figura 99-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra M-2.	259
Figura 100-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total M-2.	260
Figura 101-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra ME.	261
Figura 102-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total ME.	262
Figura 103-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra ME-a.	263
Figura 104-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total ME-a.	264
Figura 105-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra ME-b.	265
Figura 106-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total ME-b.	266
Figura 107-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra ME-c.	267
Figura 108-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total ME-c.	268
Figura 109-IV: Cromatogramas de íons de <i>m/z</i> 191 (terpanos) e <i>m/z</i> 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra ME-d.	269
Figura 110-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total ME-d.	270
Figura 111-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra LC-1.	272
Figura 112-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra LC-1.	273
Figura 113-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra LC-2.	274
Figura 114-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra LC-2.	275
Figura 115-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME.	276
Figura 116-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME.	277
Figura 117-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra M-1.	278
Figura 118-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra M-1.	279
Figura 119-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra M-2.	280

Figura 120-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra M-2.	281
Figura 121-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME-a.	282
Figura 122-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME-a.	283
Figura 123-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME-b.	284
Figura 124-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME-b.	285
Figura 125-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME-c.	286
Figura 126-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME-c.	287
Figura 127-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME-d.	288
Figura 128-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME-d.	289
Figura 129-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida bruta do óleo ME-a.	291
Figura 130-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-a.	291
Figura 131-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida bruta do óleo ME-b.	292
Figura 132-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-b.	292
Figura 133-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo ME-c.	293
Figura 134-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-c.	293
Figura 135-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo ME-d.	294
Figura 136-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-d.	294
Figura 137-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo LC-1.	295
Figura 138-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo LC-1.	295
Figura 139-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo LC-2.	296
Figura 140-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo LC-2.	296
Figura 141-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo ME.	297
Figura 142-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME.	297
Figura 143-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo M-1.	298
Figura 144-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo M-1.	298
Figura 145-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo M-2.	299
Figura 146-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo M-2.	299
Figura 147-VII: Alguns Cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo MEa (CG-EM, $m/z= 74, 177, 191$ e 217).	301

Figura 148-VII: Alguns cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo MEB (CG-EM, $m/z= 74, 177, 191$ e 217).	302
Figura 149-VII: Alguns cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo MEC (CG-EM, $m/z= 74, 177, 191$ e 217).....	303
Figura 150-VII: Alguns cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo MED (CG-EM, $m/z= 74, 191$ e 217).	304

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota sintética para preparação do ácido 5 β (H) colânico (2) e o hidrocarboneto 5 β (H) colano (8).....	70
Esquema 2: Rota sintética para preparação do ácido 5 α (H) homopregnânico (4).	72
Esquema 3: Rota sintética para preparação do ácido 8,13-tetraidrocopálico (6) e ácido 15-isocopálico (7).	74
Esquema 4: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de 2).	138
Esquema 5: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de 4).	140
Esquema 6: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de 6).	141
Esquema 7: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de 7).	143
Esquema 1-I: Preparação do éster metílico do ácido litocólico (1-a).....	161
Esquema 2-I: Preparação do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (1-b).....	167
Esquema 3-I: Preparação do éster metílico do ácido 5 β (H) colânico (1-c).....	173
Esquema 4-I: Preparação do ácido 5 β (H) colânico (2).....	179
Esquema 5-I: Preparação do 5 β (H) colanol (1-d).....	185
Esquema 6-I: Preparação do 5 β (H) colano tosil (1-e).	190
Esquema 7-I: Preparação do 5 β (H) colano (8).....	195
Esquema 8-II: Preparação da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (3-a).....	202
Esquema 9-II: Preparação do 3-ceto-22-estigmastenona (3b).....	207
Esquema 10-II: Preparação do ácido-3-ceto-5 α (H)homopregnânico (3-c).....	214
Esquema 11-II: Preparação do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d).	215
Esquema 12-II: Preparação do éster metílico do ácido-5 α (H)homopregnânico (3-e).	221
Esquema 13-II: Preparação do ácido-5 α (H)homopregnânico (4).....	226
Esquema 14-III: Esterificação da fração ácida do óleo de copaíba para obtenção do éster metílico do ácido copálico (5-a).....	232
Esquema 15-III: Preparação do 12-isocopaleno-15-oato de metila (5-b).....	239
Esquema 16-III: Preparação do 15-isocopalanoato de metila (5-c).....	245
Esquema 17-III: Preparação do ácido 15-isocopálico (7).....	251
Esquema 18-III: Preparação do ácido tetraidrocopálico (6).	251

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão apresentadas a motivação e os objetivos gerais e específicos no que concerne este trabalho de tese.

1.1. Motivação

A Geoquímica Orgânica se baseia num conjunto de métodos que engloba as ciências geológicas, químicas e biológicas, para estudos de rochas geradoras de petróleo e gás. Os principais questionamentos da Geoquímica Orgânica estão associados aos seguintes processos: origem (acumulação), preservação e maturação de matéria orgânica; geração, migração e acumulação de petróleos, além de alterações secundárias, com destaque aos processos de biodegradação. Seus conceitos também são usados para solução de problemas ambientais tais como: identificação de derrames e exsudações de óleo e contaminação de aquíferos (Tissot & Welte, 1984; Killips & Killips, 2005, Gaines *et al.*, 2009).

Existem inúmeros parâmetros e informações geoquímicas que são de extrema relevância no entendimento dos processos citados acima, tais como caracterização de fácies orgânicas, maturação da matéria orgânica presente em rochas geradoras, como, por exemplo: refletância de vitrinita ($R_o\%$); razão isotópica de elementos estáveis de carbono e hidrogênio em petróleos e betumes e perfil de distribuição de hidrocarbonetos totais presentes em petróleos.

No entanto, existem alguns compostos orgânicos, denominados biomarcadores (marcadores biológicos ou fósseis geoquímicos) que, embora representem uma pequena fração da composição química de petróleos e betumes, têm importância estratégica na caracterização geoquímica desses produtos e intermediários, respectivamente.

Biomarcadores geoquímicos são moléculas orgânicas encontradas em rochas sedimentares, petróleo e outros geomateriais, cujos esqueletos de carbono foram preservados ao longo das transformações geoquímicas sofridas por lipídeos originalmente sintetizados por organismos vivos. Por essa razão, os biomarcadores podem ser inequivocamente associados aos respectivos precursores biológicos (Killops & Killops, 2005; Peters *et al.*, 2005). São amplamente utilizados como indicadores de origem da matéria orgânica e do paleoambiente deposicional, indicadores do grau de maturação térmica da matéria orgânica e de óleos, e indicadores do nível de biodegradação de óleos (Killops & Killops, 2005; Peters *et al.*, 2005), sendo esta última aplicação de grande interesse no desenvolvimento deste trabalho.

A biodegradação envolve os processos de destruição seletiva do petróleo por ação de microorganismos (bactérias), com a consequente alteração da sua composição química. A biodegradação pode ocorrer tanto em superfície quanto em subsuperfície, desde que a temperatura dos reservatórios petrolíferos seja relativamente baixa (< 80 °C) e não haja presença de componentes bacterioestáticos nem biocidas. Neste meio, os microorganismos aeróbicos e/ou anaeróbicos podem degradar petróleo seguindo caminhos bioquímicos diferentes (Widdel & Rabus, 2001) em taxas que dependem fortemente da disponibilidade de aceptores de elétrons orgânicos e inorgânicos (Vasconcelos, 2006; Cruz, 2009; Head *et al.*, 2003; Larter *et al.*, 2003).

Considerando as alterações moleculares e a resistência de alguns compostos, várias classificações têm sido feitas para hierarquizar os diferentes estágios de biodegradação. Entretanto, a escala mais comumente empregada é a que foi sugerida por Peters e Moldowan (1993). Este modelo de biodegradação é baseado na abundância relativa de várias classes de compostos e reflete a sequência de biodegradação observada frequentemente em óleos.

Estudos quantitativos que visem investigar as variações composicionais, especialmente relacionadas aos biomarcadores hidrocarbonetos e ácidos carboxílicos podem auxiliar o refinamento da classificação dos graus de biodegradação de óleos (Bennett *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2007), além de

poderem ser aplicados a outros estudos como craqueamento secundário de óleos, cuja etapa de quantificação é crucial (Welte *et al.*, 1997).

Deste modo, durante o desenvolvimento deste trabalho, foram sintetizados quatro biomarcadores ácidos carboxílicos e um biomarcador hidrocarboneto saturado, sendo eles: ácido 5 β (H) colânico (**2**), ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**), ácido 8,13-tetraidrocopálico (**6**), ácido 15-isocopálico (**7**) e 5 β (H) colano (**8**). As matérias primas utilizadas foram: ácido litocólico (**1**), estigmasterol (**3**) e ácido copálico (**5**). O composto isocopalano (**9**) foi utilizado como padrão de referência na quantificação de alguns biomarcadores saturados e foi cedido pelo Dr. Imamura (2011). As estruturas estão ilustradas na Figura 1.

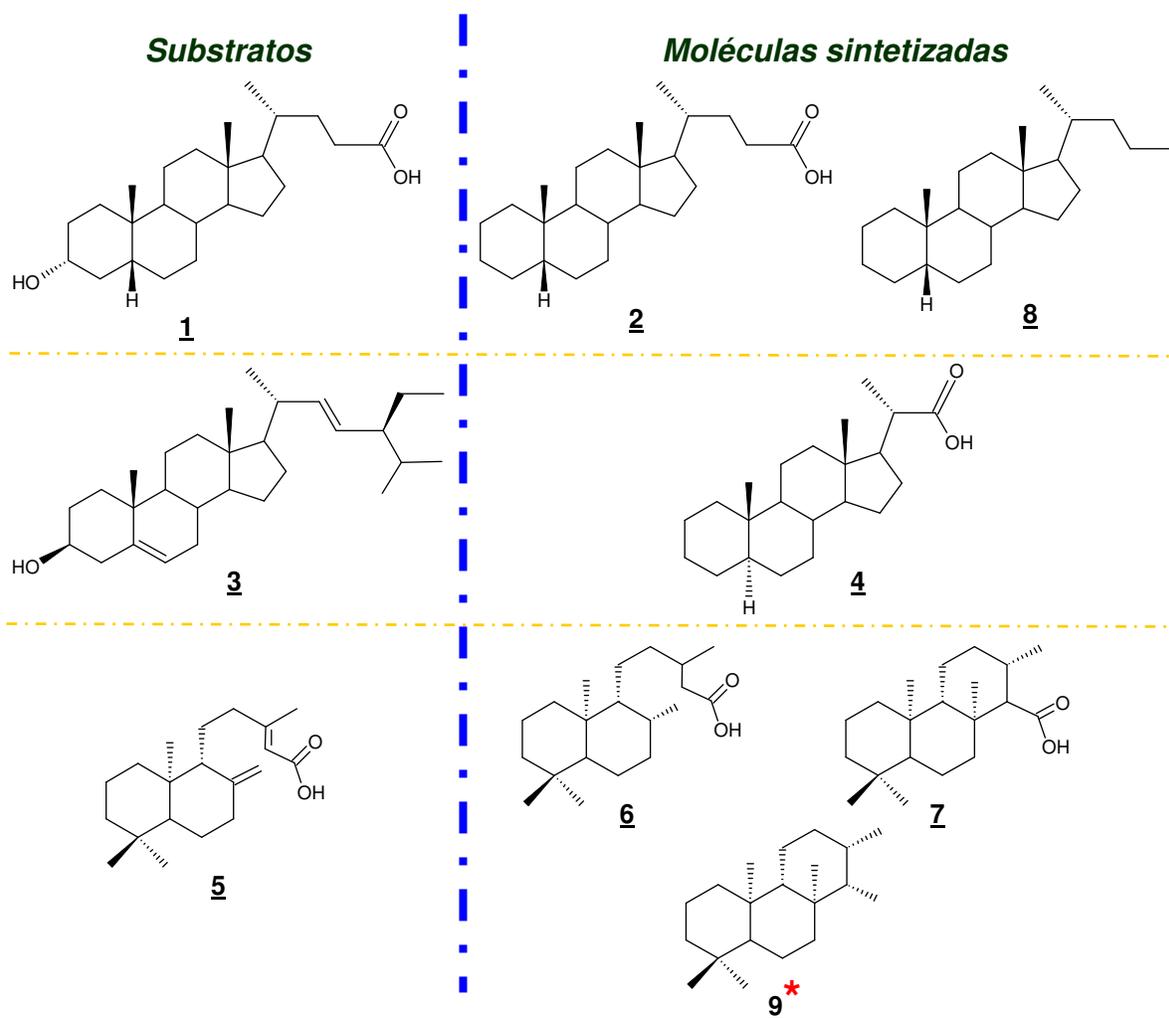


Figura 1: Substratos que foram utilizados e moléculas sintetizadas neste trabalho.

* Exceção de **9**, que nos foi cedida pelo Dr. Imamura, 2011.

O objetivo principal da preparação destas moléculas concerne na similaridade estrutural e estereoquímica que tais moléculas apresentam quando comparadas aos biomarcadores que ocorrem naturalmente no petróleo. Algumas são encontradas comercialmente, apesar de elevado custo, como **8**, que inclusive é utilizada rotineiramente como padrão de referência na quantificação de biomarcadores hidrocarbonetos das famílias dos esteranos e terpanos, por exemplo: hopanos, terpanos tricíclicos, gamacerano (Peters *et al.*, 2005).

Em geral, esta quantificação é feita através de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e a ionização das moléculas é feita por elétrons (IE). O composto **8**, assim como outros esteranos, gera como fragmento mais estável um íon cuja relação massa-sobre-carga (m/z) é 217 (Figura 2). Além disso, apresenta as vantagens de não estar presente em quantidade significativa em petróleos naturais e não coeluir com nenhuma outra molécula natural da família dos esteranos. Neste trabalho **8** foi utilizado como padrão de referência para quantificação dos esteranos.

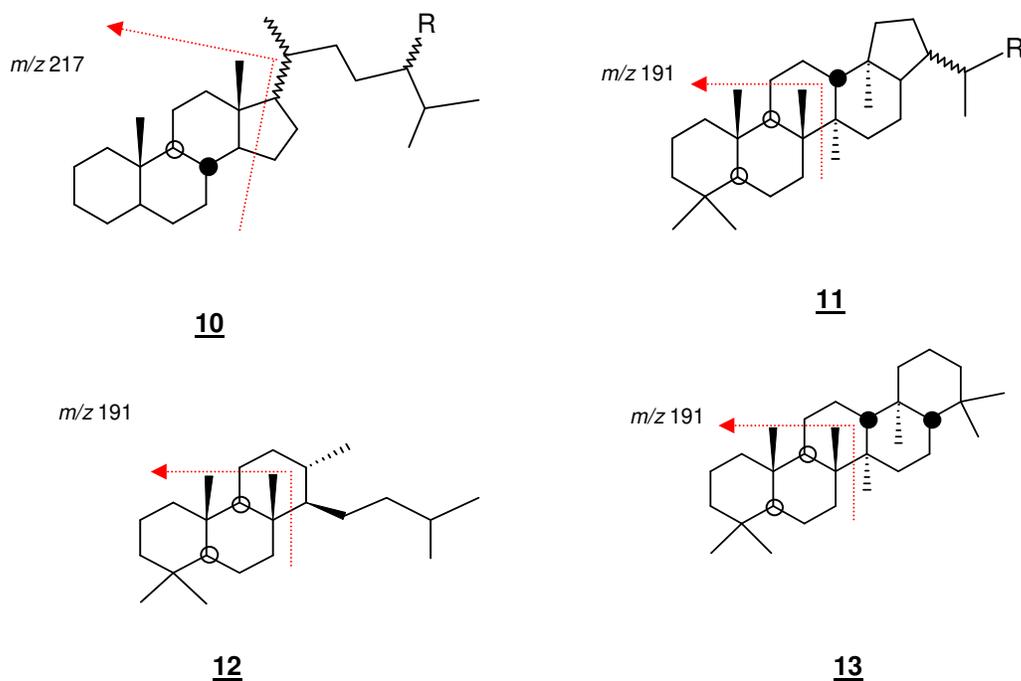


Figura 2: Principais fragmentos de esteranos (**10**), hopanos (**11**), terpanos tricíclicos (**12**) e gamacerano (**13**).

Apesar de **9** já ter a sua síntese descrita por diferentes grupos de pesquisa com distintas finalidades (Miranda, 1981; Imamura, 1981; Herz & Prasad, 1984; Heissler *et al.*, 1984; Aquino Neto *et al.*, 1982; Aquino Neto *et al.*, 1983), a maioria dos trabalhos existentes na literatura citam sua utilização para identificação ou confirmação da presença de triterpanos, uma vez que **9** também gera íon m/z 191 como sendo mais estável, como exemplos mostrados na Figura 2, seguindo o mecanismo de fragmentação dos triterpanos de ocorrência natural (Ekweozor & Strausz, 1982 e Aquino Neto *et al.*, 1986).

Neste trabalho, **9** foi utilizado como padrão de referência na quantificação dos hopanos, gamacerano, terpanos tricíclicos e tetracíclicos, quando adicionados nos óleos brutos antes do fracionamento por cromatografia líquida (CL).

Os biomarcadores ácidos **2** e **7**, que resguardam as mesmas características estruturais dos hidrocarbonetos correspondentes (**8** e **9**), foram sintetizados não apenas para serem avaliados pela técnica de espectrometria de massas *Linear Ion trap-Quadrupole/Orbitrap* (LTQ-Orbitrap), o que até o presente momento é inédito na literatura, mas principalmente, para serem utilizados como padrão de referência interna na quantificação de biomarcadores ácidos presentes nos extratos ácidos obtidos dos óleos estudados. O estudo de quantificação dos biomarcadores ácidos será realizado utilizando CG-EM dos ésteres metílicos correspondentes.

As moléculas **4** e **6** possuem diferentes características estruturais que podem ser exploradas neste trabalho. Sendo: **4** um derivado tetracíclico 5 α (H) em oposição ao composto **2** que é 5 β (H); **6** é um bicíclico com a carboxila ácida ligada na cadeia lateral da posição 9 no anel B.

É importante ressaltar que foram escolhidas rotas envolvendo reações clássicas para as sínteses dos produtos almejados, de utilização comum e bem descritas ao longo de vários anos em dissertações e teses oriundas do grupo de pesquisas geoquímicas e fitoquímicas da Unicamp (Imamura, 1981; Miranda, 1981; Rebouças, 1992; Lopes, 1995; Machado, 1995; Alves, 1997; Soriano, 2004; Lima, 2005 e Silva, 2008).

Haja visto que o objetivo primordial está na obtenção dos padrões almejados, neste trabalho não foi feita uma abordagem sobre metodologias sintéticas alternativas, ainda que isto seja de extrema relevância para entendimento e aplicação de novas tecnologias.

Trabalhou-se com dois conjuntos de óleos provenientes da Bacia Potiguar, que é uma bacia bem conhecida em termos de geologia de petróleo, especialmente em relação à geoquímica.

O conjunto I contém cinco óleos de diferentes origens, sendo dois lacustres (**LC-1** e **LC-2**), um marinho evaporítico (**ME**) e dois mistos (**M-1** e **M-2**), que são misturas de óleos de origens lacustre e marinho evaporítica. O conjunto II contém quatro óleos de mesma origem (**ME-a**, **ME-b**, **ME-c** e **ME-d**), marinho evaporíticos, e mesma evolução térmica. O que os distingue são os diferentes níveis de biodegradação.

Para tanto, utilizou-se basicamente as técnicas de CL convencional e instrumental para o fracionamento dos óleos e obtenção/purificação dos extratos ácidos e CG-EM para identificação e quantificação dos compostos de interesse. Para viabilizar os estudos quantitativos dos biomarcadores ácidos por CG-EM foi necessária a etapa de derivatização dessas moléculas aos ésteres metílicos correspondentes.

Com a finalidade de eliminar a etapa de derivatização dos compostos ácidos (sequencia de quatro reações: conversão dos ácidos carboxílicos à ésteres metílicos_redução à álcool_tosilação_redução ao hidrocarboneto) (Koike *et al.*, 1992, Rebouças *et al.*, 1992, Lima *et al.*, 2005, Lima *et al.*, 2010), e evitar perdas de informação quanto à composição dessa classe de compostos, fez-se a análise direta dos extratos ácidos de petróleo no Orbitrap. O Orbitrap, que é um analisador de massas de alta resolução lançado no mercado a pouco mais de cinco anos, apresenta elevado potencial de aplicação em estudos de compostos polares presentes em petróleo (Hu *et al.*, 2005; Watson & Sparkman, 2007; Pomerantz, *et al.*, 2011). Com esta técnica tentou-se buscar informações diretas quanto às estruturas dos ácidos carboxílicos presentes nos extratos ácidos dos petróleos e relacioná-las com os biomarcadores ácidos sintetizados neste trabalho, bem como

suas possíveis correlações de parâmetros de origem e biodegradação entre os biomarcadores ácidos e hidrocarbonetos analisados pelo modo convencional através de CG-EM.

1.2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é realizar um estudo qualitativo e quantitativo de biomarcadores ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos saturados presentes em dois conjuntos de óleos da Bacia Potiguar e avaliar o potencial da técnica Orbitrap no estudo de aspectos moleculares de biomarcadores ácidos de petróleos.

Os objetivos específicos são:

- a) Sintetizar quatro biomarcadores ácidos, a saber: 5 β (H) colânico (**2**), 5 α (H) homopregnânico (**4**), 8,13-tetraidrocopálico (**6**) e 15-isocopálico (**7**) para serem usados posteriormente no estudo de fragmentação utilizando Orbitrap e como padrões de referência na quantificação de biomarcadores ácidos, na forma de ésteres metílicos, utilizando CG-EM;
- b) Sintetizar um biomarcador hidrocarboneto saturado, a saber: 5 β (H) colano (**8**). Sendo esta molécula, **8**, juntamente com o isocopalano (**9**) (cedido pelo Dr. Imamura, 2011) utilizadas como padrões de referência na quantificação de biomarcadores hidrocarbonetos naturais de petróleo por CG-EM;
- c) Selecionar dois conjuntos de óleos provenientes da Bacia Potiguar, sendo:
Conjunto I – Cinco óleos de diferentes origens, denominados: **LC-1, LC-2, M-1, M-2 e ME**.
Conjunto II – Quatro óleos de mesma origem e evolução térmica. No entanto, com diferentes níveis de biodegradação, denominados: **ME-a, ME-b, ME-c e ME-d**.
- d) Separar as frações de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos ácidos das amostras de óleos selecionadas para este trabalho, utilizando para este fim técnicas de cromatografia líquida em coluna aberta (CL), extração em

fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP);

e) Construir curvas analíticas com os padrões **8** e **9** no CG-EM para avaliar a recuperação desses padrões de referência quando adicionados no óleo bruto e os possíveis impactos nas avaliações geoquímicas e quantificar os biomarcadores hidrocarbonetos das frações extraídas e isoladas dos óleos selecionados, utilizando **8** e **9** como padrões de referência;

f) Desenvolver método para análise direta dos extratos ácidos dos óleos selecionados e dos padrões ácidos sintetizados, utilizando Orbitrap;

g) Derivatizar parte dos extratos ácidos dos óleos do conjunto II a ésteres metílicos para posterior análise quantitativa de biomarcadores ácidos por CG-EM, utilizando **2** e **7** como padrões de referência;

h) Realizar estudos de fragmentações sequenciais no Orbitrap utilizando os padrões de ácidos sintetizados, a fim de se obter informações estruturais que possam auxiliar na avaliação dos extratos ácidos purificados provenientes dos óleos estudados;

i) Correlacionar os resultados obtidos por CG-EM e Orbitrap para os óleos estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi subdividida em quatro partes principais, de modo a facilitar a compreensão e alinhamento do trabalho realizado com os objetivos propostos. Sendo elas:

I - Geoquímica orgânica do petróleo;

II - A relevância dos estudos de ácidos carboxílicos em petróleo;

III - Orbitrap: fundamentos da técnica e potencial em análises de extratos ácidos de petróleos, com interesse voltado para Geoquímica orgânica;

IV - Aspectos geológicos da área de estudo e características composicionais dos óleos da Bacia Potiguar.

2.1. Geoquímica Orgânica do Petróleo

O petróleo (do latim *petroleum*, *petrus* = pedra e *oleum* = óleo) é uma substância oleosa, inflamável, geralmente menos densa que a água, com cheiro característico e coloração que pode variar desde o incolor ou castanho claro, até o preto, passando por verde, amarelo e marrom. Trata-se de uma combinação complexa de hidrocarbonetos, composta na sua maioria de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e aromáticos, podendo conter também quantidades pequenas de composto nitrogenados, oxigenados e sulfurados e com íons metálicos, principalmente níquel e vanádio (Hunt, 1996).

Em média petróleos produzíveis contêm 57% de hidrocarbonetos alifáticos (com uma leve predominância de lineares sobre cíclicos), 29% de hidrocarbonetos aromáticos e 14% de resinas e asfaltenos. Em uma base elementar isto consiste de aproximadamente 82 a 87% de C, 12 a 15% de H, 0,1 a 5% de S, 0,1 a 5% de O e 0,1 a 1,5% de N (Zílio & Pinto, 2002).

Séculos de especulações e experimentações acerca da origem do petróleo resultaram em numerosas hipóteses e teorias. As teorias que pretendem explicar a origem do petróleo podem ser classificadas em inorgânicas e orgânicas.

As teorias inorgânicas atribuem ao petróleo uma origem sem intervenção de organismos vivos de qualquer espécie, sendo um produto da ação da água em carbeto inorgânicos, tais como carbeto de ferro e de alumínio, que estão presentes em abundância na crosta terrestre (Tissot & Welte, 1984).

Já as teorias orgânicas atribuem aos organismos vivos um papel fundamental na produção da matéria prima (matéria orgânica) que, sob a ação do tempo e da temperatura será transformada em petróleo. Atualmente, os geólogos e geoquímicos, em sua maioria, advogam uma origem orgânica para o petróleo. A base da teoria orgânica moderna é o conceito de rocha geradora. Uma rocha geradora é uma rocha sedimentar rica em matéria orgânica que é convertida por processos bacterianos e químicos, durante o soterramento, num polímero complexo, o querogênio. Este processo é acompanhado de remoção de água e compactação dos sedimentos. O querogênio, por sua vez, é convertido em petróleo por craqueamento térmico a profundidades maiores e temperaturas relativamente elevadas. A aceitação da teoria orgânica está baseada no fato de serem encontradas no petróleo substâncias provenientes de organismos vivos, denominadas fósseis geoquímicos ou biomarcadores, que são moléculas que faziam parte da composição química de plantas ou animais e que sofreram pouca ou nenhuma alteração ao longo da história do soterramento (Tissot & Welte, 1984).

2.1.1. Tipos de Matéria Orgânica

Para que ocorra a formação do querogênio e, conseqüentemente, de petróleo, é necessário que haja preservação da matéria orgânica nos sedimentos. As condições favoráveis para deposição dos sedimentos ricos em matéria orgânica são encontradas nas plataformas continentais em zonas de ressurgência, em áreas de águas estratificadas, tais como lagoas, estuários e bacias profundas de circulação restrita onde é possível o aparecimento de uma zona anóxica (Tissot & Welte, 1984; White, 1998).

A matéria orgânica remanescente nas rochas sedimentares foi depositada em ambientes aquáticos e é composta principalmente por particulados do fitoplâncton. A preservação desse material depende do fluxo de matéria orgânica no sedimento, da taxa de acumulação de sedimento, do tamanho da partícula, da profundidade da coluna de água e da disponibilidade de oxigênio. Somente com todas essas condições favoráveis há preservação adequada da matéria orgânica que, com o soterramento sedimentar, formará o querogênio (Senftle *et al.*, 1993; Magoon & Dow, 1994; White, 1998).

O querogênio é definido como matéria orgânica sedimentar insolúvel em água, álcalis, ácidos não oxidantes e solventes orgânicos. Geralmente é acompanhado de uma pequena fração de matéria orgânica solúvel em solventes orgânicos, chamada de betume (Teichmüller & Durand, 1983; Whelan & Thompson-Rizer, 1993).

Um exame microscópico do querogênio revela que ele consiste de restos de plantas, material amorfo e raramente de restos de animais. Os constituintes identificáveis microscopicamente são chamados macerais. Eles podem ser divididos em quatro grupos, a saber: inertinita, vitrinita, exinita e liptinita. Esses grupos diferem tanto na sua composição quanto na sua origem (Teichmüller & Durand, 1983; Senftle *et al.*, 1993; Magoon & Dow, 1994; Tyson, 1995; White, 1998; Taylor *et al.*, 1998).

O grupo da inertinita consiste dos remanescentes formados pela oxidação rápida sob condições aeróbicas. Pode incluir remanescentes carbonificados de tecidos lenhosos, fungos, esporos, cutículas, resinas ou algas. A inertinita possui baixas razões atômicas de hidrogênio/carbono (H/C) e oxigênio/carbono (O/C) e, como seu nome sugere, é relativamente inerte.

O grupo da vitrinita é composto basicamente por tecidos lenhosos preservados. É o produto da carbonificação de substâncias húmicas e da lignina de vegetais superiores.

Um importante parâmetro para avaliar a maturação da matéria orgânica é a reflectância da vitrinita (R_o), que é determinada comparando-se a fração de luz incidente refletida por uma superfície polida deste maceral com um padrão calibrado, utilizando um microscópio de luz refletida. Mede-se a reflectância em vitrinitas, pois estas apresentam respostas proporcionais à maturação, enquanto em outros tipos de macerais da matéria orgânica (exinita ou inertinita), a resposta da reflectância não apresenta esta proporcionalidade. A alteração química que ocasiona a variação da reflectância é irreversível, pois é resultante da maior temperatura experimentada durante o soterramento da vitrinita.

A exinita inclui material rico em lipídeos derivado da cutícula de folhas, esporos, pólenes, algas, plantas cerosas, resinas, gorduras e óleos.

O quarto grupo, a liptinita, é, em muitos aspectos, similar à exinita, mas enquanto a exinita tem forma reconhecível, as liptinitas são corpos amorfos. Liptinitas são derivados de algas e geralmente têm razão H/C maior que as exinitas.

Esses quatro grupos de macerais reagem diferentemente ao aquecimento: a vitrinita produz um resíduo de carbono fundido, inertinitas não apresentam mudanças visíveis e as exinitas e liptinitas transformam-se em gás e carvão (Senftle *et al.*, 1993; Magoon & Dow, 1994; White, 1998).

2.1.2. Classificação do querogênio

O querogênio é geralmente classificado em três grupos, baseado nas razões atômicas de H/C e O/C (Tissot & Welte, 1984; Behar & Vandembroucke, 1987; Magoon & Dow, 1994).

Tipo I: querogênio com alta razão H/C ($\geq 1,5$) e baixa razão O/C ($< 0,1$). É rico em lipídeos, especialmente cadeias alifáticas longas e tem alto potencial gerador de petróleo. A matéria orgânica é derivada principalmente de algas e bactérias de ambientes lacustres.

Tipo II: é o tipo de querogênio mais comum, possui razões H/C e O/C intermediárias, $\sim 1,25$ e $< 0,2$, respectivamente. Deriva principalmente de plâncton e bactérias depositados em ambientes marinhos (vegetais superiores também podem contribuir). Devido à sua origem marinha, geralmente é rico em enxofre. O conteúdo de lipídeos e o potencial gerador são ligeiramente inferiores aos do querogênio do Tipo I.

Tipo III: possui baixa razão H/C ($< 1,0$) e alta razão O/C ($> 0,3$). É rico em aromáticos e pobre em estruturas alifáticas. É formado principalmente de vegetais terrestres superiores. Seu potencial gerador de óleo é baixo, mas pode ser uma fonte de gás (particularmente metano).

Como pode ser observado na Figura 3, o querogênio Tipo I é relacionado aos macerais do grupo da liptinita, o Tipo II ao da exinita e o Tipo III ao grupo da vitrinita.

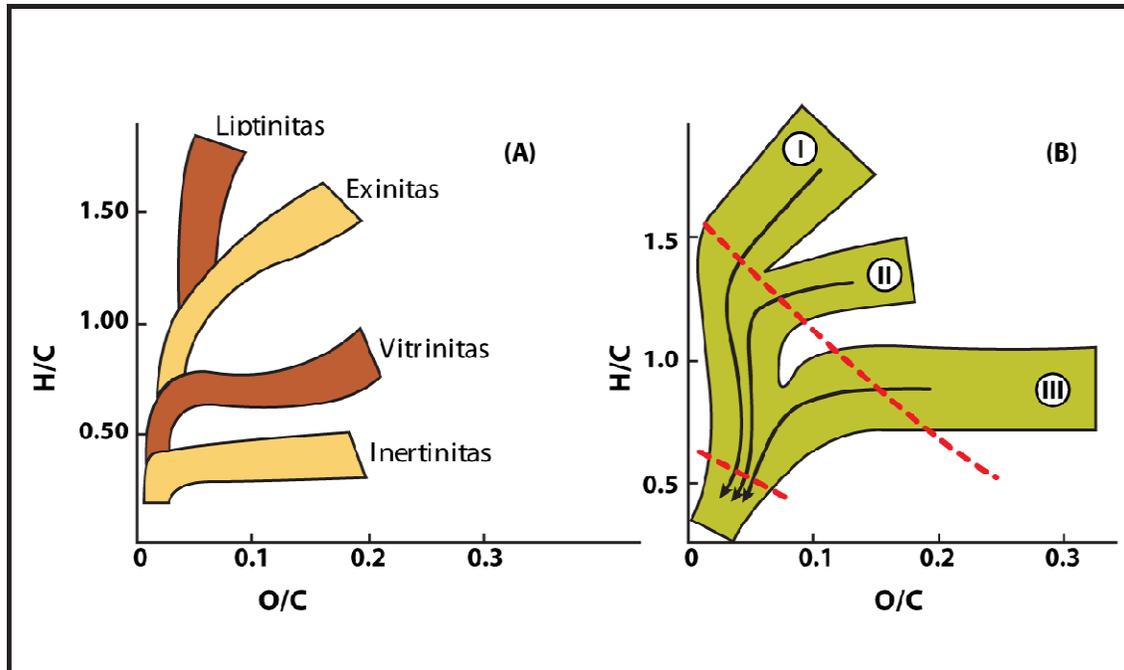


Figura 3: Diagramas Van Krevelen (razões atômicas H/C versus O/C), (a) Diferença composicional entre os grupos de macerais do querogênio, e (b) Tipos de querogênio, I, II e III. (Modificado de Tissot & Welte, 1984).

2.1.3. Estágios de Evolução da Matéria Orgânica

As transformações físico-químicas que ocorrem na matéria orgânica durante a história geológica das bacias sedimentares não podem ser consideradas como um processo isolado. Elas são controladas pelos mesmos fatores principais que também determinam as variações de composição da fase inorgânica sólida e da água intersticial dos sedimentos: atividade biológica nos primeiros estágios, depois temperatura e pressão. Além disso, podem ocorrer interações orgânicas-inorgânicas nos diferentes estágios da evolução dos sedimentos (White, 1998). Um esquema geral da evolução da matéria orgânica a partir do tempo de deposição, expresso pela profundidade, é mostrado na Figura 4.

Os valores de R_o vão de 0,2%, em matéria orgânica de sedimentos recentes, a 4% ou mais, em querogênios senis. No estágio de geração de óleo, ou

também chamada “janela de óleo”, a R_o é tipicamente na faixa de 0,6 a 1,3%. Portanto, para os valores abaixo de 0,6% e acima de 1,3% ocorrem as zonas imatura e senil, respectivamente (Tissot & Welte, 1984).

Os três estágios principais da maturação térmica da matéria orgânica nos sedimentos são diagênese, catagênese e metagênese, detalhados a seguir (Tissot & Welte, 1984; Magoon & Dow, 1994).

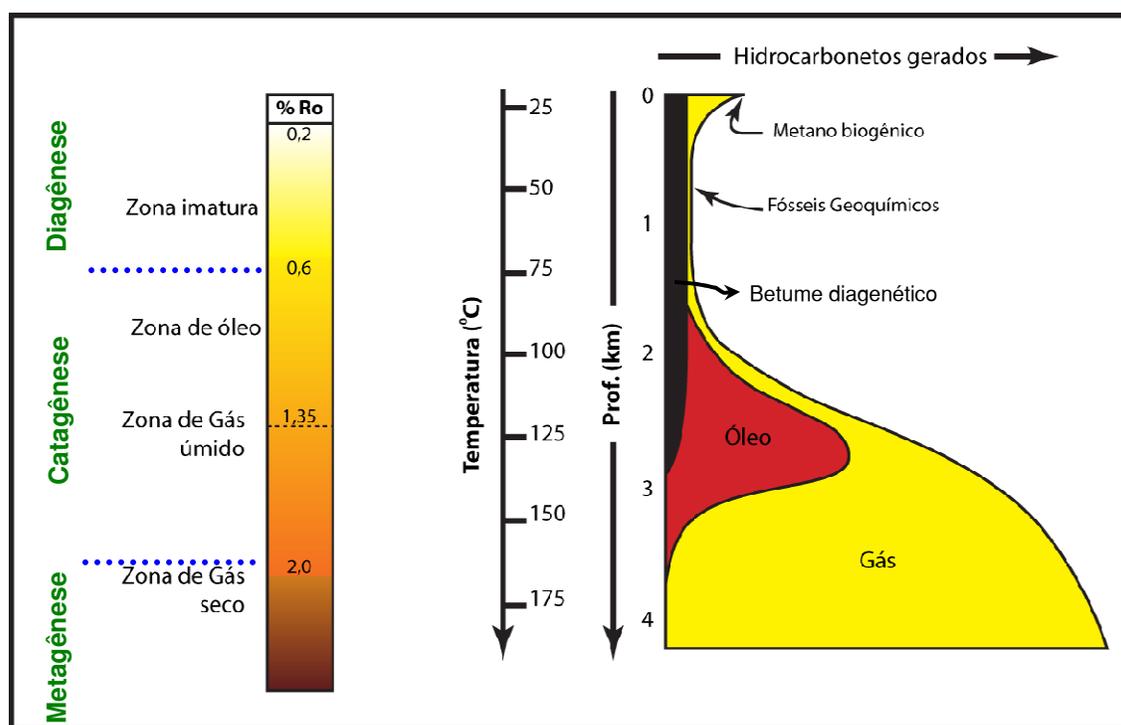


Figura 4: Esquema geral para geração de hidrocarbonetos em função da profundidade e da temperatura. As escalas de temperatura e profundidade assumem um gradiente geotérmico de 40°C por km. (Modificado de Tissot & Welte, 1984).

1. A diagênese orgânica ocorre em um intervalo de profundidade da ordem de até várias centenas de metros. No intervalo diagenético, o aumento da temperatura e da pressão é pequeno e as transformações da matéria orgânica sedimentar ocorrem sob condições brandas.

A diagênese se inicia nos sedimentos recém depositados onde a atividade microbiana é o principal agente de transformação ocasionando rearranjos químicos como policondensação e insolubilização. No final da diagênese, a

matéria orgânica consiste principalmente de querogênio. O hidrocarboneto mais importante gerado durante a diagênese é o metano biogênico derivado de reações mediadas por microorganismos em temperaturas inferiores a ~ 80 °C.

2. Na catagênese a deposição consecutiva de sedimentos resulta em soterramento das camadas anteriores, a profundidades que podem alcançar vários quilômetros, em bacias sedimentares. Isto acarreta um aumento considerável da temperatura e da pressão. Para este estágio da evolução térmica da matéria orgânica dá-se o nome de catagênese. A temperatura varia de 50 a 150°C e a pressão pode variar de 300 a 1500 bar. Neste estágio ocorre a degradação térmica do querogênio, que é responsável pela geração da maioria dos hidrocarbonetos, isto é, óleo e gás úmido (C₂₊).

3. A metagênese é o último estágio de evolução térmica da matéria orgânica. Este estágio só é alcançado em grandes profundidades. As temperaturas ficam acima de 150-175°C e a pressão também chega a valores mais elevados. Além disso, as rochas podem ser mais eficientemente influenciadas por fontes térmicas como, por exemplo, magma e hidrotermalismo. Os produtos formados a partir da matéria orgânica são metano e, finalmente, grafite.

2.1.4. Condições básicas para formação de um sistema petrolífero

O conceito de sistema petrolífero está baseado na investigação dos elementos essenciais e processos que permitem a formação de uma acumulação petrolífera, sendo capaz também de caracterizar e predizer novas acumulações de petróleo (Magoon & Dow, 1994). Para o entendimento dos sistemas petrolíferos, tem-se aplicado um enfoque multidisciplinar, envolvendo geoquímica, sedimentologia, geofísica e microestratigrafia. O estudo de um sistema petrolífero tende a estabelecer uma relação entre a porção de acumulação de uma rocha

geradora (*pod*) e o petróleo presente na rocha reservatório. A investigação dos sistemas petrolíferos permite a caracterização em tempo e espaço, do caminho do petróleo a partir da rocha geradora até a trapa. Permite também a caracterização das acumulações de petróleo, através da descrição dos fatores carga, migração e trapeamento.

De acordo com Magoon e Dow (1994), um sistema petrolífero pode ser definido como um sistema natural que compreende um *pod* de rocha geradora ativa, que inclui todos os elementos geológicos e processos que são necessários para que uma acumulação de petróleo exista. Nesta definição, o termo sistema descreve os elementos e processos que formam a unidade funcional capaz de criar acumulações de petróleo.

Os elementos essenciais incluem a rocha geradora, a rocha reservatório, a rocha selo e a sobrecarga (soterramento). Os processos são a formação da trapa e a geração-migração-acumulação de petróleo. Estes elementos essenciais e processos devem ocorrer em um tempo e espaço suficientes para que a matéria orgânica contida na rocha geradora possa ser convertida em petróleo e acumulada em um reservatório. Denomina-se como momento crítico o ponto que melhor representa no tempo a geração-migração-acumulação da maior parte do petróleo.

A rocha geradora deve conter um teor mínimo de carbono orgânico total entre 0,5 – 1,0%, estar submetida a um estágio de evolução térmica necessário para transformação do querogênio em petróleo e ter medidas de espessura e extensão lateral adequadas. A rocha reservatório deve possuir permeabilidade e porosidade adequadas para a acumulação do petróleo e posterior exploração. A rocha selante, também conhecida como capeadora, tem a função de manter o petróleo retido nas trapas e para isso, deve possuir baixa permeabilidade e alta pressão capilar.

2.2. Ácidos Carboxílicos em Petróleo

Os ácidos carboxílicos de cadeia longa são os maiores constituintes dos lipídios em organismos vivos, podendo ser encontrados em sedimentos e petróleo. Embora a presença de petróleos ácidos não constitua um fato novo, os ácidos graxos não fazem parte das análises de rotina nos estudos de exploração de petróleo. Entretanto, tais compostos podem fornecer informações complementares no estudo geoquímico orgânico de sedimentos antigos e óleos (Behar & Albrecht, 1984).

Os ácidos carboxílicos, comumente encontrados em petróleos e sedimentos, incluem diferentes tipos de estruturas químicas como, ácidos graxos lineares, ácidos isoprenóicos, ácidos cíclicos saturados ou aromáticos e compostos bifuncionalizados com α , ω -dicarboxílicos (Rebouças, 1992). Durante a diagênese, pode ocorrer tanto a preservação do grupo carboxílico presente na matéria orgânica original, como a formação deste a partir de outros grupos funcionais existentes no material de origem.

Na literatura há poucos registros de análises da fração de ácidos carboxílicos de óleos, quando comparados aos registros que existem para análises de hidrocarbonetos.

Ácidos *n*-alcanóicos, tais como hexadecanóico e octadecanóico possivelmente têm como origem organismos planctônicos ou bactérias (Schaeffer *et al.*, 1993). Em ecossistemas marinhos as bactérias são as maiores fontes de ácidos de cadeia ramificada de baixa massa molecular. As bactérias também são uma importante fonte de ácidos palmitoleico (16:1(ω -7)) e palmítico (16:0), além do biomarcador mais utilizado ácido, o *cis*-vacênico (18:1(ω -7)). Ácidos graxos poli-insaturados são encontrados em quase todos os organismos marinhos, às vezes em quantidade comparável aos ácidos graxos saturados, sendo a principal fonte os fitoplânctons. Diatomáceas e eustigmatofitos são ricos em ácido

eicosapentaenoico, (20:5(ω -3)) e produzem pequena quantidade de ácido aracdônico, (20:4(ω -6)).

Como os biomarcadores na forma de ácidos carboxílicos são mais resistentes à biodegradação, podem ser utilizados para obtenção de informações sobre reservatórios quando a maioria dos biomarcadores hidrocarbonetos já está degradada. Entretanto, a limitação do uso desses compostos está na complexidade em manipular a amostra antes da análise, o que inclui preparação, purificação, concentração, resultando em um tempo de análise longo com a possibilidade de contaminação por artefatos (Nascimento *et al.*, 1999).

A presença de compostos ácidos nos óleos pode causar a desestabilização da emulsão óleo/água ou hidratos durante o transporte. Após a produção, também podem causar algum tipo de corrosão durante o processo de refino (Hughey *et al.*, 2002; Laredo *et al.*, 2004). Como resultado desses riscos industriais, os óleos ácidos têm baixo valor comercial (Dou *et al.*, 2008), embora, atualmente, óleos altamente ácidos são uma parcela crescente da oferta de óleo global, tendo recebido muita atenção da indústria petrolífera (Li *et al.*, 2010).

A acidez de óleos de reservatórios, principalmente biodegradados ou de baixa maturidade, é causada pelo que se conhece na literatura como “ácidos naftênicos”, cujo termo, que é utilizado na indústria de petróleo, se refere principalmente aos hidrocarbonetos cíclicos com um ou mais grupos carboxílicos (Albuquerque *et al.*, 2005; Fafet *et al.*, 2008).

A acidez de um óleo é geralmente expressa pela quantidade de ácidos totais (TAN -*Total Acid Number*), o qual corresponde a medida do número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessárias para neutralizar a acidez de um grama de óleo (Li *et al.*, 2010).

Óleos derivados de rochas geradoras lacustres geralmente apresentam valores de TAN < 0,1 a 16,2 mg KOH/g de óleo. Óleos com acidez elevada (valores de TAN > 0,5 mg KOH) apresentam grau API baixo e tendem a ocorrer em reservatórios rasos (Li *et al.*, 2010; Meredith *et al.*, 2000).

A análise do cromatograma da fração de hidrocarbonetos saturados de óleos com baixo TAN, realizado por CG, geralmente apresenta a série completa

de *n*-alcanos, similares aos óleos parafínicos, entretanto, aqueles com alto valor de TAN são caracterizados por uma mistura complexa não resolvida, indicando vários níveis de biodegradação. O que é observado é que muitos óleos com valor de TAN elevado (>1) são biodegradados, e óleos crus com valores de TAN mais elevados ainda (>2) são biodegradados em um grau mais severo. Este fato faz com que a presença de compostos ácidos em óleo de reservatório esteja relacionada diretamente aos eventos de biodegradação.

Fafet e colaboradores (2008) demonstraram que a relação entre ácidos alifáticos acíclicos/cíclicos está diretamente relacionada ao nível de biodegradação (Figura 5) e à quantidade de ácido totais (ou valor de TAN), havendo uma correlação entre TAN e a concentração de ácidos carboxílicos em óleos crus, e entre a quantidade de ácidos carboxílicos e o grau de biodegradação estimado na escala de Peters e Moldowan (1993). Esta correlação é verdadeira para valores elevados de TAN (>0,1 mg KOH/g). Entretanto, para valores baixos (<0,1 mg KOH/g) às vezes não há correlação com a quantidade de ácidos carboxílicos (Fafet *et al.*, 2008).

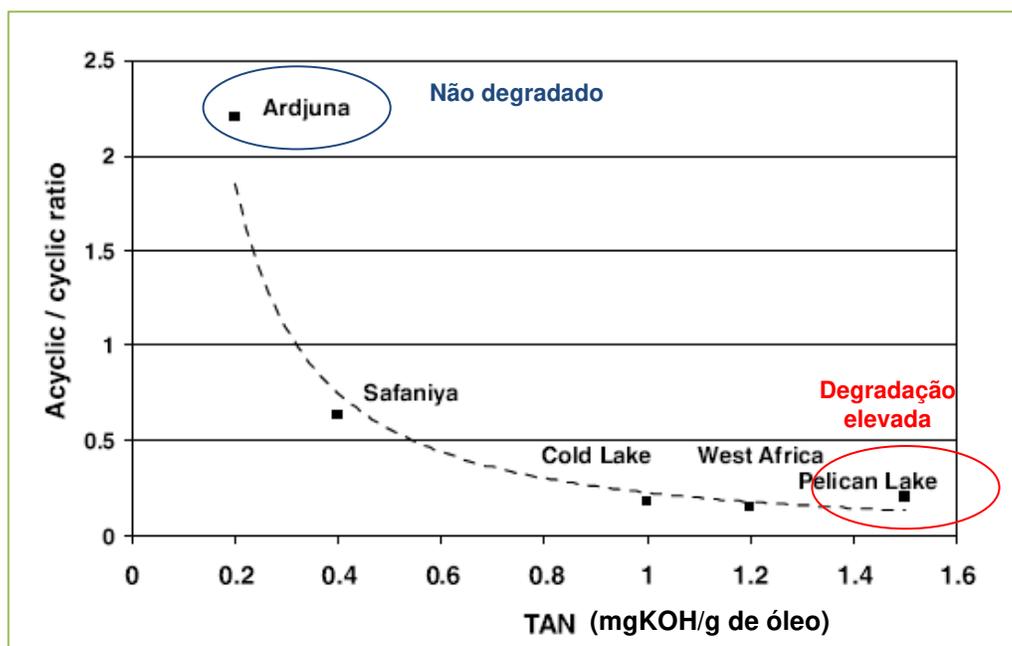


Figura 5: Correlação entre valores de TAN e razão entre ácidos alifáticos acíclicos/cíclicos (Extraído e modificado de Fafet *et al.*, 2008).

Segundo Meredith e colaboradores (2000), a presença de ácidos carboxílicos é o principal fator responsável pela acidez de óleos, e a biodegradação o principal processo que produz altas concentrações desses ácidos. Entretanto, os mesmos autores mostraram exemplos de óleos não degradados com valores elevados de TAN, sugerindo que outros fatores além da biodegradação podem causar o aumento de ácidos naftênicos nos óleos. Eles mostraram isto através da análise de trinta e três óleos *offshore* de UK, Itália e Califórnia (Figura 6). Tais fatores podem estar relacionados ao conteúdo de enxofre, o que depende do ambiente deposicional da rocha geradora e ao grau de maturação do óleo.

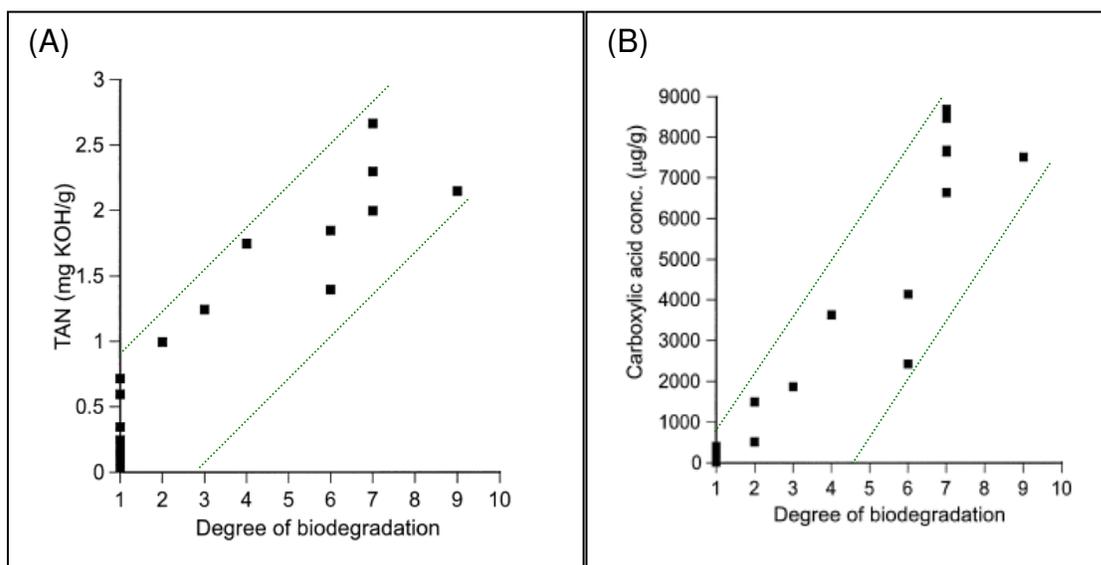


Figura 6: (A) Grau de biodegradação (escala de Peters e Moldowan, 1993) vs. TAN; (B) Grau de biodegradação (escala de Peters e Moldowan, 1993) vs. concentração de ácidos carboxílicos (µg/g óleo) excluindo misturas de óleos. (Extraído de Meredith *et al.*, 2000). Amostras de óleos *offshore* de UK, Itália e Califórnia.

Watson e colaboradores (2002) sugeriram que quantidades elevadas de ácidos carboxílicos podem ser produzidas durante a biodegradação de óleos crus. Nos experimentos de biodegradação realizados por esses autores, ácidos carboxílicos alifáticos contendo de 10 a 20 átomos de carbono são rapidamente

produzidos, coincidindo com a remoção de *n*-alcanos, mas estes ácidos também são rapidamente removidos.

Outros estudos mencionados na literatura sugerem que o aumento do teor de ácidos carboxílicos em óleos pode ser resultado da remoção seletiva de compostos não ácidos levando a um aumento relativo na concentração de compostos ácidos. Soma-se a isso o fato de que muitos ácidos carboxílicos naftênicos ou naftenoaromáticos podem ser resultado da alteração microbiana de cicloalcanos, alquilaromáticos, naftenoaromáticos ou compostos sulfurados, e possivelmente de resinas e asfaltenos. Por exemplo, ácidos orgânicos aromáticos, tais como ácido 2,6-dimetilbenzóico ou *p*-metilfenil-acético, podem ser produto da degradação anaeróbica de alquilbenzenos (Thorn & Aiken, 1998).

Ainda de acordo com a literatura, alguns hidrocarbonetos podem ser gerados pela descarboxilação de ácidos durante a diagênese e maturação, como por exemplo, o tricíclico terpano C₂₃ e o hopano C₂₇, correspondentes aos ácidos C₂₄ tricíclico terpano e C₂₈ hopano, respectivamente. Durante o processo de biodegradação os ácidos acíclicos lineares são os primeiros a serem removidos quando comparados aos compostos saturados ramificados e cíclicos.

Outro fator, além da biodegradação, que pode afetar a concentração e distribuição de ácidos em óleos são os eventos de lavagem por águas meteóricas, os quais removem os compostos ácidos de menor massa molecular. Na interface óleo-água os compostos ácidos podem se difundir para a fase aquosa durante a migração do óleo. Neste caso, se a distância entre a geradora e o reservatório for grande, os ácidos orgânicos encontrados no óleo podem, provavelmente, terem sido gerados no próprio reservatório (Barth & Bjørlykke, 1993). Neste caso, eles são importantes nos estudos de migração do petróleo e gás natural, diagênese mineral e a formação de porosidade secundária em bacias sedimentares (Dias *et al.*, 2002).

Jaffé e Gardinali (1990) observaram que há um duplo processo de geração de ácidos carboxílicos, e que os ácidos de diferentes graus de maturação são gerados em vários estágios após o máximo da geração de óleo, sugerindo que a maior parte dos ácidos biossintetizados em sedimentos recentes são incorporados

na fração geopolimérica no início da diagênese, ficando assim protegidos. Também sugerem que a maturação e a geração são fortemente dependentes em sua especiação dentro do geopolímero, e das modificações dentro da matriz polimérica durante a maturação térmica, sugerindo que os ácidos carboxílicos podem ser utilizados como biomarcadores da migração do óleo.

Ainda segundo estes autores, durante este duplo processo de geração o Índice de Preferência de Carbono (IPC) diminui quando o craqueamento térmico das cadeias começa a ser mais importante do que a geração dos ácidos biogênicos originais ligados na matriz orgânica. Uma vez que a matriz geopolimérica sofre um rearranjo estrutural ou degradação devido ao estresse térmico, a fração protegida fica exposta e o processo de geração é repetido, produzindo um aumento seguido de um decréscimo do IPC quando os ácidos começam a ser gerados. Além disso, o craqueamento térmico favorece a geração de ácidos pentacíclicos, seguidos dos ácidos *n*-alcanóicos (principalmente de cadeia longa) e os ácidos de cadeia curta.

Jaffé e colaboradores (1992), pela análise de amostras de rochas de diferentes graus de maturação também observaram um duplo processo de geração para os ácidos carboxílicos, nos quais distribuição imatura de ácidos são gerados em alto nível de maturação, mostrando que a geração dos ácidos carboxílicos depende da natureza do querogênio e dos fatores estéricos. Isto também sugere que o equilíbrio cinético e estereoquímico dos biomarcadores em sedimentos antigos pode ser mais complexo do que se imagina.

Segundo a literatura, a distribuição molecular dos ácidos carboxílicos em óleo cru também pode ser afetada pela migração do óleo. Durante a migração, os processos chamados de “lavagem” e “geocromatografia” são os responsáveis por essas modificações.

O efeito de lavagem reflete a incorporação pelo óleo de matéria orgânica presente nas rochas pelas quais o óleo migra. Enquanto que o efeito geocromatográfico é baseado na diferença de adsorção, e, portanto, da retenção, de hidrocarbonetos pela rocha. O efeito geocromatográfico nos ácidos é provocado pela diferença de polaridade afetando a abundância desses

compostos. O efeito de lavagem, entretanto, irá afetar os parâmetros moleculares de maturação da fração ácida devido à incorporação dos ácidos de diferentes maturidades durante a migração. Isso significa que a distribuição molecular dos ácidos carboxílicos em óleos crus irá depender: dos ácidos formados durante o máximo de geração do óleo; dos ácidos incorporados ao óleo durante a migração; e do fracionamento dos ácidos devido ao efeito de geocromatografia (Jaffé & Gallardo, 1993).

Por esse motivo a aplicação de biomarcadores ácidos como indicadores de biodegradação e migração tem sido utilizada, e foi o trabalho de Jaffé e Gallardo (1993) com óleos crus da Bacia de Maracaíbo, Venezuela (Figura 7). Eles demonstraram que a razão entre os ácidos tricíclicos e pentacíclicos é um bom parâmetro para avaliar o grau de biodegradação em óleos. E também sugeriram que a distribuição entre os isômeros dos ácidos hopanóicos (HAs), assim como o IPC e a razão C_{28}/C_{18} (*n*-ácidos) são bons parâmetros para avaliar o histórico de migração dos óleos.

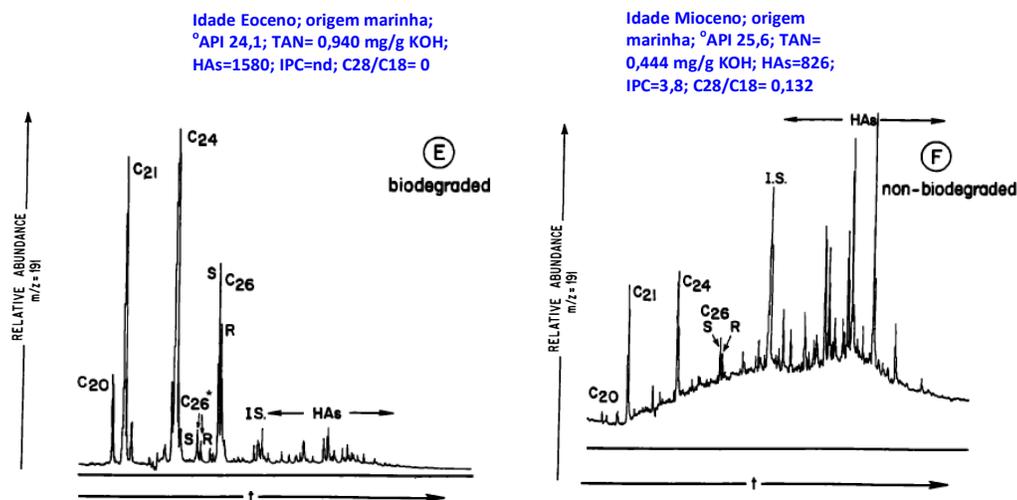


Figura 7: Cromatograma de massas do íon m/z 191 para ácidos terpanóicos (como metil ésteres) de um óleo E e F. A série homóloga dos ácidos tricíclicos estão indicados como C_{20} , C_{21} , C_{24} , C_{26} S e R. I.S.=padrão interno; HAs=ácidos hopanóicos (Extraído de Jaffé e Gallardo, 1993).

A seguir serão apresentados as principais famílias de ácidos carboxílicos presentes em petróleo, bem como as principais informações que são obtidas de interesse em estudos geoquímicos.

2.2.1. Ácidos *n*-alcanóicos

São os principais componentes ácidos presentes na maioria dos organismos e persistem por um longo tempo geológico (Peters *et al.*, 2005). Pouca correlação há entre os ácidos *n*-alcanóicos e o valor do TAN ou o grau de biodegradação. Dados da literatura onde é observado um grau de similaridade na distribuição dos *n*-alcanos com ácidos *n*-alcanóicos, sugerem que o processo responsável pela transformação do ácido *n*-alcanóico a *n*-alcano, equivale a uma simples descarboxilação. Atualmente, é aceito que os ácidos *n*-alcanóicos são os precursores, em parte, dos *n*-alcanos formados geoquimicamente.

Behar e Albrecht (1984) compararam a fração ácida e a de hidrocarbonetos de óleos de diferentes origens e observaram que pode haver uma neoformação de parte de *n*-alcanos pela descarboxilação dos ácidos durante a maturação.

Na natureza predominam os ácidos graxos com número par de átomos de carbono, na faixa de C₆ a C₂₆, cuja predominância também é observada em sedimentos recentes, e suas fontes incluem bactérias, microalgas, plantas superiores e fauna marinha, cada uma das quais contribuindo com compostos específicos, permitindo assim sua diferenciação (Volkman, 2006). Por exemplo, plantas terrestres são a principal fonte de ácidos graxos de cadeia estendida (C₂₀-C₃₀), com predominância do número de carbonos par sobre o ímpar.

Os ácidos *n*-alcanóicos mais abundantes em óleos e sedimentos são o ácido palmítico (C₁₆) e o esteárico (C₁₈) (Figura 8), e quando presentes em amostras geológicas podem ser um indicativo de atividade microbiana recente, o que inclui a contaminação das amostras por micro-organismos devido ao mal armazenamento em laboratório (Breger, 1960).

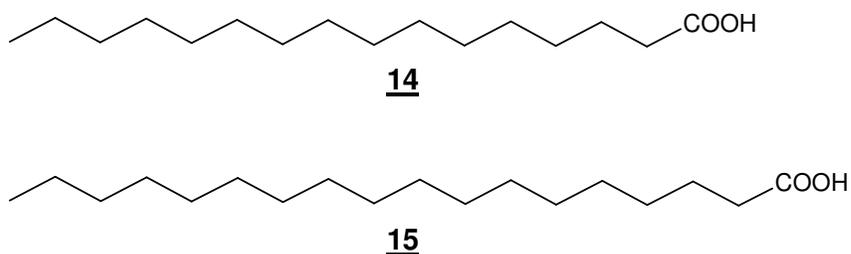


Figura 8: Estruturas dos ácidos palmítico (14) e esteárico (15).

Jaffé e Galardo (1993) observaram que em amostras de origem marinha há preferência de ácidos de massa molecular baixa, com predominância do C₁₆ e C₁₈, podendo ser um indicativo da presença de bactéria no reservatório, embora sejam também encontrados em concentrações elevadas em óleos não biodegradados.

Os ácidos *n*-alcanóicos podem ser avaliados, assim como os *n*-alcanos, pelo IPC. Como exemplo dessa aplicação pode ser citado o trabalho de Kawamura e colaboradores (1986) que, através da pirólise de amostras de querogênio da formação *Green River*, observou valores distintos para o índice de preferência de carbono quando calculado para ácidos *n*-alcanóicos e *n*-alcanos. Neste caso, os autores sugeriram que os ácidos graxos foram incorporados ao querogênio durante a sedimentação e início da diagênese, ficando assim protegidos do ataque microbiano e às modificações químicas durante os períodos de tempo geológicos. Observaram também que não houve descarboxilação com o aumento de temperatura ou o com aumento do tempo de aquecimento nos experimentos de hidropirólise, embora a quantidade de hidrocarbonetos gerados tenha aumentado (Kawamura *et al.*, 1986).

Segundo Galimberti e colaboradores (2000), na primeira etapa de alteração do óleo, *n*-parafinas são oxidadas, resultando nos ácidos graxos correspondentes. Por esta razão, segundo esses autores, os ácidos carboxílicos podem ser utilizados como indicadores do início do processo de biodegradação do óleo no reservatório quando as parafinas são removidas. Degradação bacteriana de *n*-alcanos envolve a oxidação de grupos metílicos terminais com a formação de álcool, que se oxidou ao aldeído e ao ácido carboxílico.

Na avaliação do grau de biodegradação deve ser levado em consideração que a presença de compostos ácidos em óleos de reservatório também pode ser resultado da incorporação desses compostos durante o processo de migração. Como exemplo pode ser citado o trabalho de Rodrigues e colaboradores (2000) que estudaram 10 amostras de óleos marinho evaporíticos da Bacia Sergipe-Alagoas em relação aos constituintes ácidos. Na análise dos resultados observaram que compostos moleculares como ácidos *n*-alcanóicos, isoprenóides e hopanóicos apresentaram um perfil de distribuição e abundância diferentes, podendo ser resultado da incorporação da matéria orgânica imatura nos óleos e fracionamento durante a migração.

Jaffé e colaboradores (1988), estudando a distribuição de biomarcadores ácidos em óleos, observaram que dois processos podem controlar as modificações na distribuição desses biomarcadores durante a etapa de migração: solubilização da matéria orgânica imatura durante a migração, e, em menor grau, a geocromatografia. O primeiro reflete o aumento da concentração de ácido de cadeia longa com predominância de par sobre ímpar e aumento na concentração de ácidos cíclicos, típicos de zonas imaturas. O efeito da geocromatografia pode ser visto na depletação de ácidos de cadeia longa vs. cadeia curta com o aumento da distância da migração vertical. Neste estudo, os biomarcadores ácidos foram escolhidos, pois são os componentes mais polares dos óleos e podem ser fortemente afetados pela geocromatografia; também porque a incorporação de matéria imatura durante a migração afeta a distribuição dos biomarcadores ácidos, desde que sua abundância em amostras maduras seja baixa, enquanto sua abundância em amostras imaturas é alta.

2.2.2. Ácidos isoprenóides acíclicos

Entre os ácidos isoprenóides identificados no petróleo encontram-se o ácido pristanóico (C₁₉) **16** e o ácido fitanóico (C₂₀) **17**, os quais são encontrados em óleos imaturos, sedimentos recentes e antigos, de origem marinha ou terrestre

(Figura 9). Segundo dados da literatura foram observados que a abundância desses ácidos é similar a dos hidrocarbonetos correspondentes, o que descartaria a formação dos hidrocarbonetos pela simples descarboxilação do ácido.

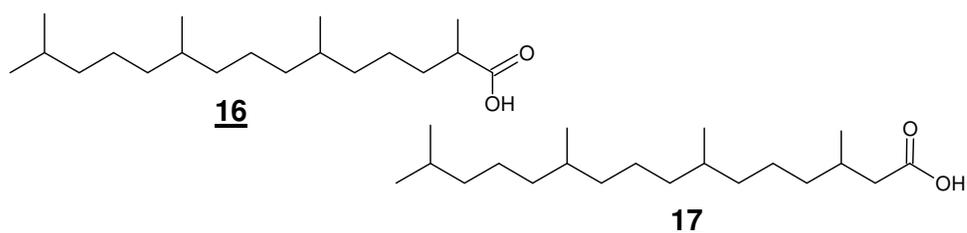


Figura 9: Estruturas dos ácidos pristanóico (**16**) e fitanóico (**17**).

Mackenzie e colaboradores (1982) observaram que os ácidos isoprenóides acíclicos demonstram que ocorre isomerização nos centros quirais com o aumento da maturação térmica e que há diferentes velocidades de isomerização entre esses centros, em geral a isomerização é mais rápida no C-2 e C-3 (relacionado ao grupo carboxila) do que no C-4 (Figura 10). Os autores sugeriram que a adsorção dos ácidos carboxílicos em sítios catalíticos pode ser o principal fator de controle da velocidade de isomerização.

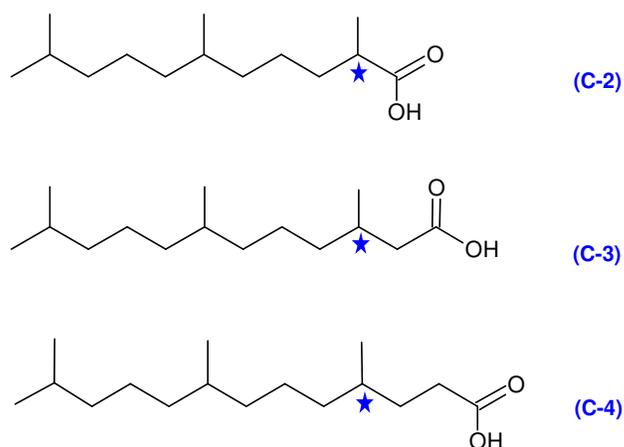


Figura 10: Isoprenóides acíclicos.

2.2.3. Ácidos terpanóicos tricíclicos e pentacíclicos

Os compostos tricíclicos mais abundantes são do tipo queilantano **18** e podem ocorrer como uma série homóloga variando de C₂₀ a C₂₆ a cadeia lateral ligada no C-14 (Figura 11).

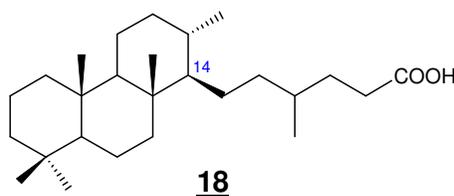
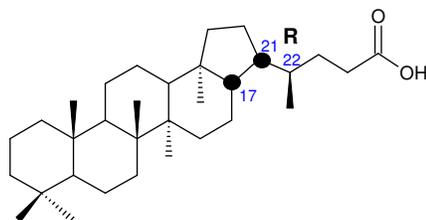


Figura 11: Estruturas de um ácido carboxílico tricíclico tipo queilantano (C₂₆) (**18**).

Em relação aos ácidos hopanóicos (pentacíclicos), a presença do ácido hopanóico (C₃₂) **19** (Figura 12) de configuração biológica 17 β (H), 21 β (H), ocorrendo apenas com um dos epímeros em C-22 e acompanhado da presença do hidrocarboneto correspondente com um carbono a menos, o 17 β (H), 21 β (H)-homohopano, pode ser um indicativo de que o ácido se origina diretamente do organismo vivo e reforça a hipótese de que o hidrocarboneto deriva do ácido graxo por descarboxilação.

De acordo com Bennett e Abbott (1999), os ácidos hopanóicos associados aos organismos vivos podem ser a principal fonte de hopanos, mas outro tipo de fonte inclui também os ácidos hopanóicos que estão ligados na matriz macromolecular (querogênio, asfalto) e podem ser liberados como ácidos livres ou são desfuncionalizados durante o processo de maturação.



19

Figura 12: Estrutura do ácido hopanóico (17β(H), 21β(H), 22R-C₃₂) (**19**).

Os ácidos hopanóicos com configuração 17β(H), 21β(H) geralmente são abundantes em sedimentos mais recentes e óleos biodegradados, neste último caso sugerindo que os ácidos 17β(H), 21β(H)-hopanóicos podem ser originários da biomassa bacteriana presente no reservatório.

Em amostras geológicas, além dos ácidos ββ-hopanóicos, podem também ser encontrados os isômeros termodinamicamente mais estáveis com configuração 17β(H), 21α(H), 22R (**20**) e 17α(H), 21β(H), 22R (**21**) e com epimerização no C-22 (**22**), resultado do efeito de maturação (Figura 13) (Jaffé & Gardinali, 1990).

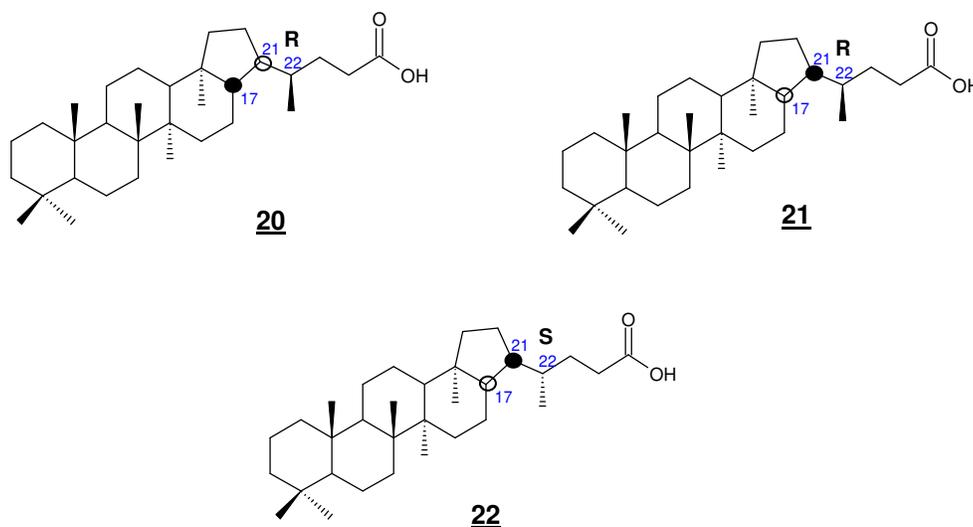


Figura 13: Estruturas dos ácidos C₃₂ hopanóicos β,α-R (20), α,β-R (21) e α,β-S (22).

Entretanto, em amostras maduras os ácidos hopanóicos podem estar ausentes ou presentes em concentrações baixas, sendo menos abundantes que os hopanos (Farrimond *et al.*, 2002). Este fato sugere que a presença de ácidos hopanóicos em óleos de reservatório é um indicativo de contaminação do óleo durante a migração através de sedimentos imaturos, ou formação durante o processo de biodegradação (Behar e Albrecht, 1984), tanto por oxidação bacteriana de hopanos quanto pela incorporação da biomassa da bactéria degradante (Meredith *et al.*, 2000). Os ácidos carboxílicos presentes em óleo cru podem ser originados de três diferentes fontes: ácidos originais da própria rocha geradora, produtos da biodegradação do óleo e também aqueles biossintetizados pelos próprios organismos que causam a biodegradação.

A presença de quantidade pequena de ácidos carboxílicos hopanóicos em matéria orgânica de origem algálica e com contribuição de matéria orgânica terrestre pode ser um indicativo do retrabalhamento da matéria orgânica por bactéria, onde os ácidos hopanóicos C₃₁ e C₃₂ com configuração 17α(H), 21β(H)-(22R) são geralmente predominantes, com menor quantidade dos isômeros 17β(H), 21α(H) e 17β(H), 21β(H) (Koike *et al.*, 1992).

Nos experimentos realizados por Watson e colaboradores (2002), foi observado que a presença de ácidos hopanóicos com configuração $17\alpha(H)$, $21\beta(H)$ em amostras muito biodegradadas indica que hopanos também podem ter sua cadeia lateral oxidada.

Segundo Meredith e colaboradores (2000), a abundância relativa de ácidos carboxílicos de cadeia longa pode ser utilizada para diferenciar biodegradação e processos de preenchimento de reservatórios, sugerindo que os biomarcadores ácidos promovem informações paralelas às que são obtidas pela análise dos hidrocarbonetos.

Nascimento e seus colaboradores (1999) utilizaram ácidos naftênicos como biosensores de migração de óleo, evolução térmica e biodegradação em óleos de bacias sedimentares brasileiras. Como parâmetro de biodegradação, estes autores utilizaram a razão entre ácidos tricíclicos e pentacíclicos terpenóicos onde uma razão < 1 foi obtida para óleo levemente biodegradado e valores > 1 foram indicativos de biodegradação severa.

Behar e Albrecht (1984) observaram que ácidos pentacíclicos e hidrocarbonetos sofrem mecanismos de degradação similares, mas os *n*-alcanos parecem ser mais resistentes do que os ácidos correspondentes, os quais sofrem modificações significativas em baixos níveis de degradação. Também, segundo esses autores, os ácidos hopanóicos podem ser utilizados como indicadores de biodegradação e os terpenóides tricíclicos são mais resistentes aos processos de biodegradação e, portanto, tendem a ser concentrados em óleos degradados. A ocorrência de famílias de tricíclicos e pentacíclicos ácidos e hidrocarbonetos sugere que ambas as classes de compostos são originadas de precursores biológicos em comum, que passaram por caminhos diagenéticos diferentes na subsuperfície.

Pan e Philp (2006) encontraram três famílias de ácidos hopanóicos: ácidos 17,21-secohopanóicos **23** (identificado em óleo degradado e não-degradado), 25-norhopanóicos **24** e 28-norhopanóico **25** (Figura 14). A presença de ácido C_{31} 17,21-secohopanóico pode indicar que a formação do ácido se dá pela abertura do anel e oxidação da cadeia lateral.

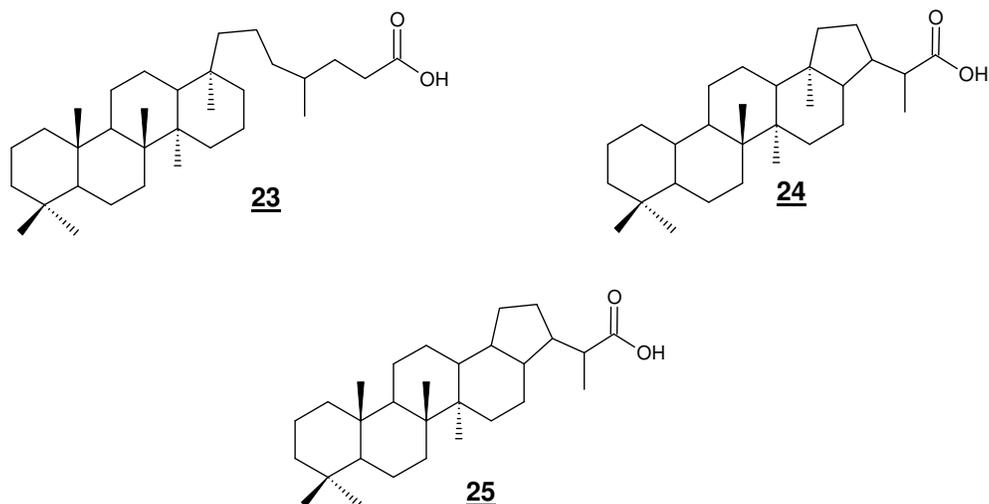


Figura 14: Estrutura da família de ácidos identificados por Pan e Philp, 2006. (13,21-secohopanoicos (23); 25-norhopanoicos (24) e 28-norhopanoicos (25).

Para Pan e Philp (2006) ácidos 25-norhopanoicos podem ser formados em dois estágios, com remoção da metila na primeira etapa seguida pela oxidação da cadeia lateral. Entretanto, Bennett e colaboradores (2007) sugerem que ácidos 25-norhopanoicos possam ser oriundos de diferentes fontes: carboxilação de 25-norhopanos, desmetilação de ácidos hopanoicos e/ou direta contribuição microbiana. Porém, a ausência de 25-norhopano com configuração $17\beta(H)$, $21\beta(H)$ em óleos sugere que a carboxilação é um caminho inviável para formação do ácido $17\beta(H)$, $21\beta(H)$ 25-norhopanoico. A configuração menos estável $17\beta(H)$, $21\beta(H)$ pode ser um composto derivado diretamente dos microorganismos responsáveis pela degradação do petróleo, pela desmetilação do ácido $17\beta(H)$, $21\beta(H)$ -hopanoico, formado pela diagênese do bacteriohopanopoliol, dentro do reservatório no contato óleo/água.

2.2.4. Ácidos esteranoicos

Os primeiros a serem detectados em óleos crus foram 5 α -pregnano-20-carboxílico (**26**) e 5 α -colânico-C₃₄ (**27**) identificados por Seifert e colaboradores em 1972 (Figura 15).

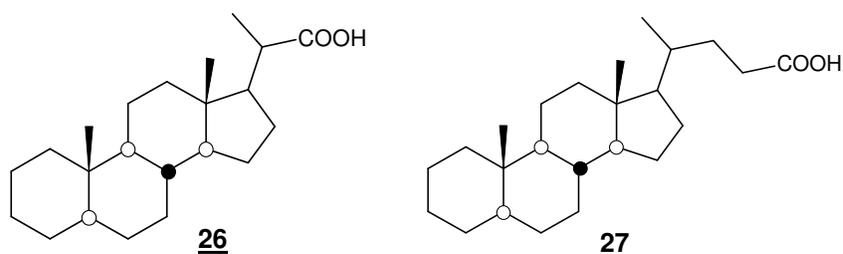


Figura 15: Estruturas de ácidos esteranoicos 5 α -pregnano-20-carboxílico (**26**) e 5 α -colânico-C₃₄ (**27**).

Schaffer e colaboradores (1993) observaram a ocorrência de ácidos 3-alquil-esteranoicos em rochas carbonáticas e sugerem que a presença de tais compostos é característica de ambiente marinho evaporítico, se originando de um precursor resultante da combinação, produzida por atividade microbiana, de Δ^2 -estereno com uma molécula de açúcar, o que seria análogo ao hopanotetrol (Schaeffer *et al.*, 1993).

Lima e colaboradores (2010), analisando extrato de rocha geradora lacustre salina da Bacia de Campos, identificaram uma nova classe de ácido 3-propilesteranoico com o grupo funcional na cadeia lateral, sugerindo que estes compostos são marcadores de biodegradação.

2.2.5. Métodos de Análise de Ácidos Graxos

A determinação de ácidos totais é uma análise que segue os padrões ASTM D 974 (IP 139/86) e ASTM D 664, porém esses métodos fornecem informações apenas sobre o número de ácidos totais ou número de neutralização e não fornecem qualquer informação composicional dos ácidos orgânicos presentes nos óleos (Jones *et al.*, 2000). Alguns métodos descritos na literatura para análise de ácidos carboxílicos utilizam etapas de extração ou saponificação ou uso de sílica gel impregnada com KOH (Koike *et al.* 1992; Lima *et al.* 2010). Para análise dos ácidos carboxílicos há uma série de métodos tais como espectroscopia no infravermelho, cromatografia gasosa, espectrometria de massas e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Várias técnicas de derivatização têm sido utilizadas no isolamento das frações ácidas antes das análises de CG e EM, incluindo técnicas de metilação utilizando BF_3/MeOH ou diazometano e esterificação utilizando flúor álcool.

Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas é a técnica mais utilizada para análise estrutural de ácidos graxos (Dubois *et al.*, 2009). As análises por cromatografia geralmente são feitas com os ácidos carboxílicos na forma de ésteres metílicos, entretanto não é possível a localização de ramificações, duplas ligações ou outras insaturações, porque as informações estruturais obtidas com o espectro de massas de FAME (ácidos graxos como metil ésteres do inglês, *Fatty Acids Methyl Ester*), insaturado ou funcionalizado, são limitadas, devido à migração da insaturação na ionização da molécula.

Os compostos ácidos presentes em óleos não são apenas os ácidos naftênicos, mas incluem também outros ácidos orgânicos que contêm átomos de N e S bem como outros compostos com vários níveis de insaturação e aromaticidade, o que torna difícil a sua separação e identificação. Os primeiros métodos para análise para a contribuição de ácidos naftênicos em óleos eram realizados por análise no infravermelho com transformada de Fourier. Com a aplicação da espectrometria de massas foi possível determinar o grau de

alquilação e ramificação dos ácidos com aplicação na caracterização de fonte de ácidos naftênicos em óleos de diferentes regiões. Dentro da espectrometria de massas várias técnicas são utilizadas para ionização das moléculas: ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), ionização química em pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*), ionização por elétrons (IE) e ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*).

Muitas análises para a caracterização de ácidos em amostras ambientais são realizadas por CG-EM utilizando IE como método de ionização, onde os ácidos são identificados na forma de ésteres de ácidos carboxílicos. Neste caso os ácidos carboxílicos presentes nas amostras devem ser previamente derivatizados. A vantagem do uso de CG-EM para análise de ácidos naftênicos é a alta sensibilidade de detecção, o que a torna uma boa técnica para análise quantitativa de ácidos naftênicos totais e para séries de ácidos naftênicos.

Métodos de ionização branda também têm sido utilizados para a caracterização direta de ácidos carboxílicos, não necessitando, neste caso, da etapa de derivatização. Os métodos de ionização branda mais empregados são ESI e APCI, cujas técnicas resultam em espectros de massas com poucos fragmentos.

Hsu e colaboradores (2000), estudando a distribuição molecular de ácidos naftênicos em óleos, avaliaram algumas técnicas de ionização branda tais como CI, ESI e APCI, no modo positivo e negativo. Como resultado observaram que APCI no modo negativo foi a técnica mais sensível e seletiva para a determinação dos ácidos (Hsu *et al.*, 2000).

Comatografia gasosa bi-dimensional acoplada à espectrometria de massas (Tempo de voo) (CGxCG/TDV-EM) é uma ferramenta para análise de misturas complexas tais como ácidos naftênicos. Hao e colaboradores, em 2005, fizeram a caracterização de uma mistura de ácidos naftênicos utilizando esta técnica e observaram que somente a informação proveniente desta análise não é suficiente para caracterizar isômeros presentes numa mistura de ácidos naftênicos (Hao *et al.*, 2005).

Na literatura há muitos métodos para a análise qualitativa de ácidos naftênicos (Green *et al.*, 1985; Fan, 1991; Barrow *et al.*, 2004; Headley *et al.*, 2007) em amostras ambientais, entretanto não há uma técnica universal para análise de misturas de ácidos naftênicos.

2.3. Orbitrap: Técnica e aplicações

Várias áreas de pesquisa, tais como proteômica e metabolômica, estão impulsionando a demanda por espectrômetros de massa de altíssima resolução e exatidão. A proteômica estuda os processos biológicos através da análise sistemática das proteínas expressas nas células ou tecidos, em consequência direta das condições externas e do estado do organismo em um determinado momento (Pereira et al., 2005). Já a metabolômica significa o estudo global do perfil metabólico de uma dada célula, tecido, fluido, órgão ou organismo em um dado instante. De certa forma representa a bioquímica pós-genômica (Pereira et al., 2005).

Na área de petróleo, não é diferente. A petroleômica vem se destacando como uma ferramenta essencial na avaliação de compostos polares presentes em óleos crus.

A espectrometria de massas de alta resolução surgiu como uma ferramenta de valor inestimável para analisar a composição química do petróleo. Sua sensibilidade para as frações polares e não voláteis a torna complementar às tradicionais técnicas, tais como CG e CG-EM.

Um analisador de massas de alta resolução lançado recentemente no mercado, em 2004, foi o LTQ Orbitrap XL (*Thermo Scientific*). É um equipamento híbrido que combina um analisador de baixa resolução (LTQ) e um analisador de alta resolução que pertence a classe dos FT-MS (Orbitrap) (Figura 16).

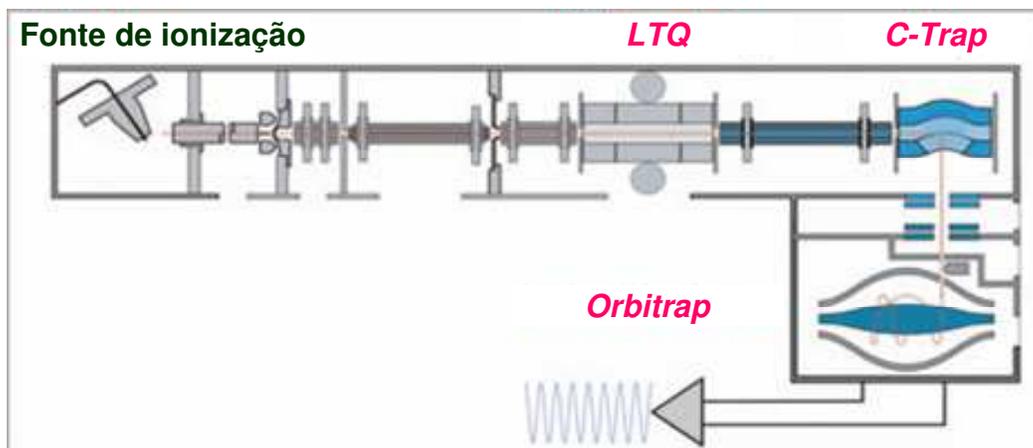


Figura 16: Diagrama esquemático do LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific)

Embora seja bastante novo, o orbitrap foi projetado com base no Trap de Kingdom, que foi desenvolvido em 1922 (Watson & Sparkman, 2007). O Orbitrap consiste de dois eletrodos na forma de eletrodos co-axiais simétricos, uma superfície externa cilíndrica e um eletrodo interno orientado na forma de eixo. Um potencial elétrico constante é aplicado entre estes dois eletrodos (não há campo magnético ou potenciais elétricos oscilantes envolvidos). As superfícies opostas dos eletrodos não são paralelas. Assim, o campo elétrico entre as duas superfícies varia em função da posição ao longo do eixo z, o eixo longitudinal dos dois eletrodos co-axiais, e é mínimo no ponto de maior distância entre as superfícies dos eletrodos, ou seja, no centro do orbitrap, como mostrado na Figura 17. Valores de m/z são medidos ao longo do eixo do campo elétrico a partir da frequência de oscilações harmônicas dos íons orbitalmente aprisionados. A frequência destas oscilações harmônicas é independente da velocidade dos íons e é inversamente proporcional à raiz quadrada da relação m/z . Orbitraps têm uma alta precisão de massa (2-5 ppm), um alto poder de resolução (até 150.000), uma alta faixa de relação massa/carga (de 6000) e uma faixa dinâmica maior que 10^3 (Watson & Sparkman, 2007).

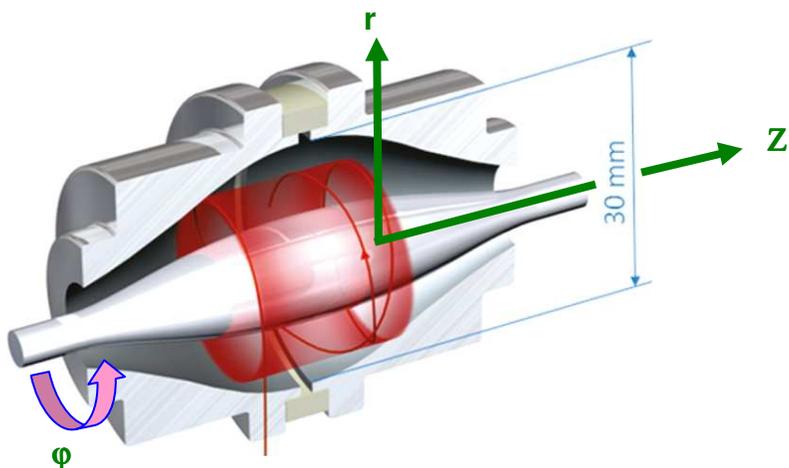


Figura 17: Esquema tridimensional da célula Orbitrap (Extraído de Pomerantz *et al.*, 2011).

Na Tabela 1 estão listadas as principais vantagens e desvantagens associadas ao espectrômetro de massas Orbitrap.

Tabela 1: Vantagens e Desvantagens do espectrômetro de massas Orbitrap

<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Acessório simples e de tamanho reduzido	Requer baixa pressão porque necessita um caminho livre de ~100 km
Poder de resolução acima de 70.000	Alto custo quando comparado ao 3D e ao QIT linear
Alta razão sinal/ruído como no FT-ICR (Vantagem de Fellgett)	Aprisionamento ineficiente dos produtos iônicos
Desempenho comparável ao FT-ICR sem necessidade de criogenia	
A dissociação induzida por colisão (CID) pode ser realizada no LTQ, C trap ou no Orbitrap	

O Orbitrap pode ser aplicado em uma variedade de amostras provenientes de matrizes complexas, permitindo a identificação de uma grande diversidade de moléculas orgânicas ainda que presentes em baixíssimas concentrações

(Hogenboom *et al.*, 2009; Bateman *et al.*, 2009; Taguchi & Ishikawa, 2010; Luo *et al.*, 2010; Pomerantz *et al.*, 2011). A elucidação estrutural por meio de medições exatas das massas moleculares, e a comparação com os compostos orgânicos de referência sintetizados, permitem não somente identificar compostos com diferentes grupos funcionais, como também podem ajudar a revelar a identidade de um dado composto desconhecido (Hogenboom *et al.*, 2009).

Pomerantz e colaboradores (2011) utilizaram o Orbitrap para análises de compostos não-voláteis de petróleo. Neste estudo, o espectro de massas de alta resolução de uma amostra de petróleo foi obtido em um Orbitrap no modo negativo de ionização ESI. Os resultados foram comparados com o espectro de massa da mesma amostra obtido por ESI FT-ICR, sendo FT-ICR: Ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier. Os dados foram adquiridos em configurações de resolução de 100 000 no formato de perfil completo. O analisador de massas Orbitrap forneceu resolução de massa inferior ao equipamento FT-ICR, mas ainda suficiente para atribuir fórmulas moleculares de componentes individuais presentes em misturas, especialmente aqueles componentes presentes em abundância relativamente alta. De fato, a resolução do Orbitrap foi comparável ao obtido por instrumentos FT-ICR de uma década atrás, época na qual o FT-ICR estava sendo usado com sucesso na caracterização do petróleo. Na Figura 18 é mostrada a distribuição das classes determinadas por FT-ICR e pelo Orbitrap. Observa-se que as mesmas são similares, sendo que em ambos os casos as classes dominantes são N e O2. Uma outra avaliação realizada foi a comparação da composição das séries de DBE (*double bond equivalent*) para uma dada classe.

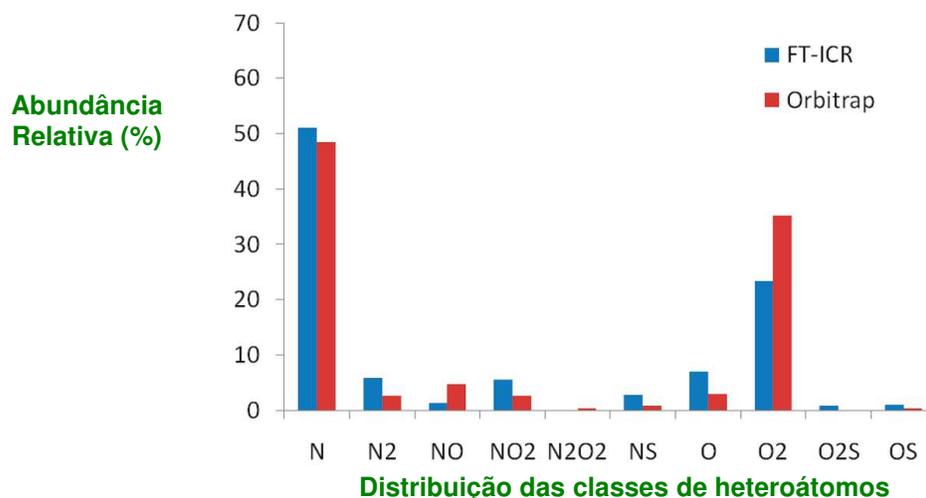


Figura 18: Distribuição das classes medidas por FT-ICR e Orbitrap (Pomerantz *et al.*, 2011).

A Figura 19 apresenta a distribuição de DBE para as espécies $C_cH_hO_2$ medidas por FT-ICR e Orbitrap. Novamente as distribuições são similares, embora não sejam perfeitamente sobrepostas.

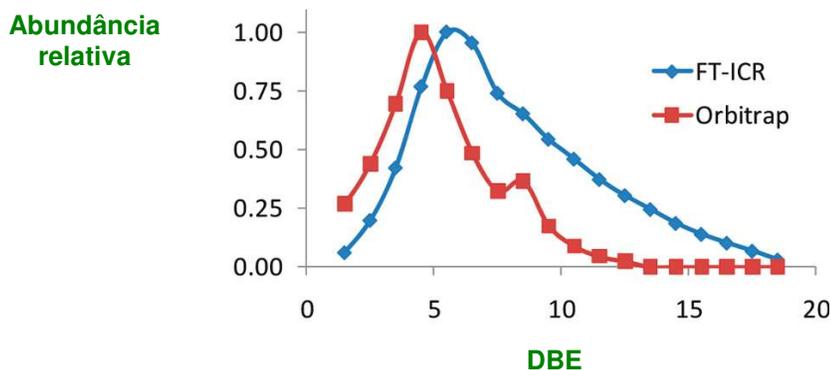
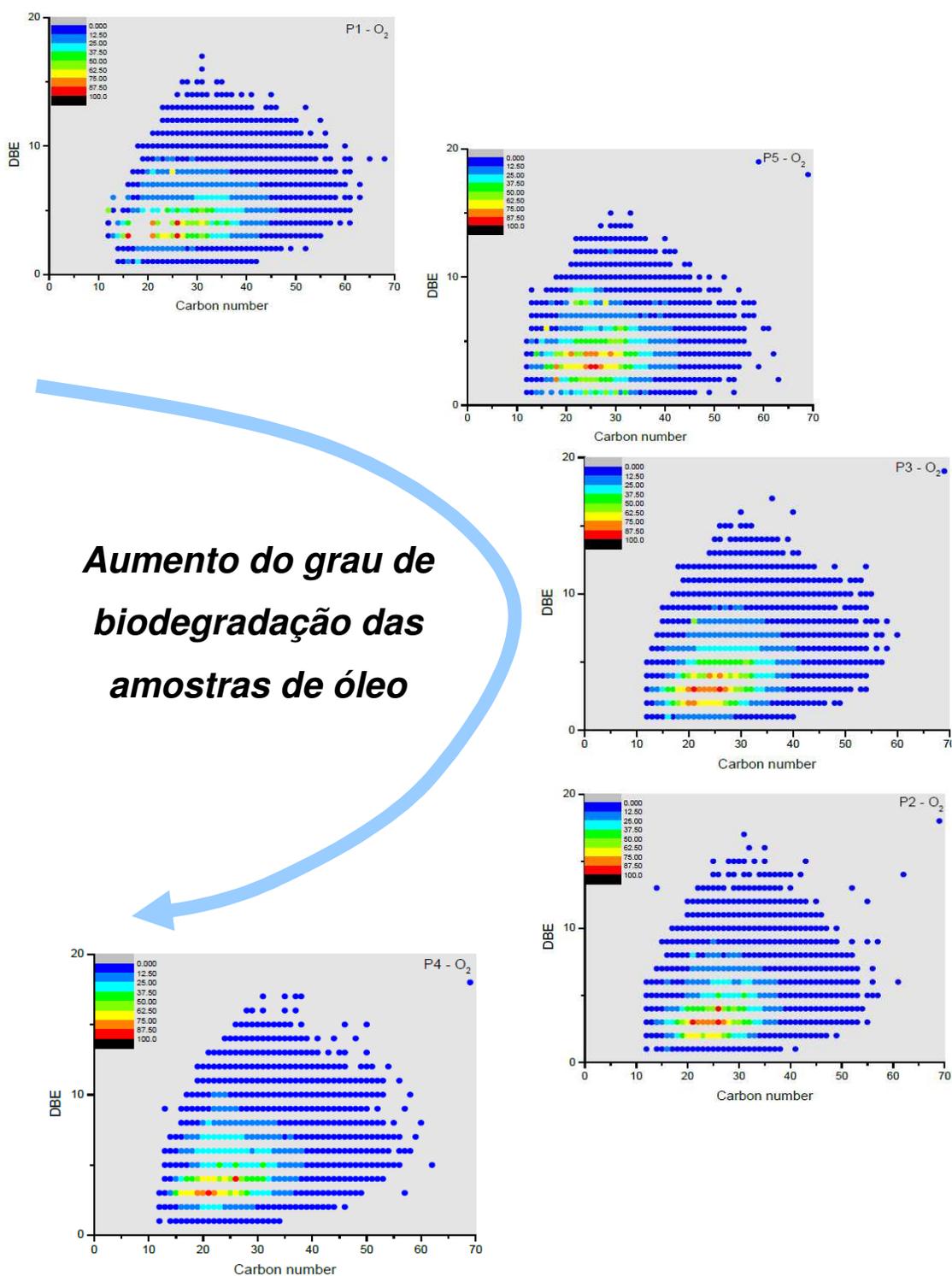


Figura 19: Distribuição das DBE para as espécies $C_cH_hO_2$ medidas por FT-ICR e Orbitrap (Pomerantz *et al.*, 2011).

Angolini e colaboradores (2011) analisaram recentemente extratos ácidos de petróleos lacustres biodegradados da Bacia de Campos utilizando o Orbitrap. Eles trabalharam com cinco petróleos com diferentes níveis de biodegradação,

variando de 1 a 7 de acordo com a escala de biodegradação Peters e Moldowan (1993). Os resultados mostraram variação sutil na distribuição dos ácidos carboxílicos, em função do DBE, conforme aumentava a biodegradação dos óleos (Figura 20).



Aumento do grau de biodegradação das amostras de óleo

Figura 20: Distribuição das DBE para as espécies $C_cH_nO_2$ medidas por ESI (-) LTQ XL Orbitrap das frações ácidas dos petróleos P1, P2, P3, P4 e P5 (Modificado de Angolini *et al.*, 2011).

2.4. Aspectos geológicos da Bacia Potiguar e seleção de amostras

A Bacia Potiguar está localizada na margem equatorial brasileira e cobre uma área aproximada de 50.000 km² incluindo um segmento emerso e outro submerso (Pessoa Neto *et al.*, 2007). É uma das bacias petrolíferas mais prolíficas do Brasil, sendo a exploração de petróleo iniciada na década de 60. A gênese da bacia está associada à separação dos continentes sul-americano e africano e a formação do oceano Atlântico Sul a partir do final do Jurássico (Szatmari *et al.*, 1987; Françolin & Szatmari, 1987; Matos, 1992; Souza-Lima & Hamsi Junior, 2003).

Dentro do contexto de sistemas petrolíferos, as acumulações de petróleo nas porções *onshore* e *offshore* na Bacia Potiguar são correlacionadas às rochas geradoras de duas unidades litoestratigráficas: Formação Pendência e Formação Alagamar (Rodrigues, 1983; Mello, 1988; Mello *et al.*, 1988a, b, 1993; Santos Neto *et al.*, 1990, 1998a,b; Santos Neto, 1996; Trindade, 1992; Trindade *et al.*, 1992; Penteado, 1995; Santos Neto & Hayes, 1999).

A Formação Pendência de idade Eocretácica corresponde à fase rifte e é composta por pelitos de paleambiente lacustre ricos em querogênio tipo I (Figura 20).

A Formação Alagamar de idade Neoaptiana, representa a fase transicional dentro de cenário tectono-sedimentar continental para um cenário tectono-sedimentar marinho de evolução da bacia. A Formação Alagamar é composta por folhelhos e calcilitos ricos em querogênio do tipo I e II (Figura 21).

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

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

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

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

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

Fácies sedimentares= Conjunto de caracteres, de natureza genética, que serve como elemento de diferenciação de uma rocha. Duarte, 1997.

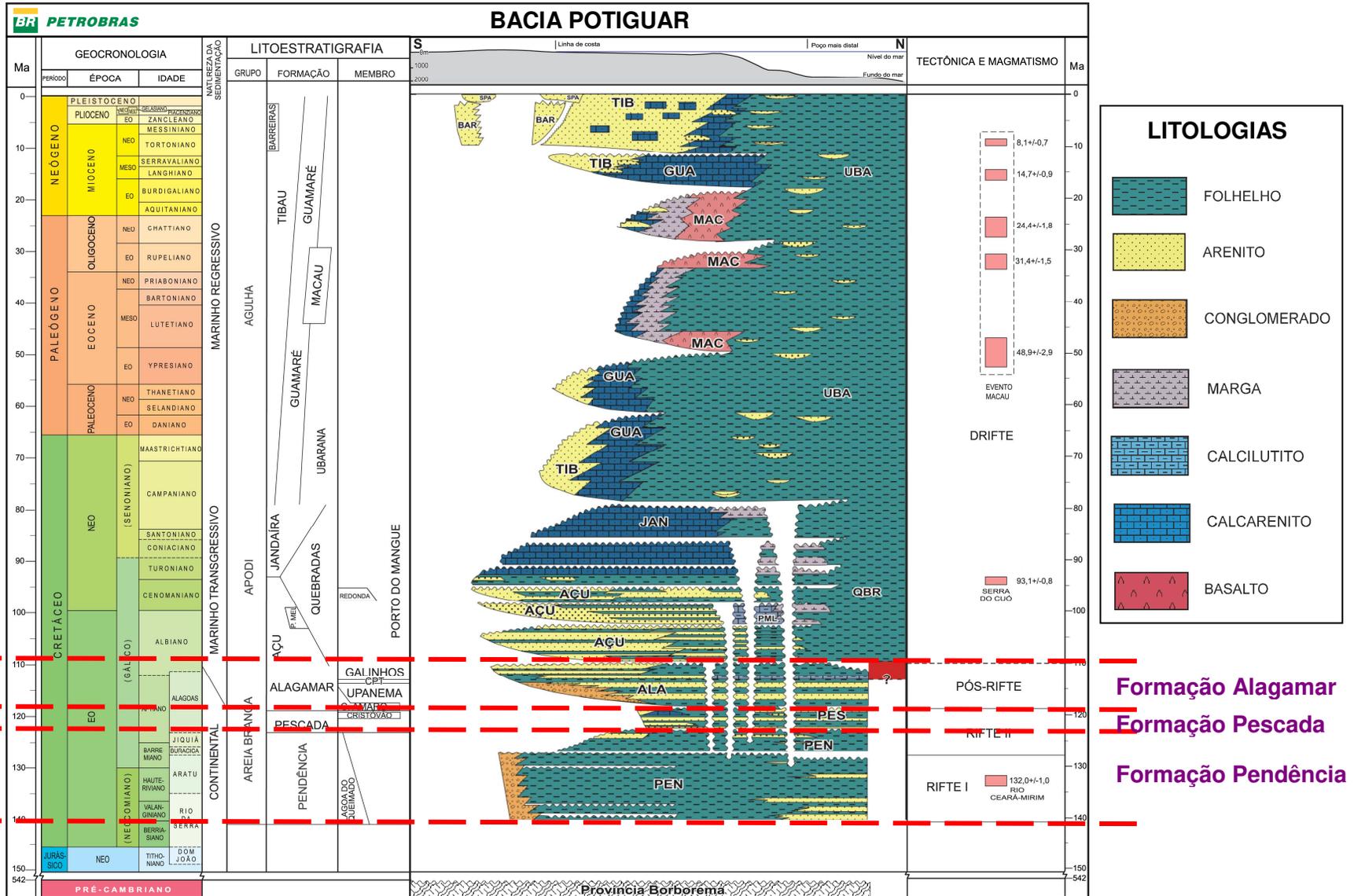


Figura 21: Carta Estratigráfica da Bacia Potiguar (Extraída de Pessoa Neto *et al.*, 2007).

Justifica-se a escolha da Bacia Potiguar para esse estudo devido ao fato dos óleos nela produzidos terem herdado diferenças composicionais de dois sistemas petrolíferos muito distintos. Isso é devido às heterogeneidades dos ambientes deposicionais das respectivas rochas geradoras e, em parte, também às alterações pós-genéticas relacionadas às variações da intensidade da preservação dos óleos. Isso propicia a existência de um material para estudo com variações composicionais muito significativas, especialmente entre os biomarcadores, e que contribuirão para aumentar significativamente a eficiência dos métodos geoquímicos para acessar os processos de geração, migração, acumulação e biodegradação de óleos dos sistemas petrolíferos explorados na bacia.

O material de estudo escolhido para essa pesquisa compreende nove óleos produzidos da porção emersa da bacia, (Figura 22) e representam os óleos de origem lacustre de água doce da Formação Pendência e os óleos da fase transicional da Formação Alagamar.

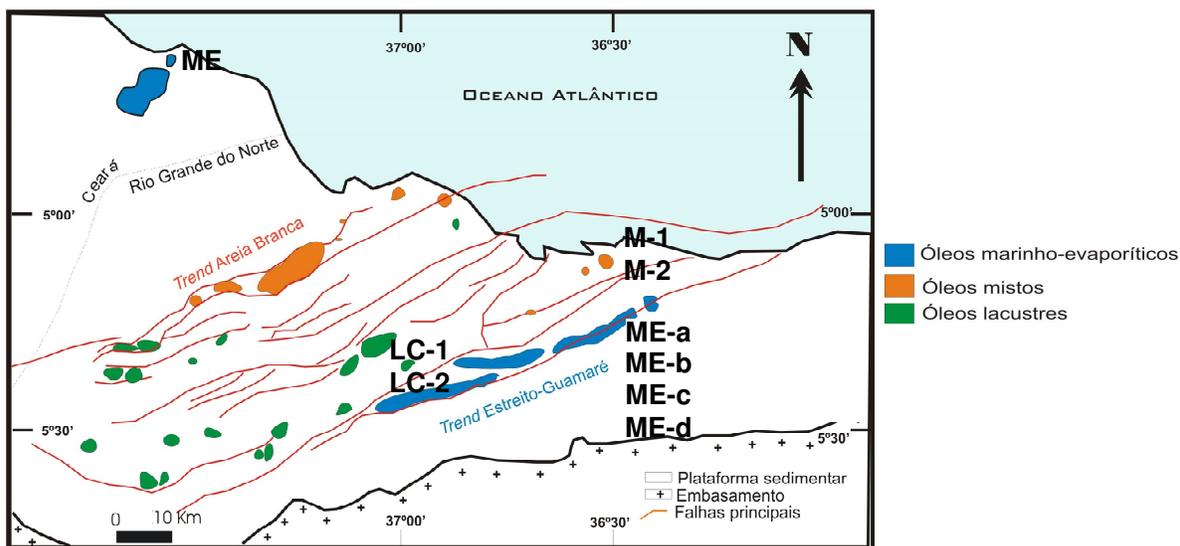


Figura 22: Mapa de localização das amostras de óleos (Conjuntos I e II) selecionadas para o estudo (Bacia Potiguar) (Modificado de Santos Neto *et al.*, 1990).

2.4.1. Características moleculares dos óleos da Bacia Potiguar

Os óleos recuperados na Bacia Potiguar foram classificados em três classes, sendo: óleos lacustre gerados pela Formação Pendência (**LC**), óleos marinho evaporíticos gerados pela Formação Alagamar (**ME**) e óleos resultantes da mistura desses dois últimos (**M**). Essas classificações foram realizadas e publicadas por diversos autores como Rodrigues *et al.*, 1983; Santos Neto *et al.*, 1990; Santos Neto *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 1984; Cerqueira, 1985; Trindade, 1992 e Trindade *et al.*, 1992; Moraes, 2007. As principais técnicas utilizadas foram cromatografia gasosa, análises de biomarcadores utilizando espectrometria de massas e isótopos estáveis de Carbono e Hidrogênio. As características básicas desses óleos estão descritas abaixo:

2.4.1.1. Óleos Gerados pela Formação Pendência

Os óleos gerados por esta formação estão concentrados principalmente na porção sudoeste da parte emersa da Bacia Potiguar, limitada pelo alinhamento estrutural de orientação aproximada leste-oeste, que passa ao sul da cidade de Mossoró e norte dos Campos de Serraria e Janduí, sendo caracterizados como óleos lacustres de água doce. Os óleos que caracterizam este ambiente ocorrem também nas Bacias do Ceará, Sergipe-Alagoas e Bahia Sul, na margem equatorial e nordeste do Brasil (Mello *et al.*, 1984).

As principais características geoquímicas desse tipo de óleo são: elevada abundância relativa de hidrocarbonetos saturados (> 60%); baixo teor de enxofre (< 0,1%) e valores isotópicos de carbono $\delta^{13}\text{C}$ menores que $-28,0\text{‰}$; e distribuição simétrica de *n*-alcanos com valores da relação pristano/fitano superior a dois (2,0); dentre os terpanos, observa-se a ausência ou baixa razão bisnorhopano/hopano; baixa proporção relativa do gamacerano em relação ao hopano; baixa concentração de esteranos, com predomínio dos isômeros C_{29} sobre os homólogos C_{27} e C_{28} ; e ausência dos C_{30} -esteranos (2-, 3- e 4-metil esteranos), dinosteranos, β -carotano e 28,30-bisnorhopanos.

2.4.1.2. Óleos Gerados pela Formação Alagamar

São aqueles que foram gerados principalmente pelos folhelhos transicionais da Formação Alagamar (Membro Galinhos) e margas da camada Ponta do Tubarão. Os óleos pertencentes a essa classe apresentam como principais características geoquímicas, porcentagem de hidrocarbonetos saturados em torno de 55%, teor de enxofre consideravelmente elevado para os óleos brasileiros (>0,5%) e valores de $\delta^{13}\text{C}$ maiores que $-26,6\text{‰}$; predominância dos *n*-alcanos de baixo peso molecular (<*n*-C₁₉); maior abundância de fitano relativamente ao pristano; ligeira predominância par/ímpar na distribuição dos *n*-alcanos; baixa razão hopano/esterano; presença de C₃₀-esteranos (2-, 3- e 4-metil esteranos) e dinosteranos; alta abundância relativa de β -carotano e gamacerano; razão Ts/Tm menor que 1; Razão C₃₅/C₃₄-hopano maior ou igual a 1; alta abundância de C₂₇ esteranos relativamente ao homólogo C₂₉.

2.4.1.3. Óleos Mistos

Os óleos mistos (**M**) são resultantes da mistura dos óleos marinho evaporíticos (**ME**) com óleos gerados a partir de folhelhos lacustres de água doce do Membro Upanema da Formação Alagamar (**LC**). Apresentam predominância de características geoquímicas ora relacionadas a ambiente lacustre de água doce, ora a ambiente marinho evaporítico.

Os óleos **M** e **ME** apresentam variáveis graus de evolução térmica, ou seja, foram originados a partir de rochas geradoras com diferentes graus de maturação. Aqueles de maior evolução térmica ocorrem ao longo de uma faixa balizada pela linha de charneira de Areia Branca, ao Norte da cidade de Mossoró, estendendo-se até a plataforma continental.

É comum os óleos marinho evaporíticos e os mistos apresentarem biodegradação. Em alguns, a biodegradação é incipiente, notando-se apenas um decréscimo relativo aos *n*-alcanos de baixo peso molecular. Já em outros, a

biodegradação agiu severamente, eliminando quase que todos os alcanos normais e desmetilando os hopanos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo foram descritos os procedimentos utilizados para avaliação geoquímica dos óleos através de análises do óleo total, bem como obtenção de suas frações principais para posteriores análises qualitativas e quantitativas de biomarcadores hidrocarbonetos. Também estão descritos os métodos utilizados para obtenção e limpeza dos extratos ácidos dos petróleos e os procedimentos adotados para síntese e caracterização dos biomarcadores ácidos carboxílicos e hidrocarboneto propostos neste trabalho.

3.1. Protocolo analítico

As técnicas analíticas empregadas para realização deste trabalho estão listadas abaixo seguidas de um fluxograma que ilustra as várias etapas deste trabalho (Figura 23).

- ❖ **AE-EMRI** (Análise elementar acoplada à espectrometria de massas para medição de razão isotópica) para análise de isótopos estáveis de ^{13}C ;
- ❖ **CG-DIC** para análise do óleo total (perfil de distribuição dos hidrocarbonetos);
- ❖ **CLMP** para separação semi-preparativa das amostras de óleo nas frações de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos polares; *Embora sejam comuns as análises de hidrocarbonetos aromáticos por CG-EM, neste trabalho estas análises não foram realizadas tendo em vista que não seriam fundamentais para o atingimento dos objetivos propostos;*

- ❖ **CG-EM** no modo de monitoramento seletivo de íons para análise de alguns biomarcadores hidrocarbonetos específicos presentes na fração de hidrocarbonetos saturados e ésteres metílicos correspondentes aos biomarcadores ácidos;
- ❖ **CL** (coluna aberta) para obtenção dos extratos ácidos de petróleo seguida de **SPE** para limpeza dos extratos ácidos;
- ❖ **Orbitrap** para análise direta dos extratos ácidos de petróleo e padrões de biomarcadores ácidos sintetizados neste trabalho;
- ❖ **Síntese** dos padrões ácidos e hidrocarboneto utilizados na quantificação dos biomarcadores por CG-EM e avaliação estrutural utilizando Orbitrap.

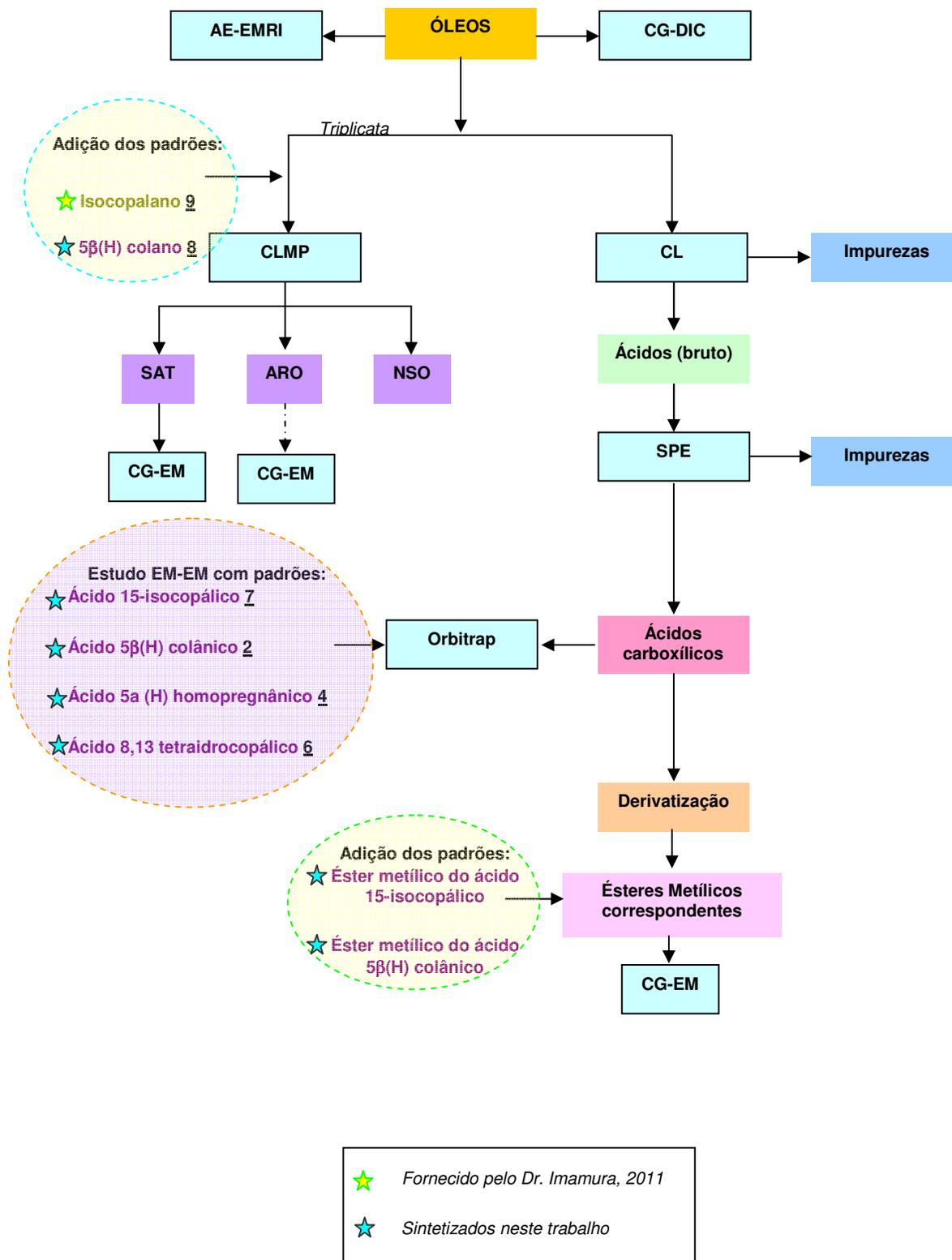


Figura 23: Técnicas analíticas empregadas na realização deste trabalho.

3.2. Isótopos estáveis de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$)

Por definição, o termo “isótopos” refere-se aos átomos cujos núcleos contêm o mesmo número de prótons (ou número atômico), mas um número diferente de nêutrons (Hoefs, 2004).

A notação delta é definida segundo a equação abaixo:

$$\delta^{13}\text{C}_{amostra} = \frac{(R_{amostra} - R_{padr\tilde{a}o})}{R_{padr\tilde{a}o}} * 1000 \text{‰}$$

onde R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e de um padrão de referência internacionalmente aceito. O valor de delta é, portanto, uma diferença relativa de razão isotópica entre a amostra e um padrão, e é expresso em partes por mil (‰). Utilizou-se como referência um padrão secundário ajustado ao padrão internacional PDB (Carbonatos de *belemnites* da Formação *Pee Dee* do Estado da Carolina do Sul, EUA).

A razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de hidrocarbonetos é utilizada para a caracterização e interpretação do paleoambiente de deposição. Ela reflete a composição isotópica original do CO_2 utilizado na fotossíntese, e é dependente do tipo de organismo fotossintetizador, da produtividade e preservação da matéria orgânica, assim como dos processos sin- e pós-deposicionais. O processo de fotossíntese concentra preferencialmente ^{12}C na matéria orgânica, pois é o isótopo mais leve, de modo que a sua razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ é menor do que do CO_2 empregado em suas reações.

A determinação do $\delta^{13}\text{C}$ em amostras de óleos e extratos, além de outros geomateriais, é realizada através de um equipamento denominado analisador elementar que é acoplado a um espectrômetro de massas para razão isotópica.

Para esta análise, pesou-se cerca de 0,5 mg da amostra de óleo em uma cápsula de estanho. Esta foi então inserida no amostrador automático do analisador elementar. Ao se iniciar o procedimento analítico, a cápsula contendo a

amostra foi levada à combustão quantitativa em um reator de oxidação mantido a 900 °C, contendo os reagentes óxido de cromo e prata / óxido de cobalto (II, III), Cr_2O_3 e $\text{Ag} / \text{Co}_3\text{O}_4$, gerando assim, dióxido de carbono, água e óxidos de nitrogênio (CO_2 , H_2O e N_xO_y , respectivamente). Estes gases foram então levados a um reator de redução, recheado com cobre elementar (Cu) e aquecido a 680 °C, para que os compostos N_xO_y formados fossem reduzidos a nitrogênio (N_2). Esses gases passaram por um agente dessecante (coluna recheada com perclorato de magnésio, MgClO_4 , composto conhecido como anidrônio), que possui a função de reter as moléculas de H_2O presentes na mistura. As moléculas de CO_2 e N_2 foram, posteriormente, separadas em uma coluna cromatográfica recheada. As moléculas de CO_2 produzidas foram enviadas para a fonte de íons do espectrômetro de massas e sofreram ionização por impacto de elétrons, gerando os íons de massa 44, 45 e 46, os quais são detectados nos coletores de Faraday. Através dessa leitura, o equipamento calculou automaticamente os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de cada amostra.

3.3. Cromatografia em fase gasosa acoplada à detecção por ionização em chama (CG-DIC)

As análises de óleo total (*whole oil*) foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo HP-6890A (*Agilent Technologies*), equipado com injetor *split-splitless* e detector por ionização em chama (DIC), utilizando coluna capilar com fase estacionária 5% fenilmetilpolisiloxano (DB5, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno. x 0,25 µm de espessura da *J&W*). Uma alíquota de 1 µL de óleo diluído em diclorometano foi injetada no equipamento, cujo gás de arraste empregado foi o hélio, em velocidade de fluxo constante de 1,3 mL/min. As condições são mostradas na Tabela 2. O injetor foi mantido a uma temperatura de 300 °C e o detector a 340 °C.

Tabela 2: Programação de temperatura do forno do CG-DIC

Rampa do forno	°C/min	Temp. (°C)	Tempo de análise (min)
Inicial	-	40	-
Rampa	2,5	320	112
Após a análise	-	40	130

3.4. Cromatografia líquida de média pressão (CLMP)

A técnica de CLMP é usualmente aplicada na separação semi-preparativa das principais famílias de compostos presentes no petróleo, sendo as mesmas subdivididas em hidrocarbonetos saturados (SAT), hidrocarbonetos aromáticos (ARO) e compostos contendo heteroátomos como nitrogênio, enxofre e oxigênio, usualmente denominados compostos NSO ou resinas e asfaltenos. Utiliza-se cromatografia em fase normal, sendo o sistema composto por duas colunas de vidro empacotadas com sílica gel como adsorvente e *n*-hexano como fase móvel.

Foram pesadas cerca de 60 mg de cada amostra de óleo em frasco de 7 mL de capacidade, em triplicata. Em seguida, foram adicionados ao óleo os padrões 5 β (H) colano (6 μ g) e isocopalano (19 μ g). A amostra foi diluída em 1,0 mL de *n*-hexano e em seguida injetada, de forma manual no CLMP. Os compostos de natureza polar (NSO) ficaram retidos na pré-coluna, enquanto os SAT e ARO foram enviados para coluna principal, onde foram separados e em seguida coletados automaticamente. O intervalo de tempo no qual frações SAT e ARO foram coletadas é função dos resultados que são observados nos detectores de índice de refração (IR) e ultravioleta (UV). As frações de SAT e ARO foram concentradas à secura e posteriormente as frações SAT foram analisadas por CG-EM, após adição do padrão fixo D4colestano (1,04 μ g). A fração NSO foi recuperada utilizando-se solução de diclorometano:metanol (95:5) e posteriormente também foi evaporada à secura.

3.5. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo HP-6890 (*Agilent Technologies*) acoplado a um espectrômetro de massas.

Cerca de 1 μL da fração de hidrocarbonetos saturados diluída em *n*-hexano foi injetado no equipamento, no modo sem divisão de fluxo (*splitless*), cujo gás de arraste foi hélio num fluxo de 33 cm/s. Utilizou-se a coluna capilar *J&W*, de sílica fundida, com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno contendo 0,25 μm de espessura de fase estacionária.

A programação de tempo e temperatura utilizada na análise dos biomarcadores saturados está apresentada na Tabela 3.

Para as análises dos biomarcadores ácidos convertidos à ésteres metílicos utilizou-se modo de injeção sem divisão de fluxo para 1 μL de solução de ésteres metílicos em *n*-hexano (5 mg/mL) com programação tempo/temperatura mostrada na Tabela 3.

Os fragmentos de massas foram monitorados com o espectrômetro operando no modo monitoramento seletivo de íons (MSI), sendo os mesmos explicitados na

Tabela 4, no caso dos biomarcadores saturados, e Tabela 6 para os biomarcadores ácidos convertidos a ésteres metílicos. O modo de ionização por elétrons (IE) com energia de 70 eV e a temperatura da interface foi mantida em 310°C.

Tabela 3: Programação de temperatura do forno do CG-EM para análise dos biomarcadores hidrocarbonetos

Rampa do forno	°C/min	Temp. (°C)	Tempo de análise (min)
Inicial	-	55	-
Rampa 1	20,0	150	~ 4,8
Rampa 2	1,5	320	~109,6
Após a análise	-	55	125

Tabela 4: Íons monitorados para análise de biomarcadores hidrocarbonetos.

Íons monitorados para análise dos biomarcadores saturados (<i>m/z</i>)
177
191
217
218
221
253
259

Tabela 5: Programação de temperatura do forno do CG-EM para análise dos biomarcadores ácidos convertidos a ésteres metílicos

Rampa do forno	°C/min	Temp. (°C)	Tempo de análise (min)
Inicial	-	70	-
Rampa 1	20,0	150	4,0
Rampa 2	1,5	335	~124
Após a análise	-	55	160

Tabela 6: Íons monitorados para análise de biomarcadores ácidos convertidos a ésteres metílicos

Íons monitorados para análise dos biomarcadores ésteres metílicos (<i>m/z</i>)
74
177
191
217
218
231
253

3.6. Cromatografia líquida para obtenção do extrato ácido

Fez-se o isolamento da fração de compostos ácidos presentes nos óleos utilizando-se o método clássico de extração contínua em coluna contendo sílica gel impregnada com KOH em isopropanol (Koike *et al.*, 1992 e Lima *et al.*, 2010). A massa de óleo adicionada na coluna variou de acordo com a amostra, mostrada na Tabela 7.

Tabela 7: Massa de óleo utilizada para obtenção do extrato ácido.

	Amostras	Massa de óleo (g)
Conjunto I	LC-1	60
	LC-2	62
	M-1	65
	M-2	113
	ME	91
Conjunto II	ME-a	99
	ME-b	111
	ME-c	91
	ME-d	102

Em um becher de 1 L foram adicionados 25 g de KOH (pastilha) e 400 mL de isopropanol. A mistura foi agitada, sob aquecimento brando (50 °C) até completa dissolução do KOH e em seguida foram adicionados 200 g de sílica gel, previamente ativada a 400 °C. Após homogeneização, a mistura foi deixada em repouso por 1 hora e, posteriormente, transferida para uma coluna cromatográfica com reciclagem de solvente (Figura 24). O excesso de KOH e isopropanol foi removido por lavagem com éter etílico seco e então a massa de óleo, dissolvida em pequena quantidade de éter etílico, foi aplicada no topo da coluna. A fração não ácida foi eluída com 400 mL de éter etílico seco, mantido sob refluxo por cerca de 12 h. Em seguida, a coluna foi eluída continuamente, com cerca de 400 mL de uma solução de ácido fórmico (99%) em éter etílico 20% v/v (refluxo, 12h).

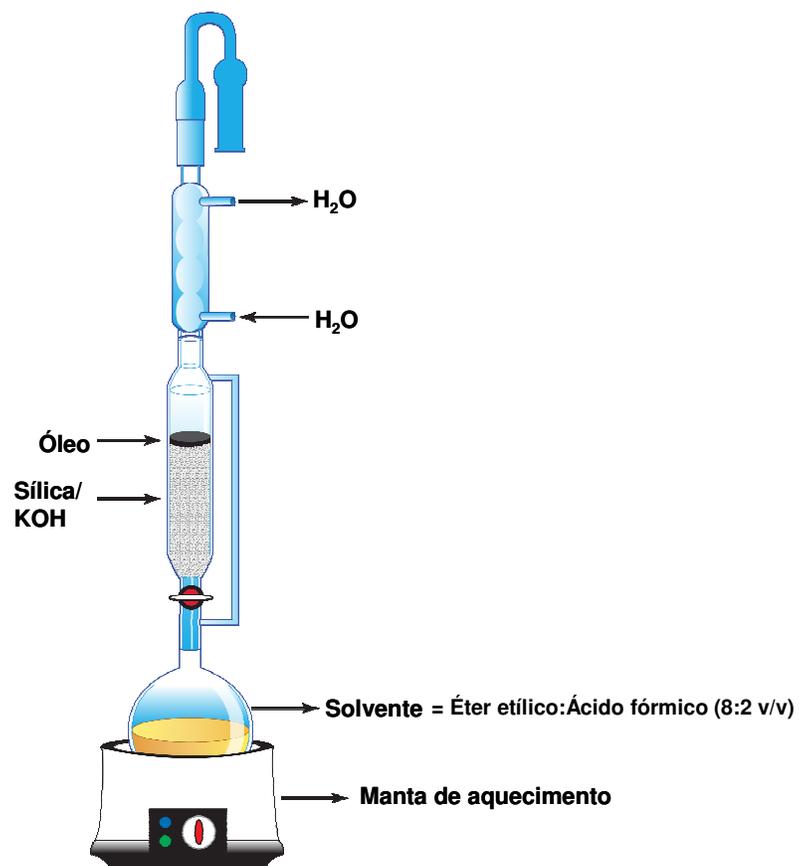


Figura 24. Coluna cromatográfica/sistema de extração contínua para obtenção da fração ácida dos petróleos.

3.7. Extração em fase sólida (SPE)

Foi realizado um procedimento adicional de limpeza do extrato ácido utilizando-se extração em fase sólida (SPE – *solid phase extraction*) amino sílica ($-NH_2$) (Albuquerque *et al.*, 2005; Queiroz, 2010), seguindo a metodologia explicitada no fluxograma da Figura 25.

Inicialmente o cartucho de SPE foi condicionado lavando-se o mesmo com 6 mL de uma solução de éter etílico em metanol 10% (v/v) seguido de 18 mL de clorofórmio em metanol 10% (v/v) de modo a remover eventuais impurezas que possam estar presentes no cartucho e impactariam nas análises dos compostos de interesse. Após este condicionamento, a amostra de extrato ácido foi dissolvida em volume mínimo de *n*-hexano:benzeno (75:25) e deixada em banho de ultrassom por 10 min. As quantidades de extrato ácido foram variáveis, conforme a amostra e o tipo de cartucho utilizados, mostrados na Tabela 8. Posteriormente, a amostra foi aplicada no cartucho com auxílio de pipeta de Pasteur. O cartucho foi eluído com 18 mL de *n*-hexano:benzeno (75:25) por 3 vezes. A fração neutra foi recolhida em balão de fundo redondo, de 100 mL de capacidade, de massa conhecida.

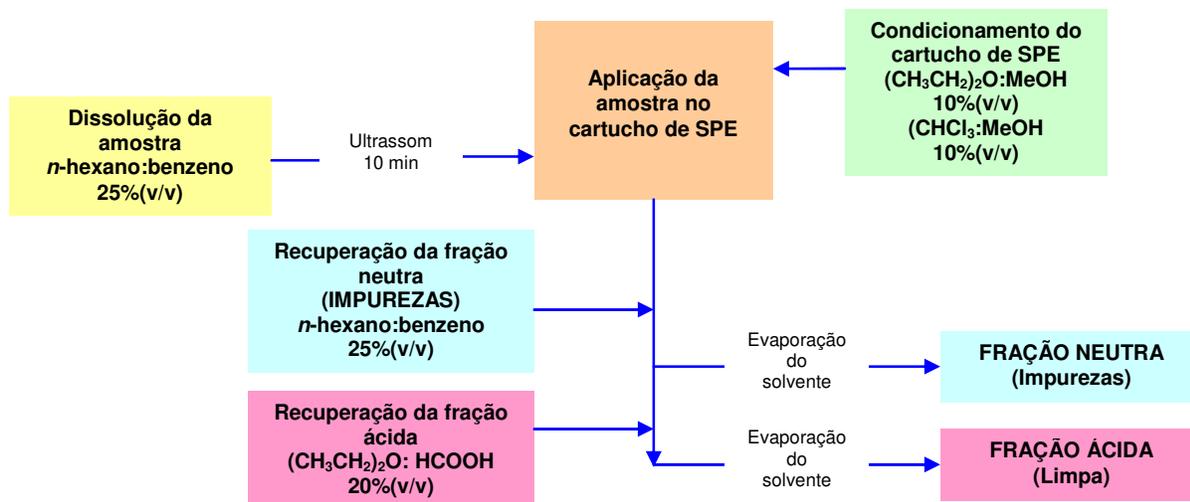


Figura 25: Fluxograma da metodologia desenvolvida para limpeza da fração ácida usando SPE.

O extrato ácido purificado foi recuperado do cartucho utilizando-se 30 mL de éter etílico:ácido fórmico (80:20) por 3 vezes recolhidos em balão de fundo redondo, de 250 mL de capacidade, previamente pesado. Os extratos ácidos purificados e as frações neutras foram obtidos após evaporação dos solventes em evaporador rotativo.

Tabela 8: Massa de extrato ácido utilizada para obtenção de fração ácida purificada utilizando-se SPE.

	Amostras	Massa de óleo (g)	Cartucho SPE
Conjunto I	LC-1	0,0500	NH ₂ Agilent®_Accubond 1g/50mg
	LC-2	0,0500	
	M-1	0,0497	
	M-2	0,0396	
	ME	0,0498	
Conjunto II	ME-a	0,4618	NH ₂ Sep-Pak®_Waters 10g/500mg
	ME-b	0,4680	
	ME-c	0,4991	
	ME-d	0,1623	

3.8. Orbitrap

Poucos trabalhos relatam o uso específico desta técnica para análise de ácidos naftênicos extraídos de petróleo. Principalmente no que se refere ao estudo a nível molecular (Potz *et al.*, 2010; Smith & Rowland, 2008 e Rudznski *et al.*, 2002).

Sendo assim, inicialmente foram realizados vários testes utilizando-se a técnica de ionização ESI (modo negativo e positivo) e posterior análise e detecção no LTQ-Orbitrap. Num primeiro momento alguns testes foram feitos injetando-se a fração de ácidos isolada diretamente na fonte de ionização (infusão direta). Posteriormente, a fim de se obter melhores resultados, utilizou-se o cromatógrafo líquido (*Accela*) com diferentes colunas de fase reversa: *Thermo Hypersil Gold C-8* (50mm x 2,1mm; 1,9µm), *Thermo Hypersil Gold C-18* (50 mm x 2,1mm; 1,9µm) e *Hypercarb* (50mm x 2,1mm; 1,9µm). No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Não se obteve boa resolução e, aparentemente, parte dos compostos de interesse (ácidos alcanóicos, terpanóicos, sesquiterpanóicos, esteranoícos, esteranoícos triaromáticos e monoaromáticos e carotenóicos) estavam sendo retidos na coluna cromatográfica inviabilizando o estudo.

Tendo em vista que dispúnhamos de um analisador de massas de alta resolução (Orbitrap), e que estávamos trabalhando somente com o extrato ácido purificado de petróleo com interesse em ácidos carboxílicos, optou-se por trabalhar com uma técnica de ionização por infusão direta, que responde muito bem para os compostos de interesse, sendo a mesma APCI (Watson & Sparkman, 2007). Trata-se de uma técnica suave de ionização, onde ácidos carboxílicos são ionizados aos ânions moleculares correspondentes. Por este motivo, trabalhou-se somente com a visualização dos compostos no modo negativo.

3.8.1. Condições de trabalho para análise dos extratos ácidos no Orbitrap

Modo de ionização: APCI, modo negativo (-)

Concentração da amostra: 0,5 mg/mL (isopropanol:tolueno,1:1)

Sheat gás (N₂): 20 psi

Gás auxiliar (N₂): 5 psi

Corrente da descarga: 25µA

Temperatura de aquecimento do capilar: 255 °C

Voltagem do capilar: -30 V

Voltagem da lente do tubo: -100 V

Fluxo da seringa: 50 µL/min

Fluxo da Fase móvel: 70 µL/min [Foi utilizado um T para conexão entre a fase móvel (isopropanol:tolueno-1:1) e a amostra (infusão direta)]

Resolução: 100.000

Faixa de *m/z* trabalhada: 190-750

Microscans: 10

3.8.2. Experimentos EM-EM com padrões biomarcadores ácidos 2, 4, 6 e 7

Concentração dos padrões: 0,1 mg/mL (isopropanol:tolueno, 1:1)

CID: 35 V

Faixa de *m/z* trabalhada: 90-500

3.9. Síntese de biomarcadores ácidos e hidrocarboneto

As rotas sintéticas escolhidas para realização deste trabalho primaram pela obtenção de bons rendimentos e foram baseadas em reações comumente descritas ao longo de vários anos em dissertações e teses oriundas do grupo de pesquisas geoquímicas e fitoquímicas do IQ-UNICAMP e outras referências encontradas na literatura (Imamura & Rúveda, 1980, Miranda *et al.* 1981, Imamura, 1981; Miranda, 1981;Rebouças, 1992; Lopes, 1995; Machado, 1995; Alves, 1997; Soriano, 2004; Lima, 2005 e Silva, 2008, Becker et al., 1973; Corey & Suggs, 1975; Vogel, 1978; House, 1972 e Ikan, 1991).

A parte experimental das sínteses, bem como a caracterização dos produtos e intermediários, estão descritas nos ANEXOS I, II e III.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

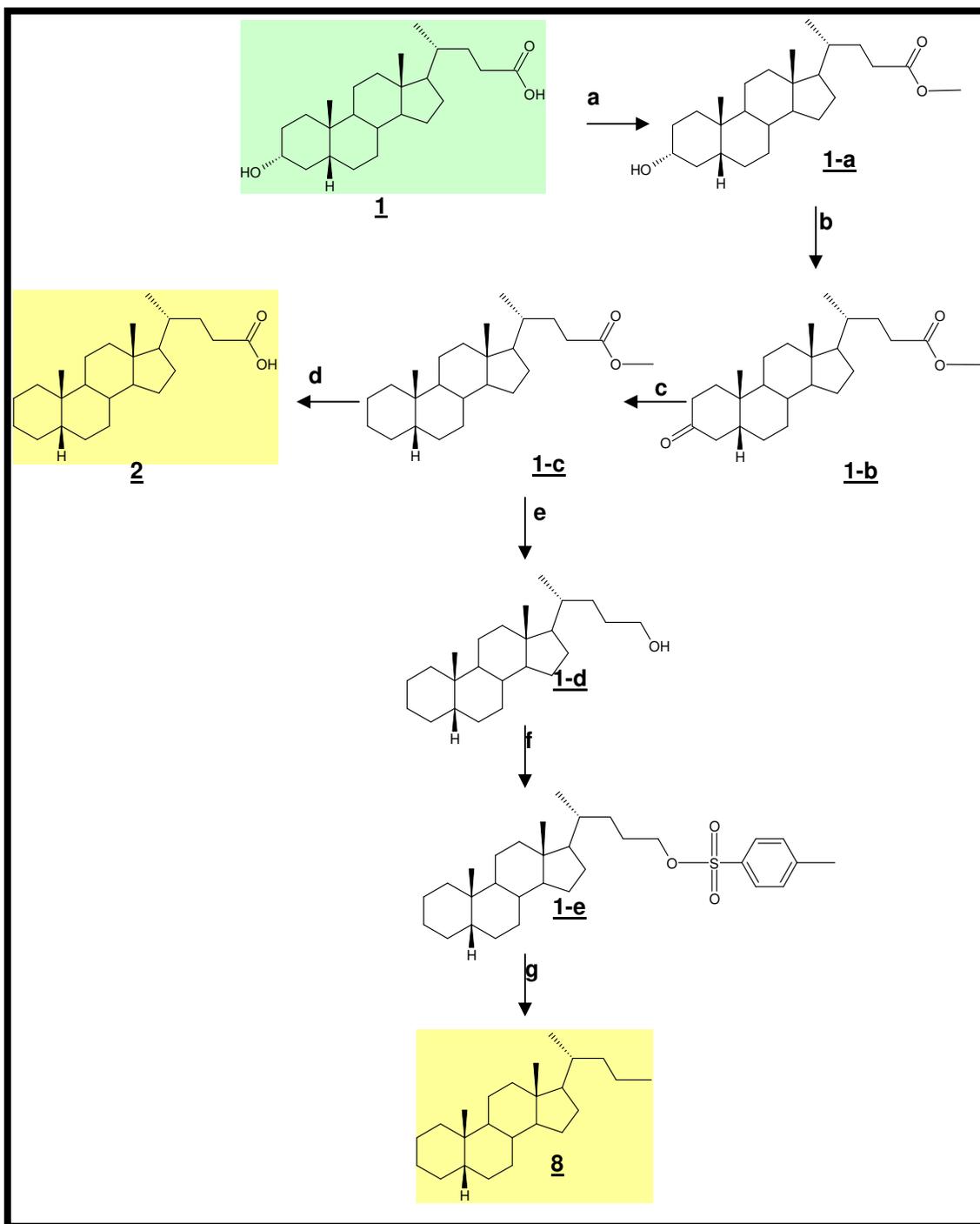
Os resultados estão organizados sequencialmente, iniciando-se com as sínteses orgânicas, seguidas das caracterizações geoquímicas dos óleos selecionados com base nas análises qualitativas de biomarcadores hidrocarbonetos saturados e outras análises químicas; avaliação do fator de recuperação dos biomarcadores hidrocarbonetos padrões (isocopalano e 5 β (H) colano); impacto na quantificação dos biomarcadores saturados (terpanos) utilizando-se o isocopalano como padrão interno; caracterização geoquímica qualitativa e semi-quantitativa dos extratos ácidos dos óleos, utilizando-se Orbitrap, bem como estudo da fragmentação dos padrões de biomarcadores ácidos através desta nova técnica analítica.

4.1. Síntese de biomarcadores ácidos e hidrocarboneto

4.1.1. Obtenção do ácido 5 β (H)colânico (**2**) e 5 β (H) colano (**8**)

A primeira etapa realizada para preparação de **2**, a partir do ácido litocólico **1**, que foi escolhido como material de partida porque é um composto 5 β (H), consistiu na proteção da carboxila ácida através de esterificação com diazometano (Esquema 1). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e a obtenção do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**) foi confirmada por espectroscopia na região do infravermelho (IV), através do aparecimento da banda de absorção referente ao estiramento da carbonila de éster em 1729 cm⁻¹, bem como pelos dados de ressonância magnética nuclear (RMN

^{13}C) onde foi observado o sinal referente ao deslocamento químico do carbono da metoxila em 51,43 ppm. Em seguida, fez-se a oxidação da função álcool para cetona com Clorocromato de piridínio (PCC) e, além das análises no IV e RMN, o produto foi confirmado por CG-EM onde observou-se o pico do íon molecular com m/z 388. Em seguida, o intermediário ceto-éster **1b** sofreu redução de *Clemmensen* que foi acompanhada por CCDA, e a confirmação do éster metílico do ácido 5 β (H) colânico **1-c** foi dada pela presença do pico do íon molecular de m/z 374. Parte do éster **1-c** foi reservada para ser utilizada como padrão de referência na quantificação de biomarcadores ácidos por CG-EM. Uma outra porção de **1-c** foi hidrolisada em meio básico para fornecer o ácido 5 β (H) colânico **2** que, após análise no Orbitrap, confirmou a obtenção do produto com exatidão de massa menor que 0,5 ppm. O hidrocarboneto 5 β (H) colano **8** foi obtido a partir da redução do éster **1-c** seguida de tosilização do álcool, e posterior clivagem reductiva do grupo tosil. Todos os procedimentos para obtenção desses produtos e intermediários, bem como as caracterizações por IV, RMN ^{13}C e ^1H , DEPT 135 e 90 (RMN ^{13}C) e CG-EM encontram-se no ANEXO I.



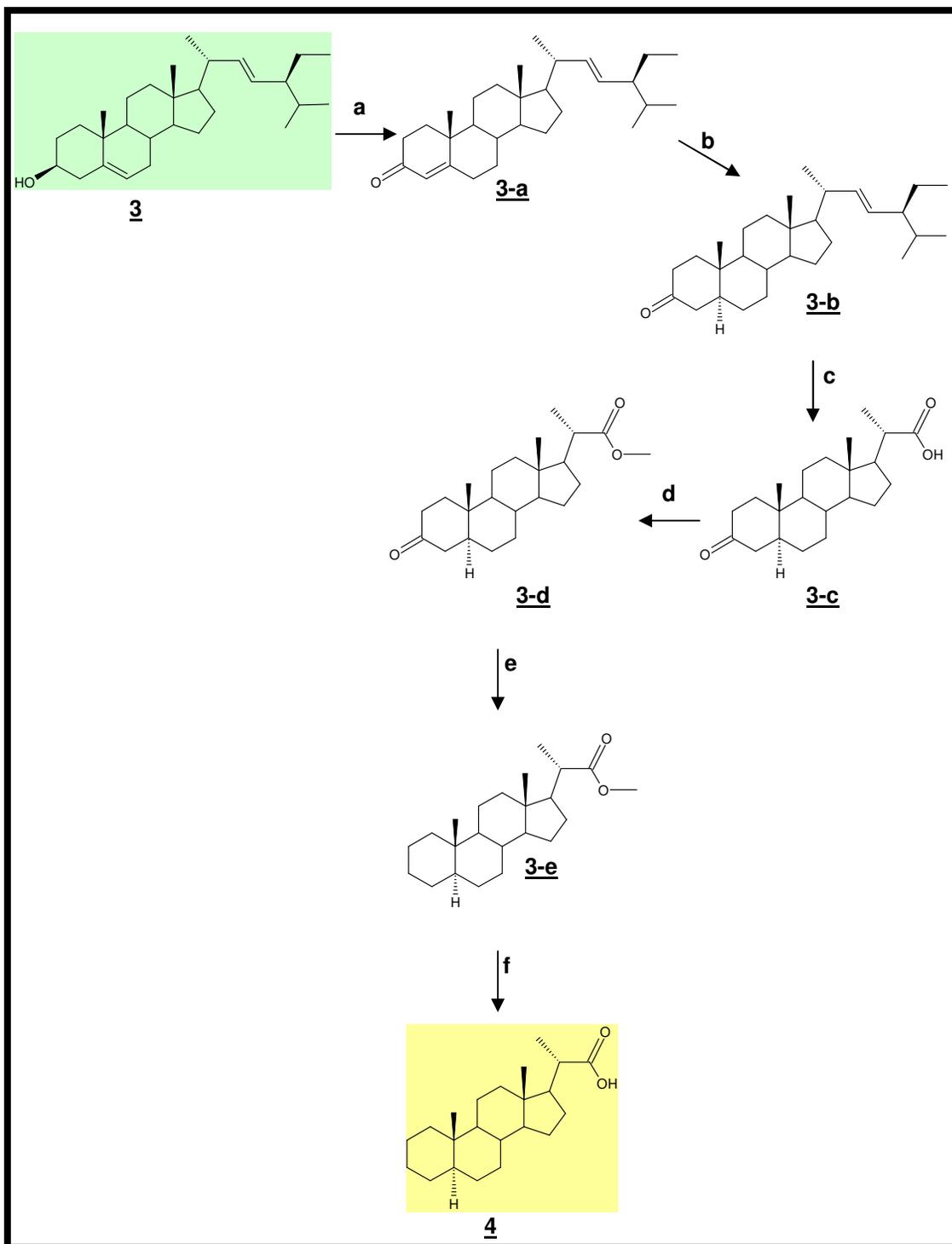
Etapas: (a) CH_2N_2 /éter dietílico anidro, 0 °C (100%); (b) PCC/Alumina/benzeno, refluxo, 25h (96%); (c) Zn/HgCl₂, HCl, refluxo, 8h, (98%); (d) KOH/MeOH 10%, refluxo, 2h (99%); (e) LiAlH₄, THF anidro, refluxo, 24h (75%); (f) TsCl/CH₂Cl₂, 0 °C, 1h de agitação, 10 dias repouso sob refrigeração (100%); (g) LiAlH₄, THF anidro, refluxo, 24h (90%) (Ikan, 1991; Vogel, 1978; Blunt & Stothers, 1977; Ongley & Hazzard, 1973 e Paiva *et al.*, 1996).

Esquema 1: Rota sintética para preparação do ácido 5β(H) colânico (2) e o hidrocarboneto 5 β (H) colano (8).

4.1.2. Obtenção do ácido 5 α (H) homopregnânico (4)

A partir do composto comercial estigmasterol **3** (97% de pureza), realizou-se uma oxidação de *Oppenauer* para obtenção de 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (**3-a**) que, posteriormente, foi purificada utilizando-se cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em sílica gel com eluente hexano:acetato de etila (70:30). A redução da dupla ligação da carbonila cetônica α,β -insaturada do componente **3-a**, com lítio em amônia líquida, forneceu uma cetona saturada com configuração *trans* na junção do anel A/B. Através da análise por CG-EM foi possível confirmar a formação deste produto pela presença do íon molecular m/z 412 e foram observados no RMN de ^{13}C os deslocamentos químicos dos carbonos em 46,69 ppm, correspondente ao carbono sp^3 metilênico (CH_2) e 44,72 ppm, de um carbono sp^3 metínico (CH), provenientes da hidrogenação da dupla ligação entre os carbonos C4-C5, respectivamente.

Em seguida realizou-se uma reação de ozonólise do derivado **3-b**, obtendo-se o ácido-3-ceto-5 α (H)homopregnânico (**3-c**) após tratamento com água oxigenada, com rendimento bruto de 92%. O ácido **3-c** foi em seguida esterificado com diazometano, e após purificação em CCDP (sílica gel com eluente hexano:acetato de etila 30%), forneceu o éster metílico (**3-d**) com 65% de rendimento. O produto **3-d** foi analisado por CG-EM sendo confirmada a presença do pico do íon molecular com m/z 360. Posteriormente, o ceto-éster **3-d** teve a carbonila cetônica reduzida através da reação de *Clemmensen* para fornecer **3-e**. Este intermediário foi caracterizado por RMN de ^{13}C pelo aparecimento do deslocamento químico em 27,15 ppm do carbono sp^3 metilênico (CH_2), proveniente da redução do carbono carbonílico no carbono C-3. A última etapa consistiu na hidrólise básica do éster **3-d** para fornecer o biomarcador proposto, o ácido 5 α (H) homopregnânico **4**, com 92% de rendimento (Esquema 2). Todos os procedimentos para obtenção desses produtos e intermediários, bem como as caracterizações por IV, RMN ^{13}C e ^1H , DEPT 135 e 90 (RMN ^{13}C) e CG-EM encontram-se no ANEXO II.



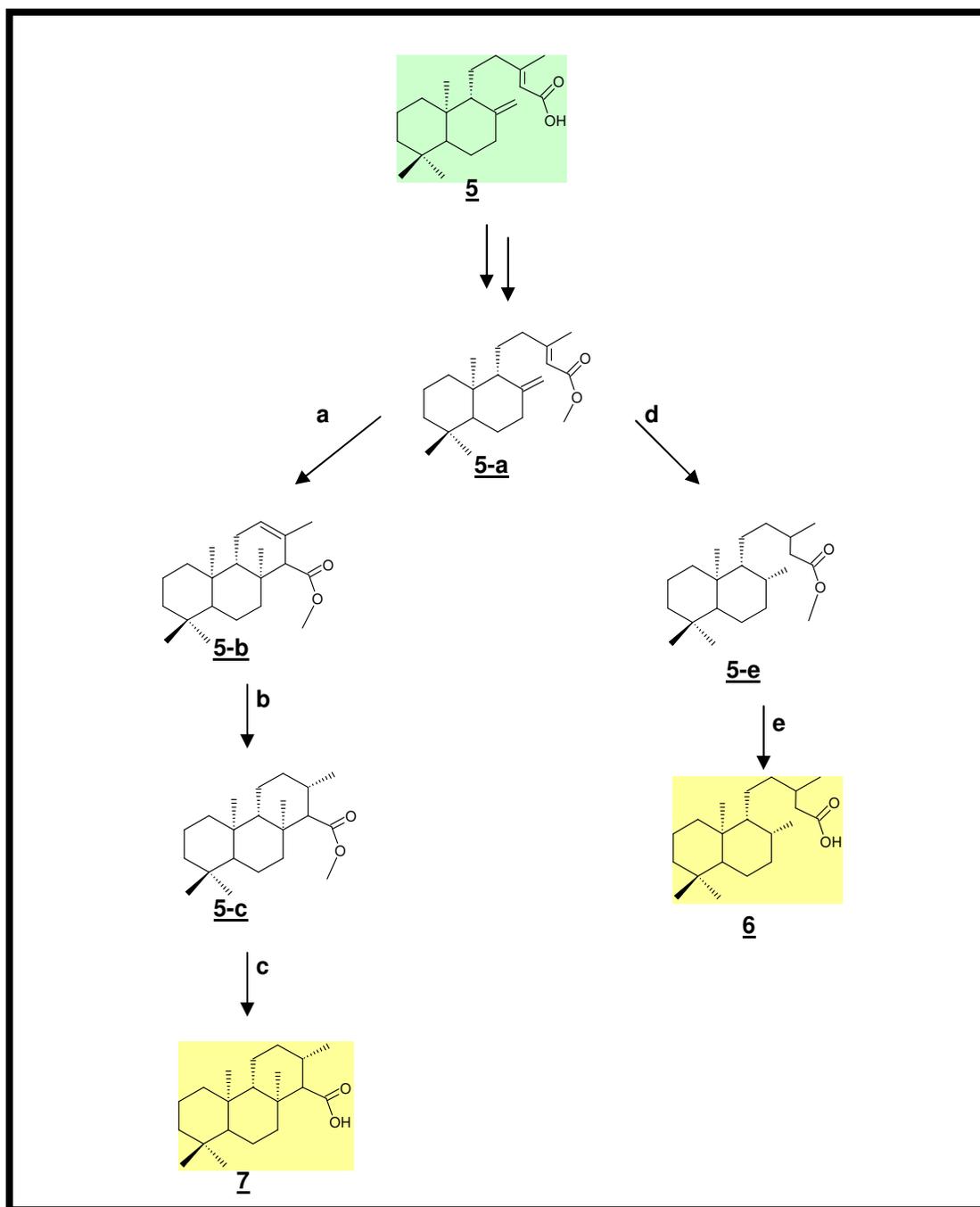
Etapas: (a) Isopropóxido de alumínio, ciclohexanona (excesso), benzeno, refluxo, 24h (69 %); (b) Li/NH₃, THF anidro, -78 °C, 3h (65%); (c) O₃, H₂O₂, 2h (92%); (d) CH₂N₂/éter dietílico anidro, 0 °C, (65%) (e) Zn/HgCl₂, HCl, refluxo, 8h (70%); (f) KOH/MeOH 10%, refluxo, 2h (92%),(Vogel, 1978; Blunt & Stothers, 1977; Ongley & Hazzard, 1973 e Paiva *et al.*, 1996).

Esquema 2: Rota sintética para preparação do ácido 5α (H) homopregnânico (4).

4.1.3. Obtenção dos ácidos 8,13-tetraidrocopálico (**6**) e 15-isocopálico (**7**)

O óleo de copaíba é extraído do tronco de árvores de diversas espécies do gênero *Copaífera* (Leguminosae), e foi selecionado para este estudo tendo em vista que seu extrato ácido possui cerca de 25% de ácido copálico **5**. Este ácido já tem se mostrado como excelente precursor para a síntese de biomarcadores ácidos terpanos tricíclicos e bicíclicos, relacionados aos terpanos clássicos estudados em geoquímica orgânica (Imamura, 1981, Miranda, 1981, Soriano, 2004). Após sucessivas extrações ácido-base do óleo de copaíba, o extrato ácido foi separado e esterificado com excesso de diazometano, e o éster metílico do ácido copálico (**5-a**) foi isolado em 13% de rendimento, após purificação em coluna aberta com sílica gel. O éster metílico (**5-a**) foi utilizado como precursor para as sínteses das substâncias **6** e **7** (Esquema 3).

Para a obtenção do ácido terpano tricíclico (**7**) (Esquema 3) fez-se uma ciclização intramolecular de **5-a** em ácido fórmico, a 80 °C por 4 h. O rendimento desta reação foi de aproximadamente 43% e a análise por CG-EM confirmou a formação do intermediário **5-b** através da presença do pico do íon molecular com m/z 318, bem como pela presença dos fragmentos m/z 177 (pico base) e 191. A hidrogenação catalítica de **5-b** utilizando Rh/alumina foi realizada com sucesso para preparação do éster metílico (**5-c**), em excelente rendimento químico (92%). O produto **5-c** foi confirmado por CG-EM onde observou-se a presença do pico referente ao íon molecular com m/z 320. Parte de **5-c** foi reservada para ser utilizada como padrão de referência na quantificação de biomarcadores ácidos por CG-EM. Uma outra porção de **5-c** foi hidrolisada em meio básico para produção do ácido 15-isocoplálico **7**, que após análise no Orbitrap, confirmou a obtenção do produto com exatidão de massa menor que 0,2 ppm. O produto **6** foi obtido a partir da hidrólise do éster metílico do ácido 8,13 tetraidrocopálico **5-e**, o qual foi preparado a partir da hidrogenação de **5-a**. Todos os procedimentos para obtenção desses produtos e intermediários, bem como as caracterizações por IV, RMN ^{13}C e ^1H , DEPT 135 e 90 (RMN ^{13}C) e CG-EM encontram-se no ANEXO III.



Etapas: (a) HCOOH (95%), 80 °C, 4h (43%); (b) H₂, Rh/alumina 5%, 65 psi, 16h, (92%); (c) KOH/MeOH 10%, refluxo, 10h (10%); (d) H₂, Pd-C 30%, 65 psi, 2h; (e) KOH/MeOH 10%, refluxo, 5h (Imamura & Rúveda, 1980; Miranda, 1980, Imamura, 1981 e Miranda *et al.*, 1981).

Esquema 3: Rota sintética para preparação do ácido 8,13-tetraidrocopálico (**6**) e ácido 15-isocopálico (**7**).

4.2. Caracterização geoquímica dos óleos estudados

Os principais aspectos composicionais dos óleos estudados neste trabalho, obtidos através das análises químicas realizadas (CLMP, CG-DIC, AE-EMRI e CG-EM), estão em total concordância com as caracterizações geoquímicas já descritas na literatura para os óleos da Bacia Potiguar (Rodrigues *et al.*, 1983; Santos Neto *et al.*, 1990; Santos Neto *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 1984; Cerqueira, 1985; Trindade, 1992 e Trindade *et al.*, 1992; Moraes, 2007).

De acordo com os resultados obtidos das análises semi-preparativas dos óleos utilizando-se CLMP, observou-se que os percentuais de hidrocarbonetos saturados recuperados para os óleos lacustres são superiores (SAT > 65 %) aos óleos mistos (SAT 45-60 %) e marinho evaporíticos (SAT 40-60 %), ao passo que a recuperação de compostos polares é inferior para os óleos lacustres (NSO ~ 15 %) quando comparada à recuperação desta fração para os óleos mistos (NSO 20-26%) e marinho evaporíticos (NSO médio de 33%). Os resultados de recuperação dos hidrocarbonetos aromáticos, para os três tipos de óleo, ficaram em média equivalentes, variando numa faixa entre 15-26 % de ARO. Estes resultados estão evidenciados no gráfico ternário da Figura 26, o qual foi construído com base nos resultados apresentados na Tabela 9.

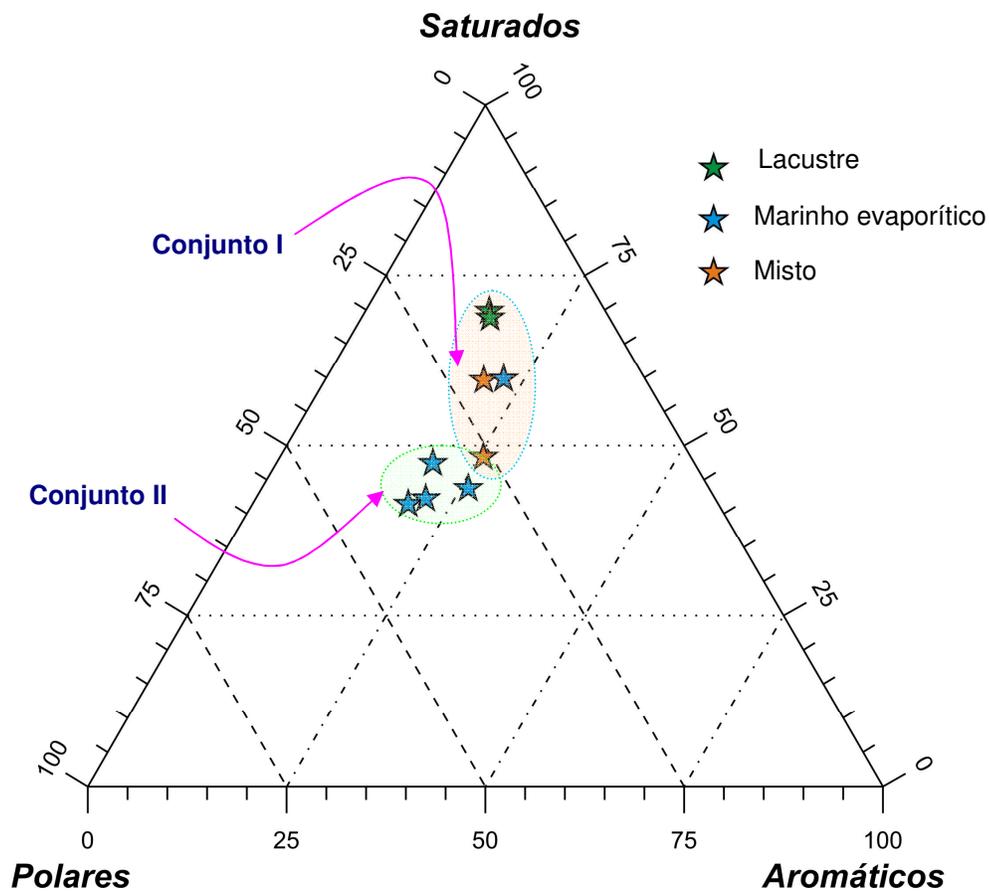


Figura 26: Diagrama ternário das frações de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos polares (NSO) dos dois conjuntos de óleos estudados (valores médios retirados da Tabela 9).

Tabela 9: Porcentagem em massa das frações de hidrocarbonetos saturados (**SAT**), hidrocarbonetos aromáticos (**ARO**) e compostos polares (**NSO**) dos nove óleos estudados (análises feitas utilizando-se CLMP em triplicata).

	<i>Hidrocarbonetos SATurados</i>			<i>Hidrocarbonetos AROmáticos</i>			<i>Compostos Polares (NSO)</i>		
	%SAT	Média	Desv Pad	%ARO	Média	Desv Pad	%NSO	Média	Desv Pad
LC-1	69,6	69,8	1,39	15,1	15,6	0,39	15,3	14,6	1,42
	71,4			15,7			13,0		
	68,6			15,9			15,5		
LC-2	68,3	68,8	0,52	16,5	16,2	0,30	15,1	15,0	0,26
	68,6			16,2			15,2		
	69,4			15,9			14,7		
ME	41,7	41,4	0,47	18,9	19,6	0,69	39,4	39,0	0,81
	40,9			19,5			39,6		
	41,6			20,3			38,1		
M-1	49,1	48,3	0,97	25,7	25,6	0,50	25,2	26,1	0,83
	48,5			25,0			26,4		
	47,2			26,0			26,8		
M-2	59,0	59,6	0,82	20,5	20,0	0,80	20,5	20,4	0,05
	60,5			19,0			20,4		
	59,2			20,4			20,4		
ME-a	48,0	47,4	0,80	20,2	19,7	0,80	31,8	32,9	1,60
	46,9			19,1			34,1		
	44,1*			28,9*			27,0*		
ME-b	42,3	42,2	0,20	21,7	21,4	0,27	35,9	36,4	0,45
	42,2			21,3			36,5		
	41,9			21,3			36,8		
ME-c	59,2	59,8	0,71	22,8	22,4	0,38	17,9	17,8	0,53
	59,5			22,2			18,3		
	60,6			22,1			17,3		
ME-d	43,7	43,7	0,59	26,7	26,0	1,26	29,6	30,3	0,83
	43,0			26,8			30,2		
	44,2			24,6			31,2		

* Desconsiderados para cálculos de média e desvio padrão.

Os perfis cromatográficos obtidos para as análises do óleo total, bem como os resultados das análises de $\delta^{13}\text{C}$ (Figura 27) também são condizentes com o que já vem sendo descrito na literatura ao longo de vários anos (Rodrigues, 1983 e Santos Neto *et. al.*, 1990).

Os óleos classificados como lacustre (**LC-1** e **LC-2**) apresentaram a predominância de *n*-alcanos de alto peso molecular ($>n\text{-C}_{23}$), razão pristano/fitano

2,8 para **LC-1** e 2,9 para **LC-2**, e valores de $\delta^{13}\text{C}$ -31,14 ‰ para **LC-1** e -31,27 ‰ para **LC-2**.

O segundo tipo de óleo analisado é composto por uma mistura do óleo de origem continental e transicional (**M-1** e **M-2**) onde predominam características geoquímicas, ora relacionadas a ambiente lacustre de água doce, ora a ambiente marinho hipersalino, segundo Santos Neto e colaboradores (1990 e 2003).

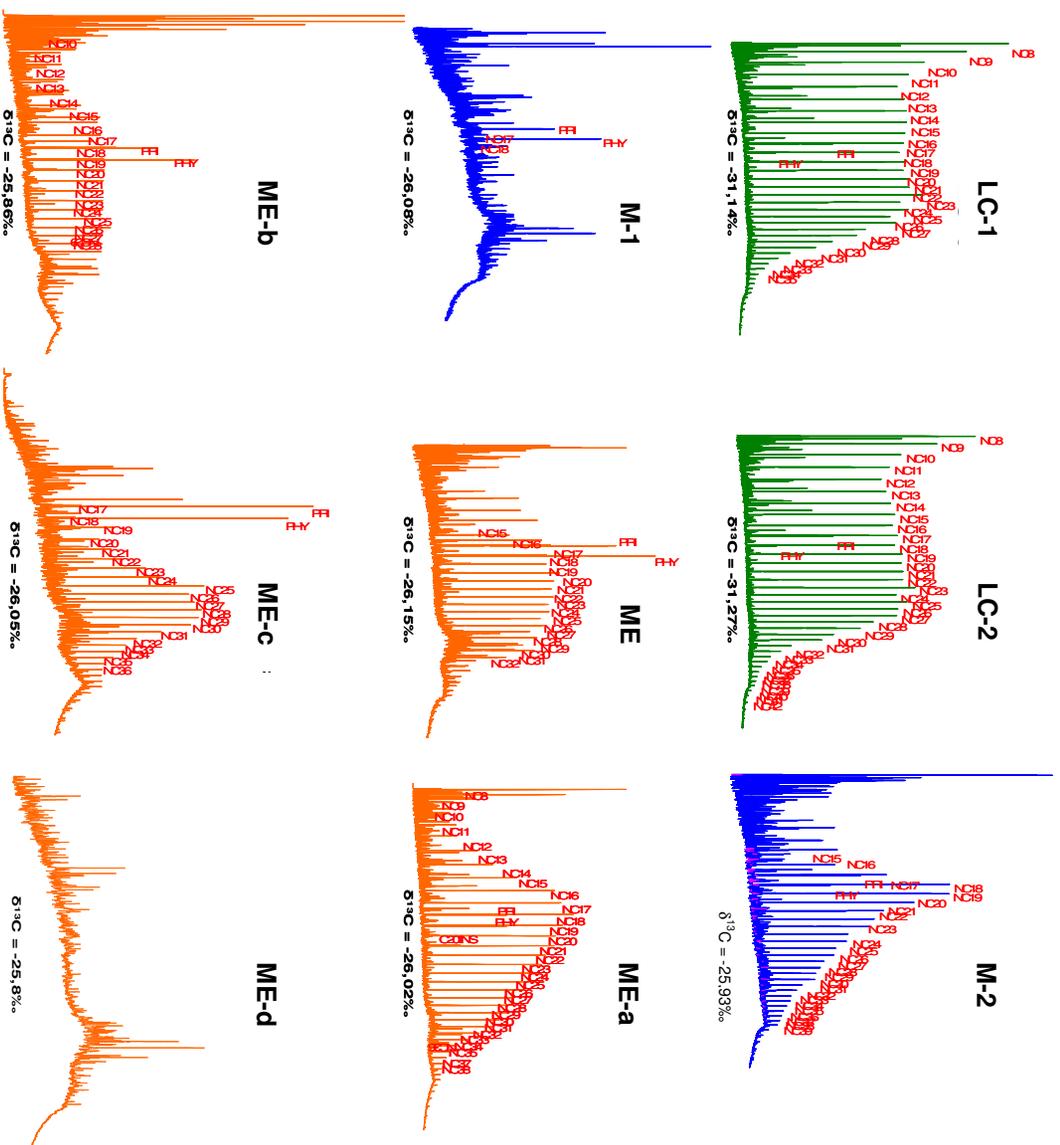


Figura 27: Cromatogramas dos óleos totais (CG-DIC). Os eixos x e y são respectivamente: tempo de análise, em minutos, na faixa entre 5-120 min e abundância relativa, em pico ampere (pA), na faixa entre 0-300 pA. Estes cromatogramas encontram-se ampliados no ANEXO IV.

Normalmente observa-se biodegradação nos óleos Alagamar e mistos podendo ser, em alguns casos, incipiente, ressaltado por apenas um decréscimo relativo dos *n*-alcanos de baixo peso molecular, porém também foi observado que a biodegradação agiu severamente eliminando quase que todos os alcanos normais (Morais, 2007). Estas características também foram observadas nos óleos **M-1** e **M-2**, tal qual demonstrado na Figura 27.

Para os óleos gerados pela sequência transicional (marinha evaporítica, **ME**, **ME-a**, **ME-b**, **ME-c** e **ME-d**) foram observadas razão pristano/fitano inferior a 1, $\delta^{13}\text{C}$ variando entre $-25,8\text{‰}$ e $-26,9\text{‰}$ (Figura 27), e baixa abundância relativa, e em alguns casos até mesmo ausência, de hidrocarbonetos de cadeia normal, principalmente na faixa de baixo peso molecular ($< n\text{-C}17$). A ausência destes compostos é resultante da ação de microorganismos na biodegradação destes petróleos, já reportada anteriormente na literatura por diversos autores (Morais, 2007; Santos Neto, 1990).

Os óleos de conjunto II foram classificados quanto ao Índice Peters & Moldowan de biodegradação (PMI) de Peters e Moldowan (1993). Este índice varia de acordo com várias observações que são feitas a partir de análises geoquímicas básicas, como análise do óleo total (CG-DIC) e análise de biomarcadores saturados e aromáticos (CG-EM) (Figura 28).

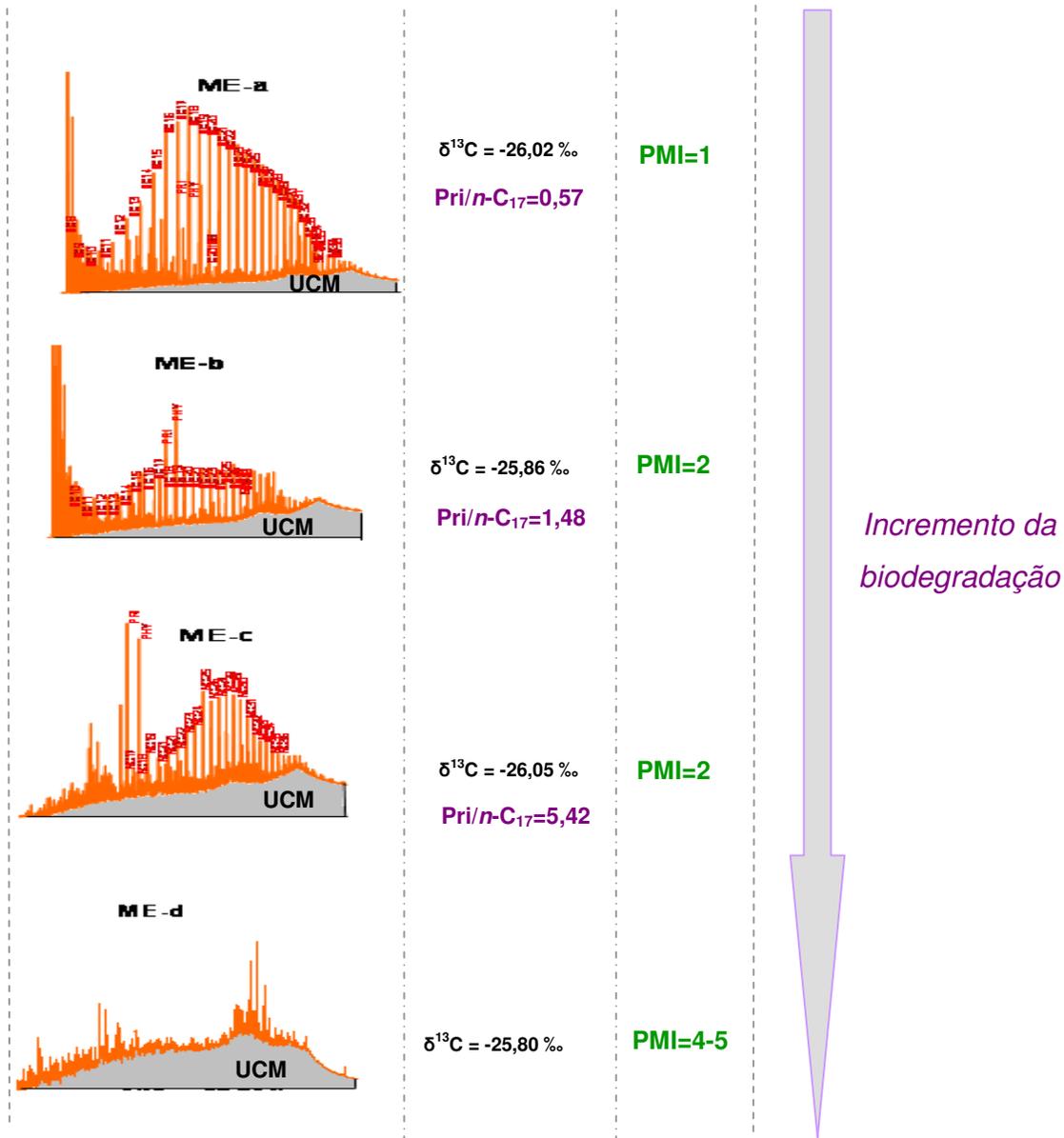


Figura 29: Classificação dos óleos do conjunto II quanto aos diferentes níveis de biodegradação, segundo índice PMI.

Informações da literatura indicam que o aumento da biodegradação provoca uma elevação na razão isotópica entre $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, refletindo em valores menos negativos de $\delta^{13}\text{C}$ para o óleo total. No entanto, o $\delta^{13}\text{C}$ total do óleo residual após os processos de biodegradação, bem como o $\delta^{13}\text{C}$ das frações que o compõe, incluindo a fração de ácidos carboxílicos, é resultante dos vários

processos pelos quais essas moléculas passaram, cada um com sua parcela de contribuição (Seewald, 2003).

Os ácidos carboxílicos presentes em amostras de petróleo podem ser originados de diferentes fontes: diagênese da matéria orgânica, produtos da biodegradação do óleo e também aqueles biossintetizados pelos próprios organismos que causam a biodegradação.

De acordo com os resultados das análises isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$) das frações de ácidos carboxílicos presentes nos óleos do conjunto II (Figura 30) acredita-se que a maior parte dos ácidos carboxílicos presentes nestes óleos sejam, de fato, oriundas da biodegradação, uma vez que os $\delta^{13}\text{C}$ são menos negativos que do próprio óleo original.

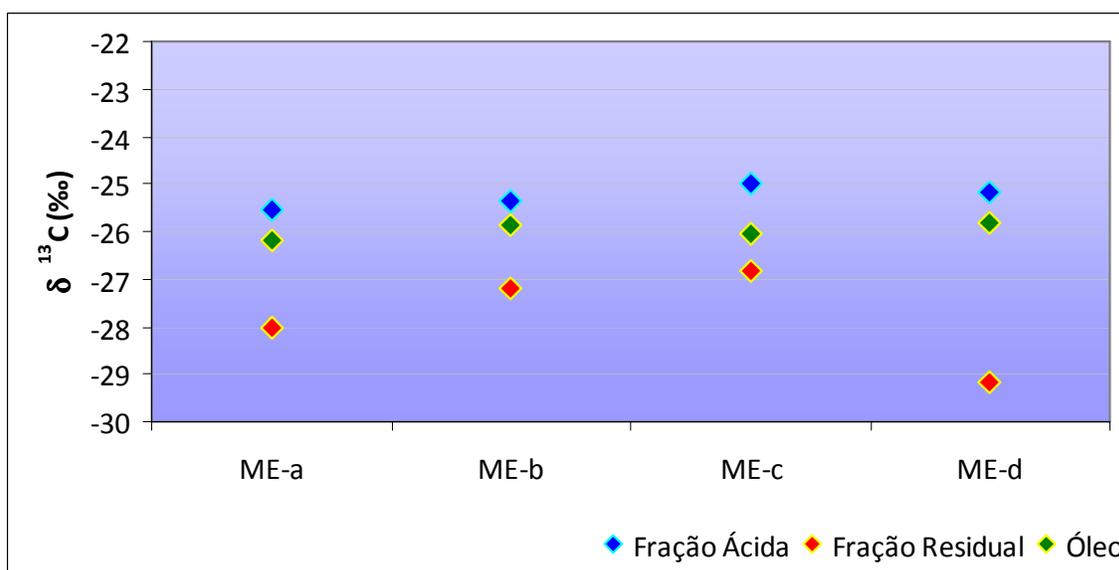


Figura 30: Análise $\delta^{13}\text{C}$ do óleo original e das frações de ácidos carboxílicos e residual ao processo de extração dos ácidos.

Os resultados das análises, ainda que qualitativas, de biomarcadores saturados, também foram condizentes com as informações que se encontram na literatura, com destaque para as razões de biomarcadores reportadas na Tabela 10, que normalmente são razões-chave na distinção genética de tais óleos, estudo

de evolução térmica e biodegradação e ficam melhores observadas quando apresentadas na forma gráfica (Figura 31, 32 e 33) ou até mesmo através da observação dos cromatogramas de íons m/z 191 e 217, destacados nas Figuras 34 e 35.

Tabela 10: Algumas das razões de biomarcadores hidrocarbonetos obtidas através da análise qualitativa das frações de hidrocarbonetos saturados utilizando CG-EM (MSI).

Razões	Conjunto I					Conjunto II				
	Amostras	LC-1	LC-2	M-1	M-2	ME	ME-a	ME-b	ME-c	ME-d
DIA/C27AA	0,44	0,39	0,13	0,21	0,06	0,09	0,14	0,23	0,21	
DIAH/H30	0,10	0,08	0,03	0,07	0,02	0,03	0,04	0,06	0,04	
GAM/H30	0,34	0,36	0,83	0,78	1,09	0,66	0,63	0,55	0,54	
H35/H34	0,53	0,59	0,93	0,85	0,96	0,78	0,85	0,77	0,77	
23/24TRI	1,22	1,25	1,31	1,27	1,52	1,63	1,38	1,40	1,28	
HOP/STER	19,90	20,24	3,12	2,20	2,15	1,81	1,60	1,42	1,81	
TRIC/HOP	0,63	0,57	0,10	0,21	0,06	0,21	0,26	0,42	0,26	
TRIC/STER	12,47	11,47	0,31	0,47	0,14	0,38	0,41	0,60	0,46	
TS/(TS+TM)	0,54	0,52	0,36	0,45	0,28	0,34	0,38	0,43	0,38	
NORNEO/H29	0,35	0,34	0,24	0,32	0,16	0,21	0,24	0,28	0,27	
C29BBS/C29R	0,51	0,51	0,73	0,61	0,17	0,37	0,32	0,76	0,69	
H29/C29TS	2,87	2,91	4,12	3,10	6,21	4,66	4,17	3,61	3,74	
C29BB/C29	0,42	0,40	0,49	0,48	0,28	0,35	0,33	0,48	0,46	
TPP	0,95	0,95	0,52	0,51	0,42	0,36	0,31	0,27	0,34	
20S/(20S+20R) St	0,47	0,50	0,41	0,36	0,28	0,39	0,32	0,44	0,45	
$\alpha\beta\beta/(\alpha\beta\beta+\alpha\alpha\alpha)$	0,42	0,40	0,49	0,48	0,28	0,35	0,33	0,48	0,46	

Os biomarcadores foram identificados com base nos tempos de retenção, *m/z* específico e experiência prévia na análise de óleos comuns a esta mesma bacia sedimentar.

Legenda: Relação entre as alturas obtidas nos diferentes *m/z* monitorados

DIA/C27AA = (DIA27S+DIA27R)/(C27S+C27R) = (13 β , 17 α -diacolestano 20S+13 β , 17 α -diacolestano 20R)/(5 α , 14 α , 17 α -colestano 20S+5 α , 14 α , 17 α -colestano 20R) (*m/z* 217)
DIAH/H30 = 17 α , 21 α (H)-diahopano/ 17 α , 21 β (H)-hopano (*m/z* 191)
GAM/H30 = Gamacerano/17 α (H),21 β (H)-hopano (*m/z* 191)
H35/H34 = (H35S+H35R)/(H34S+H34R) = 17 α , 21 β (H)-pentabishomohopano (22S+22R)/ 17 α ,21 β (H)-tetrabishomohopano (22S+22R) (*m/z* 191)
23/24TRI = TR23/TR24 = Terpano Tricíclico C₂₃/Terpano Tricíclico C₂₄ (*m/z* 191)
HOP/STER = 17 α (H),21 β (H)- hopano/(C27 $\alpha\alpha\alpha$ S+ C27 $\alpha\alpha\alpha$ R) = conc. total hopanos (*m/z* 191)/conc. total esteranos (*m/z* 217)
TRIC/HOP=(TR19+TR20+TR21+TR22+TR23+TR24+TR25A+TR25B+TR26A+TR26B+TR28A+TR28B+TR29A+TR29B+TR30A+TR30B)/Concentração total de hopanos (*m/z* 191)
TRIC/STER=(TR19+TR20+TR21+TR22+TR23+TR24+TR25A+TR25B+TR26A+TR26B+TR28A+TR28B+TR29A+TR29B+TR30A+TR30B) (*m/z* 191)/Concentração total de esteranos (*m/z* 217)
TS/(TS+TM) = 18 α (H)-22,29,30-trisnorneohopano/(18 α (H)-22,29,30-trisnorneohopano + 17 α (H)-22,29,30-trisnorhopano) (*m/z* 191)
NORNEO/H29 = C29TS/H29 = 18 α (H)-30-norneohopano/17 α , 21 β (H)-30-norhopano (*m/z* 191)
C29BBS/C29R = 5 α , 14 β , 17 β estigmastano 20S/5 α , 14 β , 17 β - estigmastano 20R (*m/z* 217)
H29/C29TS = 17 α , 21 β (H)-30-norhopano/18 α (H)-30-norneohopano (*m/z* 191)
C29BB/C29 = (C29 $\alpha\beta\beta$ S + C29 $\alpha\beta\beta$ R)/(C29 $\alpha\alpha\alpha$ S + C29 $\alpha\beta\beta$ R + C29 $\alpha\beta\beta$ S + C29 $\alpha\alpha\alpha$ R) (*m/z* 217)
TPP = terpanos tetracíclicos poliprenoides (*m/z* 253)/C27 diasteranos (*m/z* 217)
20S/(20S+20R) St = C29S/(C29S+C29R) esteranos (*m/z* 217)
 $\alpha\beta\beta/(\alpha\beta\beta+\alpha\alpha\alpha)$ = (C27 $\alpha\beta\beta$ S+C27 $\alpha\beta\beta$ R)/(C27 $\alpha\beta\beta$ S+C27 $\alpha\beta\beta$ R+C27 $\alpha\alpha\alpha$ S+C27 $\alpha\alpha\alpha$ R) = (5 α , 14 β , 17 β -colestano 20S + 5 α , 14 β , 17 β -colestano 20R)/(5 α , 14 β , 17 β -colestano 20S + 5 α , 14 β , 17 β -colestano 20R + 5 α , 14 α , 17 α -colestano 20S + 5 α , 14 α , 17 α -colestano 20R) (*m/z* 217)

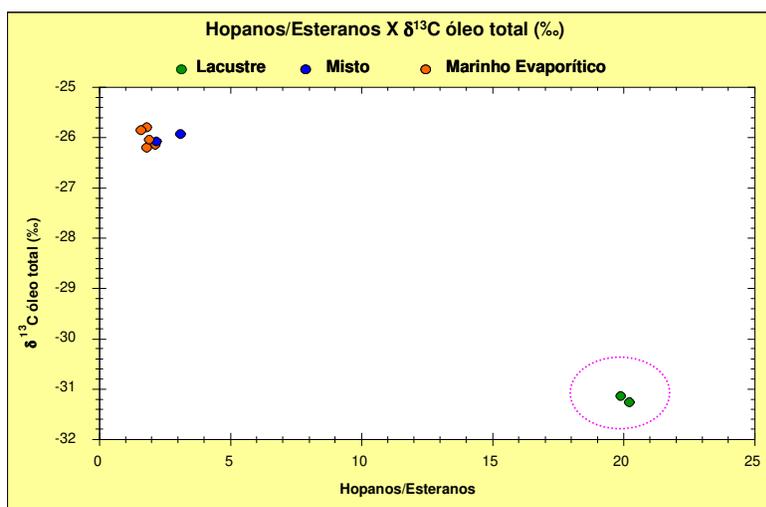
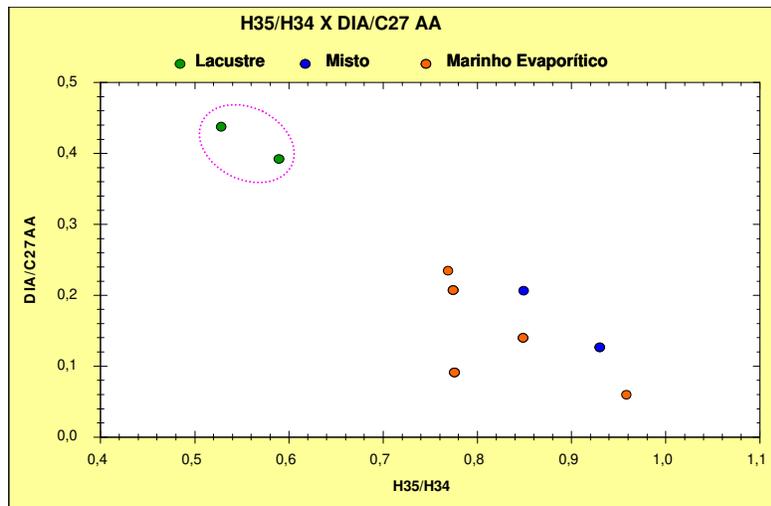
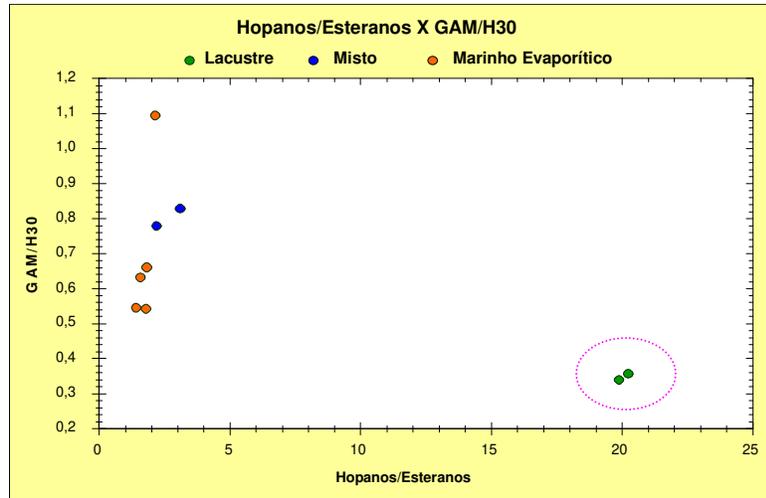


Figura 31: Gráficos relacionando parâmetros geoquímicos moleculares utilizados para avaliação de origem.

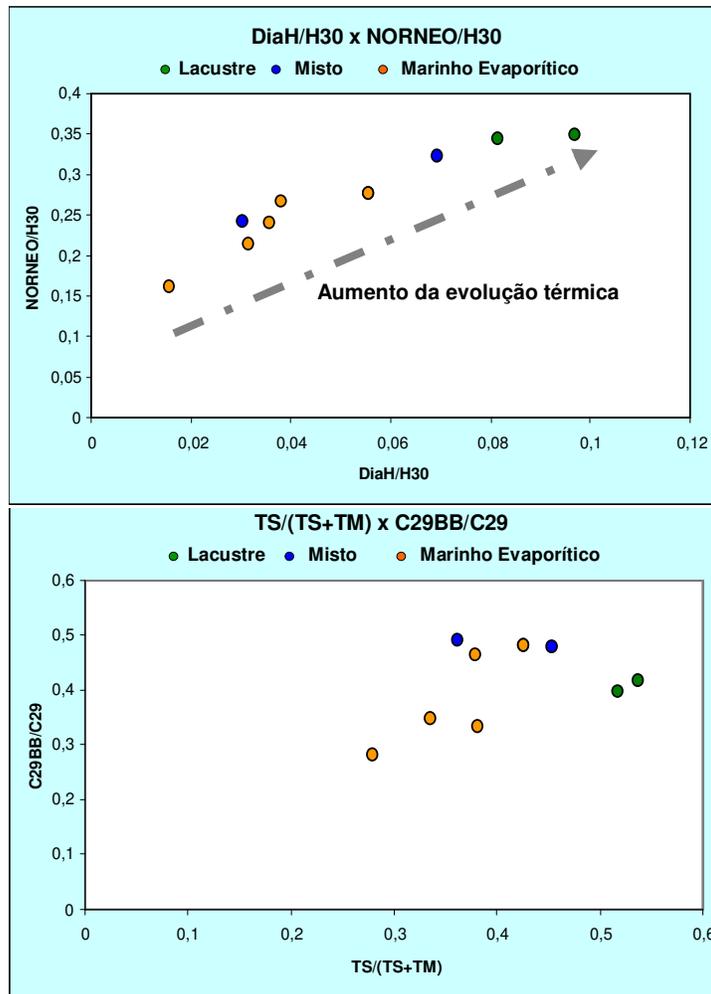


Figura 32: Gráficos utilizando parâmetros geoquímicos moleculares relacionados ao grau de evolução térmica dos óleos estudados.

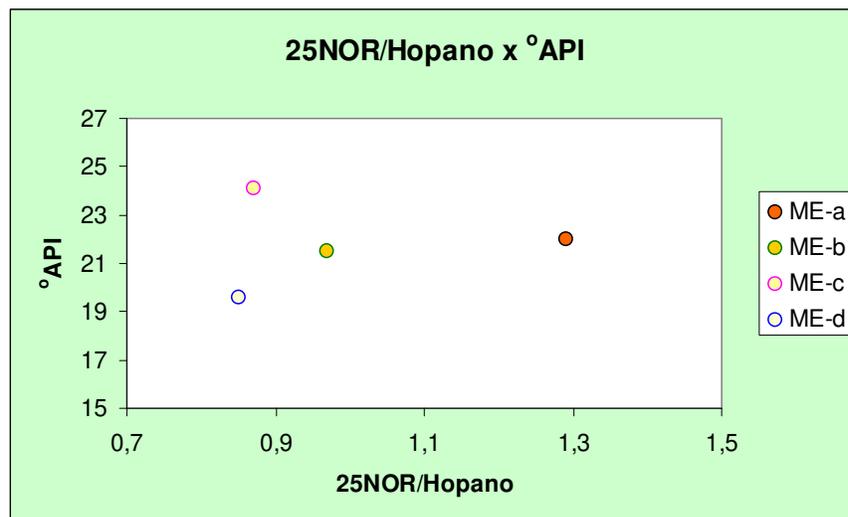


Figura 33: Gráfico utilizando parâmetros geoquímicos relacionados à biodegradação.

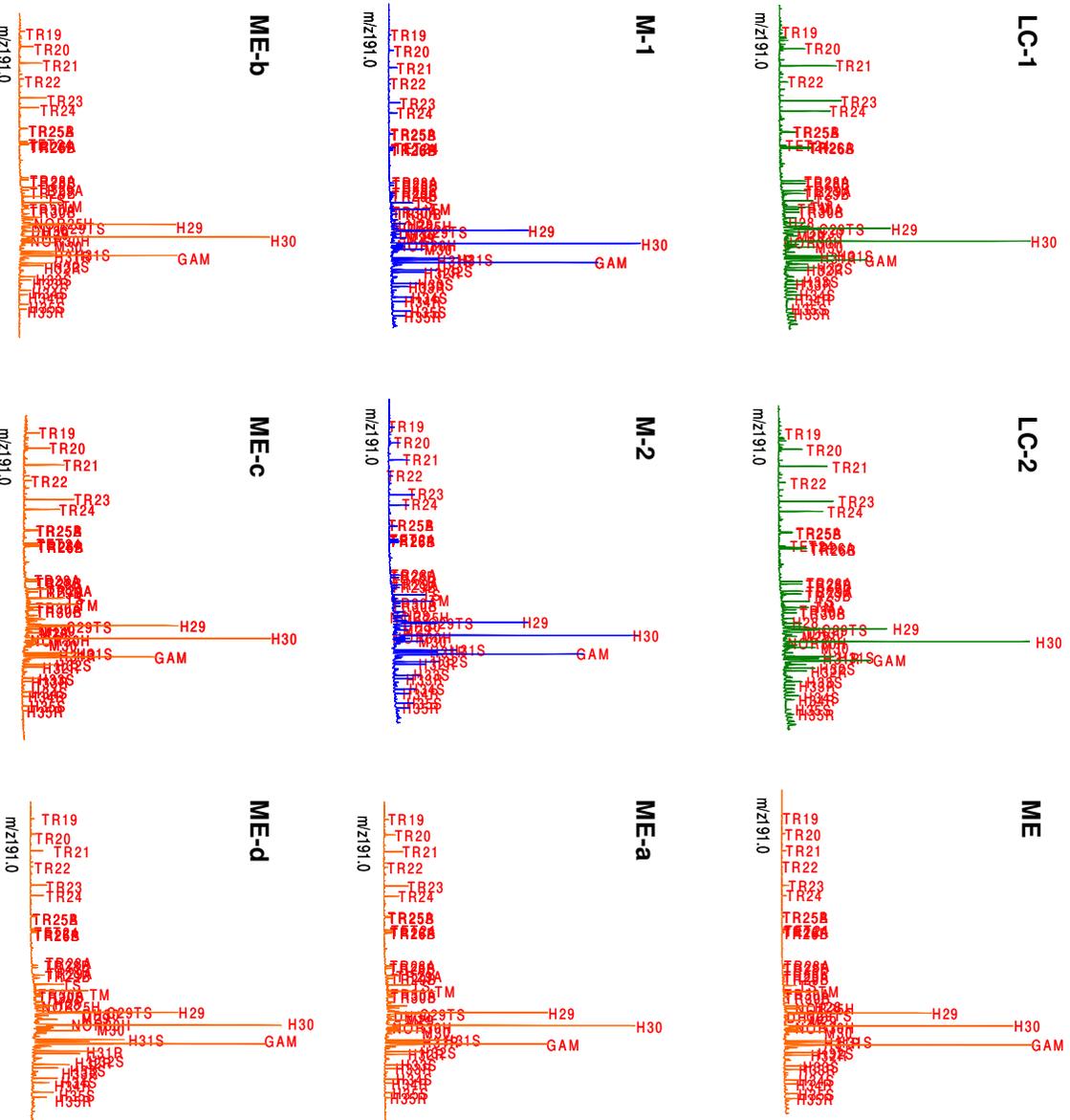


Figura 34: Cromatogramas de íons das frações de hidrocarbonetos saturados dos óleos estudados no m/z 191. Os eixos x e y são respectivamente: tempo de análise, em minutos, na faixa entre 20-120 min e abundância relativa na faixa entre 0-400 pA. Estes cromatogramas de íons encontram-se ampliados no ANEXO IV.

Legenda: **TR 19** = Terpano Tricíclico C_{19} , **TR 20** = Terpano Tricíclico C_{20} , **TR 21** = Terpano Tricíclico C_{21} , **TR 22** = Terpano Tricíclico C_{22} , **TR 23** = Terpano Tricíclico C_{23} , **TR 24** = Terpano Tricíclico C_{24} , **TR 25A** e **TR25B** = Terpano Tricíclico C_{25} (S e R), **TET24** = Terpano Tetracíclico C_{24} , **TR 26A** e **TR26B** = Terpano Tricíclico C_{26} (S e R), **TR 28A** e **TR28B** = Terpano Tricíclico C_{28} (S e R), **TR 29A** e **TR29B** = Terpano Tricíclico C_{29} (S e R), **TS** = 18 α (H)-22,29,30-trisnormehopano, **TM** = 17 α (H)-22,29,30-trisnormhopano, **TR 30A** e **TR30B** = Terpano Tricíclico C_{30} (S e R), **H28** = 17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnormhopano, **NOR25H** = 17 α (H)-C28 desmetilado no anel A/B, **H29** = 17 α (H),21 β (H)-30-norhopano, **C29TS** = 18 α (H)-22,29,30-trisnormhopano, **DH30** = 17 α (H)-diahopano, **M29** = 17 α (H), 21 α (H)-30-normoretano, **H30** = 17 α (H), 21 β (H)-hopano, **NOR30H** = 17 α ,30-nor-29-homhopano, **M30** = 17 α (H),21 α (H)-moretano, **H31S** e **H31R** = 17 α (H),21 β (H)-homhopano (22S e 22R), **GAM** = gamacerano, **H32S** e **H32R** = 17 α (H),21 β (H)-bishomhopano (22S e 22R), **H33S** e **H33R** = 17 α (H),21 β (H)-trishomhopano (22S e 22R), **H34S** e **H34R** = 17 α (H),21 β (H)-tetrakishomhopano (22S e 22R), **H35S** e **H35R** = 17 α (H),21 β (H)-pentakishomhopano (22S e 22R).

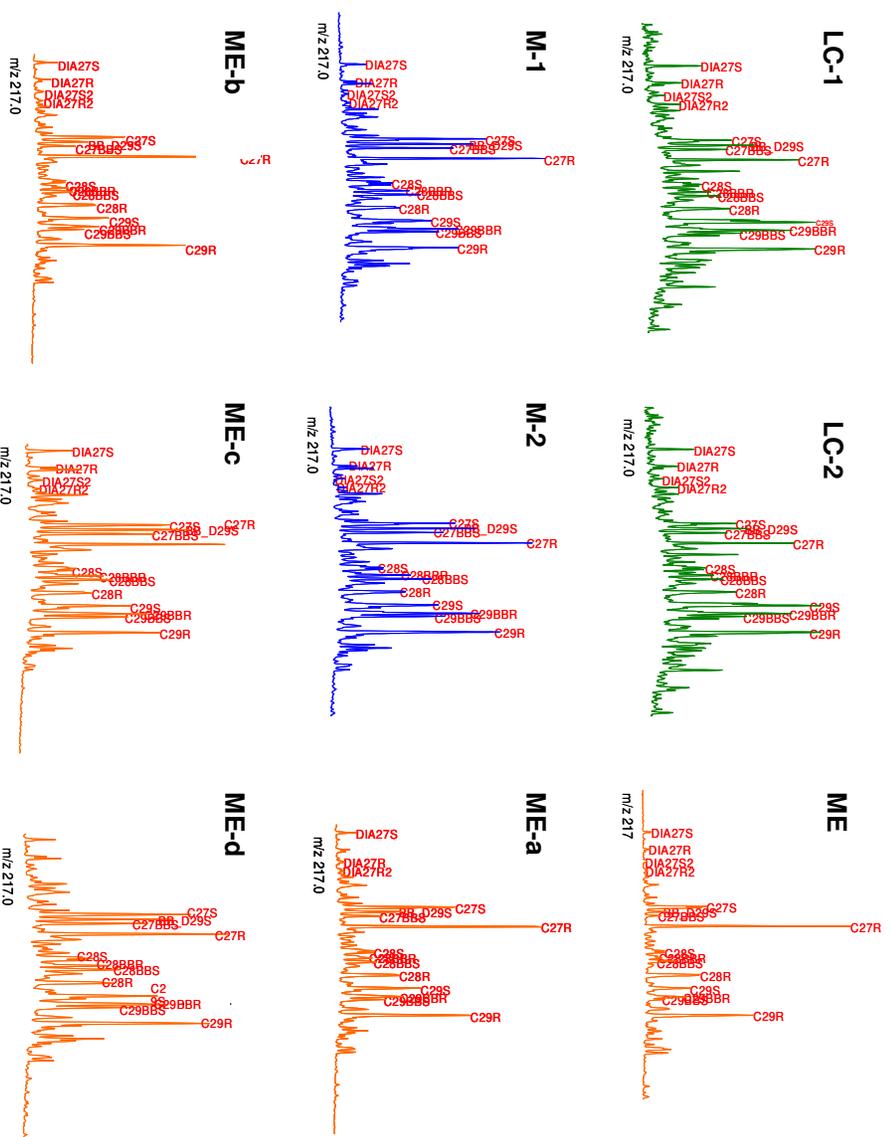


Figura 35: Cromatogramas de íons das frações de hidrocarbonetos saturados dos óleos estudados no m/z 217. Os eixos x e y são respectivamente: tempo de análise, em minutos, na faixa entre 20-120 min e abundância relativa na faixa entre 0-400 pA. Estes cromatogramas de íons encontram-se ampliados no ANEXO IV.

Legenda: **DIA27S** = 13g(H),17α(H)-diacolestano (20S), **DIA27R** = 13g(H),17α(H)-diacolestano (20R), **DIA27S2** = 13α(H),17β(H)-diacolestano (20S), **DIA27R2** = 13α(H),17β(H)-diacolestano (20R), **C27S** = 5α(H),14α(H),17α(H)-colestano (20S), **C27abbs** = 5α(H),14g(H),17β(H)-colestano (20R), **C27abbs** = 5α(H),14g(H),17β(H)-colestano (20S), **C27R** = 5α(H),14α(H),17α(H)-colestano (20R), **C28S** = 5α(H),14α(H),17α(H)-24-metil-colestano (20S), **C28 bbr** = 5α(H),14g(H),17β(H)-24-metil-colestano (20R), **C28 bbs** = 5α(H),14g(H),17β(H)-24-metil-colestano (20S), **C28R** = 5α(H),14α(H),17α(H)-24-metil-colestano (20R), **C29S** = 5α(H),14α(H),17α(H)-24-etil-colestano (20S), **C29 bbr** = 5α(H),14g(H),17β(H)-24-etil-colestano (20R), **C29 bbs** = 5α(H),14g(H),17β(H)-24-etil-colestano (20S), **C29R** = 5α(H),14α(H),17α(H)-24-etil-colestano (20R).

4.3. Análise quantitativa de biomarcadores saturados: utilização do isocopalano (9) como padrão de referência para quantificação de terpanos

De modo geral, existem muitos trabalhos na literatura que reportam a quantificação de biomarcadores saturados em petróleos e extratos de rochas geradoras, utilizando apenas o $5\beta(H)$ colano como padrão de referência, adicionados na amostra original antes de qualquer tratamento, para a quantificação de esterano e terpanos presentes na amostra original (Peters & Moldowan, 1993).

Também existem vários trabalhos que citam a utilização de padrões deuterados, como por exemplo: D4-colestano, para quantificação de esteranos e terpanos (Peters & Moldowan, 2005). Apesar do D4-colestano apresentar mecanismo de fragmentação similar aos biomarcadores de ocorrência natural da família dos esteranos, o m/z utilizado para o monitoramento do fragmento gerado a partir deste padrão (D-4 colestano – m/z 221) difere dos íons característicos dos terpanos e esteranos, que correspondem ao m/z 191 e 217, respectivamente.

Existem ainda questões relacionadas às perdas de massa que podem acontecer, e em geral ocorrem de maneira variável em função da composição molecular dos óleos e extratos, durante o fracionamento dos mesmos utilizando-se CL para obtenção das frações correspondentes aos hidrocarbonetos saturados e aromáticos, os quais são analisados quantitativamente por CG-EM e os resultados são reportados com base na amostra original e as perdas são desconsideradas.

Associadas a estas questões, somam-se ainda, a da qualidade da coleta de amostras de petróleo, presença de contaminantes de fluido de perfuração, entre outros, que podem ser provenientes de recuperação secundária de reservatórios, passando até mesmo pela forma como as amostras de petróleos e extratos estão armazenados no laboratório.

Face à essas questões, trabalhar com razões entre biomarcadores, sejam as mesmas tomadas por área ou altura dos picos, ainda que em diferentes janelas

de relação m/z , faz com que todos esses fatores sejam agrupados e não prejudiquem avaliações e estudos relativos à diferenciação genética de óleos, estudos de correlação óleo-óleo e óleo-rocha, entre outros.

No entanto, estudos quantitativos que visem investigar as variações da quantidade de compostos devido a processos como craqueamento secundário ou biodegradação, não podem ser realizados diretamente através de razões, uma vez que não se pode tomar as concentrações em relação aos hidrocarbonetos saturados como base de comparação em óleos diferentes.

Sendo assim, neste trabalho foi feito um estudo para avaliar inicialmente a recuperação de diferentes padrões de biomarcadores hidrocarbonetos, o 5β (H) colano (**8**) e o isocopalano (**9**), quando adicionados em óleos de diferentes naturezas (Conjuntos I e II) antes da realização do fracionamento dos mesmos por CLMP. Esta avaliação foi feita com base na construção de curvas analíticas feitas com diferentes concentrações de **8** e **9** e analisadas por CG-EM, conforme descrito a seguir.

4.3.1. Cálculo da recuperação dos padrões isocopalano (9**) e 5β (H) colano (**8**)**

A fim de calcular o percentual de recuperação dos padrões adicionados ao óleo [isocopalano (**9**) e 5β (H) colano (**8**)], antes da separação para obtenção das frações de hidrocarbonetos saturados foram, primeiramente, preparadas soluções-padrão de **8** e **9** para a construção das curvas analíticas. O sinal analítico corresponde à razão do sinal do padrão em questão com um padrão fixo.

Em geral, os procedimentos analíticos são afetados por vários erros, derivados tanto da manipulação das amostras e das soluções-padrão, quanto de problemas instrumentais, como, por exemplo, a instabilidade da resposta instrumental. Por essas razões utilizou-se a adição de uma concentração fixa de um padrão interno (D4-colestano), a fim de compensar os diversos erros analíticos

inerentes ao processo, particularmente efetivo no caso de substratos muito complexos, tal qual a mistura de hidrocarbonetos saturados provenientes de petróleos.

Na Figura 36 é mostrada a curva analítica para o isocopalano. As concentrações utilizadas foram: 5; 7; 8; 9; 10 e 11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As medidas foram realizadas em triplicata, sendo que os valores utilizados correspondem à média das três medidas.

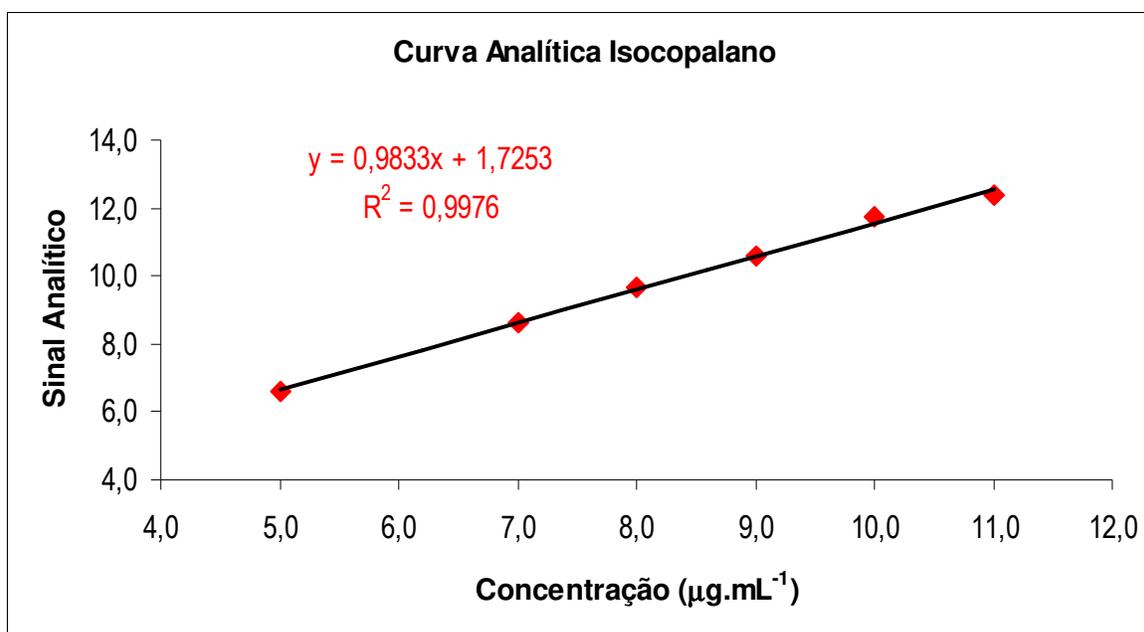


Figura 36: Curva analítica para o padrão isocopalano, com sua respectiva equação e coeficiente de determinação (r^2).

Para a construção da curva de calibração são utilizadas soluções em diferentes concentrações do analito e uma concentração constante de um padrão interno. Conseqüentemente, a variável dependente y no gráfico de calibração é a razão da resposta do analito com a resposta do padrão interno e a variável independente x é a concentração conhecida do analito. Neste tipo de calibração o padrão interno é um composto similar ao analito, mas diferente o suficiente para ser quantificado separadamente. Ele é escolhido geralmente por estar ausente na

amostra e ter um comportamento semelhante ao analito no processo de análise. A mesma quantidade de padrão interno é adicionada em cada um dos padrões de calibração. A curva analítica é obtida plotando-se a razão do sinal do padrão com o sinal do padrão interno vs. a concentração do padrão (Lavagnini *et al.*, 2006; Cuadros-Rodríguez *et al.*, 2001).

Em todos os óleos deste estudo foram adicionados 400 μL de uma solução, em isooctano, com $47,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de isocopalano. Após o fracionamento por CLMP, a fração de hidrocarbonetos saturados foi analisada no CG-EM para determinação da concentração do padrão isocopalano utilizando a sua curva analítica e cálculo da sua recuperação. Este estudo foi realizado em triplicata. Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos comparados à concentração de isocopalano adicionada.

Tabela 11: Resultados do ensaio de recuperação do padrão isocopalano.

<i>Óleos</i>	<i>Conc. nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Conc. calculada curva ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Recuperado %</i>	<i>Média recuperado %</i>	<i>Coef. var. %</i>
LC-1	9,5	6,17	64,95	66,56	4,85
		6,75	71,07		
		6,05	63,67		
LC-2	9,5	6,49	68,31	67,11	1,56
		6,39	67,26		
		6,25	65,77		
M-1	9,5	6,50	68,42	66,25	2,91
		6,05	63,73		
		6,33	66,61		
M-2	9,5	5,41	56,92	59,92	4,53
		6,03	63,49		
		5,64	59,35		
ME	9,5	5,61	59,08	62,28	4,45
		6,26	65,84		
		5,88	61,93		
ME-a	9,5	5,76	60,61	66,16	7,42
		6,21	65,32		
		6,89	72,54		
ME-b	9,5	5,59	58,81	61,60	3,26
		5,94	62,54		
		6,03	63,45		
ME-c	9,5	6,03	63,49	62,78	0,84
		5,91	62,24		
		5,95	62,61		
ME-d	9,5	6,53	68,78	68,70	1,33
		6,42	67,54		
		6,63	69,78		

Observa-se que a variação entre as triplicatas foi muito pequena, todas menores que 8%, já a recuperação variou de 60 a 69%, sem uma correlação direta com o tipo de óleo.

As concentrações utilizadas para a construção da curva analítica do padrão 5 β (H) colano foram: 0,5; 1; 2; 3; 4; e 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Na Figura 37 é mostrada a curva analítica para o 5 β (H) colano. As medidas foram realizadas em triplicata e os valores utilizados correspondem à média das três medidas.

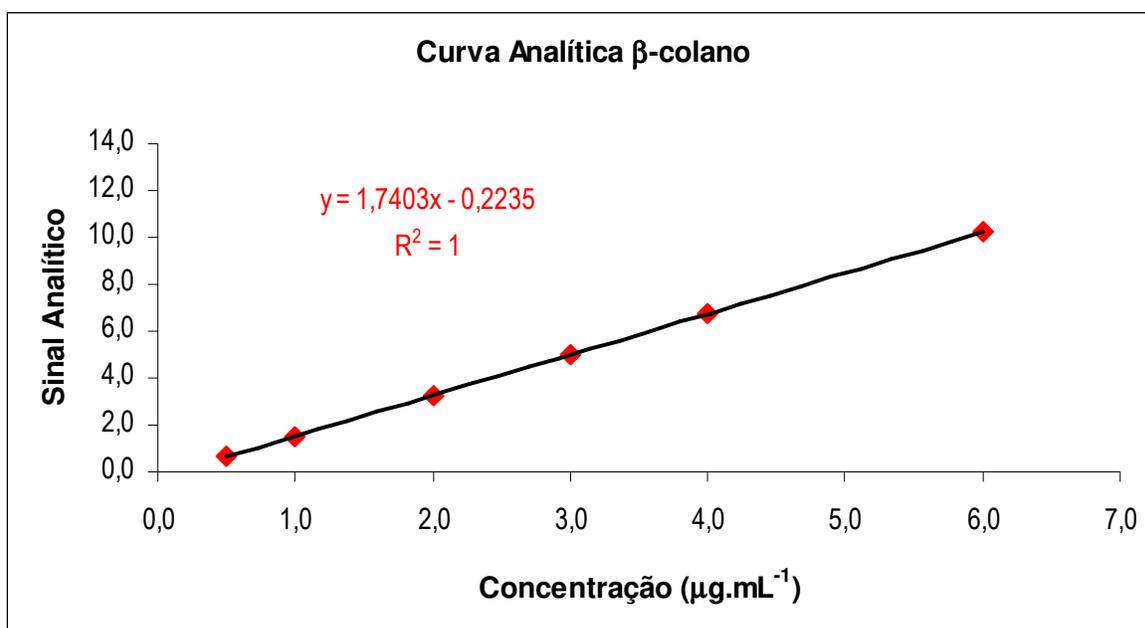


Figura 37: Curva analítica para o padrão 5 β (H) colano, com sua respectiva equação e coeficiente de determinação (r^2).

Do mesmo modo que para o padrão anterior, o padrão 5 β (H) colano foi adicionado no óleo antes da separação das frações (60 μL de uma solução em isooctano de concentração 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Na Tabela 12 estão reunidos os resultados obtidos, bem como os dados de recuperação.

Tabela 12: Resultados do ensaio de recuperação do padrão 5 β (H) colano.

<i>Óleos</i>	<i>Conc. nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Conc. calculada curva ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)</i>	<i>Recuperado %</i>	<i>Média recuperado %</i>	<i>Coef. var. %</i>
LC-1	3,0	-	-	81,66	1,54
		2,49	41,46		
LC-2	3,0	2,41	40,20	79,09	1,21
		2,41	40,19		
M-1	3,0	2,36	39,39	83,06	1,58
		2,34	39,05		
M-2	3,0	2,53	42,23	74,82	2,78
		2,44	40,65		
ME	3,0	2,50	41,72	74,73	4,03
		2,33	38,85		
ME-a	3,0	2,22	36,93	82,65	6,36
		2,19	36,44		
ME-b	3,0	2,13	35,49	79,43	2,02
		2,35	39,17		
ME-c	3,0	2,25	37,43	78,21	3,76
		2,38	39,59		
ME-d	3,0	2,36	39,34	85,28	1,36
		2,70	45,03		
		2,36	39,30		
		2,34	39,01		
		2,45	40,84		
		2,45	40,78		
		2,23	37,20		
		2,36	39,34		
		2,56	42,61		
		2,52	41,94		
		2,60	43,36		

Neste caso observa-se que as recuperações foram maiores do que aquelas obtidas para o isocopalano. A recuperação variou de 75 a 85%. Também não se observa uma tendência na variabilidade com o tipo de óleo.

Para melhor visualização, as recuperações de ambos os padrões são mostradas em um gráfico na Figura 38.

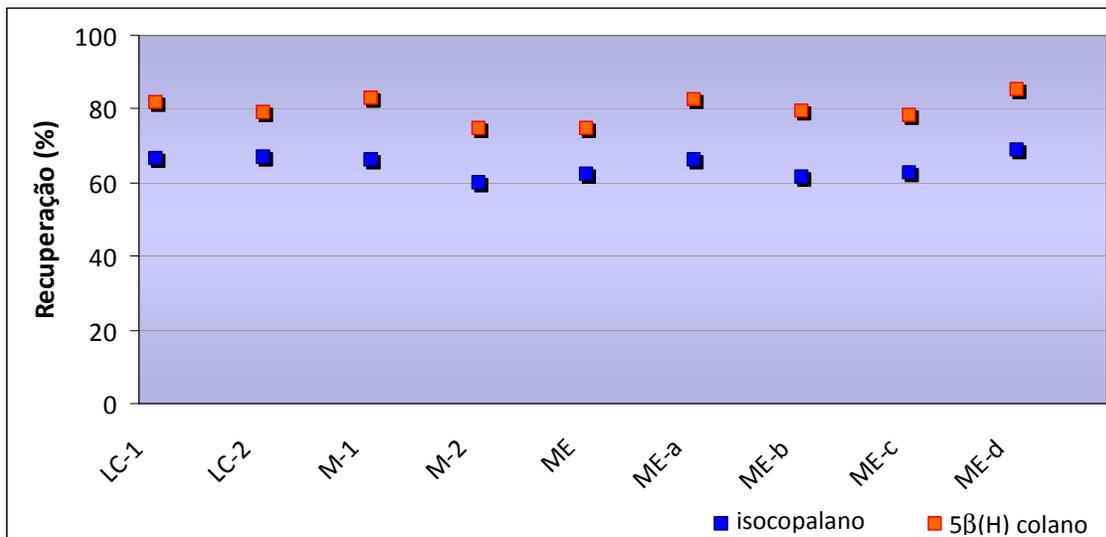


Figura 38: Recuperação dos padrões isocopalano e 5β (H) colano.

Essa diferença no percentual de recuperação entre o 5β (H) colano e o isocopalano pode estar associada a diferentes fatores. Um deles pode ser a diferença na lipofilicidade dessas moléculas. O isocopalano é menos lipofílico que o 5β (H) colano, logo pode ficar mais retido na coluna de sílica durante o processamento por CLMP, podendo ser perdido durante o processo de fracionamento do óleo. A diferença percentual de recuperação não está associada aos diferentes tempos de retenção observados por CG, uma vez que o processo de separação no CG é comandado pelas diferenças de peso molecular e ponto de ebulição. Deste modo, o isocopalano, que possui peso molecular menor, sai num tempo de retenção menor que o 5β (H) colano, que por sua vez, possui um peso molecular maior, conforme demonstrado na Figura 39.

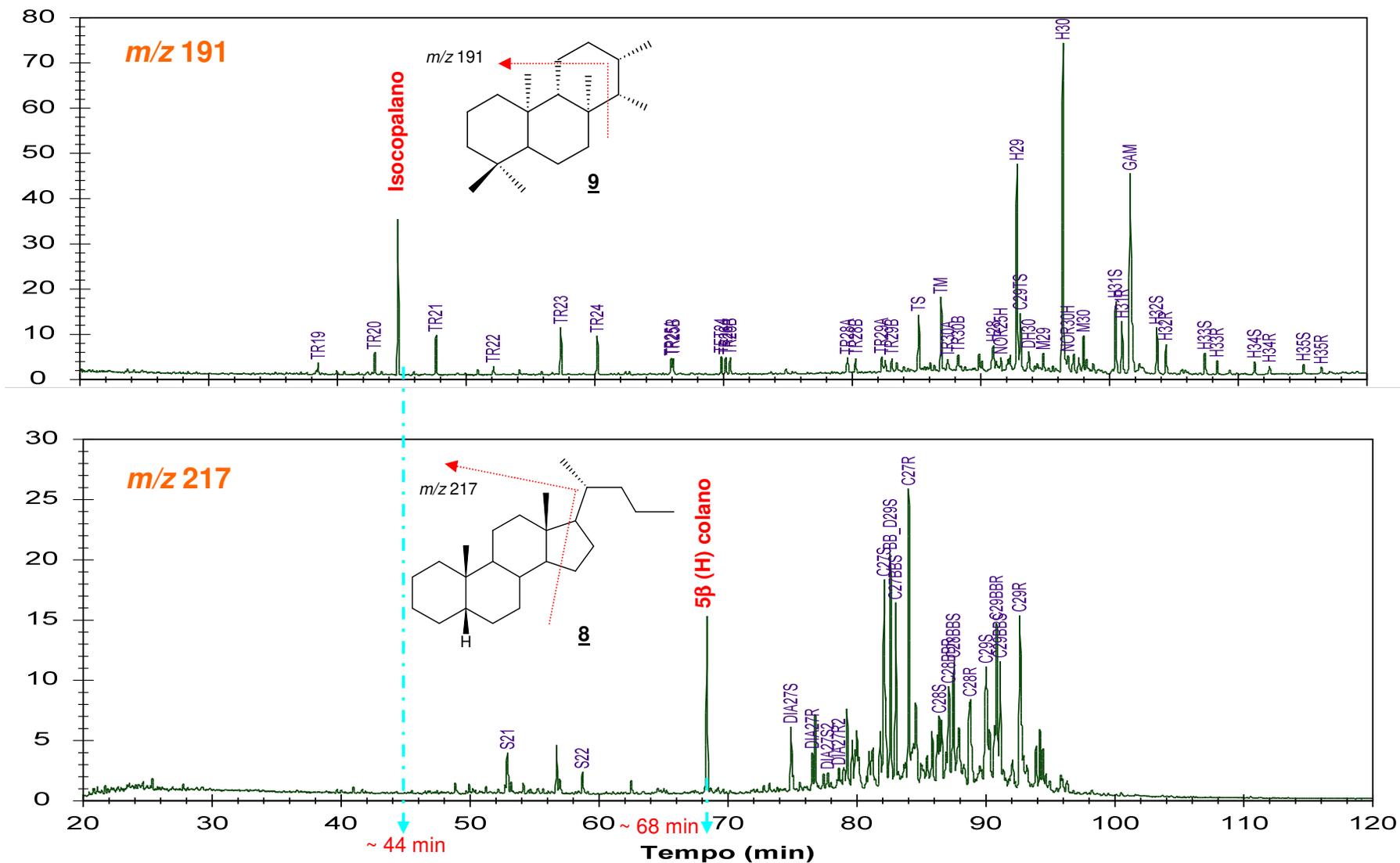


Figura 39: Cromatogramas de íons de uma das amostras de hidrocarbonetos saturados analisadas no CG-EM para visualização dos tempos de retenção dos padrões internos (isocopalano e 5β (H) colano) adicionados aos óleos antes da separação cromatográfica no CLMP.

4.3.2. Comparação entre fatores de resposta do isocopalano, 5 β (H) colano, hopano (H₃₀) e D4-colestano

Outro aspecto que deve ser avaliado quanto aos impactos na quantificação de terpanos, utilizando-se isocopalano ao invés de 5 β colano, está no fator de resposta que esta molécula apresenta quando comparado aos fatores de resposta dos diversos compostos que são avaliados nesta mesma razão m/z , como os biomarcadores hopanóis (hopanos, nor-hopanos e homo-hopanos) e não-hopanóis (gamacerano, terpanos tetracíclicos e terpanos tricíclicos).

Deste modo, foi preparada uma solução onde foram adicionadas, rigorosamente, a mesma massa de isocopalano (**9**), 5 β (H) colano (**8**), D-4 colestano (**28**) e hopano (17 α , 21 β , C₃₀) (**29**). Esta solução foi injetada, em triplicata, no CG-EM no modo MSI e os íons pesquisados foram m/z 191, 217 e 221 (todos com o mesmo *Dwell time*).

Observou-se que a relação entre as áreas obtidas para cada uma destas moléculas, quando divididas pela área obtida para o C₃₀ hopano, são bastante diferentes e que a que mais se aproximou, nestas condições de trabalho, foi a do D4-colestano (Figura 40 e Figura 41).

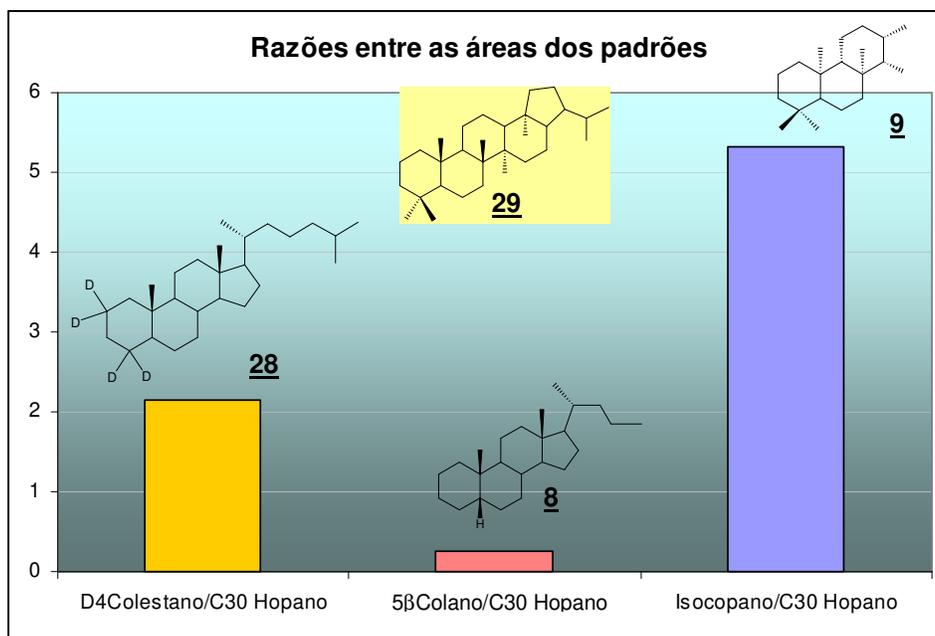


Figura 40: Razões entre as áreas do D4colestano/C₃₀ hopano, 5β(H) colano/C₃₀ hopano e isocopano/C₃₀ hopano

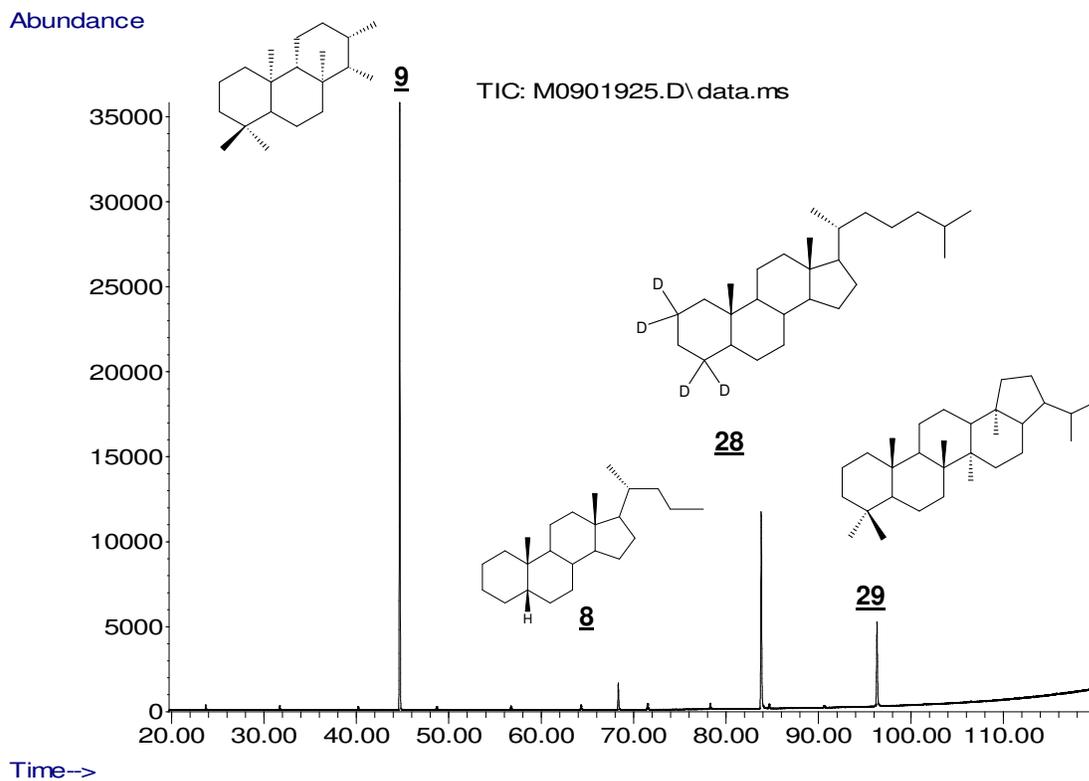


Figura 41: Cromatograma de íons totais da mistura de padrões.

Além das características estruturais de cada uma destas moléculas, é importante avaliar o peso molecular e conseqüentemente o ponto de ebulição, e como isto se reflete no tempo de retenção das mesmas.

Apesar do isocopalano ter uma fragmentação similar ao C₃₀ hopano, é importante ressaltar que os tempos de retenção são bastante diferentes e a estrutura também apresenta diferenças. O isocopalano é um terpano tricíclico e o hopano é um terpano pentacíclico.

O D4-colestano, que tem fragmentação similar ao 5 β colano, deu uma resposta mais condizente com o hopano, apesar das diferenças estruturais.

O que fica evidente é que tais moléculas possuem comportamentos e respostas químicas diferenciadas e, em casos onde não haja necessidade de refinamento quantitativo, trabalhar com razões de áreas e alturas é o mais indicado.

Em contrapartida, em casos onde haja necessidade de estudos quantitativos mais refinados, a utilização de fatores de respostas adequados e avaliação de amostras de petróleo com concentrações de biomarcadores certificadas são de extrema importância.

4.3.3. Comparação da quantificação dos hopanos com isocopalano e 5 β (H) colano e impacto na razão entre as concentrações HOPANOS/ESTERANOS

Como consequência direta da diferença entre os fatores de respostas destes compostos, descritos no item acima, os resultados das razões de biomarcadores, quando calculadas através das concentrações dos mesmos, cujos numeradores são biomarcadores terpanóis, isto é, foram calculadas com base no isocopalano, e os denominadores são biomarcadores esteranois, isto é, foram calculadas com base no 5 β (H) colano, apresentaram um acréscimo de quase 60%, como mostrado na Tabela 13.

Por exemplo, a quantificação dos hopanos, quando realizada com isocopalano é 1,6 vezes superior do que quando realizada com 5 β (H) colano. Isto era de se esperar, uma vez que a resposta em área do 5 β (H) colano é muito menor do que a resposta em área do isocopalano, devido às diferenças estruturais e, conseqüentemente, comportamentais destas moléculas quando analisadas por CG-EM (Tabela 13).

Tabela 13: Comparação entre a razão de biomarcadores hopanos/esteranos calculada a partir das massas obtidas com dois padrões.

<i>Amostra</i>	<i>Área do padrão β-colano</i>	<i>Área do padrão isocopalano</i>	<i>Área dos esteranos</i>	<i>Área dos hopanos</i>	<i>esteranos (β-colano) μg</i>	<i>hopanos (β-colano) μg</i>	<i>hopanos (isocopalano) μg</i>	<i>hop/est (β-colano)</i>	<i>hop/est (isocop/β-colano)</i>	<i>Dif. %</i>
LC-1	60473	122921	66829	869253	6,63	86,25	134,4	13,0	20,3	55,8
	62764	121829	67889	872265	6,49	83,39	136,0	12,8	21,0	63,1
LC-2	59971	118870	77678	1008044	7,77	100,85	161,1	13,0	20,7	59,8
	57891	120838	74694	990422	7,74	102,65	155,7	13,3	20,1	51,7
	59769	122093	75151	982834	7,54	98,66	152,9	13,1	20,3	55,0
M-1	45770	91547	872051	1619423	114,32	212,29	336,1	1,9	2,9	58,3
	46379	92909	897469	1636172	116,10	211,67	334,6	1,8	2,9	58,1
	45949	90846	868391	1585924	113,39	207,09	331,7	1,8	2,9	60,2
M-2	199382	366089	718953	1087227	21,64	32,72	56,4	1,5	2,6	72,5
	189052	398399	668832	1010206	21,23	32,06	48,2	1,5	2,3	50,3
	166280	337445	572799	869759	20,67	31,38	49,0	1,5	2,4	56,0
ME	31176	64356	1188193	1526754	228,67	293,83	450,7	1,3	2,0	53,4
	33495	68369	1265767	1629608	226,74	291,91	452,9	1,3	2,0	55,1
	32617	66370	1260494	1630447	231,87	299,93	466,8	1,3	2,0	55,6
ME-a	46549	91910	861549	1500637	111,05	193,43	165,8	1,7	1,9	55,0
	45657	94056	867122	1516524	113,95	199,29	160,8	1,7	1,8	47,9
	47887	93802	871549	1513932	109,20	189,69	163,6	1,7	1,9	55,4
ME-b	47568	96922	1021518	1476545	128,85	186,24	310,2	1,4	2,8	60,4
	46609	96906	1031292	1488537	132,76	191,62	306,3	1,4	2,7	53,7
	48569	97599	1062489	1486643	131,26	183,65	306,7	1,4	2,8	61,7
ME-c	88982	181784	1288027	1586290	86,85	106,96	289,5	1,2	2,2	55,4
	93290	199717	1393628	1690565	89,63	108,73	291,9	1,2	2,2	52,3
	94983	193511	1376869	1666050	86,98	105,24	289,4	1,2	2,2	57,6
ME-d	37215	75016	797662	1357420	128,60	218,85	343,8	1,7	2,7	57,1
	37358	75654	891534	1500682	143,19	241,02	376,9	1,7	2,6	56,4
	41134	84062	778638	1342679	113,58	195,85	303,5	1,7	2,7	55,0

4.4. Caracterização geoquímica dos extratos ácidos dos óleos estudados

4.4.1. Obtenção dos extratos ácidos

A quantidade de extratos ácidos obtidos dos petróleos estudados variou de acordo com amostra. Nota-se que no conjunto I (Tabela 15), o óleo **ME** apresentou uma recuperação de ácidos superior aos óleos **LC-1** e **LC-2**, conforme era de se esperar, uma vez que estes últimos não apresentam nenhuma evidência de biodegradação. Os óleos **M-1** e **M-2** apresentaram recuperações similares aos óleos lacustres.

No conjunto II, onde todos os óleos possuem a mesma origem e todos são afetados pela biodegradação, a recuperação dos ácidos foi, de modo geral, superior aos do conjunto I, à exceção do **ME-d** (Tabela 14), onde a recuperação foi baixa em função de um problema operacional durante a extração, acarretando na permanência dos compostos ácidos junto com a fração neutra. Isto foi evidenciado tanto pela massa recuperada de extrato ácido, muito inferior ao que se esperaria em função do perfil do óleo e dos resultados de análise por espectroscopia na região de IV, onde para todos os óleos do conjunto II observou-se banda de absorção característica para ácidos carboxílicos ($\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) na fração de ácida e ausência da mesma nas frações neutras, à exceção das frações ácida e neutra recuperadas do óleo **ME-d**. Estes espectros encontram-se no Anexo VI.

Tabela 14: Recuperação percentual de extrato ácido utilizando sílica gel/KOH.

	<i>Amostras</i>	<i>Massa óleo (g)</i>	<i>Fração ácida BRUTA (g)</i>	<i>Recuperação Fração ácida (%)</i>
Conjunto I	LC-1	60	0,35	0,6
	LC-2	62	0,22	0,4
	M-1	65	0,42	0,6
	M-2	113	0,30	0,3
	ME	91	1,89	2,1
Conjunto II	ME-a	99	1,28	1,3
	ME-b	111	1,36	1,2
	ME-c	91	0,49	0,5
	ME-d	102	0,16	0,2

No início dos trabalhos no Orbitrap, foi feita uma avaliação preliminar dos resultados utilizando-se esta fração ácida “bruta”. No entanto, por se tratar de um equipamento de alta resolução de massa, foi observada a presença de muitas impurezas. Deste modo, foi realizado um procedimento adicional de limpeza da fração ácida “bruta” utilizando-se SPE e os resultados obtidos, incluindo o percentual de recuperação do método, estão destacados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados da limpeza da fração de ácidos por SPE.

	<i>Amostras</i>	<i>Fração ácida BRUTA aplicada no SPE (g)</i>	<i>Impurezas (g)</i>	<i>Fração ácida (g)</i>	<i>Impurezas (%)</i>	<i>Fração ácida (%)</i>	<i>Rec. Total (%)</i>
Conjunto I	LC-1	0,0500	0,0336	0,0147	67,0	29,4	96,6
	LC-2	0,0500	0,0376	0,0102	75,0	20,4	95,6
	M-1	0,0497	0,0210	0,0210	42,0	56,1	98,4
	M-2	0,0396	0,0272	0,0121	68,7	30,6	99,2
	ME	0,0498	0,0242	0,0250	48,6	50,4	98,6
Conjunto II	ME-a	0,4618	0,0830	0,3516	18,0	76,1	94,1
	ME-b	0,4680	0,1280	0,3130	27,4	66,9	94,2
	ME-c	0,4991	0,1000	0,3400	20,0	68,1	88,2
	ME-d	0,1623	0,0722	0,0602	44,5	37,1	82,5

Os extratos ácidos purificados foram analisados por espectroscopia na região do IV onde observou-se uma banda de absorção de ~ 1704 a 1714 cm^{-1} , referente à deformação axial da carbonila dos ácidos. Estes espectros encontram-se no anexo VI.

Com o intuito de comparar o perfil molecular dos extratos ácidos obtidos neste trabalho utilizando-se a técnica Orbitrap, com os vários trabalhos presentes na literatura (Silva, 2008; Behar & Albrecht, 1984 e Lima, 2005), que versam diretamente a respeito de biomarcadores ácidos carboxílicos da Bacia Potiguar, ainda que convertidos a esteres metílicos ou até mesmo reduzidos a hidrocarbonetos, parte dos extratos ácidos purificados dos óleos do conjunto II foram convertidos a ésteres metílicos utilizando-se diazometano.

A esterificação foi acompanhada por CCDA e em seguida esses extratos foram purificados CCDP (fase móvel: diclorometano:acetato de etila, 50:50).

4.4.2. Análise dos ésteres metílicos por CG-EM (Conjunto II)

Com base nos resultados da esterificação/purificação, apresentados na Tabela 16, fica evidente que ocorreu uma perda de ácidos bi e tri funcionalizados durante esta derivatização/limpeza. Isto pode representar uma perda de informação molecular relevante, que, em parte, pode ser suprida utilizando-se outras técnicas de espectrometria de massas que dispensem essas reações de derivatização.

Tabela 16: Resultados limpeza dos ésteres metílicos utilizando-se CCDP.

	<i>Amostras</i>	<i>Éster metílico (Bruto) (mg)</i>	<i>Éster metílico purificado (mg)</i>	<i>Recuperação Fração Éster (%)</i>
Conjunto II	ME-a	41,0	23,2	56,6
	ME-b	38,0	10,8	28,4
	ME-c	43,0	10,5	24,4
	ME-d	14,0	7,0	50,0

Como consequência principal da baixa recuperação das frações de ésteres metílicos, os resultados das análises de CG-EM não foram plenamente satisfatórios, tendo em vista que em alguns casos observou-se uma razão sinal/ruído muito baixa (ANEXO VII).

Sendo assim, foi feita apenas análise qualitativa de alguns biomarcadores ácidos, ainda que se tenha adicionado os padrões isocopalato de metila (**5-c**) e 5 β colanato de metila (**1-c**).

Os resultados das análises qualitativas dos ésteres metílicos dos óleos do conjunto II serão apresentados em paralelo aos resultados das análises dos extratos ácidos utilizando-se Orbitrap de modo a facilitar a compreensão.

4.4.3. Orbitrap: Aplicação em extratos ácidos de petróleo

Seguem nas figuras a seguir (Figura 42 e Figura 43) os espectros de massas dos ácidos extraídos e purificados provenientes dos dois conjuntos de óleos selecionados para este trabalho. Estes espectros foram obtidos por infusão direta no APCI(-) e detecção no Orbitrap na faixa de m/z entre 190 e 750 com resolução de 100.000 e encontram-se ampliados no ANEXO V.

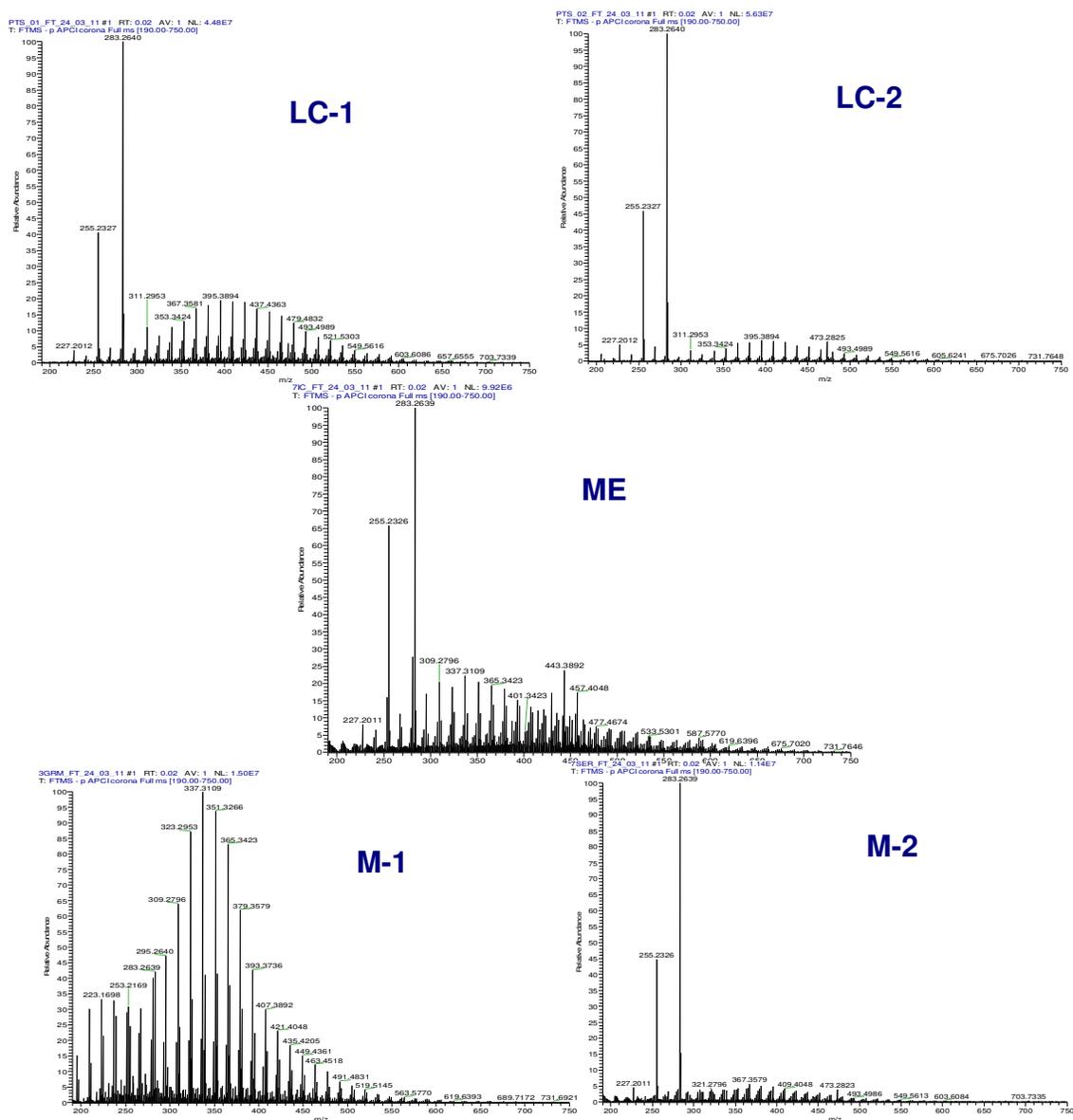


Figura 42: Espectros APCI (-) dos extratos ácidos conjunto I (Orbitrap).

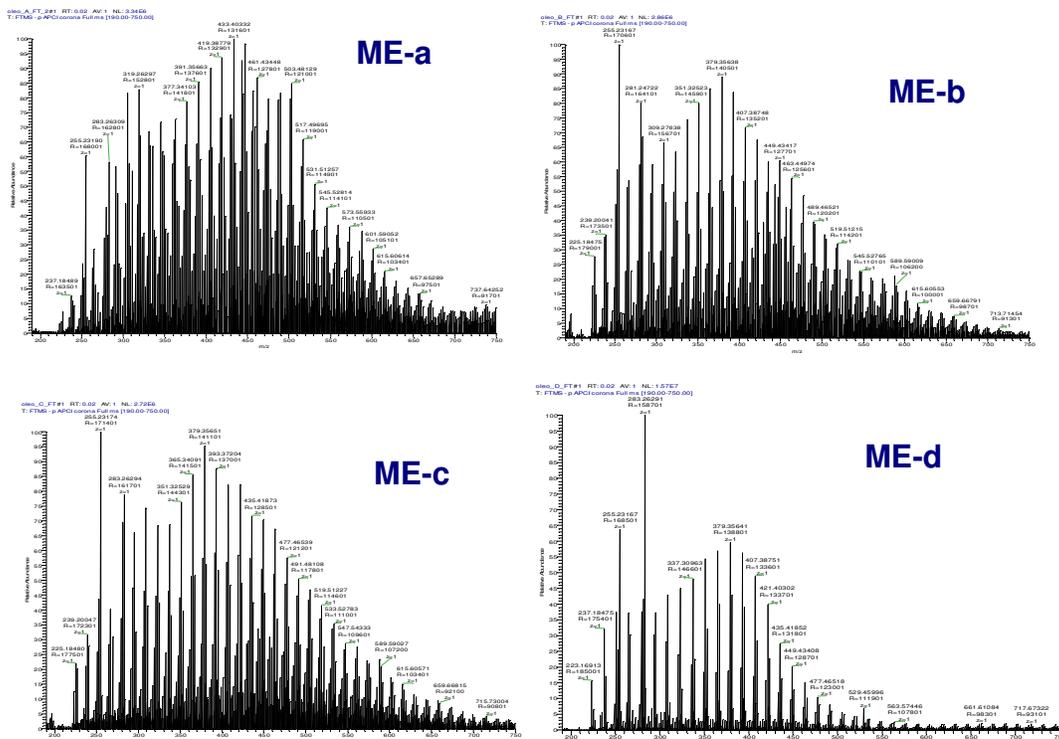


Figura 43: Espectros APCI (-) dos extratos ácidos conjunto II (Orbitrap).

Os perfis de ácidos carboxílicos observados para todos os extratos foram semelhantes com alguns dos exemplos encontrados na literatura utilizando-se técnicas similares (Figura 44) (Rudzinski *et al.*, 2002; Mohammed & Sorbie, 2009).

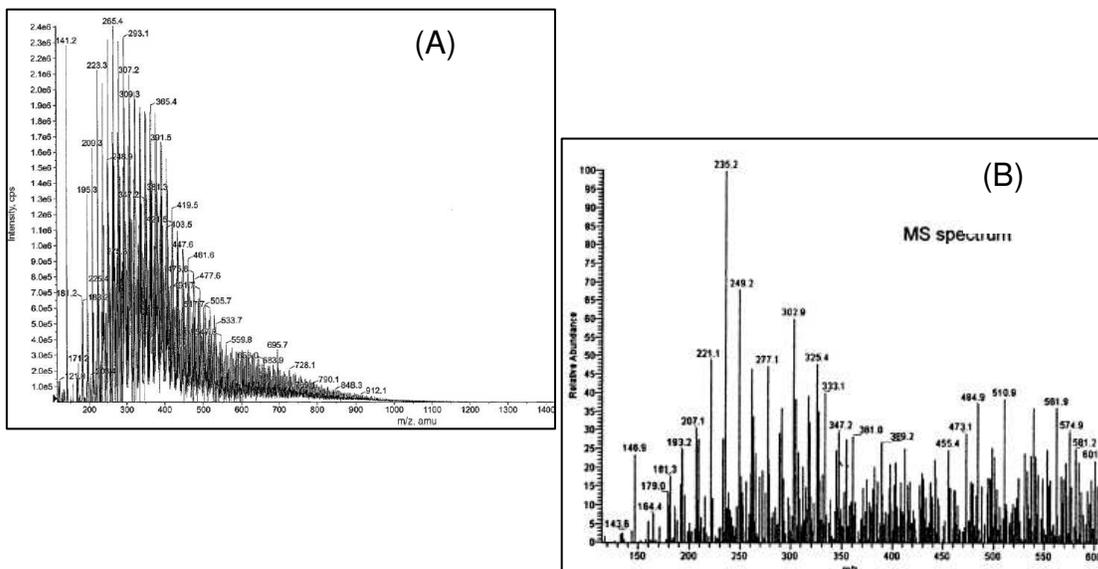


Figura 44: A) Espectro APCI (-) de extrato ácido de petróleo (Extraído de Mohammed & Sorbie, 2009) e B) Espectro ESI (-) de extrato ácido do óleo Maya (Extraído de Rudzinski *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que apesar do Orbitrap ter uma resolução maior que do que o LTQ, os mesmos íons foram detectados pelos dois analisadores, seguindo a mesma distribuição de massas (ANEXO V).

De modo a confirmar a presença de ácidos carboxílicos, fez-se uma avaliação das massas correspondentes aos íons de interesse obtidos nos espectros de massas dos extratos ácidos analisados no Orbitrap.

Os dados extraídos do Orbitrap foram tratados com o programa que acompanha o equipamento, que é o *Xcalibur*. Utilizando este programa foi possível atribuir fórmulas moleculares mínimas, dentro de uma determinada faixa de erro e de acordo com informações prévias dos possíveis elementos químicos presentes, confirmando em quase todos os íons, fórmulas moleculares correspondentes aos ácidos carboxílicos.

Contudo, neste tipo de análise são detectados mais de 7000 íons e, deste modo, a utilização de um programa para o tratamento dos dados obtidos contribui bastante na compilação dos resultados. O programa utilizado para esta finalidade foi o *Composer*[®] onde informações diretas sobre distribuição em porcentagem de

classes de heteroátomos, número de carbonos e insaturações por *double bond equivalents* ou número equivalente de insaturações (DBE) foram obtidas. A composição molecular do petróleo é geralmente expressa pela fórmula química (Altgelt & Bonduszynski, 1994):

$C_nH_{2n+z}X$, onde n é o número de carbonos,
 z é a deficiência de hidrogênio (medida do caráter aromático) e
 X é o heteroátomo (NSO) na molécula.

A DBE é calculada pela equação abaixo e na prática quanto mais alto é o valor de DBE, mais insaturado é o composto:

$$DBE = [n] - [\text{número de hidrogênios}/2] + [\text{número de heteroátomos}/2] + 1$$

Por exemplo, o ânion correspondente ao ácido *n*-hexadenóico tem fórmula molecular $[C_{16}H_{32}O_2 - H]^-$ e $DBE = 1,5$, ou seja:

$$DBE = 16 - (31/2) + (2/2) + 1 = 1,5$$

Deste modo, moléculas com DBE 1,5, de compostos classe O2, correspondem aos ácidos carboxílicos alifáticos. Classe O2 é convencionalmente denominada como sendo a classe de ácidos carboxílicos. Moléculas com DBE 2,5, de compostos classe O2, estão relacionadas a ácidos carboxílicos monocíclicos e assim por diante (Altgelt & Bonduszynski, 1994).

Neste trabalho, foi feita a extração/purificação dos ácidos de petróleo tendo em vista que se pretendia trabalhar apenas com a classe O2.

De acordo com os resultados obtidos quanto à intensidade relativa dos compostos classe O2 pode-se afirmar que a extração e purificação da fração ácida proveniente das amostras de petróleo foram realizadas com sucesso, uma vez que os percentuais variaram entre 94 e 100%. As demais classes encontradas, no resíduo de 0-6%, foram compostos nitrogenados (classe NO e NO2) e polioxigenados (O4).

Estes resultados estão explicitados, por amostra, na Figura 45 à exceção da amostra **M-2**, cujo perfil de íons totais demonstrou uma baixa abundância relativa de íons inviabilizando, portanto, seu tratamento de dados.

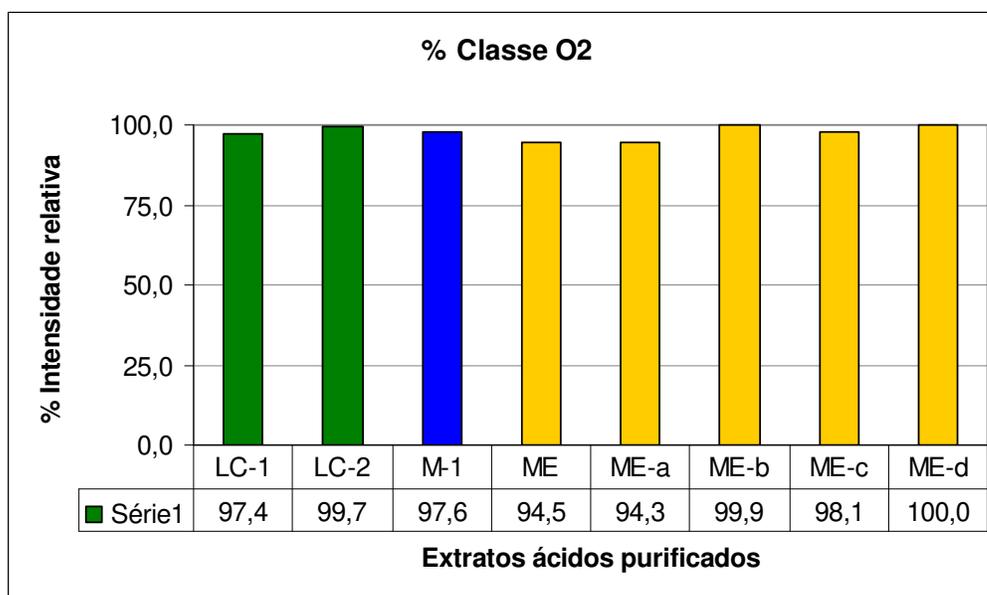


Figura 45: Percentual da classe O2 nos extratos ácidos purificados dos óleos lacustres (**LC-1** e **LC-2**), óleo misto (**M-1**) e óleos marinho evaporíticos (**ME**, **ME-a**, **ME-b**, **ME-c** e **ME-d**).

Foi feita uma pesquisa da distribuição do percentual dos íons observados, dentro da classe O2 (ácidos carboxílicos), em função do DBE.

Os resultados obtidos para os óleos lacustres **LC-1** e **LC-2** (Figura 46) mostraram uma elevada abundância relativa de íons correspondentes aos ácidos carboxílicos alifáticos, cujo DBE é 1,5. Os principais contribuintes para esta elevada abundância são ácidos carboxílicos contendo um total de 16 e 18 átomos de carbono.

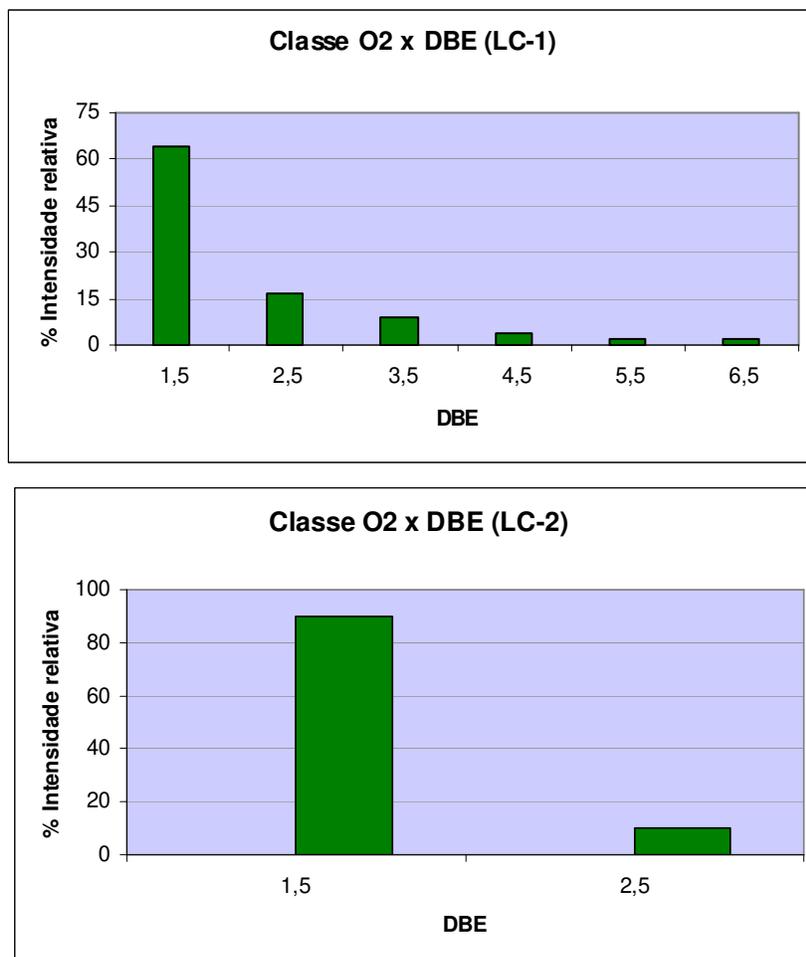
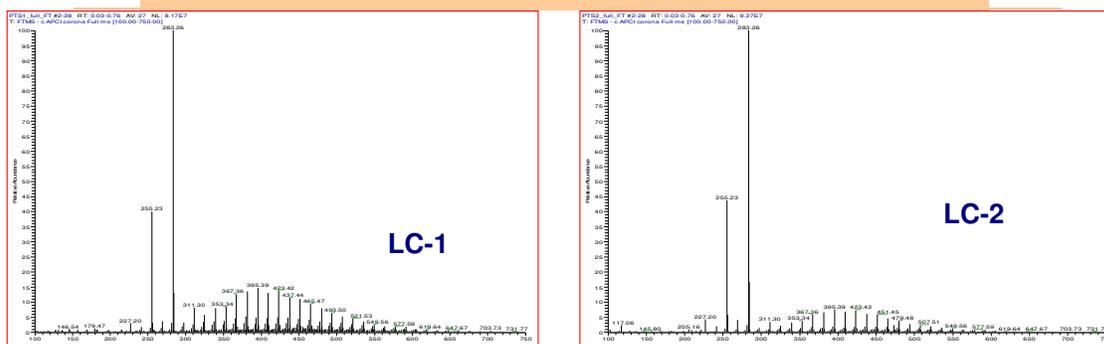


Figura 46: Percentual da classe O2 x DBE nos extratos ácidos purificados dos óleos lacustres (LC-1 e LC-2).

Este resultado já tinha sido evidenciado através dos espectros de massas dos extratos ácidos (Figura 47). Em princípio, esperava-se que os resultados de **LC-1** e **LC-2**, em termos de DBE x Classe O2, fossem equivalentes. Essa estimativa foi baseada nos resultados obtidos nas análises geoquímicas realizadas com os hidrocarbonetos saturados. Tanto os perfis de biomarcadores hidrocarbonetos, quanto a análise do óleo total (CG-DIC), mostraram perfis bem semelhantes.

a) Resultados do Orbitrap – Espectro de massas APCI (-)



b) Resultados do CG-DIC – Cromatograma óleo total

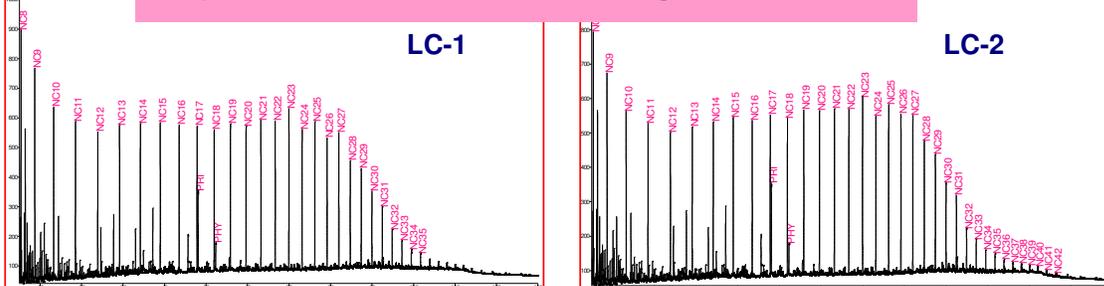


Figura 47: a) Espectros de APCI (-) dos extratos ácidos de **LC-1** e **LC-2**; b) CG-DIC do óleo total de **LC-1** e **LC-2**.

A amostra **LC-1** apresentou maior variação de íons (DBE 1,5 a 6,5) do que a amostra **LC-2** (DBE 1,5 e 2,5), ainda que a proporção seja baixa para os compostos com DBE superiores a 2,5. O que foi observado na amostra **LC-2** pode ter sido ocasionado pela supressão dos demais íons, tendo em vista que a abundância relativa dos ácidos alifáticos com 16 e 18 átomos de carbono está muito elevada, e se tratam de moléculas facilmente ionizáveis nas condições trabalhadas com APCI (-).

Resultados similares a estes já foram descritos na literatura, para óleos de mesma origem e da mesma bacia sedimentar (Silva, 2008 e Lopes, 1995). No entanto, o diferencial está na forma como essas moléculas eram analisadas. Normalmente utilizava-se técnica de CG-EM na análise dos ácidos carboxílicos sinteticamente convertidos a ésteres metílicos e até mesmo reduzidos aos hidrocarbonetos correspondentes. O emprego destas metodologias são ainda indispensáveis, principalmente em se tratando de biomarcadores, cuja

complexidade está associada a presença de vários centros quirais nas moléculas e com o emprego da cromatografia gasosa, que é uma técnica bem estabelecida e de elevadíssimo poder de resolução, muitas informações podem ser extraídas.

Silva (2008) observou a presença de ácido *n*-hexadecanóico (*n*-C₁₆) e *n*-octadecanóico (*n*-C₁₈), em elevadas concentrações, em óleos do tipo lacustre de água doce e misto, da Bacia Potiguar e sugeriu que estes possam ser provenientes de bactérias que atuam na formação do petróleo, uma vez que os mesmos se mostraram predominantes em amostras de óleos não biodegradados (Figura 48).

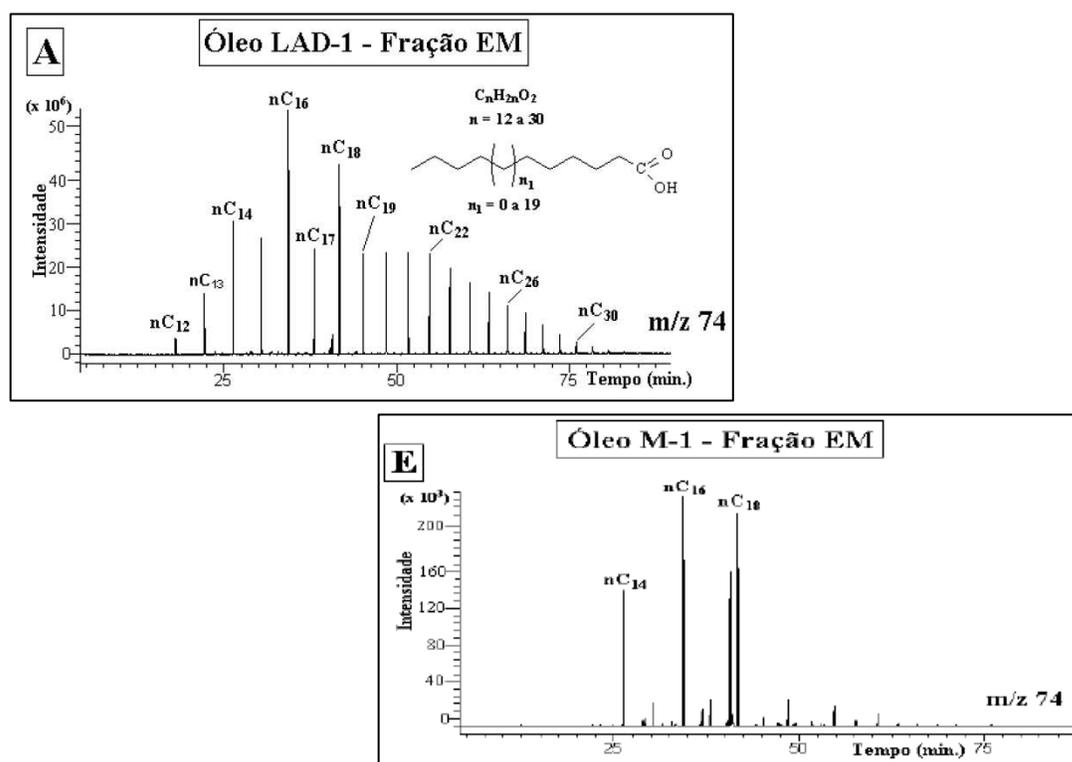


Figura 48: Resultados das análises CG-EM ($m/z \ 74$) de extratos ácidos de petróleos da Bacia Potiguar convertidos a ésteres metílicos. **A:** óleo lacustre água doce; **E:** óleo misto (Extraído de Silva, 2008).

Os resultados obtidos para os extratos ácidos provenientes dos óleos marinho evaporíticos do Conjunto I (**ME**), assim como os do conjunto II (**ME-a**, **ME-b**, **ME-c** e **ME-d**) mostraram uma distribuição maior de DBE para a classe O2, incluindo classes de compostos aromáticos que estão associadas às moléculas com maior grau de insaturação (Figura 49 e Figura 50, respectivamente).

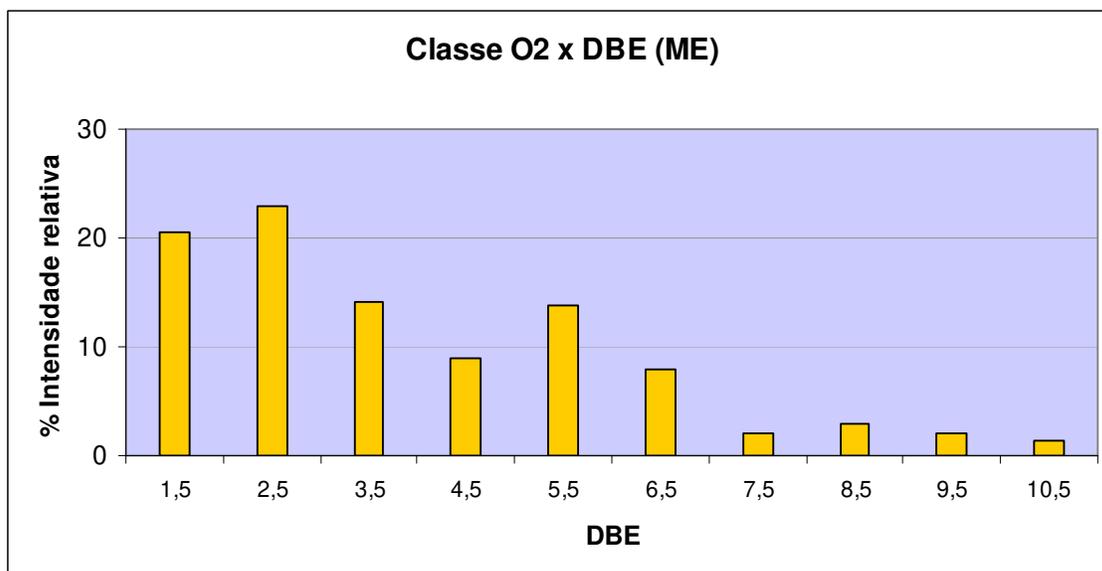


Figura 49: Percentual da classe O2 x DBE no extrato ácido purificado do óleo misto (**M-1**).

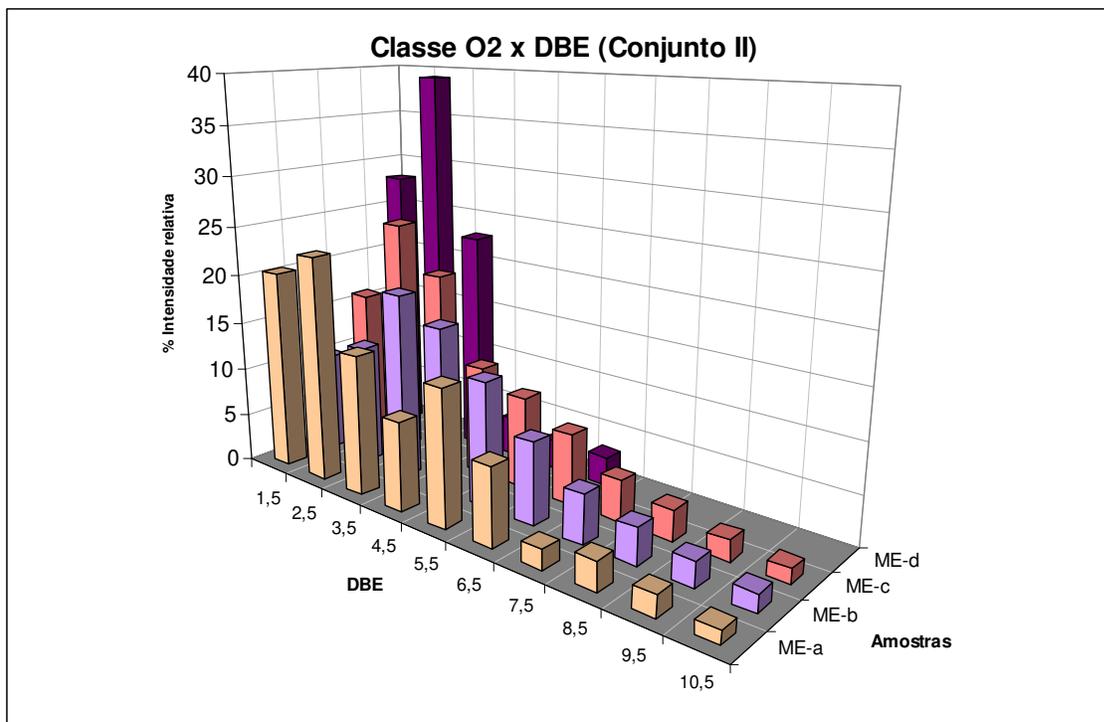


Figura 50: Percentual da classe O2 x DBE nos extratos ácidos purificados dos óleos marinho evaporíticos (**ME, ME-a, ME-b, ME-c e ME-d**).

Este resultado já era, de fato, esperado para essas amostras, tendo em vista que se tratam de óleos que sofreram biodegradação, evidenciada pelas análises prévias dos biomarcadores hidrocarbonetos e os perfis dos óleos obtidos por CG-DIC, onde foi possível observar uma diminuição dos hidrocarbonetos de cadeia linear de baixo peso molecular e aumento do *Hump* associado à UCM (Anexo IV).

Comparando-se os perfis dos íons m/z 74, que correspondem aos fragmentos (ion base) de ácidos carboxílicos de cadeia linear, provenientes das análises por CG-EM dos ésteres metílicos dos óleos marinho evaporíticos do conjunto II, com os resultados obtidos das análises diretas dos extratos ácidos através do Orbitrap (Figura 51), observou-se grande correspondência. No entanto, fica notório que através da análise direta do extrato ácido, utilizando o Orbitrap, a informação a respeito da composição molecular desta classe de compostos é mais refinada. Sendo possível visualizar moléculas que não foram detectadas na fração éster metílico.

Análises dos extratos ácidos (Orbitrap)

Análises dos ésteres metílicos (CG-EM)

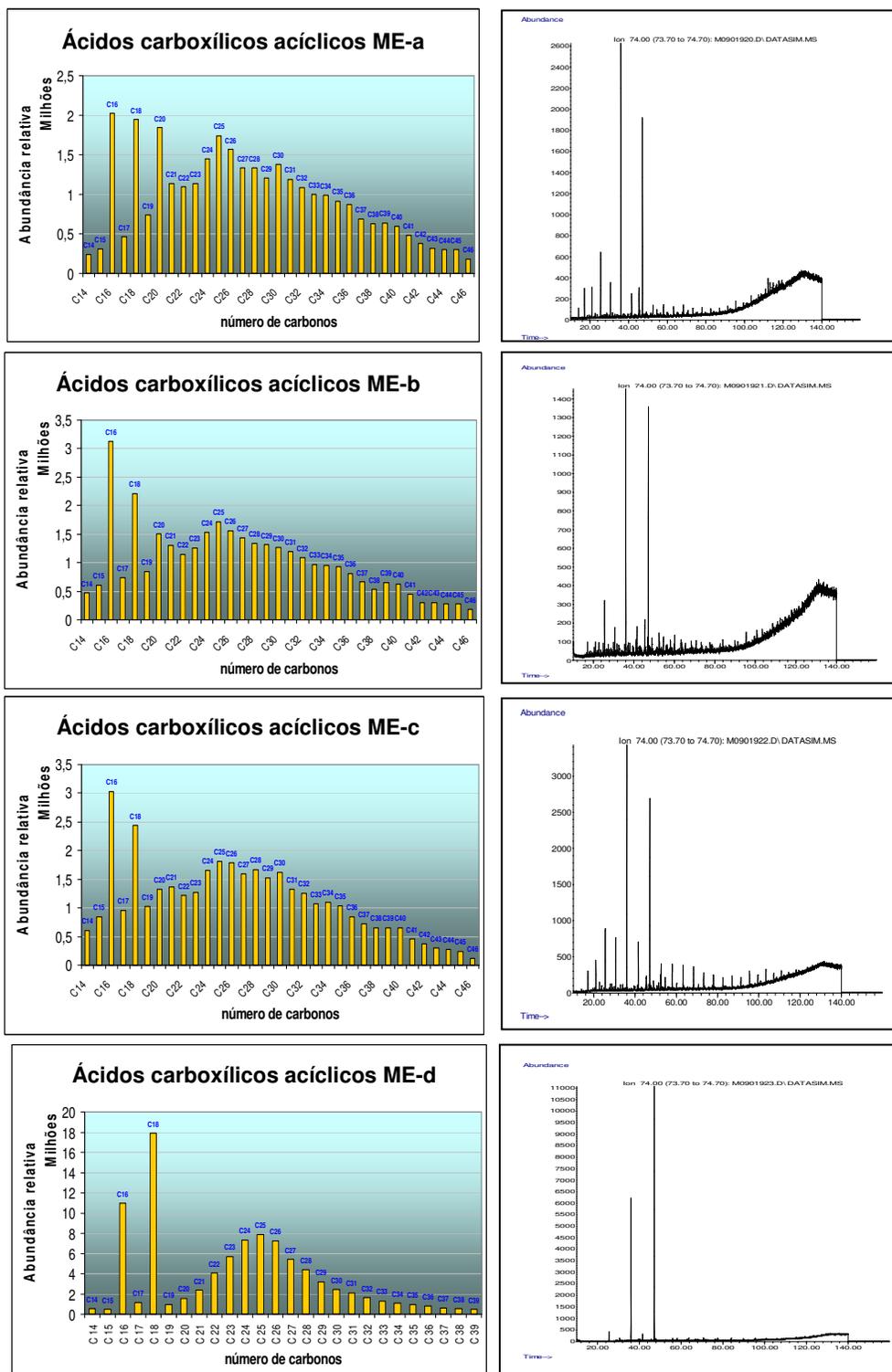


Figura 51: Histograma dos ácidos carboxílicos acíclicos (DBE=1,5, classe O2) extraídos dos espectros APCI (-) dos extratos ácidos dos óleos do conjunto II e cromatograma de íons dos ésteres metílicos correspondentes aos ácidos carboxílicos dos óleos do conjunto II (CG-EM, m/z 74).

Todas as amostras apresentaram ácidos $n\text{-C}_{16}$ e $n\text{-C}_{18}$ alcanóico em maior proporção relativa, tal qual Fafet e colaboradores (2008) observaram nas análises por CG-EM de extratos ácidos de petróleos, reduzidos a hidrocarbonetos, (Bacia Potiguar) e Silva (2008) observou os mesmos perfis nas análises CG-EM de dois extratos ácidos, convertidos a ésteres metílicos, de óleos marinho evaporíticos da Bacia Potiguar (Figura 52).

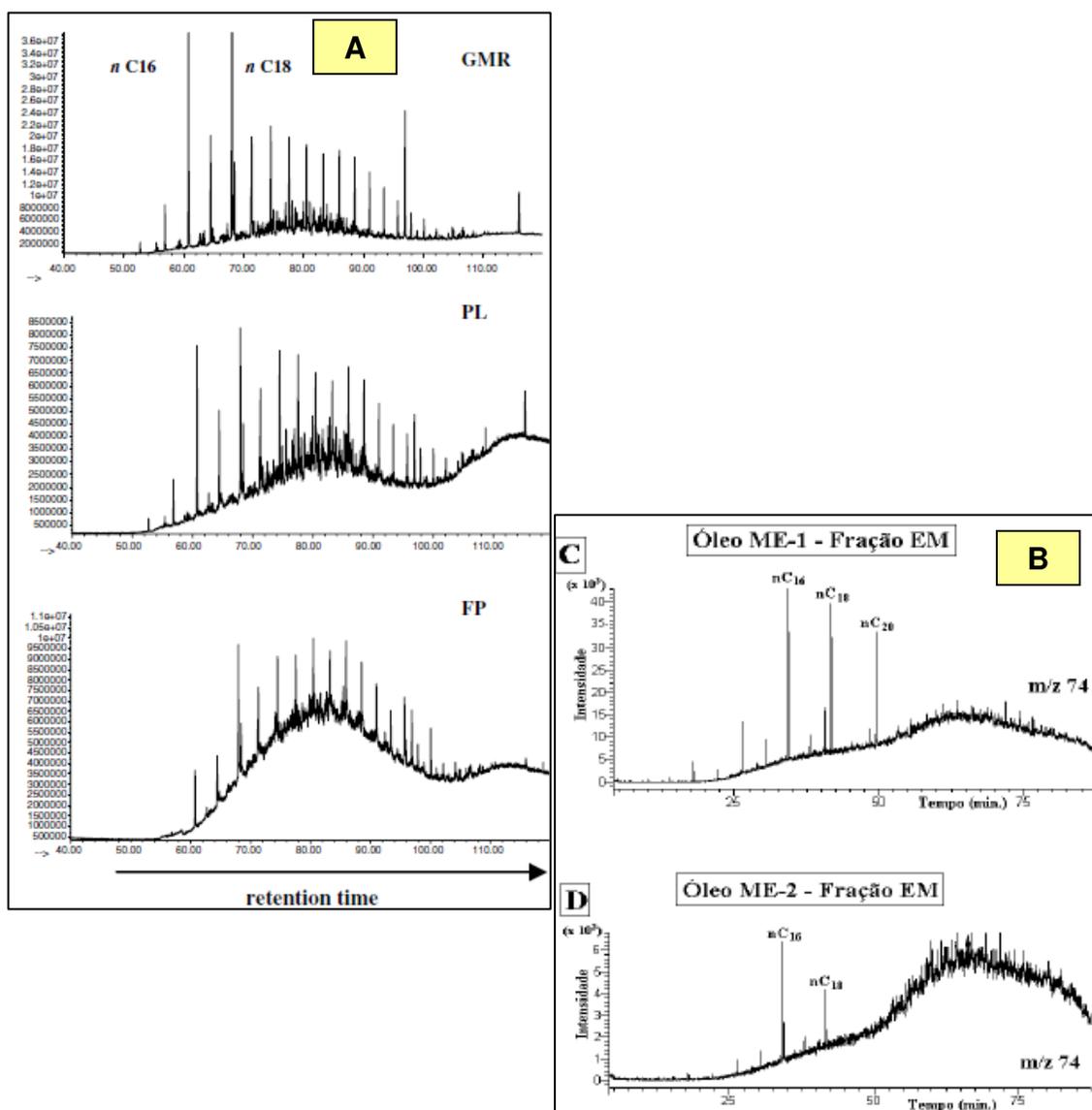


Figura 52: Resultados das análises CG-EM de extratos ácidos de petróleos da Bacia Potiguar reduzidos a hidrocarbonetos (A) (Extraído de Fafet et al., 2010) e extratos ácidos de petróleos marinho evaporíticos da Bacia Potiguar convertidos a ésteres metílicos (B) (Extraído de Silva, 2008).

Nos extratos ácidos do conjunto II (óleos marinho evaporíticos) também foi observado que as moléculas com DBE 2,5, que correspondem aos ácidos carboxílicos monocíclicos substituídos, foram as que deram maior intensidade relativa. Essa classe de compostos é especialmente interessante pois é nela que se enquadram as moléculas de biomarcadores característicos de membranas celulares de diversas bactérias do gênero *Alicyclobacillus* (Goto *et al.*, 2002 e De Rosa *et al.*, 1972), conforme reportado por Rodrigues *et al.* (2000) que caracterizaram a distribuição de ácidos ω -cicloexil-undecanóico em óleos marinhos evaporíticos e lacustres de água doce brasileiros. Também foi observada uma alta concentração de moléculas ácidas com DBE de 5,5, que está associada a ácidos tetracíclicos e é onde potencialmente se encontram os biomarcadores ácidos esteranóicos.

No extrato ácido do óleo misto **M-1**, também se observou uma proeminência na classe O2 com DBE 2,5. Este óleo também está biodegradado e, conforme o perfil mostrado na Figura 53, ele se assemelha mais com o extrato ácido proveniente do óleo marinho evaporítico (**ME**) do que com os óleos lacustres (**LC-1** e **LC-2**). Diferentemente dos demais extratos ácidos analisados, o **M-1** não apresentou, de forma relevante, ácidos carboxílicos alifáticos com 16 e 18 átomos de carbono. Apresentou uma distribuição com pico máximo na faixa entre 22 e 25 átomos de carbono.

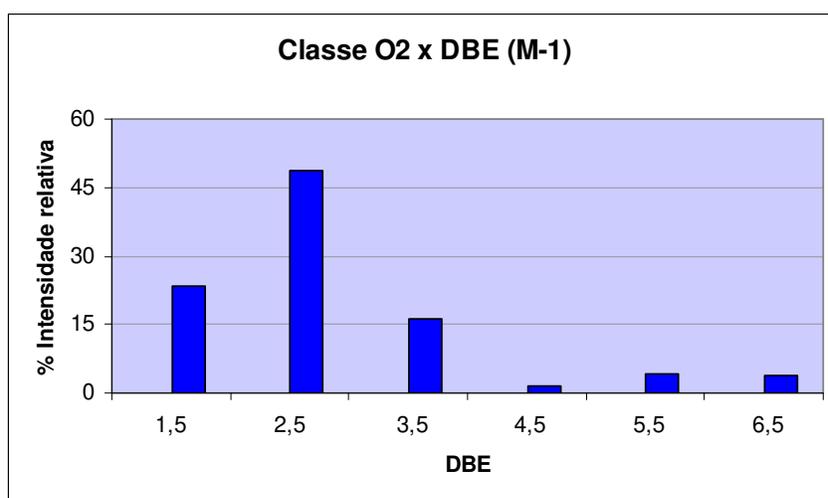


Figura 53: Percentual da classe O2 x DBE no extrato ácido purificado do óleo misto (**M-1**).

Foi feita uma correlação entre as amostras de extratos ácidos, tendo como base os resultados obtidos através do tratamento de dados do Orbitrap, e construiu-se um gráfico cruzando as informações de DBE das amostras (Figura 54). Como a amostra **LC-2** não apresentou distribuição de moléculas com DBE superior a 2,5, foi utilizada apenas a amostra **LC-1** como representante de óleo lacustre. Comparou-se a somatória dos DBE 5,5+6,5, relacionados a compostos policíclicos, com a somatória de DBE 1,5+2,5, relacionados a compostos alifáticos e monocíclicos. Observou-se que o óleo de origem lacustre **LC-1** fica na região onde a quantidade de compostos alifáticos é predominante. Em contrapartida, o óleo marinho evaporítico **ME** mostrou em sua composição maior contribuição de compostos policíclicos. Já o óleo misto **M-1** se apresentou num ponto intermediário de composição.

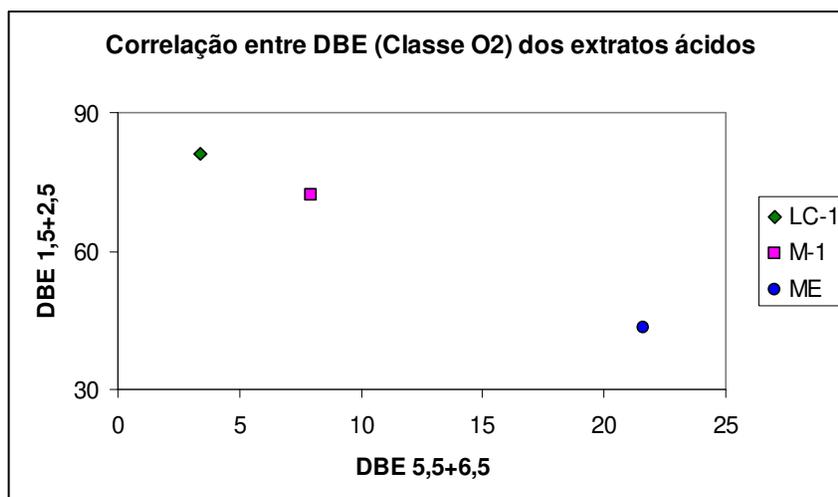


Figura 54: Correlação entre DBE1,5+2,5 *versus* DBE5,5+6,5 para os extratos ácidos **LC-1**, **M-1** e **ME**.

Os óleos lacustres estudados neste trabalho não apresentam indícios de biodegradação, enquanto os óleos marinho-evaporítico e misto se encontram biodegradados. Sendo assim, acredita-se que esse efeito de aumento de

ciclização está mais associado ao efeito de biodegradação do que propriamente à diferenciação genética.

Esse tipo de correlação já foi feita anteriormente por diversos pesquisadores utilizando-se dados de análises de ácidos carboxílicos provenientes de petróleos, através de diferentes técnicas como o FAB-MS (*Fast Atom Bombardment – Mass Spectrometry*) (Fan, 1991) e mais recentemente, Kim e colaboradores (2005) que utilizaram ESI (-) FT-ICR para análise direta de petróleos com diferentes graus de biodegradação e demonstram que, com o avanço do processo de biodegradação, a quantidade de ácidos carboxílicos de cadeia cíclica aumenta, enquanto a de ácidos carboxílicos de cadeia aberta diminui (Figura 55). Esse parâmetro (Razão A/C) foi comparado à outros parâmetros que normalmente são utilizados para avaliar o grau de biodegradação como °API e TAN.

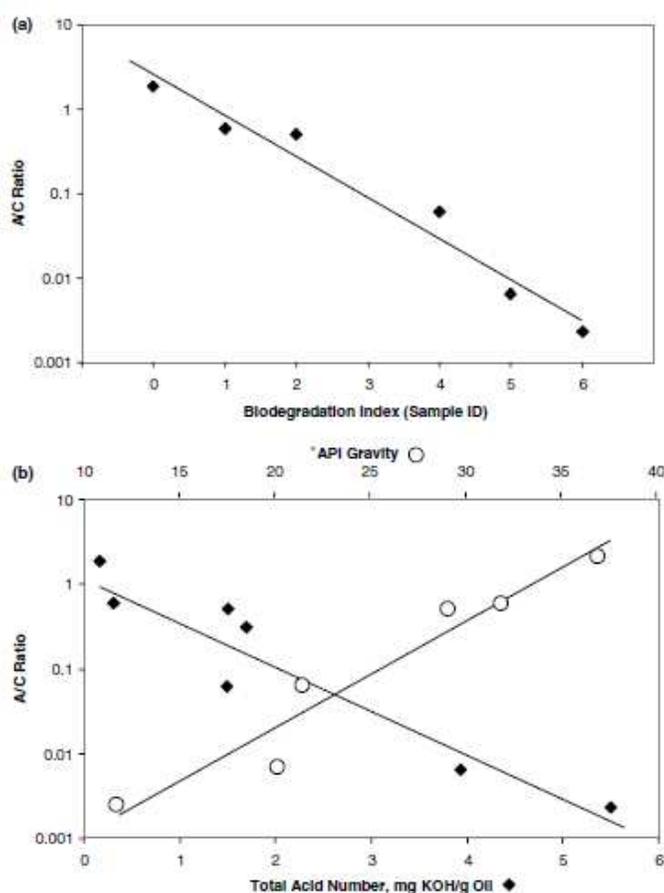


Figura 55: a) Razão A/C x PMI e b) TAN x Razão A/C x °API (Petróleos analisados em ESI(-) FT-ICR) (Extraído de Kim *et al.*, 2005).

A razão A/C proposta por Kim e colaboradores (2005) é calculada a partir da quantidade total de compostos acíclicos (DBE 1,5), dividida pelo somatório das quantidades dos compostos que contém de dois a quatro anéis (DBE de 3,5 a 5,5) e neste trabalho foi calculada a partir dos resultados obtidos das análises dos extratos ácidos do conjunto II por APCI (-) Orbitrap. Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 17 e na Figura 56, foram coerentes com os observados na literatura (Kim *et al.*, 2005), com excessão da amostra **ME-d**, que por apresentar menor %API, teoricamente apresentaria menor valor da razão A/C. No entanto, este resultado está sendo afetado pelo problema que ocorreu durante a etapa de extração dos compostos ácidos.

Tabela 17: Razão A/C e %API dos óleos do conjunto II.

Amostra	Razão A/C	%API
ME-a	0,21	22
ME-b	0,39	21,5
ME-c	0,47	24
ME-d	0,94	19,6

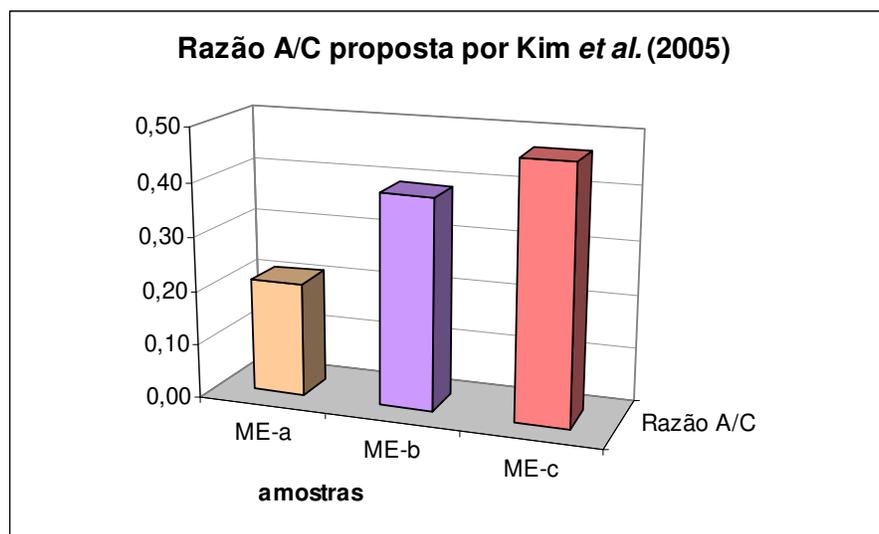


Figura 56: Razão A/C das amostras do conjunto II.

Na tentativa de se fazer uma correlação entre os resultados obtidos para as análises dos extratos ácidos pelo Orbitrap e os resultados obtidos para as análises dos biomarcadores hidrocarbonetos saturados pelos métodos convencionais (CG-EM), fez-se uma seleção preliminar de alguns biomarcadores terpanos, principalmente os hopanos e esteranos que são comumente estudados, a fim de avaliar a origem dos óleos em questão.

Antes de se iniciar a pesquisa das moléculas ácidas de interesse, calculou-se a massa monoisotópica teórica associada ao ânion correspondente a cada molécula neutra e fez-se uma busca detalhada nos resultados obtidos no Orbitrap. A presença do íon molecular pesquisado, ainda que com erros inferiores a 3 ppm, não caracteriza necessariamente a presença da molécula em questão, tendo em vista as diversas possibilidades de estereoisômeros. No entanto, a ausência caracteriza a não existência de tais moléculas na fração ácida em questão, de acordo com os procedimentos adotados neste trabalho.

Para os terpanos foram pesquisadas 17 moléculas, sendo que algumas possuem a mesma massa exata por serem tratadas de isômeros estruturais. Esta informação fica mais evidente comparando-se o cromatograma de íons extraídos, com razão m/z 191, da fração de biomarcadores neutros da amostra LC-1 (Figura 57 e a Tabela 18), onde estão explicitadas as massas moleculares correspondentes às moléculas selecionadas.

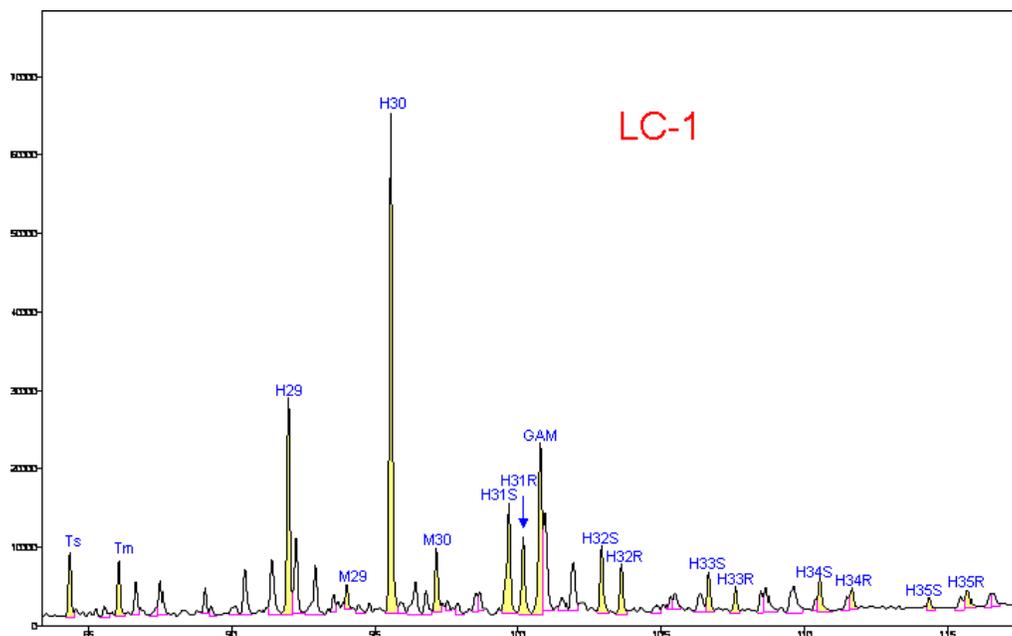


Figura 57: Expansão de parte do cromatograma de íons (m/z 191) da fração hidrocarbonetos saturados da amostra **LC-1**.

Tabela 18: Íons pesquisados no Orbitrap e moléculas neutras correspondentes (terpanos)-**LC-1**.

Sigla	Hidrocarboneto saturado		Ácido carboxílico correspondente	
	Fórmula molecular	Massa monoisotópica Teórica (Da)	íon molecular (M)	Massa monoisotópica Teórica (Da)
Ts	$C_{27}H_{46}$	370,3599	$C_{28}H_{45}O_2^-$	413,3425
Tm	$C_{27}H_{46}$	370,3599	$C_{28}H_{45}O_2^-$	413,3425
H29	$C_{29}H_{50}$	398,3912	$C_{30}H_{49}O_2^-$	441,3738
M29	$C_{29}H_{50}$	398,3912	$C_{30}H_{49}O_2^-$	441,3738
H30	$C_{30}H_{52}$	412,4069	$C_{31}H_{51}O_2^-$	455,3894
M30	$C_{30}H_{52}$	412,4069	$C_{31}H_{51}O_2^-$	455,3894
H31S	$C_{31}H_{54}$	426,4225	$C_{32}H_{53}O_2^-$	469,4051
H31R	$C_{31}H_{54}$	426,4225	$C_{32}H_{53}O_2^-$	469,4051
GAM	$C_{30}H_{52}$	412,4069	$C_{31}H_{51}O_2^-$	455,3894
H32S	$C_{32}H_{56}$	440,4382	$C_{33}H_{55}O_2^-$	483,4207
H32R	$C_{32}H_{56}$	440,4382	$C_{33}H_{55}O_2^-$	483,4207
H33S	$C_{33}H_{58}$	454,4538	$C_{34}H_{57}O_2^-$	497,4364
H33R	$C_{33}H_{58}$	454,4538	$C_{34}H_{57}O_2^-$	497,4364
H34S	$C_{34}H_{60}$	468,4695	$C_{35}H_{59}O_2^-$	511,4520
H34R	$C_{34}H_{60}$	468,4695	$C_{35}H_{59}O_2^-$	511,4520
H35S	$C_{35}H_{62}$	482,4851	$C_{36}H_{61}O_2^-$	525,4677
H35R	$C_{35}H_{62}$	482,4851	$C_{36}H_{61}O_2^-$	525,4677

As 17 moléculas pesquisadas para os terpanos correspondem a um total de 8 massas moleculares, em função dos isômeros. No caso dos esteranos foram pesquisadas 3 massas exatas (Tabela 19), que de fato correspondem à várias moléculas cuja diferenciação está apenas na ordem de ligação de alguns centros quirais. Neste caso foram selecionadas as moléculas $\alpha\alpha\alpha$ C27S e R, $\alpha\alpha\alpha$ C28S e R e $\alpha\alpha\alpha$ C29S e R. Ainda existem os isômeros $\alpha\beta\beta$ S e R com 27, 28 e 29 carbonos, além dos esteranos irregulares. Apesar da complexidade que pode ser observada no resultado do CG-EM (Figura 58) para o cromatograma de íons extraídos, com razão m/z 217, da fração de biomarcadores neutros da amostra LC-1, todos os ácidos correspondentes irão gerar o mesmo íon molecular e esta complexidade será traduzida em três massas exatas idênticas.

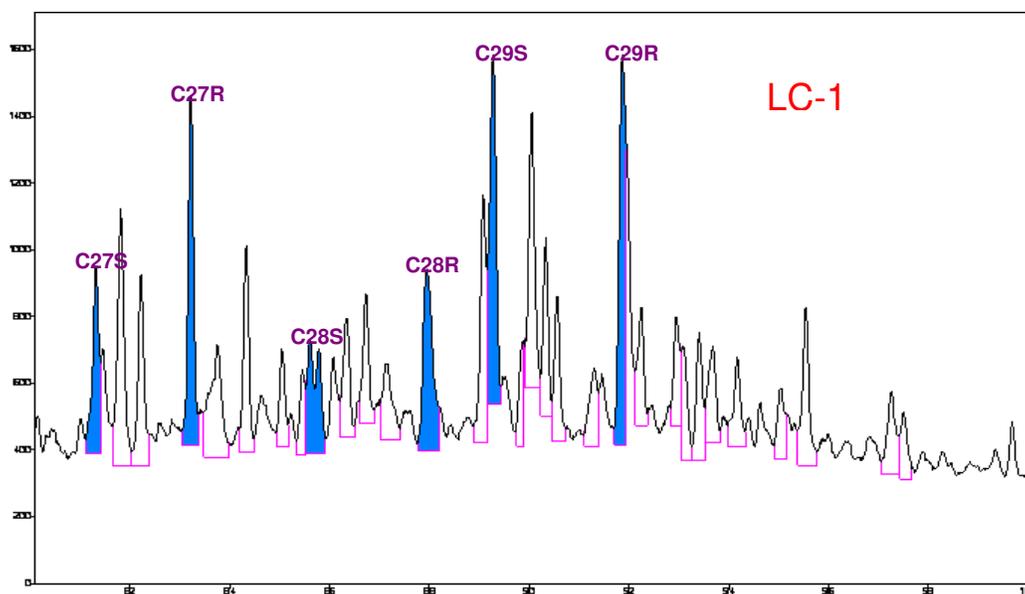


Figura 58: Expansão de parte do cromatograma de íons (m/z 217) da fração de hidrocarbonetos saturados da amostra **LC-1**.

Tabela 19: Íons pesquisados no Orbitrap e moléculas neutras correspondentes (esteranos)-**LC-1**.

Sigla	Hidrocarboneto saturado		Ácido carboxílico correspondente	
	<i>Fórmula molecular</i>	<i>Massa monoisotópica Teórica (Da)</i>	<i>íon molecular (M)</i>	<i>Massa monoisotópica Teórica (Da)</i>
C27S	C ₂₇ H ₄₈	372,3756	C ₂₈ H ₄₇ O ₂ ⁻	415,3582
C27R	C ₂₇ H ₄₈	372,3756	C ₂₈ H ₄₅ O ₂ ⁻	415,3582
C28S	C ₂₈ H ₅₀	386,6966	C ₂₉ H ₄₉ O ₂ ⁻	429,3738
C28R	C ₂₈ H ₅₀	386,6966	C ₂₉ H ₄₉ O ₂ ⁻	429,3738
C29S	C ₂₉ H ₅₂	400,4069	C ₃₀ H ₅₁ O ₂ ⁻	443,3895
C29R	C ₂₉ H ₅₂	400,4069	C ₃₀ H ₅₁ O ₂ ⁻	443,3895

O resultado da pesquisa dos íons listados nas tabelas anteriores (Tabela 18 e 19) está sumarizado na Tabela 20. Os erros obtidos foram todos inferiores 1,2 ppm.

Tabela 20: Resultados da pesquisa da massa exata de alguns biomarcadores, com seus respectivos erros de exatidão de massa em ppm.

Conjunto I									
Tipo de Ácido carboxílico	Íon molecular pesquisado (M)	LC-1		LC-2		M-1		ME	
		Intensidade relativa (%)	erro (ppm)						
DBE=6,5 Pentacíclicos	C ₂₈ H ₄₅ O ₂ ⁻	-	-	-	-	0,2957	0,1	0,3264	0,7
	C ₂₉ H ₄₇ O ₂ ⁻	-	-	-	-	0,3795	-0,2	0,4251	-0,9
	C ₃₀ H ₄₉ O ₂ ⁻	0,3276	0,7	-	-	0,2307	0,1	0,9219	-0,7
	C ₃₁ H ₅₁ O ₂ ⁻	0,5215	-0,2	-	-	-	-	1,1934	0,2
	C ₃₂ H ₅₃ O ₂ ⁻	0,2709	-0,7	-	-	0,2123	-0,4	0,6439	-0,7
	C ₃₃ H ₅₅ O ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-	0,6149	-1,2
	C ₃₄ H ₅₇ O ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-	0,4393	-0,3
	C ₃₅ H ₅₉ O ₂ ⁻	0,1969	-0,3	-	-	-	-	0,4088	-0,8
	C ₃₆ H ₆₁ O ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-	0,2983	0,9
	C ₂₈ H ₄₅ O ₂ ⁻	-	-	-	-	0,2888	0,0	1,1169	0,3
DBE=5,5 Tetracíclicos	C ₂₉ H ₄₉ O ₂ ⁻	0,2808	0,2	-	-	0,3726	-0,2	1,7263	0,8
	C ₃₀ H ₅₁ O ₂ ⁻	0,2582	0,6	-	-	0,4023	-0,3	3,1805	-0,5
Conjunto II									
Tipo de Ácido carboxílico	Íon molecular pesquisado (M)	ME-a		ME-b		ME-c		ME-d	
		Intensidade relativa (%)	erro (ppm)						
DBE=6,5 Pentacíclicos	C ₂₈ H ₄₅ O ₂ ⁻	0,4675	0,0	0,3927	-0,1	0,3177	0,1	0,2016	0,1
	C ₂₉ H ₄₇ O ₂ ⁻	0,4790	0,1	0,3883	0,1	0,3548	0,2	0,2117	0,3
	C ₃₀ H ₄₉ O ₂ ⁻	0,8153	-0,1	0,6819	0,0	0,4899	0,2	0,1773	0,4
	C ₃₁ H ₅₁ O ₂ ⁻	1,0126	0,1	0,7488	0,1	0,5498	-0,2	0,1682	0,1
	C ₃₂ H ₅₃ O ₂ ⁻	0,7390	0,0	0,4872	0,1	0,4183	0,3	-	-
	C ₃₃ H ₅₅ O ₂ ⁻	0,5435	0,2	0,4028	0,1	0,3858	0,1	-	-
	C ₃₄ H ₅₇ O ₂ ⁻	0,5065	0,1	0,3447	0,0	0,3499	0,1	-	-
	C ₃₅ H ₅₉ O ₂ ⁻	0,4768	0,0	0,3757	0,0	0,3324	0,1	-	-
	C ₃₆ H ₆₁ O ₂ ⁻	0,4224	0,1	0,3307	0,1	0,2262	-0,1	-	-
	C ₂₈ H ₄₅ O ₂ ⁻	0,8373	0,0	0,6448	0,1	0,5473	0,1	0,2396	0,1
DBE=5,5 Tetracíclicos	C ₂₉ H ₄₉ O ₂ ⁻	1,0558	0,0	0,8256	0,0	0,6118	0,0	0,2397	0,4
	C ₃₀ H ₅₁ O ₂ ⁻	1,3578	0,0	1,1058	0,0	0,7457	-0,1	0,2376	0,1

No caso dos ácidos pentacíclicos, o que se observou foi uma distribuição normal para a amostra **ME**, com picos majoritários nos ácidos correspondentes aos biomarcadores com 29 e 30 átomos de carbono. As amostras **LC-1** e **M-1** não apresentaram uma distribuição normal (Figura 59).

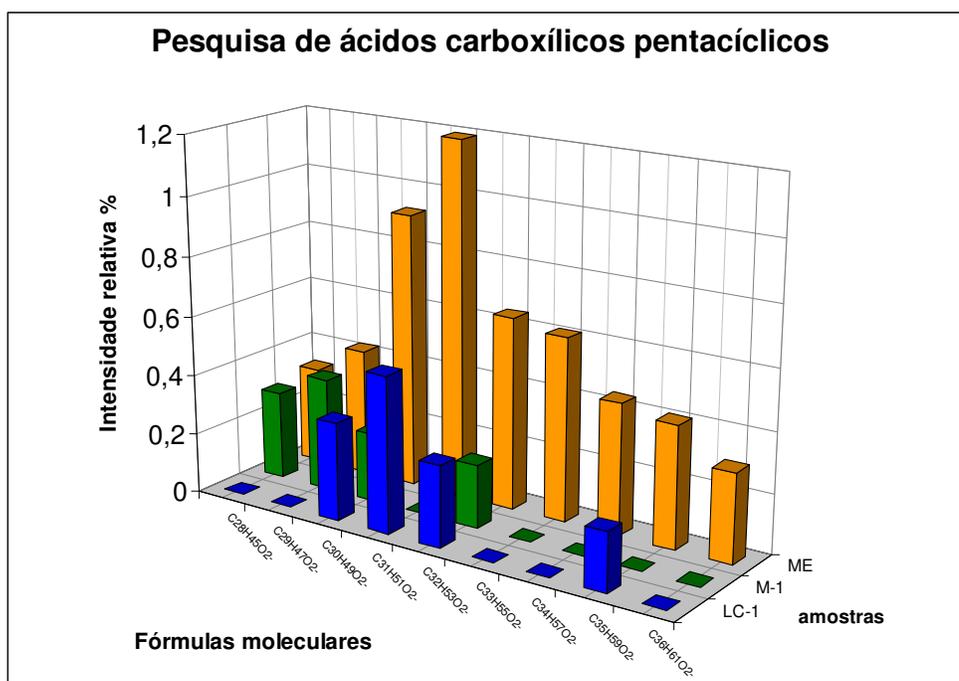


Figura 59: Distribuição dos ácidos carboxílicos pentacíclicos pesquisados nas amostras do conjunto I.

Já o perfil das amostras quanto à distribuição dos ácidos carboxílicos tetracíclicos mostrou um perfil crescente de quantidades relativas entre os ácidos com 28, 29 e 30 átomos de carbono, independente da origem (Figura 60).

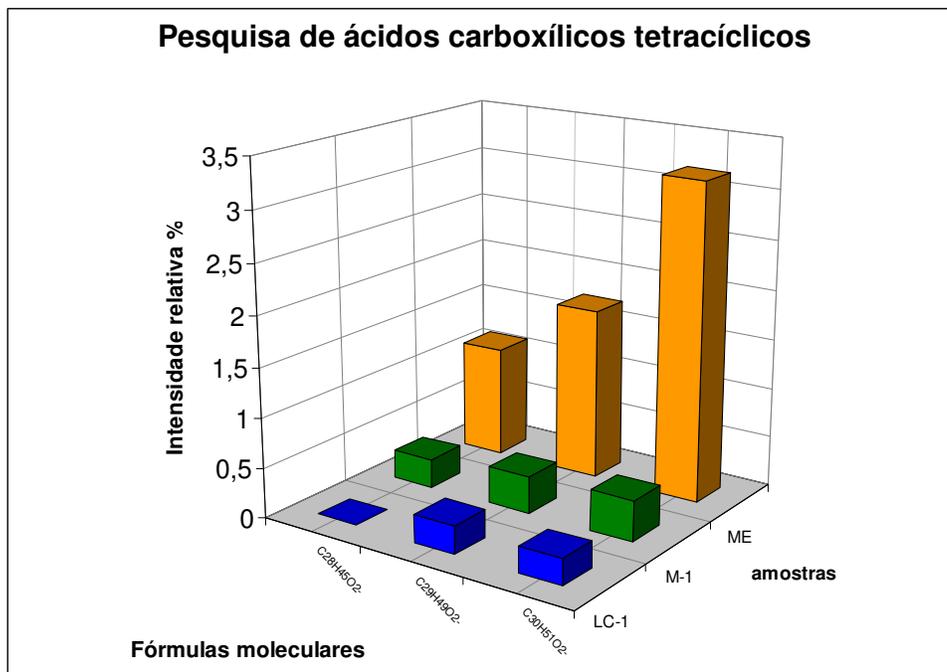


Figura 60: Distribuição dos ácidos carboxílicos tetracíclicos pesquisados nas amostras do conjunto I.

Os óleos do conjunto II mostraram uma diminuição relativa tanto dos ácidos pentacíclicos quanto dos ácidos tetracíclicos pesquisados, com o aumento da biodegradação (Figura 61).

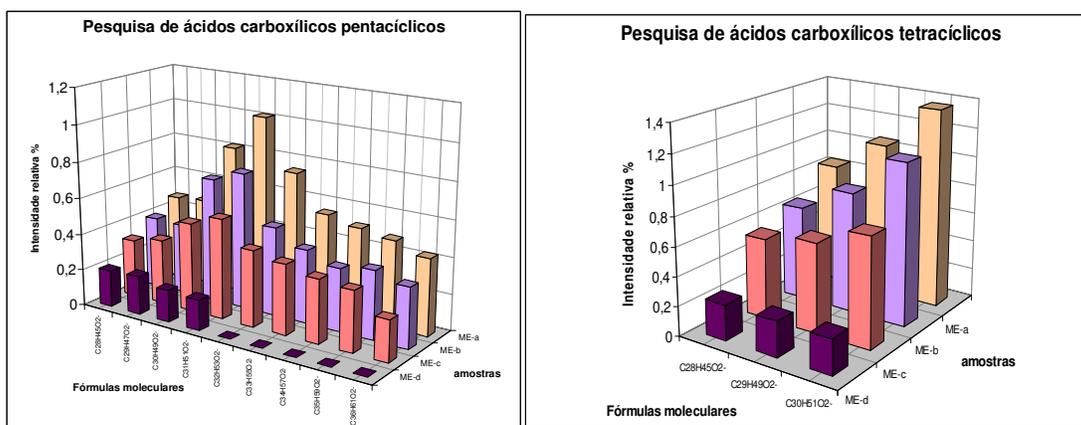


Figura 61: Distribuição dos ácidos carboxílicos pentacíclicos e tetracíclicos pesquisados nas amostras do conjunto II.

No entanto, a razão entre estes ácidos pesquisados (pentacíclicos/tetracíclicos) não mostrou uma relação clara com o avanço da biodegradação apesar de mostrar a distinção entre as diferentes origens, assim como a relação derivada da razão dos biomarcadores saturados hopanos/esteranos (Figura 62).

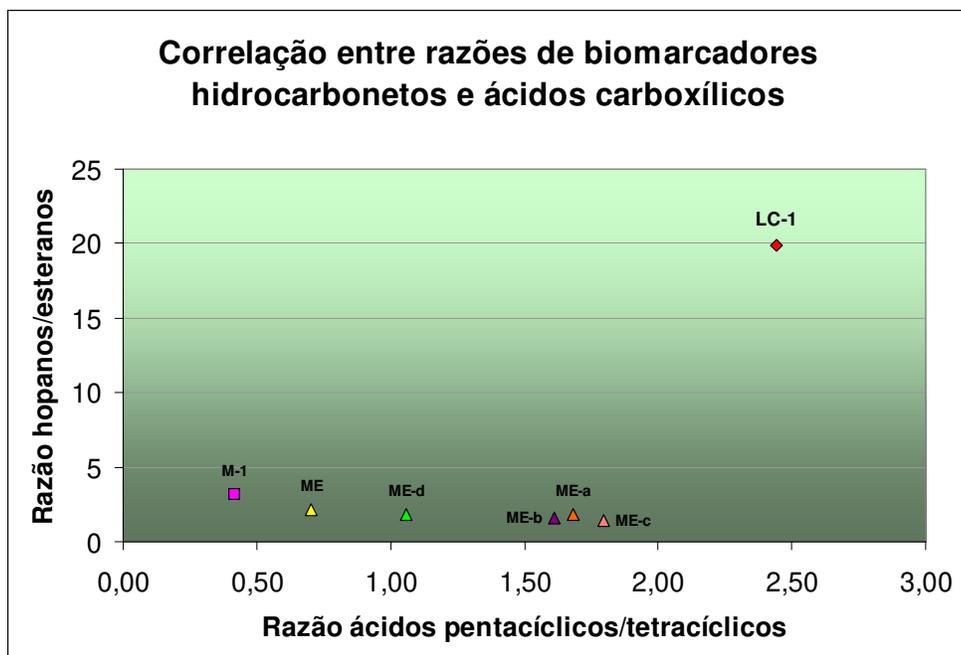


Figura 62: Ácidos pentacíclico/tetracíclicos (Orbitrap) versus hopanos/esteranos (CG-EM).

4.5. Estudo da fragmentação de padrões de biomarcadores ácidos utilizando LTQ-Orbitrap

Até o presente momento, não existem na literatura trabalhos que citem a utilização do Orbitrap em estudos de fragmentação sequencial (EM^n) de moléculas orgânicas, tais quais os padrões de biomarcadores ácidos sintetizados neste trabalho (2, 4, 6 e 7). Tendo em vista que se pretende avaliar se tais moléculas fornecem padrões de fragmentação associados aos seus arcabouços estruturais, fez-se a fragmentação secundária dos ânions moleculares correspondentes aos compostos de interesse, cuja razão m/z e estruturas estão destacadas na Figura 63, juntamente ao espectro APCI (-) da mistura dos padrões sintetizados neste trabalho.

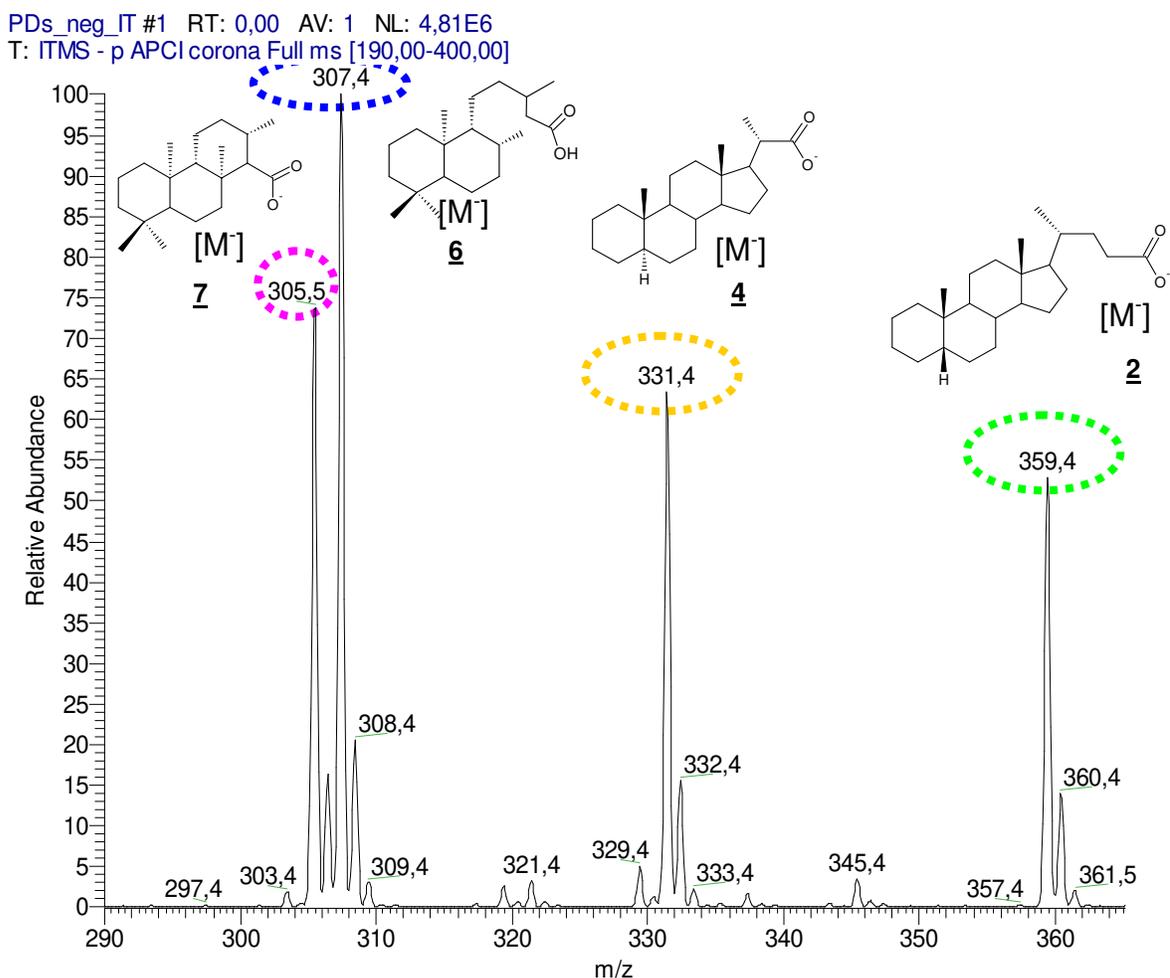


Figura 63: Espectro APCI (-) dos padrões de biomarcadores ácidos 6, 7, 4 e 2.

A relevância deste estudo se baseia na potencial aplicação desta técnica no intuito de se obter informações estruturais diretas da análise de biomarcadores ácidos presentes em extratos ácidos provenientes de petróleo, sem a necessidade de derivatização. Pretende-se avaliar se os biomarcadores ácidos passam por mecanismos de fragmentação similares aos observados na análise de biomarcadores hidrocarbonetos por CG-EM, com ionização por elétrons (IE).

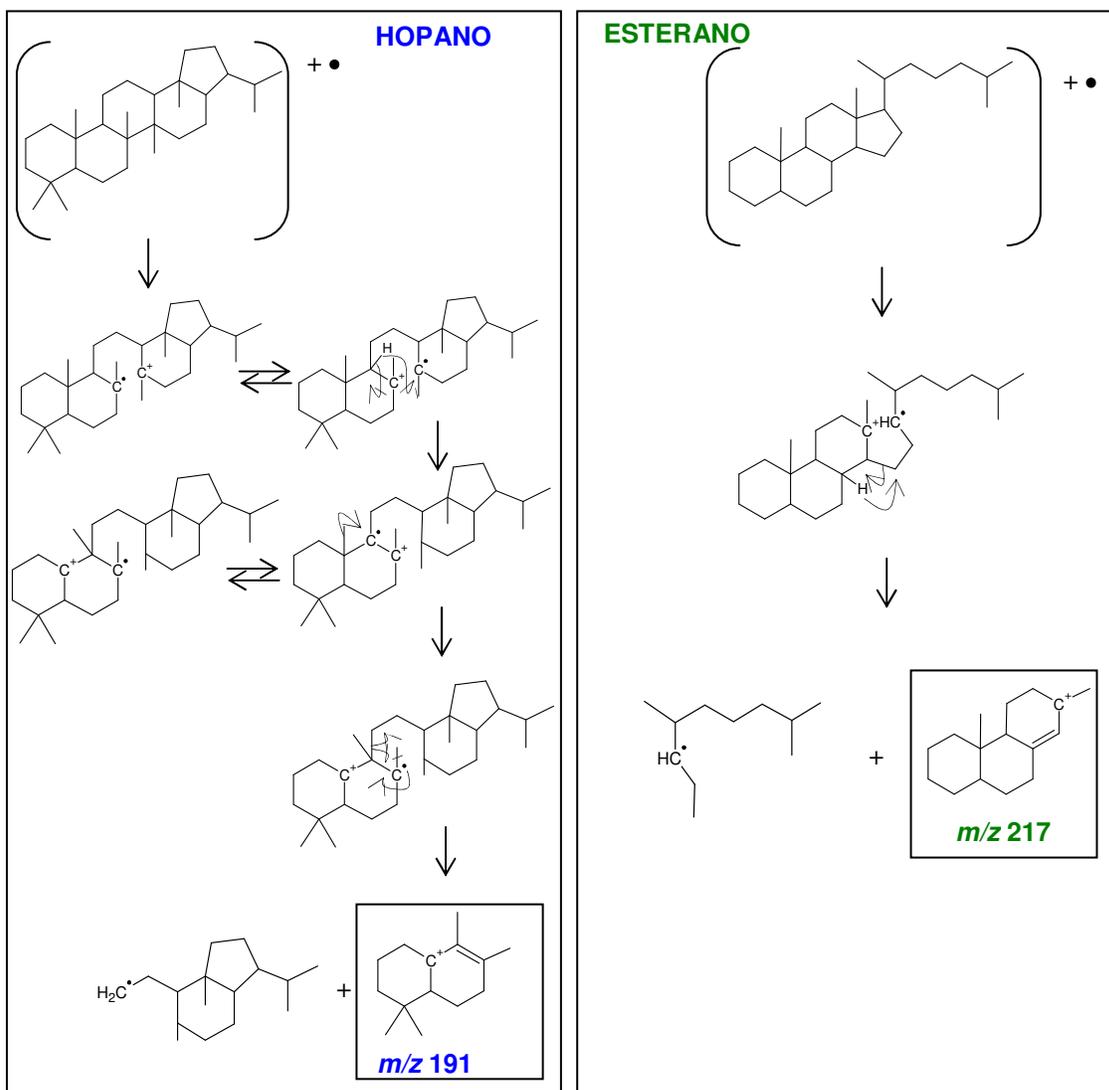


Figura 64: Mecanismos para formação dos íons m/z 191 e 217 a partir da ionização de moléculas com esqueleto básico dos hopanos e esteranos, respectivamente, via CG-EM (IE).

Neste caso, os padrões de fragmentação revelam características cruciais quanto às estruturas dos biomarcadores saturados, permitindo inclusive distinguí-las quanto às suas famílias, ora esteranos (m/z 217), ora hopanos (m/z 191) entre

outras famílias de biomarcadores e seus respectivos fragmentos diagnósticos (Figura 64).

Quando se compara a fragmentação de moléculas por IE, utilizando-se substratos do tipo hidrocarbonetos, e a fragmentação de ânions por dissociação induzida por colisão (CID), utilizando-se uma molécula que possui uma função, como por exemplo, os ácidos carboxílicos estudados neste trabalho, observa-se que possivelmente os mecanismos de fragmentação seguem diferentes vias. No caso da fragmentação dos hidrocarbonetos por IE, no geral são formados carbocátions radicalares de massas ímpares, íons radicalares e moléculas neutras. Na fragmentação dos padrões de biomarcadores ácidos estudados neste trabalho, observou-se a formação de carbânions relativos às perdas de moléculas neutras, sendo as principais: água, dióxido de carbono e etileno.

Existem vários trabalhos na literatura que citam estas perdas características (H_2O , CO_2 e $H_2C=CH_2$) associadas à presença do grupo funcional ácido carboxílico, utilizando-se porém, outras técnicas de espectrometria de massas (Lo *et al.*, 2003; Rikka, 2007 e Shi *et al.*, 2010). Em 2002 Rudzinski e colaboradores fizeram um estudo com diversos padrões de ácidos carboxílicos (Tabela 21 e Figura 65), utilizando ESI(-) FT-ICR, e observaram somente as perdas referentes às massas 18, 28 e 44, independente da estrutura molecular das substâncias estudadas, incluindo um biomarcador, o ácido 5 β colânico.

Tabela 21: Experimento ESI(-) EM-EM de padrões de ácidos carboxílicos (Extraída de Rudzinski *et al.*,2002)

Composto	Íon precursor m/z [M-H] ⁻	Íon produto m/z	Perda de massa	Fragmento perda neutra
Ácido ciclohexilacético	141	97	44	CO ₂
Ácido ciclohexanobutírico	169	125, 151	44, 18	CO ₂ , H ₂ O
Ácido adamantanoacético	193	149, 175,165	44, 18, 28	CO ₂ , H ₂ O, CO
Ácido 5 β colânico	359	341, 331, 315	18, 28, 44	H ₂ O, CO, CO ₂
Ácido 2 naftilacético	185	141, 157	44, 28	CO ₂ , CO
Ácido 1,2,3,4 tetraidronaftênico	175	131, 147, 157	44, 28, 18	CO ₂ , CO, H ₂ O
Ácido benzóico	121	77	44	CO ₂
Ácido pirenocarboxílico	245	201	44	CO ₂
Ácido pirenocético	259	215	44	CO ₂
Ácido pirenobutírico	284	215	72	CO ₂ + C ₂ H ₂

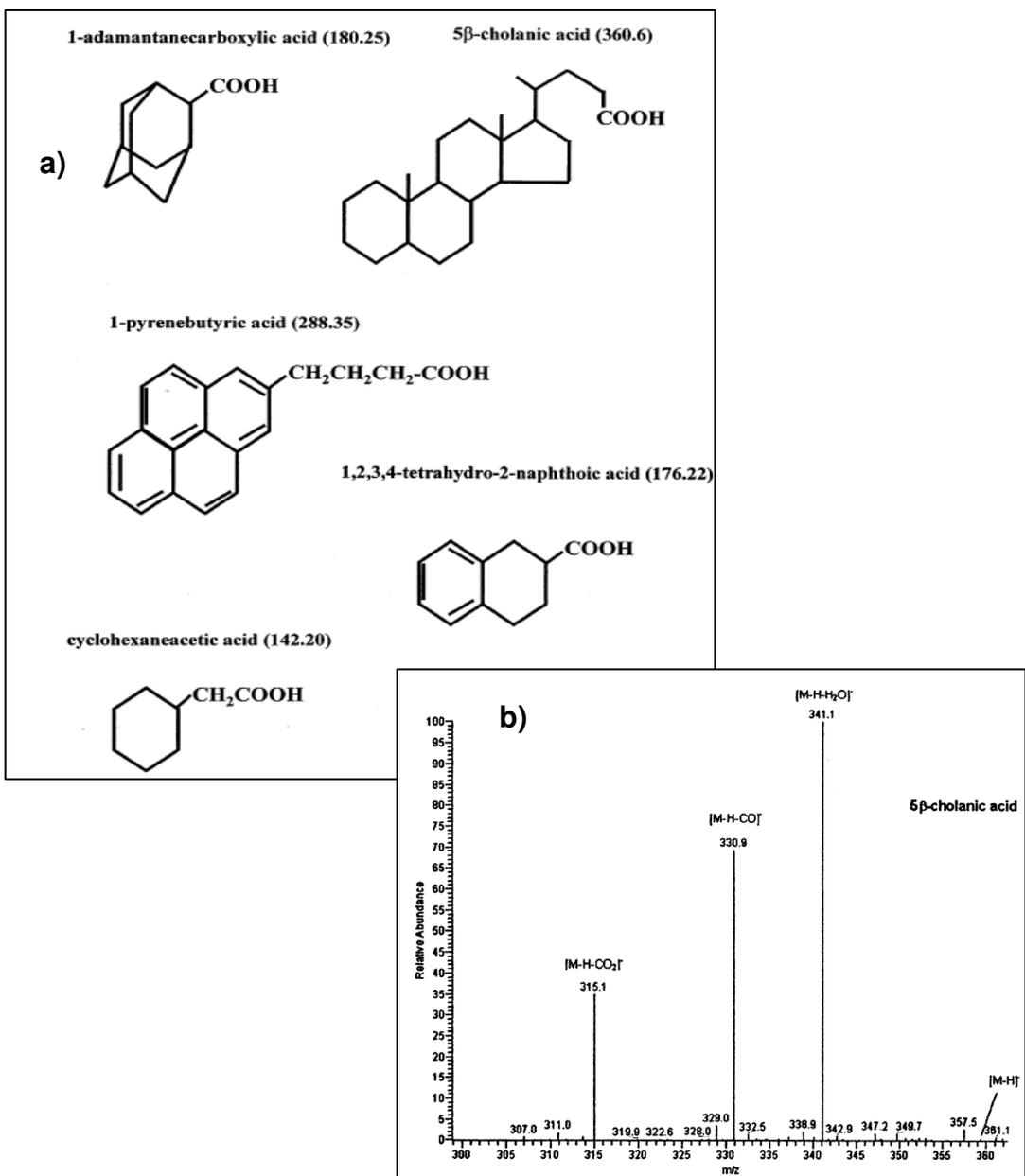


Figura 65: a) Representação de algumas das moléculas analisadas; b) Resultado de ESI(-) EM-EM do ácido 5 β colânico (Extraído de Rudzinski *et al.*, 2002).

No entanto, não existem outros relatos que explorem a formação de outros fragmentos, a partir de biomarcadores ácidos carboxílicos, atrelados às suas estruturas, utilizando-se as técnicas recentes de espectrometria de massas.

No Orbitrap é possível se utilizar uma energia de dissociação mais elevada, quando comparada à dissociação induzida por colisão (CID), que é feito no LTQ.

Neste caso, os fragmentos gerados a partir do íon precursor, são analisados no LTQ, com resolução unitária. No modo de fragmentação com mais energia, que é denominado HCD, do inglês *High Collision Dissociation*, esta ocorre num módulo diferenciado, sendo então os fragmentos gerados encaminhados para análise com alta resolução no Orbitrap.

Com o objetivo de se estudar a fragmentografia de biomarcadores ácidos de petróleo, o trabalho foi conduzido com os padrões puros (**2**, **4**, **6** e **7**) fazendo inicialmente experimentos com CID. Este fato se deu por conta de um problema operacional no módulo HCD, quando se trabalhava no modo negativo, o qual é crucial para estudos de ácidos carboxílicos.

Observando-se os espectros obtidos para os quatro biomarcadores estudados **2**, **4**, **6** e **7** (Figura 66), nota-se que apesar das perdas em comum de H₂O [M⁻ -18], CO₂ [M⁻ -44] e H₂C=CH₂ [M⁻ -28] para os quatro biomarcadores, quando submetidos à dissociação com energia de colisão de 35 V, dentro do IT, outros fragmentos foram observados, principalmente para o ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**) e o ácido 15-isocopálico (**7**).

A primeira observação importante é quanto à abundância relativa entre os fragmentos, de acordo com as suas estruturas químicas (Figura 66). Observa-se que tanto para o ácido 5 β (H) colânico (**2**), quanto para o ácido 8,13 tetraidrocopálico (**6**), o pico base é o referente à perda de água. Já para os biomarcadores ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**) e o ácido 15-isocopálico (**7**), ocorre uma fragmentação maior da molécula, ainda que a energia de dissociação aplicada tenha sido a mesma. Esta distribuição diferenciada pode estar associada a diferentes fatores como: estabilidade relativa entre os fragmentos gerados, posição da carboxila na estrutura química e principalmente flexibilidade e/ou rigidez das ligações químicas presentes nas estruturas.

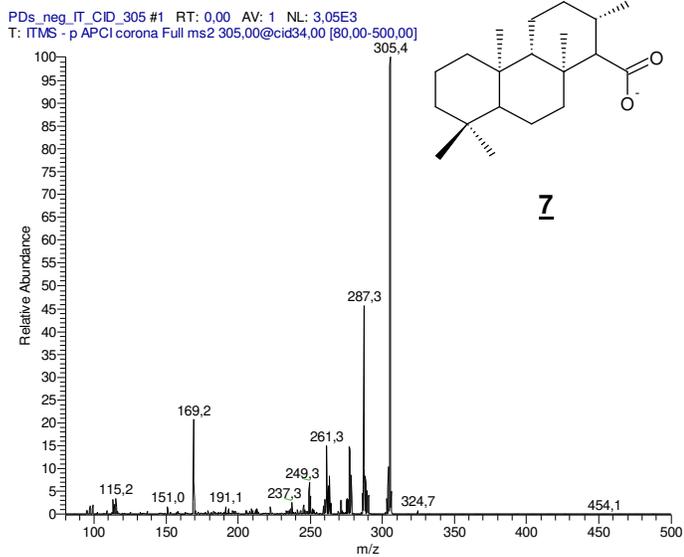
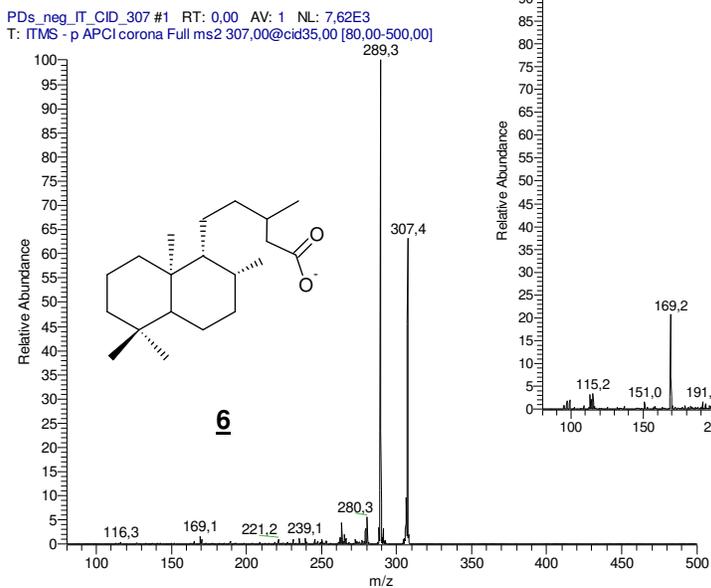
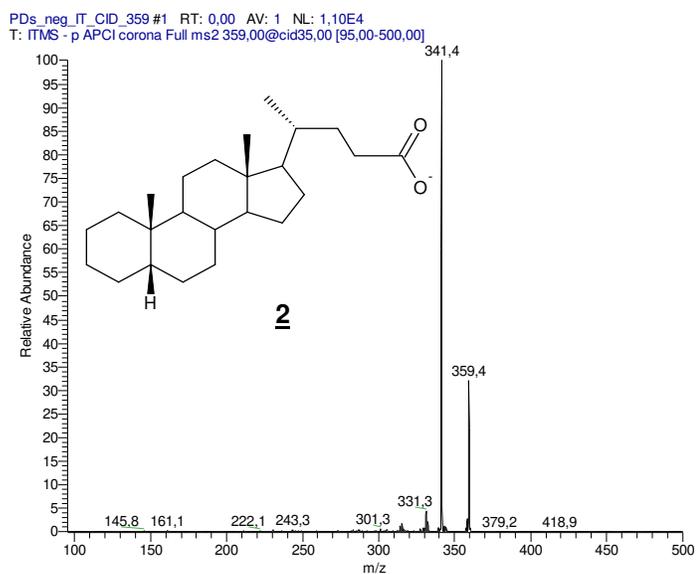
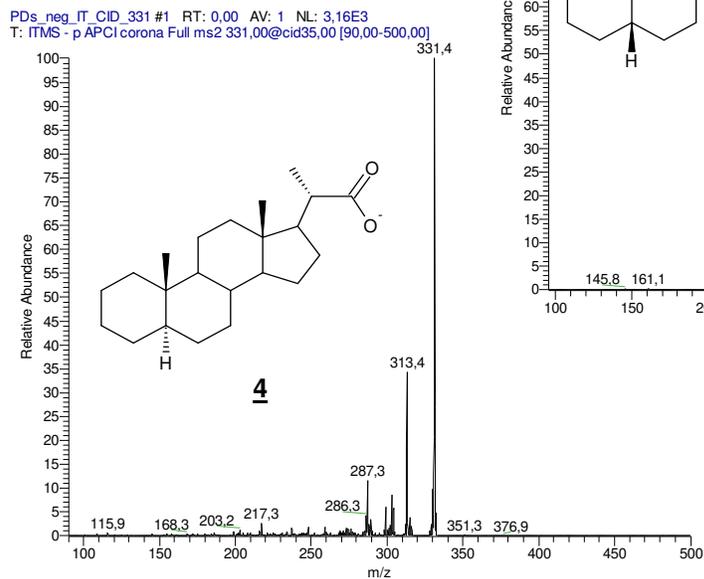


Figura 66: Espectros APCI (-) EM-EM dos padrões estudados.

Destacando-se os principais íons gerados pelo biomarcador **2** (Figura 67), observa-se que este é o que gera o pico mais intenso relativo a perda de água, que pode ser proveniente dos rearranjos de hidrogênio tal qual mostrado nos mecanismos propostos para a formação destes fragmentos no Esquema 4.

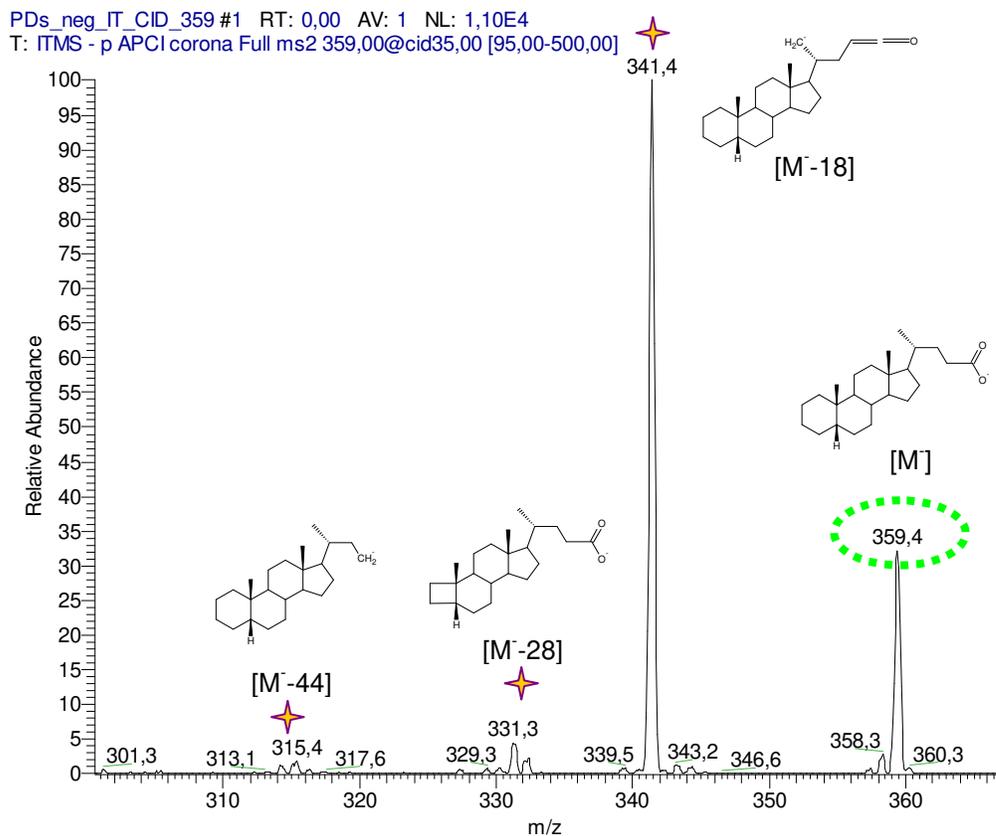
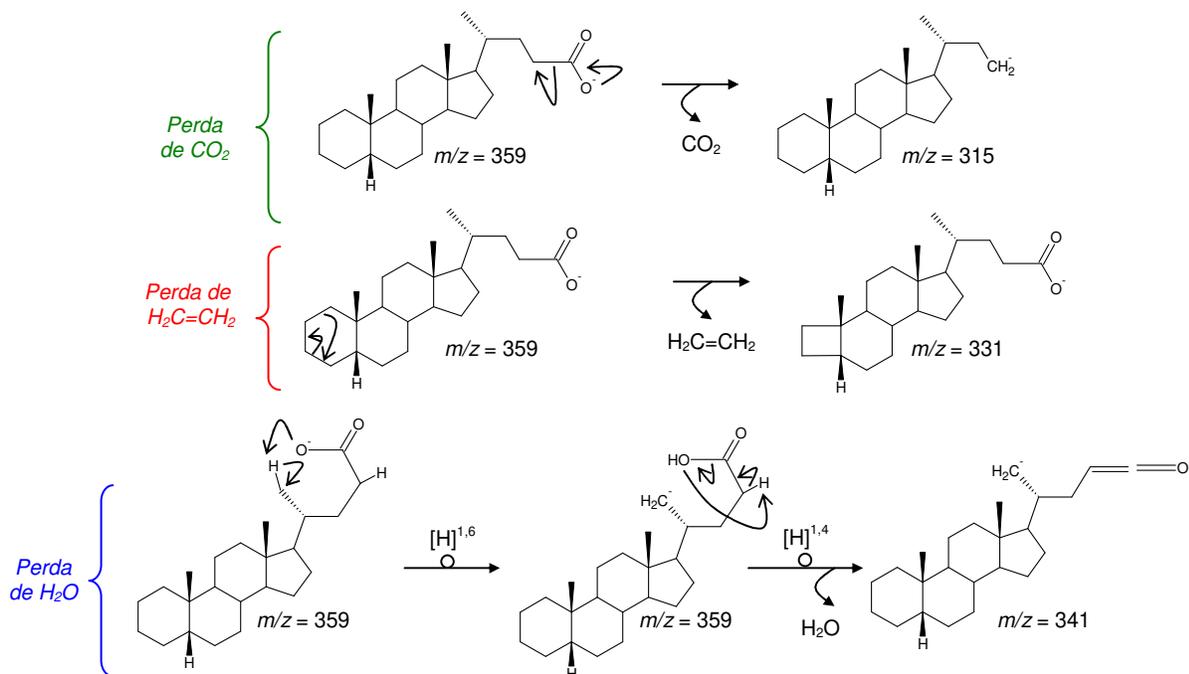


Figura 67: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão **2**.



Esquema 4: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de **2**).

No caso do ácido 5α (H) homopregnânico (**4**), cujas principais diferenças estruturais, quando comparado ao **2**, estão nas junções dos anéis A e B, que em **4** é *trans*, e na distância do carboxilato do carbono C₁₇ do anel D, foram observados outros fragmentos importantes (Figura 68), um deles com m/z 217, ainda que numa abundância discreta, se assemelha ao fragmento encontrado nos esteranos quando analisado por CG-EM (IE) (Figura 64).

PDs_neg_IT_CID_331 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 3,16E3
T: ITMS - p APCI corona Full ms2 331,00@cid35,00 [90,00-500,00]

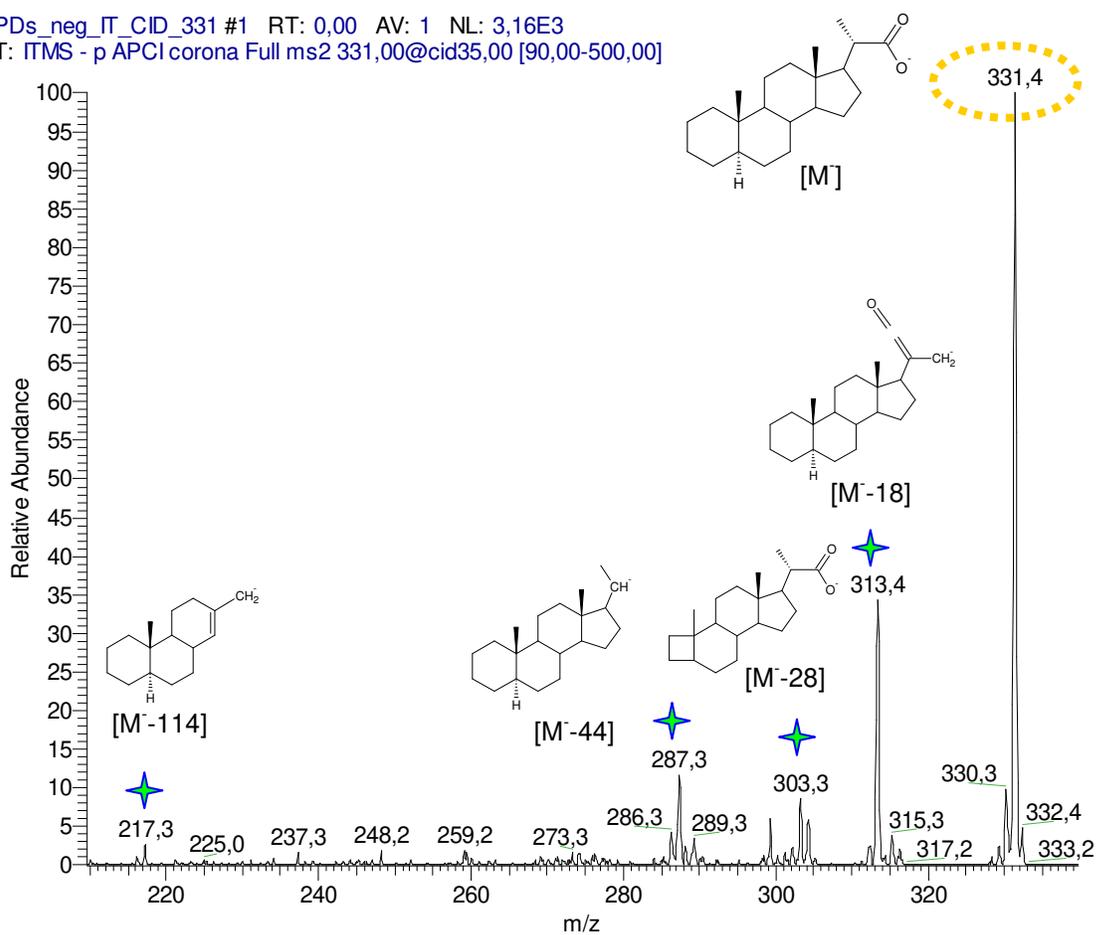
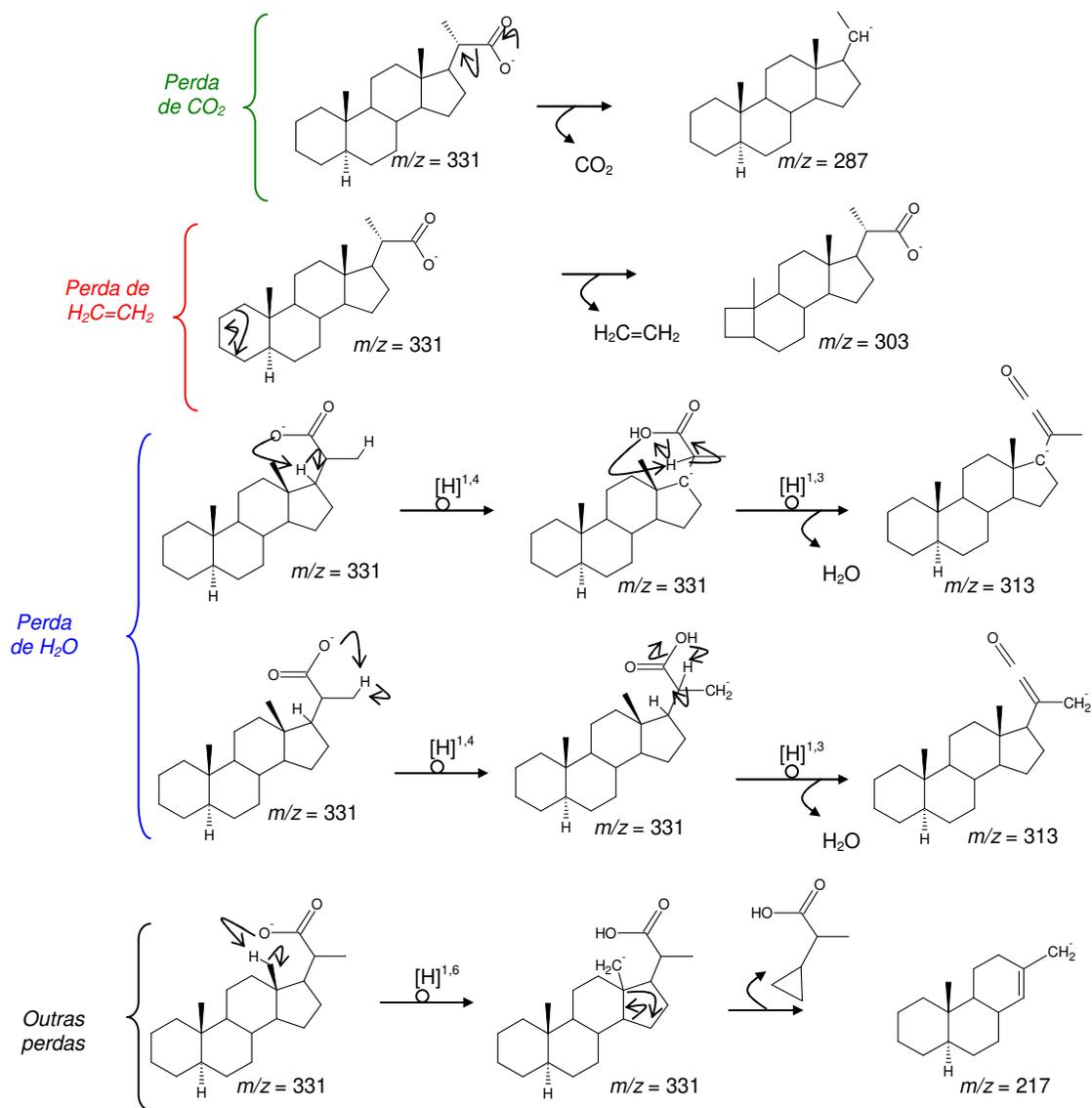


Figura 68: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão **4**.

Os mecanismos propostos para a formação dos fragmentos observados para o biomarcador **4** encontram-se ilustrados no Esquema 5.



Esquema 5: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de **4**).

A fragmentação do ânion correspondente ao ácido 8,13 tetraidrocopálico (**6**) apresentou como fragmento principal o produto resultante da perda de água, tal qual o biomarcador **2** (Figura 69). Essas moléculas (**2** e **6**) tem em comum a carboxila em cadeia carbônica livre, relativamente distante do anel, favorecendo as migrações de hidrogênios γ carbonila para posterior eliminação de água (Esquema 6).

PDs_neg_IT_CID_307 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 7,62E3
 T: ITMS - p APCI corona Full ms2 307,00@cid35,00 [80,00-500,00]

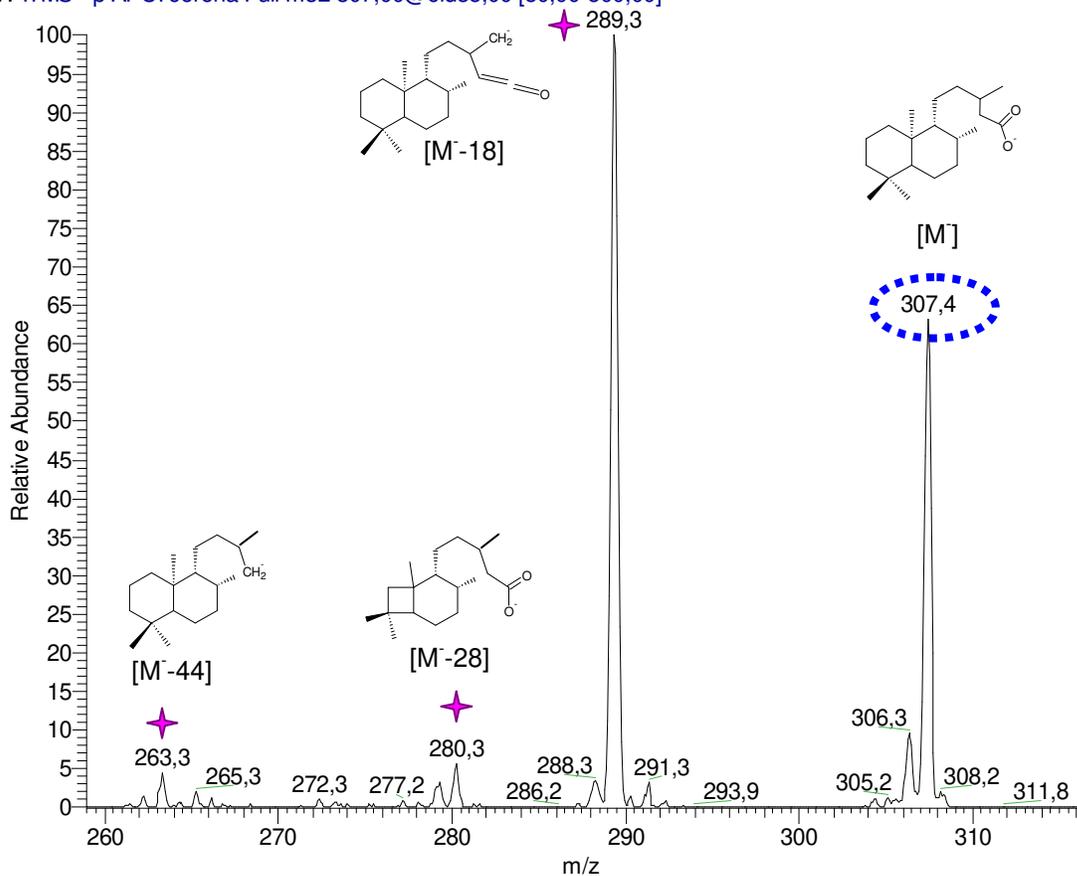
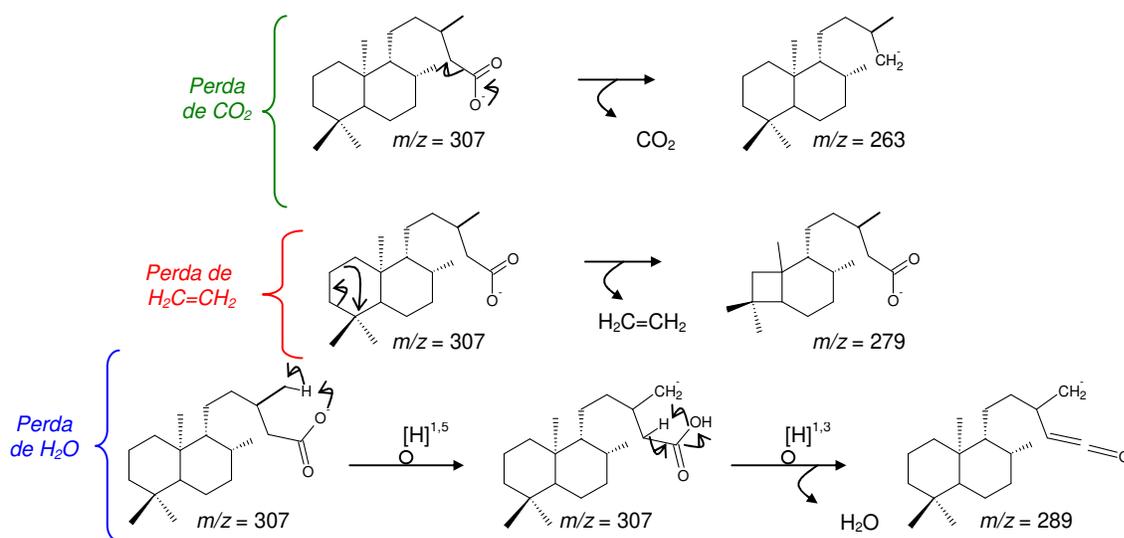


Figura 69: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão **6**.



Esquema 6: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de **6**).

Dentre os quatro biomarcadores estudados, o ácido 15-isocopálico (**7**) foi um dos que apresentou maior diversificação de fragmentos, sendo um deles de m/z 169 e abundância relativa de ~ 25%, referente à perda de massa neutra 136 (Figura 70; Esquema 7).

PDs_neg_IT_CID_305 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 3,05E3
T: ITMS - p APCI corona Full ms2 305,00@cid34,00 [80,00-500,00]

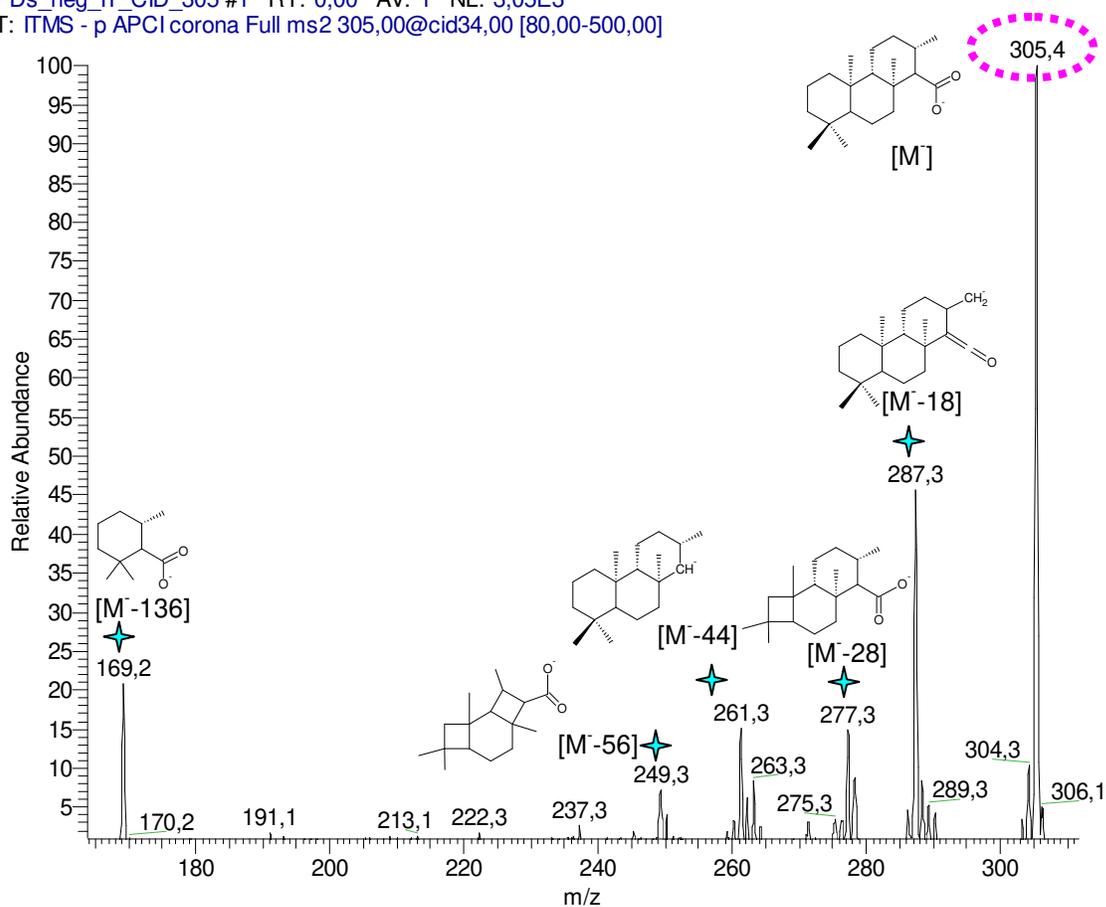
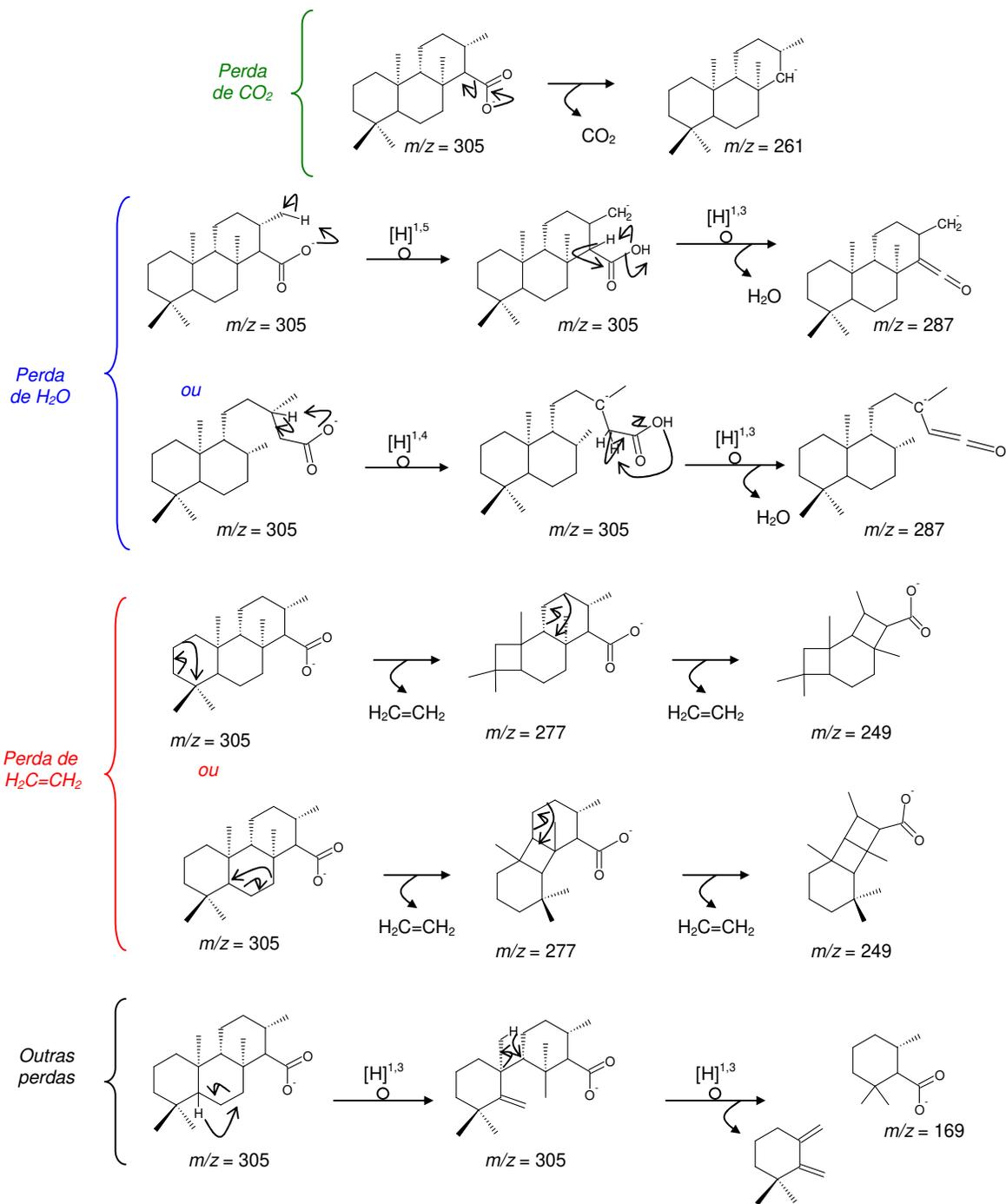


Figura 70: Espectro APCI (-) EM-EM do padrão **7**.

Este ácido tem uma estrutura mais rígida e a carboxila está ligada diretamente no anel C. Provavelmente estas características singulares, quando comparadas às dos demais compostos estudados, fazem com que este possa formar este íon de razão m/z 169 em quantidade significativa.



Esquema 7: Mecanismos propostos para formação dos fragmentos (EM-EM de 7).

É de extrema importância que este estudo também seja realizado utilizando-se o módulo de dissociação de alta colisão (HCD), para que se possa fazer o registro das massas destes fragmentos com alta resolução. O mais relevante é que foi possível observar diferentes padrões de fragmentação, de acordo com as estruturas correspondentes às moléculas estudadas e que isso pode ser extrapolado para misturas mais complexas, chegando inclusive à aplicação direta em extratos ácidos de petróleo, de modo a facilitar a compreensão e investigação destas misturas.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As sínteses orgânicas propostas neste trabalho foram realizadas à contento e os produtos puderam ser utilizados na etapa de quantificação dos biomarcadores hidrocarbonetos e, principalmente, para o estudo da fragmentografia dos biomarcadores ácidos utilizando o Orbitrap.

As amostras de petróleo escolhidas para o estudo foram adequadas ao propósito, tendo em vista que representam geradores de diferentes origens e diferentes níveis de biodegradação. No entanto, é difícil encontrar na natureza amostras de óleos que representem apenas um *end-member*, sem qualquer outro tipo de variação quanto à evolução térmica ou alterações por ação de microorganismos. Sendo assim, idealmente o conjunto I seria melhor representado se a única diferenciação das amostras estivesse relacionada à origem, o que não foi possível, uma vez que as amostras de origem lacustre não foram afetadas por ação de microorganismos e as amostras de origem marinho evaporítica foram.

Quanto às análises quantitativas dos biomarcadores saturados, observou-se que existe uma recuperação diferenciada entre os padrões hidrocarbonetos avaliados, após o processo de fracionamento do petróleo utilizando-se CLMP e análise por CG-EM. O isocopalano apresentou um fator de recuperação na faixa entre 60-69% enquanto o 5 β colano apresentou um fator de recuperação na faixa entre 75-85%.

Apesar do isocopalano ter uma fragmentação similar ao C₃₀ hopano, não se observou correspondência direta nas respostas analíticas dos mesmos. Outros estudos precisam ser realizados, com diferentes níveis de concentração, e preferencialmente, testando-se padrões que possuam padrão de fragmentação e estrutura similares aos hopanos. Em casos onde não haja necessidade de refinamento quantitativo, trabalhar com razões de áreas e alturas é o mais indicado. Em contrapartida, em casos onde haja necessidade de estudos quantitativos mais refinados, a utilização de fatores de respostas adequados, ainda que relativos, e avaliação de amostras de petróleo com concentrações de

biomarcadores certificadas são de extrema importância para diversos estudos geoquímicos. Principalmente os que envolvem diferenciação de níveis de biodegradação e necessidade de quantidade mínima de um determinado biomarcador, que possa indicar diferenças paleoambientais ou genéticas.

Os extratos ácidos dos petróleos estudados neste trabalho foram obtidos com êxito, uma vez que apresentaram percentual de compostos da classe O2 superior à 95%. No entanto, é desejável que outros métodos de isolamento de extrato ácido de petróleo sejam avaliados, de modo à dispensar a etapa de extração em coluna, que consome elevadas quantidades de solventes e tempo de preparação.

Através dos resultados obtidos das análises diretas de extratos ácidos de petróleos utilizando-se o Orbitrap pode-se comparar as diferentes distribuições de DBE da classe O2 dos óleos estudados. Aspectos relacionados à origem puderam ser observados nos óleos do conjunto I, como a presença majoritária de ácidos pentacíclicos (potencialmente hopanóicos) em óleos de origem lacustre, quando comparados aos ácidos tetracíclicos (potencialmente esteranóicos). Com relação às amostras do conjunto II, foi possível classificá-las quanto ao grau de biodegradação das mesmas utilizando-se a razão A/C.

Até o presente momento, não existem na literatura trabalhos que cite a utilização do Orbitrap em estudos de fragmentação sequencial (EM-EM) de biomarcadores ácidos. O que se observou neste trabalho, é que existe uma correlação direta entre as estruturas químicas e os fragmentos gerados a partir da dissociação induzida por colisão (CID) dos ácidos 5β (H) colânico, ácido 5α (H) homopregnânico, ácido 8, 13-tetraidrocopálico e ácido 15-isocopálico.

É fundamental que ensaios de EMⁿ sejam realizados utilizando-se alta energia de dissociação (HCD), para que os fragmentos possam ser analisados em alta resolução. Contudo, os resultados obtidos já revelam o grande potencial desta técnica para obtenção de fragmentos diagnósticos de famílias de biomarcadores ácidos presentes em petróleos, a partir da análise direta de extratos ácidos no Orbitrap.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, F.C.; CINTRA, R.H.; SILVA, M.T.; BRAGA, C.M.S.; SILVA, A.P.O.; ANDRADE, G.H.; MOURA, B.R.; PEREIRA, R.C.L.; GUIMARÃES, R.C.L.; SILVA, P.N., 2005. Estudo de Metodologias para determinação de ácidos naftênicos de petróleos nacionais. *3º Congresso Brasileiro de Petróleo e Gás*, Salvador.

ALTGELT, K.H.B., BONDUSZYNSKI, M.M., 1994, "Composition and analysis of heavy petroleum fractions", New York: Marcel Dekker.

ALVES, P.B., 1997, Detalhes sobre a História Geológica da Bacia Sergipe/Alagoas a Partir de Biomarcadores Ácidos e Síntese de Biomarcadores, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

ANGOLINI, C., F., F.; SANTOS NETO, E. V.; MARSAIOLI, A. J., 2011, Acidic fraction analyses of Brazilian oils using petroleomics, *25th IMOG Book of Abstracts*, Interlaken, Switzerland.

AQUINO NETO, F. R.; CARDOSO, J. N.; RODRIGUES, R. and TRINDADE, L. A. F., 1986, Evolution of tricyclic alkanes in the Espirito Santo Basin, Brazil, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 50, 2069-2072.

AQUINO NETO F. R., RESTLE A., CONNAN J., ALBRECHT P., OURISSON G., 1982, "Novel Tricyclic terpanes (C19, C20) in sediments and petroleum", *Tetrahedron Lett.*, 23, 2027-2030.

AQUINO NETO, F. R., TRENDEL J. M., RESTLE A., ALBRECHT P., CONNAN J., 1983, "Occurrence and formation of tricyclic and tetracyclic terpanes in sediments and petroleum", *Advances in Org. Geochem.*, 659-667.

BARROW, M.P.; HEADLEY, J.V.; PERU, K.M.; DERRICK, P.J., 2004, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of principal components in oil sands naphthenic acids, *J. Chromatogr. A*, 1058, 51-59.

BARTH, T.; BJØRLYKKE, K., 1993, Organic acids from source rock maturation: generation potentials, transport mechanisms and relevance for mineral diagenesis, *Appl. Geochem.*, 8, 325-337.

BATEMAN, K. P.; KELLMANN, M.; MUENSTER, H.; PAPP, R.; TAYLOR, L., 2009, Quantitative–Qualitative Data Acquisition Using a Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20, 1441–1450.

BECKER, H.; *Organicum-Practical Handbook of Organic Chemistry*, Addison-Wesley Publishing Company, INC, 1973.

BEHAR, F.H.; ALBRECHT, P., 1984, Correlations between carboxylic acids and hydrocarbons in several crude oils. Alteration by biodegradation, *Org. Geochem.*, 6, 597-604.

BEHAR, F.; VANDENBROUCKE, M., 1987, Chemical modelling of kerogens, *Org. Geochem.*, 11, 1, 15-24.

BENNETT, B.; ABBOTT, G.D., 1999, A natural pyrolysis experiment -- hopanes from hopanoic acids? *Org. Geochem.*, 30, 1509-1516.

BENNETT, B.; FUSTIC, M.; FARRIMOND, P.; HUANG, H.; LARTER, S.R., 2006, 25-norhopane: formation during biodegradation of petroleum in the subsurface, *Org. Geochem.*, 37, 787-797.

BENNETT, B.; AITKEN, C.M.; JONES, D.M.; FARRIMOND, P.; LARTER, S.R., 2007, The occurrence and significance of 25-norhopanoic acids in petroleum reservoirs, *Org. Geochem.*, 38, 1977-1985.

BLUNT, J.W.; STOTHERS, I.B., 1979, ¹³C NMR spectra of steroids - A survey and commentary, *Org. Magn. Reson.*, 9, 439-466.

BREGER, I. A., 1960, Diagenesis of metabolites and a discussion of the origin of petroleum hydrocarbons, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 19, 297-308.

CERQUEIRA, J.R., Geoquímica do Campo de Ubarana e adjacências (Bacia Potiguar), Dissertação de mestrado, UFBA, Bahia, Brasil, 1985.

COREY, E.J.; SUGGS, J.W., 1975, Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for Oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds, *Tetrahedron Lett.*, 2647-2650.

CRUZ, G.F., 2009, Biodegradação aeróbia e anaeróbia de petróleo do campo Pampo Sul, bacia de Campos, RJ, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L., GÁMIZ-GRACIA, L., ALMANSA-LÓPEZ, E. M., BOSQUE-SENDRA, J. M., 2001, Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach, *Trends Anal. Chem.*, vol. 20, no. 11.

DE ROSA, M.; GAMBACORTA, A.; MINALE, L., 1972, The formation of ω -cyclohexyl-fatty acids from Shikimate in acidophilic thermophilic bacillus, *Biochem. J.*, 128, 751-754.

DIAS, R.F.; FREEMAN, K.H.; LEWAN, M.D.; FRANKS, S.G., 2002, [δ]¹³C of low-molecular-weight organic acids generated by the hydrous pyrolysis of oil-prone source rocks, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 66, 2755-2769.

DOU, L.; CHENG, D.; LI, M.; XIAO, K.; SHI, B.; LI, Z., 2008, Unusual high acidity oils from the Great Palogue Field, Melut Basin, Sudan, *Org. Geochem.*, 39, 210-231.

DUARTE, O. O., *Dicionário Enciclopédico Inglês-Português de Geofísica e Geologia*, 1^a edição, Rio de Janeiro, PETROBRAS, 1997.

DUBOIS, N.; BERNATHAN, G.; GOUYGOU, J.; BERGE, J., 2009, Gas chromatographic behavior of fatty acid derivatives for mass spectrometry on low-polarity capillary column, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111, 688-697.

EKWEOZOR C. M., STRAUZ O. P., 1982, "18,19-Bisnor-13 β H,14 α H-cheilanthane: a novel degraded tricyclic sesterpenoid-type hydrocarbon from the Athabasca oil sands", *Tetrahedron Lett.*, 23, 2711-2714.

FAFET, A.; KERGALL, F.; DA SILVA, M.; BEHAR, F., 2008, Characterization of acidic compounds in biodegraded oils, *Org. Geochem.*, 39, 1235-1242.

FAN, T.P., 1991, Characterization of naphthenic acids in petroleum by fast atom bombardment mass spectrometry, *Energy & Fuels*, 5, 371-375.

FARRIMOND, P.; GRIFFITHS, T.; EVDOKIADIS, E., 2002, Hopanoic acids in Mesozoic sedimentary rocks: their origin and relationship with hopanes, *Org. Geochem.*, 33, 965-977.

FRANÇOLIN, J.B.L., SZATMARI, P., 1987, Mecanismos de rifteamento da porção oriental da margem norte brasileira. *Rev. Bras. Geocien.*, 17, 196–207.

GAINES, S.M., EGLINTON, G., RULLKÖTTER, J., *Echoes of Life – what fossil molecules reveal about earth history*, Editora Oxford, New York, 2009.

GALIMBERTI, R.; GHISELLI, C.; CHIARAMONTE, M.A., 2000, Acidic polar compounds in petroleum: a new analytical methodology and applications as molecular migration indices, *Org. Geochem.*, 31, 1375-1386.

GREEN, J.B.; STIERWALT, B.K.; THOMSON, J.S.; TREESE, C.A., 1985, Rapid isolation of carboxylic acids from petroleum using high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 57, 2207-2211.

GOTO, K.; MATSUBARA, H.; MOCHIDA, K.; MATSUMURA, T.; HARA, Y.; NIWA, M.; YAMASATO, K., 2002, Alicyclobacillus herbarius sp. nov., a novel bacterium containing ω -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea, *Int. J. Systemat. Evol. Microbiol.*, 52, 109–113.

HAO, C.; HEADLEY, J.V.; PERU, K.M.; FRANK, R.; YANG, P.; SOLOMON, K.R., 2005, Characterization and pattern recognition of oil and sand naphthenic acids using comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1067, 277-284.

HEAD, I.M., JONES, M.D., LARTER, S.R., 2003, Biological activity in deep subsurface and the origin of heavy oil, *Nature*, 426, 344-352.

HEADLEY, J.V.; PERU, K.M.; BARROW, M.P.; DERRICK, P.J., 2007, Characterization of Naphthenic Acids from Athabasca Oil Sands Using Electrospray Ionization: The Significant Influence of Solvents, *Anal. Chem.*, 79, 6222-6229.

HESSLER D., O CAMPO R., ALBRECHT P., RIEHL J. J., OURISSON G., 1984, "Identification of long-chain tricyclic terpene hydrocarbons (C21-C30) in geological samples", *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 496-498.

HERZ, W.; PRASAD, J. S., 1984, Synthesis and Mass Spectra of Tricyclic C22, C23, and C24 Terpane Isomers of the ent-Isocopalne Series, *J. Org. Chem.*, 49, 326-333.

HOEFS, J. *Stable isotope geochemistry*. 5th., rev. enl. New York: Springer, 2004.

HOGENBOOM, A.C.; LEERDAM, J.A. VAN; VOOGT, P., 2009, Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, v. 1216, p. 510-519.

HOUSE, H.O., *Modern Synthetic Reactions*, 2nd., W.A. Benjamin, Inc. California, 228, 1972.

HSU, C.S.; DECHERT, G.J.; ROBBINS, W.K.; FUKUDA, E.K., 2000, Naphthenic Acids in Crude Oils Characterized by Mass Spectrometry, *Energy & Fuels*, 14, 217-223.

HU, Q., NOLL, R.J., LI, H., MARAKOV, A., HARDMAN, M., COOKS, R.G., 2005, The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.*, 40, 430-443.

HUGHEY, C.A.; RODGERS, R.P.; MARSHALL, A.G.; QIAN, K.; ROBBINS, W.K., 2002, Identification of acidic NSO compounds in crude oils of different geochemical origins by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Org. Geochem.*, 33, 743-759.

HUNT, M.J., *Petroleum Geochemistry and Geology*, 2nd., New York, W.H. Freedman, 1996.

IKAN, R, *Natural Products- A Laboratory Guide*, 2nd., Academic Press, New York, 138-141, 1991.

IMAMURA, P.; RÚVEDA, E.A., 1980, The C-13 configuration of the Bromine-containing diterpene isoaplysin-20. Synthesis of debromoisoaplysin-20 and its c-13 epimer, *J. Org. Chem.*, 45, 510-515.

IMAMURA, P., 1981, Determinação da estereoquímica de C-13 e tentativa da síntese de diterpeno bromado isoaplisina-20, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

JAFFÉ, R.; ALBRECHT, P.; OUDIN, J.L., 1988, Carboxylic acids as indicators of oil migration: II. Case of the Mahakam Delta, Indonesia, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 52, 2599-2607.

JAFFÉ, R.; GALLARDO, M.T., 1993, Application of carboxylic acid biomarkers as indicators of biodegradation and migration of crude oils from the Maracaibo Basin, Western Venezuela, *Org. Geochem.*, 20, 973-984.

JAFFÉ, R.; GARDINALI, P.; WOLFF, G.A., 1992, Evolution of alkanes and carboxylic acids in ancient sediments from the Maracaibo Basin, *Org. Geochem.*, 18, 195-201.

JAFFE, R.; GARDINALI, P.R., 1990, Generation and maturation of carboxylic acids in ancient sediments from the Maracaibo Basin, Venezuela, *Org. Geochem.*, 16, 211-218.

JONES, D.M.; WATSON, J.S.; MEREDITH, W.; CHEN, M.; BENNETT, B., 2000, Determination of Naphthenic Acids in Crude Oils Using Nonaqueous Ion Exchange Solid-Phase Extraction, *Anal. Chem.*, 73, 703-707.

KAWAMURA, K.; TANNENBAUM, E.; HUIZINGA, B.J.; KAPLAN, I.R., 1986, Long-chain carboxylic acids in pyrolysates of Green River kerogen, *Org. Geochem.*, 10, 1059-1065.

KILLOPS, S. & KILLOPS, V. *Introduction to Organic Geochemistry*, 2nd., LTC, Austrália, Rio de Janeiro, 2005.

KIM, S., STANFORD, L.A., RODGERS, R. P., MARSHALL, A.G., CLIFFORD, WALTERS, QIAN, K., WENGER, L.M., MANKIEWICZ, O., 2005, "Microbial alteration of the acidic and neutral polar NSO compounds revealed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry", *Org. Geochem.*, 36, 1117-1134.

KOIKE, L., REBOUÇAS, L.M.C, REIS, F.A.M., MARSAIOLI, A.J., RICHNOW, H.H. e MICHAELIS, W., 1992, Naphthenic acids from crude oils of Campos Basin, *Org. Geochem.*, 18, 6, 851-860.

LAREDO, G.C.; LAPEZ, C.R.; ALVAREZ, R.E.; CASTILLO, J.J.S.; CANO, J.L., 2004, Identification of Naphthenic Acids and Other Corrosivity-Related

Characteristics in Crude Oil and Vacuum Gas Oils from a Mexican Refinery, *Energy Fuels*, 18, 1687-1694.

LARTER, S.R., WILHELMS, A., HEAD, I.M., KOOPMANS, M., APLIN, A., PRIMIO, R., ZWACH, C., ERDMANN, M., TELNAES, N., 2003, The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface—part 1: biodegradation rates in petroleum reservoirs, *Org. Geochem.*, 34, 601-613.

LAVAGNINI, I.; MAGNO, F.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P., *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*, John Willey & Sons, 2006.

LI, M.; CHENG, D.; PAN, X.; DOU, L.; HOU, D.; SHI, Q.; WEN, Z.; TANG, Y.; ACHAL, S.; MILOVIC, M.; TREMBLAY, L., 2010, Characterization of petroleum acids using combined FT-IR, FT-ICR-MS and GC-MS: Implications for the origin of high acidity oils in the Muglad Basin, Sudan, *Org. Geochem.*, 41, 959-965.

LIMA, S.G., 2005, Síntese e Identificação de Biomarcadores em Óleos da Bacia de Campos e Bacia Potiguar. Identificação de 3-Alquil-Esteranos, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

LIMA, S.G., STEFFEN, R.A, REIS, F.A.M., KOIKE, L., SANTOS NETO, E.V., CERQUEIRA, J.R., 2010, "1-Propyl ergostanoic acids: Possible new indicator for oil biodegradation", *Org. Geochem.*, 41, 325-339.

LO, C.C.; BROWNLEE, B.G.; BUNCE, N.J., 2003, Electrospray-Mass Spectrometric Analysis of Reference Carboxylic Acids and Athabasca Oil Sands Naphthenic Acids, *Analytical Chemistry*, 75, 6394-6400.

LOPES, J.A.D., 1995, Estudo de Biomarcadores em Óleos do Campo Fazenda Belém, Bacia Potiguar: Identificação de 3-Alquil- e 3-Carboxialquil Esteranos, Constituintes de uma Nova Classe de Biomarcadores, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

LUO, Y.; LI, T.; YU, F.; KRAMER, T.; CRISTEA, I.M., 2010, Resolving the Composition of Protein Complexes Using a MALDI LTQ Orbitrap. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, v. 21, p. 34-46.

MACHADO, S.S., 1995, Aspectos Moleculares das Frações Neutra e Ácida de Petróleos da Bacia de Sergipe-Alagoas. Síntese de Biomarcadores Aromáticos Derivados de Esteróis, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas.

MACKENZIE, A.S.; PATIENCE, R.L.; YON, D.A.; MAXWELL, J.R., 1982, The effect of maturation on the configurations of acyclic isoprenoid acids in sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 46, 783-792.

MAGOON, L. B., & DOW, W. G. The petroleum system – from source to trap, *AAPG Memoir* 60, 3-24, 1994.

MATOS, R.M.D., 1992. The northeast Brazilian rift system. *Tectonics*, 11, 766–791.

MELLO, M.R., 1988, Geochemical and molecular studies of the depositional environments of source rocks and their derived oils from the Brazilian marginal basins, *PhD. Thesis*, University of Bristol.

MELLO, M.R., GAGLIANONE, P.C., BRASSELL, S.C., MAXWELL, J.R., 1988a. Geochemical and biological marker assessment of depositional environments using Brazilian offshore oils. *Mar. Pet. Geol.*, 5, 205–222.

MELLO, M.R., TELNÆS, N., GAGLIANONE, P.C., CHICARELLI, M.I., BRASSELL, S.C., MAXWELL, J.R., 1988b. Organic geochemical characterisation of depositional palaeoenvironments of source rocks and oils in Brazilian marginal basins. In: Katz, B.J., Pratt, L.M. (Eds.), 1987, *Advances in Org. Geochem.*, Pergamon Press, Oxford, pp. 31–45.

MEREDITH, W.; KELLAND, S.J.; JONES, D.M., 2000, Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition, *Org. Geochem.*, 31, 1059-1073.

MIRANDA, D.S., 1981, Sínteses estereosseletivas do *ent*-13(16),14-espongiadien-12a-ol e do isocopalano, a partir do 12-isocopaleno-15-oato de metila, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas.

MIRANDA, D.S.; BRENDOLAN, G.; IMAMURA, P.M.; SIERRA, M.G.; MARSAIOLI, A.J.; RÚVEDA, E.A., 1981, Stereoselective Synthesis of the Enantiomer of the Novel Marine Diterpene Isoagatholactone, *ent*-13(16),14-spongiadien-12a-ol, and the Parent Hydrocarbon Isocopalane from Methyl Isocopalate, *J. Org. Chem.*, 46, 4851-4858.

MOHAMMED, M.A.; SORBIE, K.S., 2009, 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*, 349, 1-3, 1-18.

MORAIS, E.T., 2007, Aplicações de Técnicas de Inteligências Artificial para Classificação Genética de Amostras de óleo da PÇorção Terrestre, Bacia Portuguesa, Brasil, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

NASCIMENTO, L.R.; REBOUÇAS, L.M.C.; KOIKE, L.; DE A.M REIS, F.; SOLDAN, A.L.; CERQUEIRA, J.R.; MARSAIOLI, A.J., 1999, Acidic biomarkers from Albacora oils, Campos Basin, Brazil, *Org. Geochem.*, 30, 1175-1191.

ONGLEY, P.A.; HAZZARD, B.J., 1973, *Organicum: Practical Handbook of Organic Chemistry*, Massachusetts, Pergamon Press, 5th., 768.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S., *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*, 2nd., New York, Harcourt Brace College Publishers, 511, 1996.

PAN, X.; PHILP, R.P., 2006, 17,21-Secohopanoic acids, 25-norhopanoic acids, and 28-norhopanoic acids in source rocks and crude oils, *Org. Geochem.*, 37, 1085-1100.

PENTEADO, H.L.B., 1995, Caracterização por geoquímica orgânica das Camadas Ponta do Tubarão na porção noroeste da Bacia Potiguar, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; NUCCI, G., 2005, Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica, *Química Nova*, 28, Suplemento, S107-S111.

PESSOA NETO, O. C.; SOARES, U.M.; SILVA, J.G.F.; ROESNER, E.H., 2007, Bacia Potiguar. *Bol. Geocien. Petrobras*, 15, 2, 357-369.

PETERS, K.E.; MOLDOWAN, J.M., *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils and Ancient Sediments*; Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1993.

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

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

POMERANTZ, A.E., MULLINS, O.C., PAUL, G., RUZICKA, J., SANDERS, M., 2011, Orbitrap Mass Spectrometry: A proposal for Routine Analysis of Nonvolatile Components of Petroleum, *Energy Fuels*, 25, 3077-3082.

PÖTZ, S., WILKES, H., WITT, M., HORSFIELD, B., 2010, "Characterization of complex assemblages of organic acids in geological samples by negative electrospray ionization mass spectrometry using a double-focusing magnetic sector field mass spectrometer", *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 24, 1185-1197.

QUEIROZ, M.E.C., 2010, "Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas", *Sci. Chromatogr.*, 2,1, 13-25.

REBOUÇAS, L.M.C., 1992, Ácidos Naftênicos e Petróleos do Campo Albacora, Bacia de Campos e Síntese de Biomarcadores, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

RIKKA, P., 2007, Spectrometric identification of naphthenic acids isolated from crude oil, *Ms. Thesis*, Texas State University.

RODRIGUES, R., 1983, Utilização de marcadores biológicos na correlação dos óleos da bacia do Ceará e parte emersa da bacia Potiguar. *Bol. Tec. Petrobras*, 26, 163–179.

RODRIGUES, D.C.; KOIKE, L.; REIS, F.D.A.M.; ALVES, H.P.; CHANG, H.K.; TRINDADE, L.A.; MARSAIOLI, A.J., 2000, Carboxylic acids of marine evaporitic oils from Sergipe-Alagoas Basin, Brazil, *Org. Geochem.*, 31, 1209-1222.

RUDZINSKI, W.E., OEHLERS, L., ZHANG, Y., 2002, “Tandem Mass Spectrometric Characterization of Commercial Naphthenic Acids and a Maya Crude Oil”, *Energy Fuels*, 16, 1178-1185.

SANTOS NETO, E.V., 1996, Isotopic characterization of the Cretaceous lacustrine and marine-evaporitic sequences and related oils from the Potiguar basin, northeastern Brazil. *PhD. Thesis*, Indiana University.

SANTOS NETO, E.V., HAYES, J.M., TAKAKI, T., 1998a, Isotopic biogeochemistry of the Neocomian lacustrine and Upper Aptian marine-evaporitic sediments of the Potiguar Basin, northeastern Brazil. *Org. Geochem.*, 28, 361-381.

SANTOS NETO, E.V., HAYES, J.M., TAKAKI, T., 1998b, Paleoclimatic assessment of Cretaceous lacustrine and marine evaporitic sequences from the Potiguar Basin (Brazil) based on the hydrogen isotopic compositions of saturated hydrocarbons. *Rev. Latinoam. Geol. Org.*, 4, 5-24.

SANTOS NETO, E. V., MELLO, M. R., RODRIGUES, R. 1990, Caracterização Geoquímica dos óleos da Bacia Potiguar, *Congr. Bras. Geol.*, Natal, 2, 974-985.

SANTOS NETO, E.V., HAYES, J.M., 1999, Use of hydrogen and carbon isotopes characterizing oils from the Potiguar Basin (Onshore), northeastern Brazil. *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull.*, 83, 496–518.

SCHAEFFER, P.; FACHE-DANY, F.; TRENDEL, J.M.; ALBRECHT, P., 1993, Polar constituents of organic matter rich marls from evaporitic series of the Mulhouse basin, *Org. Geochem.*, 20, 1227-1236.

SEEWALD, J. S., 2003, Organic-inorganic interactions in petroleum-producing sedimentary basins, *Nature*, 426, 327-333.

SEIFERT, W. K.; GALLEGOS, E. J.; TEETER, R. M., 1972, Proof of Structure of Steroid Carboxylic Acids in a California Petroleum by Deuterium Labeling, Synthesis, and Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, 94,16.

SENFLE, J. T.; LANDIS, C. R.; MCLAUGHLIN, R. Organic Petrographic Approach to Kerogen Characterization. In: ENGEL, M. H. & MACKO, S. A. *Organic Geochemistry – Principles and Applications*, New York, 1993.

SHI, Q.; ZHAO, S.; XU, Z.; CHUNG, K.S.; ZHANG, Y.; XU, C., 2010, Distribution of Acids and Neutral Nitrogen Compounds in a Chinese Crude Oil and Its Fractions: Characterized by Negative-Ion Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Energy Fuels*, 24, 4005-4011.

SILVA, A.A., 2008, Estudos Geoquímicos com Evidências Paleoambientais, Maturação e Biodegradação dos Óleos de Diferentes Origens da Bacia Potiguar, Brasil. Síntese de Biomarcadores de Esteróis, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

SMITH, B.E., ROWLAND, S.J., 2008, A derivatisation and liquid chromatography/electrospray ionisation multistage mass spectrometry method for the characterisation of naphthenic acids, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 22, 3909-3927.

SORIANO, M.P.C., 2004, Rotas exploratórias visando a síntese do eperuol a partir dos ácidos abiético e copálico, *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

SOUZA-LIMA, W. & HANSI JUNIOR, G. P. 2003. Origem, evolução e classificação das bacias sedimentares. *Bacias sedimentares brasileiras*, 5, 49.

SZATMARI, P., FRANÇOLIN, J.B.L., ZANOTTO, O., WOLFF, S., 1987. Evolução tectônica da margem equatorial brasileira. *Rev. Bras. Geocien.*, 17, 180–188.

TAGUCHI, R., ISHIKAWAA, M., 2010, Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search, *J. Chromatogr. A*, 1217, 4229-4239.

TAYLOR, G. H.; TEICHMÜLLER, M.; DAVIS, A.; DIESSEL, C. F. K.; LITKE, R.; ROBERT, P. *Organic Petrology*, Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 1998.

THORN, K.A.; AIKEN, G.R., 1998, Biodegradation of crude oil into nonvolatile organic acids in a contaminated aquifer near Bemidji, Minnesota, *Org. Geochem.*, 29, 909-931.

TEICHMÜLLER, M. & DURAND, B., 1983, Fluorescence microscopical rank studies on liptinites and vitrinites in peat and coals, and comparison with results of the rockoeval pyrolysis, *Int. J. Coal Geol.*, 2, 197-230.

TISSOT, B. P. & WELTE, D. H. *Petroleum Formation and Occurrence*, 2nd., Springer-Verlag, New York, 1984.

TRINDADE, L.A.F., 1992, Geochemical assessment of petroleum migration and mixing in the Potiguar and Sergipe-Alagoas Basins, Brazil, *PhD. Thesis*, University of Stanford.

TRINDADE, L.A.F., BRASSELL, S.C., SANTOS NETO, E.V., 1992. "Petroleum migration and mixing in the Potiguar Basin, Brazil", *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull.*, 76, 1903–1924.

TYSON, R. V. *Sedimentary Organic Matter*, Chapman & Hall, London, 1995.

VASCONCELOS, S.P., 2006, Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microrganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul), *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas.

VESSECCHI, R., LOPES, N. P., GOZZO, F. C., DÖRR, F. A., MURGU, M., LEBRE, D. T., ABREU, R., BUSTILHOS, O. V., RIVEROS, J. M., 2011, Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa, *Quím. Nova*, *in press*, 1-13.

VOLKMAN, J.K., 2006, Lipid Markers for Marine Organic Matter. *Handbook of Environmental Chemistry*, Berlin, Springer, 2, 27-70.

VOGEL, *Vogel's Textbook of practical Organic Chemistry*, 4th., longman Group Limited, 83-93, 332, 1978.

WATERHOUS, D. V.; BARNES, S.; MUCCIO, D. D., 1985, Nuclear magnetic resonance spectroscopy of bile acids. Development of two-dimensional NMR methods for the elucidation of proton resonance assignments for five common hydroxylated bile acids, and their parent bile acid, 5 β -cholanoic acid, *J. Lipid Res.*, 26, 1068-1078.

WATSON, J.S.; JONES, D.M.; SWANNELL, R.P.J.; VAN DUIN, A.C.T., 2002, Formation of carboxylic acids during aerobic biodegradation of crude oil and evidence of microbial oxidation of hopanes, *Org. Geochem.*, 33, 1153-1169.

WATSON, J.T. & SPARKMAN, O.D., *Introduction to Mass Spectrometry*, 4th., Wiley, 2007.

WHELAN, J. K. & THOMPSON-RIZER, C. L. Chemical Methods for Assessing Kerogen and Protokerogen Types and Maturity. In: Engel, M. H. & Macko, S. A. *Organic Geochemistry – Principles and Applications*, New York, 1993.

WELTE, D .H.; HORSFIELD, B.; BAKER, D. R. (Eds.), *Petroleum and Basin Evolution, Insights from Petroleum Geochemistry, Geology and Basin Modeling*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1997.

WHITE, W. M. *Geochemistry*, Cornell University, 1998.

WIDDEL, F. & RABUS, R., 2001, Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons, *Environ. Biotechnol.*, 12, 259-276.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B., 2002, Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros, *Bol. Téc. Petrobras*, 45, 1, 21-25.

ANEXO I

Neste trabalho foram utilizados reagentes e solventes com grau analítico indicados para as diferentes finalidades e quando necessário foram previamente purificados seguindo métodos descritos na literatura (Perrin, 1980).

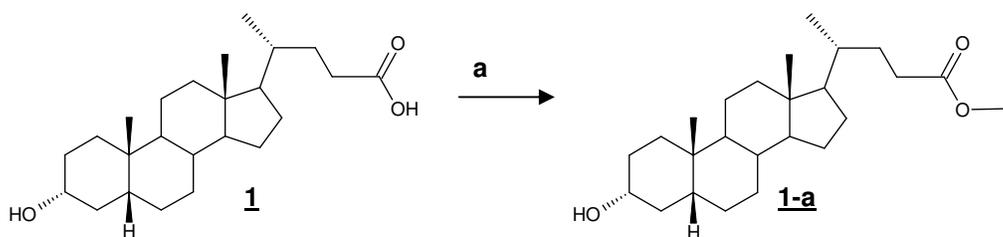
As análises em CCDA foram realizadas empregando-se cromatofolhas de alumínio (20x20 cm), recobertas com sílica gel com indicador de fluorescência UV_{254nm} (Merck).

As CC foram realizadas utilizando-se sílica gel 60, 70-230 mesh (Merck).

Equipamentos:

- CL-EM/EM: Accela LTQ-XL Orbitrap (*Thermo Finnigan*)
- Ponto de fusão: MA 381 - Display N 480 D (*Marconi*)
- Infra-vermelho: 380 FT/IR KBr , Fluorolube emulsion (*Thermo Nicolet*)
- Rotação ótica: 341 – Polarimeter (*Perkin Elmer*)
- RMN: NMR-carbon (¹³C_62,5 MHz) e (¹H_ 250 MHz) (*Bruker*)

I.1. Preparação e caracterização do intermediário éster metílico do ácido litocólico (**1-a**)



(a) CH_2N_2 /éter dietílico anidro, 0 °C, (100%).

Esquema 1-I: Preparação do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

Em um balão de 100 mL de capacidade foram dissolvidos 4,00 g (0,010 mol) de ácido litocólico (**1**) em 50 mL de éter dietílico. Em seguida, uma solução etérea de diazometano foi adicionada, gota a gota sob refrigeração (banho de gelo), até que se verificasse a permanência de uma coloração amarelada. A mistura foi deixada em repouso de um dia para o outro a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, uma alíquota da mistura foi analisada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando-se $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5) como eluente e aplicando-se o reagente como padrão. O fator de retenção do produto foi de 0,63. Posteriormente, o éter foi evaporado em evaporador rotativo e o produto obtido (4,14 g – 100% rendimento) foi caracterizado por diferentes técnicas espectroscópicas (IV, RMN ^{13}C e ^1H) e CG-EM.

Análise direta por CG-EM mostrou um único pico a 19,38 min, cujo espectro de massas mostrou o íon molecular com baixa abundância relativa com PM 390, mostrando que o grupo hidroxila na posição α no anel A é liberado na forma de água produzindo íon com PM 372.

A atribuição dos sinais dos carbonos no espectro de RMN ^{13}C foram feitas utilizando-se os espectros de DEPT 135 e 90 e o espectro do reagente ácido litocólico (**1**), encontrado na literatura (Waterhous *et al.*, 1985). A pequena desproteção apresentada no C22, é devido à mudança eletrônica da função química com proteção de $\Delta\delta$ de - 4,5 ppm, devido à transformação de ácido para éster metílico.

Ponto de fusão: 131,1 - 131,2 °C;

[α_D]: +27,0 ° (4,84 g/100 mL CHCl₃);

Infravermelho (cm⁻¹): 1729 (carbonila de éster); 3320 (OH);

Espectro de massas (m/z): 390, 372, 318, 257, 215.

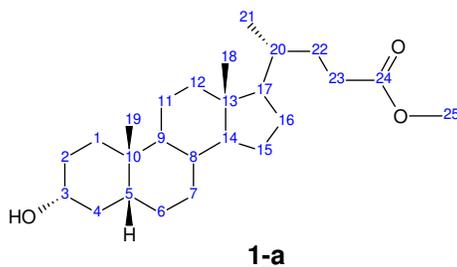


Tabela 1-I: Atribuições de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) e RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**) obtidos neste trabalho comparados aos dados da literatura de atribuição de RMN ¹³C para ácido litocólico (**1**) (Waterhous *et al.*, 1985).

C	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	¹³ C (δ, ppm) (Waterhous <i>et al.</i> , 1985)
1	34,54	1,95-0,95, m, 2H	35,3
2	30,52	1,95-0,95, m, 2H	30,3
3	71,82	3,57, m, 1H	70,5
4	36,44	1,95-0,95, m, 2H	36,3
5	42,08	1,95-0,95, m, 1H	41,9
6	27,17	1,95-0,95, m, 2H	27,1
7	26,39	1,95-0,95, m, 2H	26,3
8	35,83	1,95-0,95, m, 1H	35,6
9	40,42	1,95-0,95, m, 1H	40,2
10	35,33	-	34,2
11	20,80	1,95-0,95, m, 2H	20,6
12	40,15	1,95-0,95, m, 2H	40,0
13	42,71	-	42,4
14	56,47	1,95-0,95, m, 1H	56,3
15	24,17	1,95-0,95, m, 2H	24,0
16	28,15	1,95-0,95, m, 2H	28,0
17	55,93	1,95-0,95, m, 1H	55,8
18	12,01	0,89, s, 3H	11,9
19	23,34	0,61, s, 3H	23,3
20	35,33	1,95-0,95, m, 1H	35,1
21	18,23	0,88, d, 3H	18,2
22	31,03	1,95-0,95, m, 2H	30,9
23	30,98	2,26, m, 2H	30,9
24	174,75	-	178,1
25	51,43	3,63, s, 3H	-

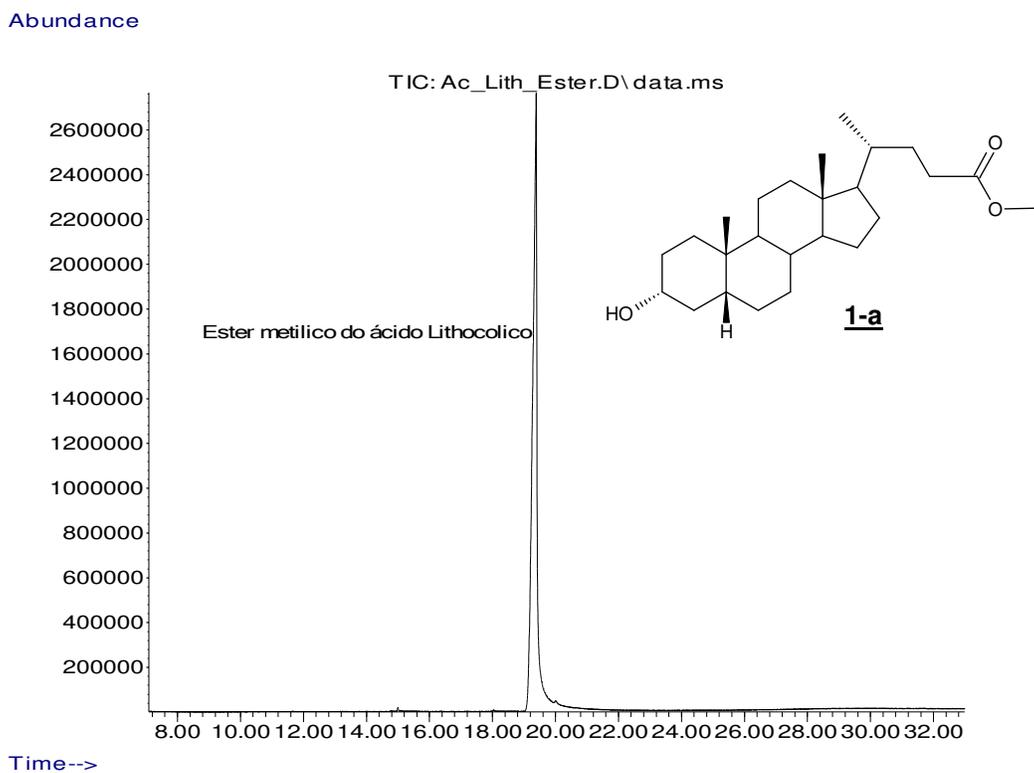


Figura 1-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

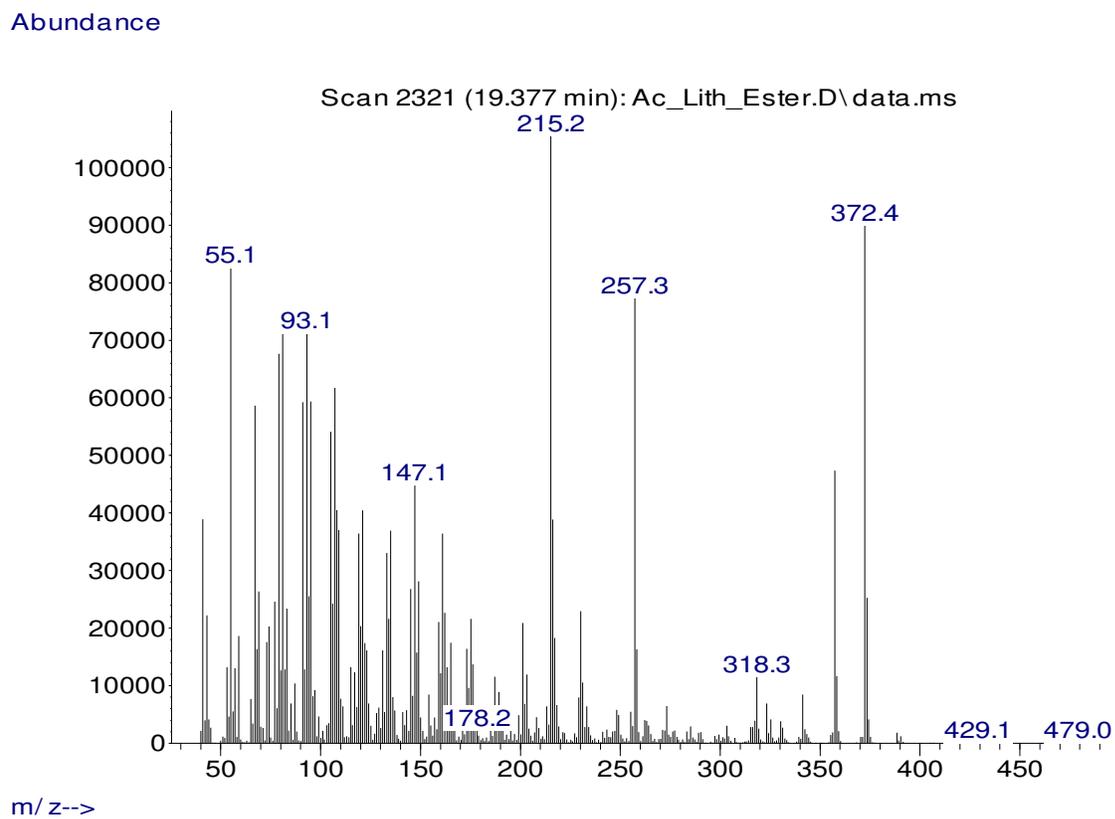


Figura 2-I: Espectro de massas do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

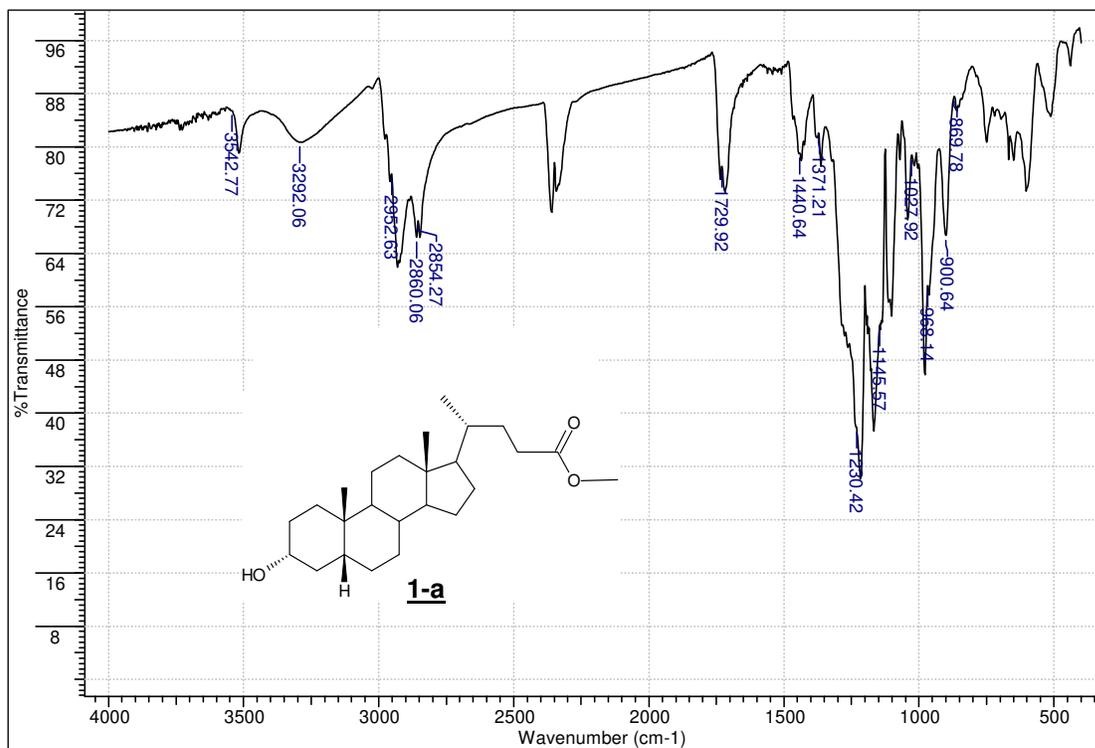


Figura 3-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

1a_mn_C13
Luis Fernando EMAclith CDCI3 /250 Mhz ago06lukC

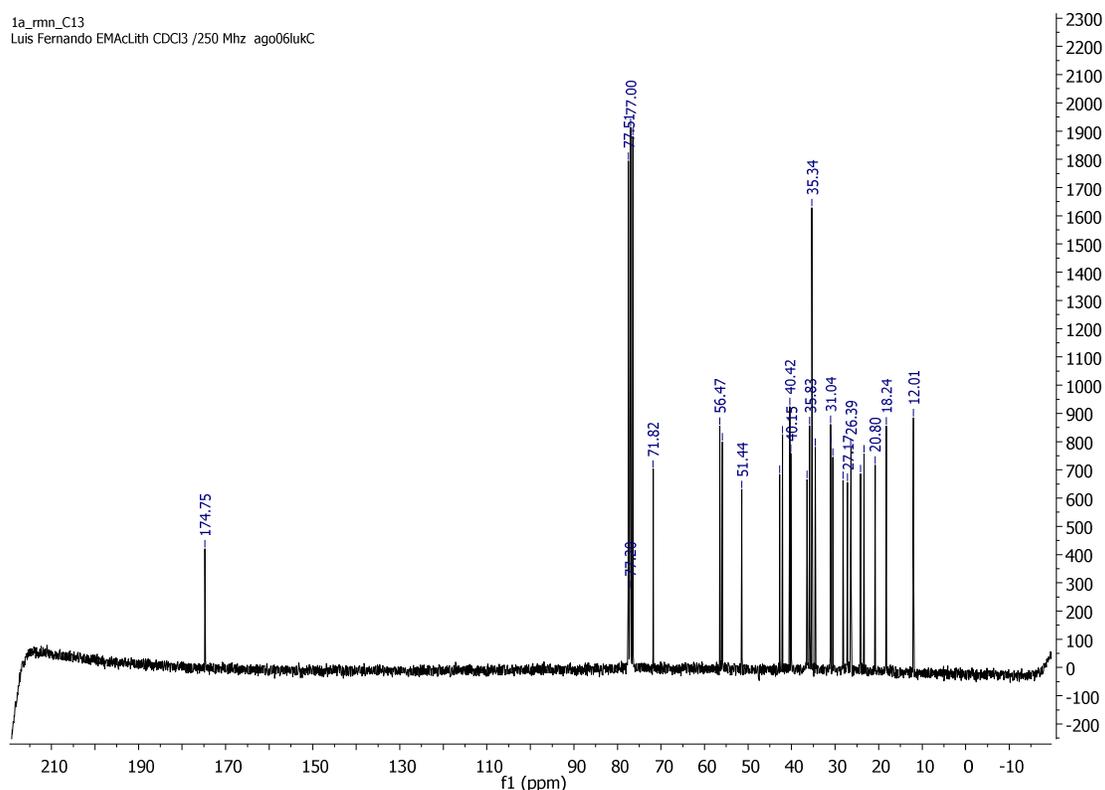


Figura 4-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

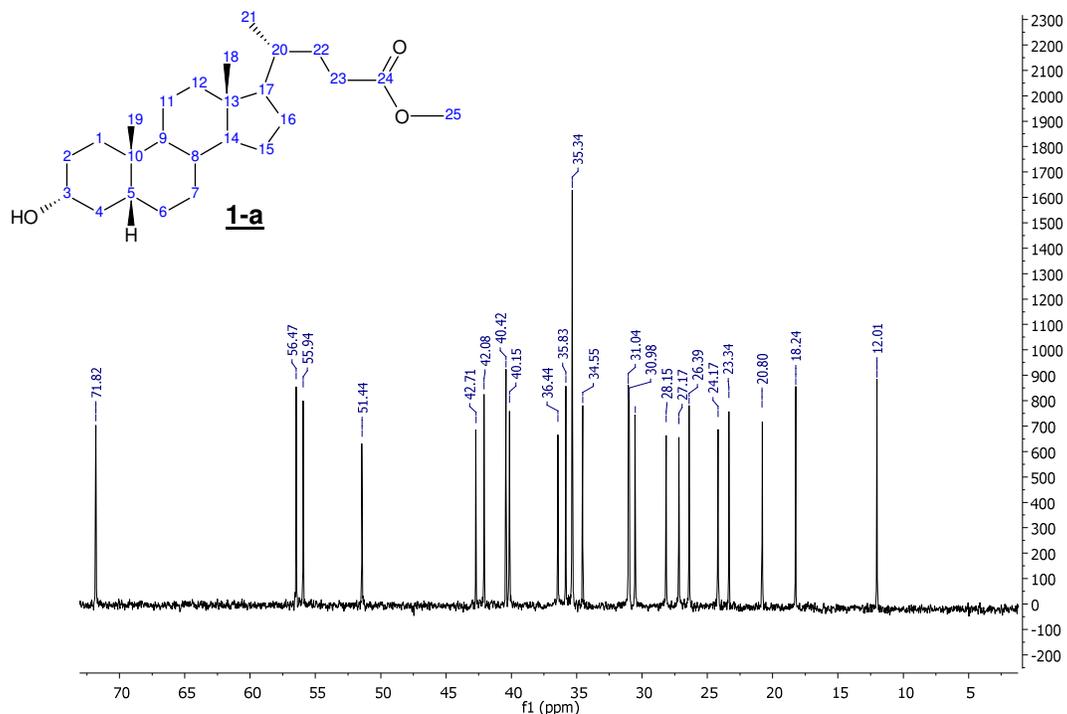


Figura 5-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**) ampliado na faixa entre 10 e 75 ppm.

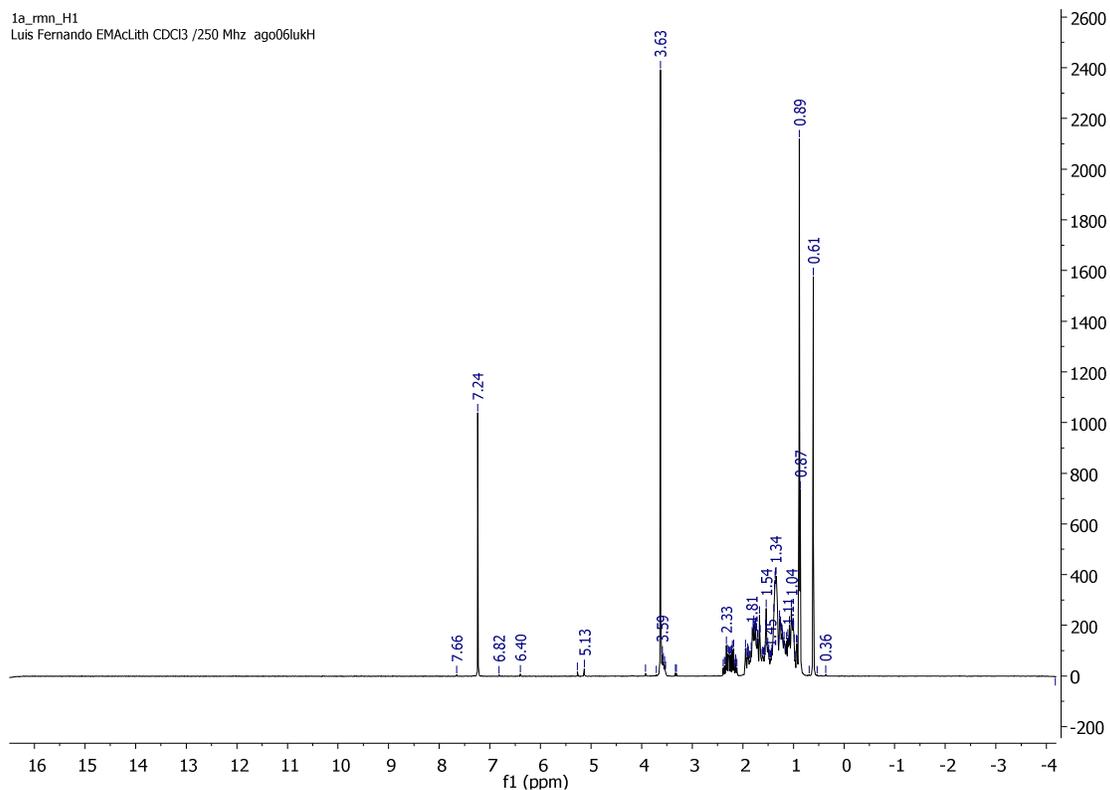


Figura 6-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

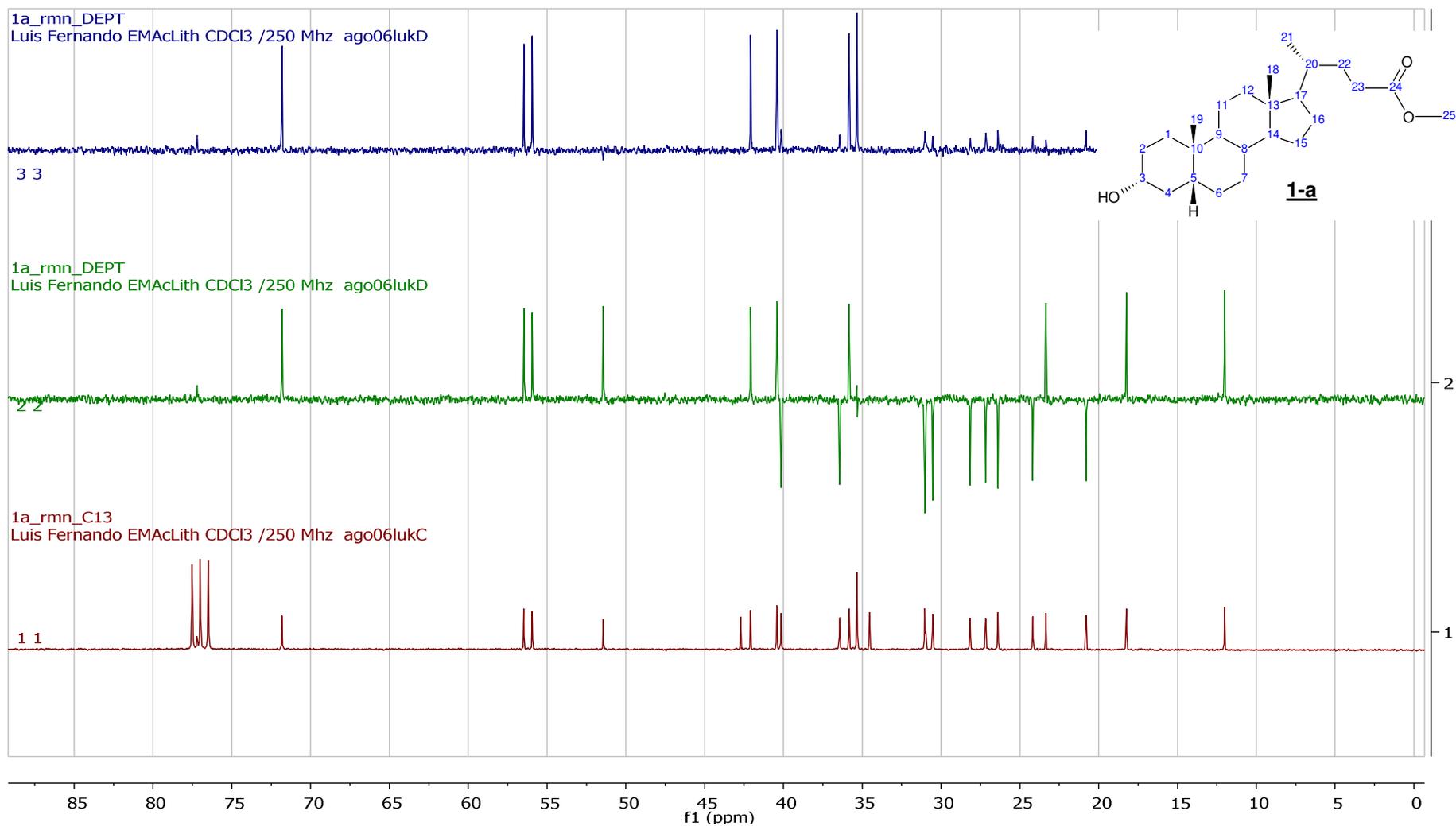
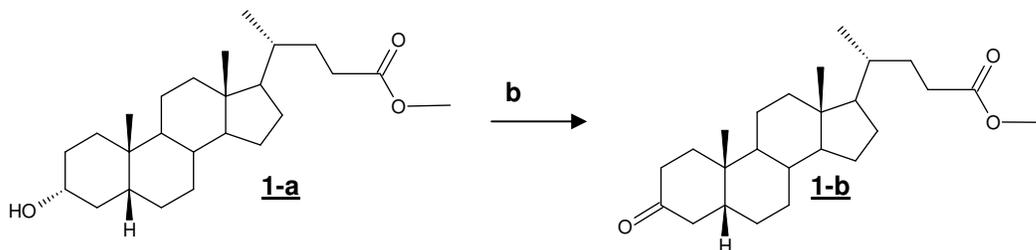


Figura 7-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido litocólico (**1-a**).

I.2. Preparação e caracterização do intermediário éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**)



(b) PCC/Alumina/benzeno, refluxo, 25h (96%).

Esquema 2-I: Preparação do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

Foram adicionados aproximadamente 20 g de PCC-Alumina (preparados no dia anterior) a 3,90 g (0,010 mol) do composto **1-a** em benzeno. Deixou-se sob refluxo e agitação por 24h. Após este período, fez-se uma CCDA utilizando-se $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5) como eluente e notou-se a presença de reagente. Sendo assim, foram adicionados mais 10 g de PCC/Alumina e deixou-se em refluxo por mais 1h. Após este tempo, uma nova CCDA acusou reação total. Evaporou-se o solvente em evaporador rotativo e em seguida o produto foi passado por uma coluna de alumina (40 g de alumina; 3 cm de diâmetro interno da coluna) e filtrado com diclorometano. Após evaporação do solvente, obteve-se 3,73 g de **1-b** (96% de rendimento).

Ponto de fusão: 123,3 – 123,7 °C;

$[\alpha]_D$: +31,5 ° (5,15 g/100 mL CHCl_3);

Infravermelho (cm^{-1}): 1735 (carbonila de éster); 1712 (carbonila de cetona);

Espectro de massas (m/z): 388, 356, 318, 273, 231.

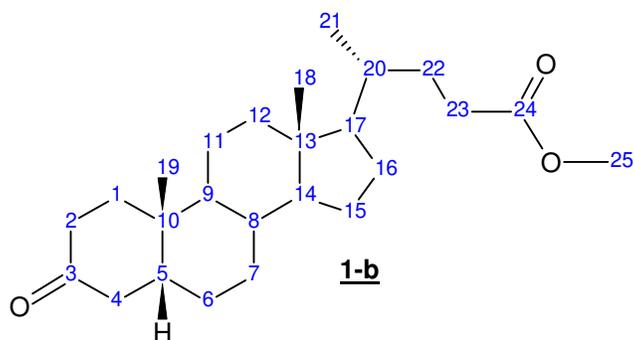


Tabela 2-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	31,17	2,37-1,01, m, 2H
2	36,99	2,37-1,01, m, 2H
3	213,28	-
4	42,33	2,37-1,01, m, 2H
5	44,30	2,37-1,01, m, 2H
6	26,60	2,37-1,01, m, 2H
7	25,74	2,37-1,01, m, 2H
8	35,51	2,37-1,01, m, 1H
9	40,72	2,37-1,01, m, 1H
10	34,86	-
11	21,17	2,37-1,01, m, 2H
12	40,02	2,37-1,01, m, 2H
13	42,75	-
14	56,41	2,37-1,01, m, 1H
15	24,12	2,37-1,01, m, 2H
16	28,11	2,37-1,01, m, 2H
17	55,95	2,37-1,01, m, 1H
18	12,04	0,99, s, 3H
19	22,68	0,65, s, 3H
20	35,32	2,37-1,01, m, 1H
21	18,25	0,89, d, 3H
22	30,95	2,37-1,01, m, 2H
23	31,02	2,66, m, 2H
24	174,66	-
25	51,43	3,63, s, 3H

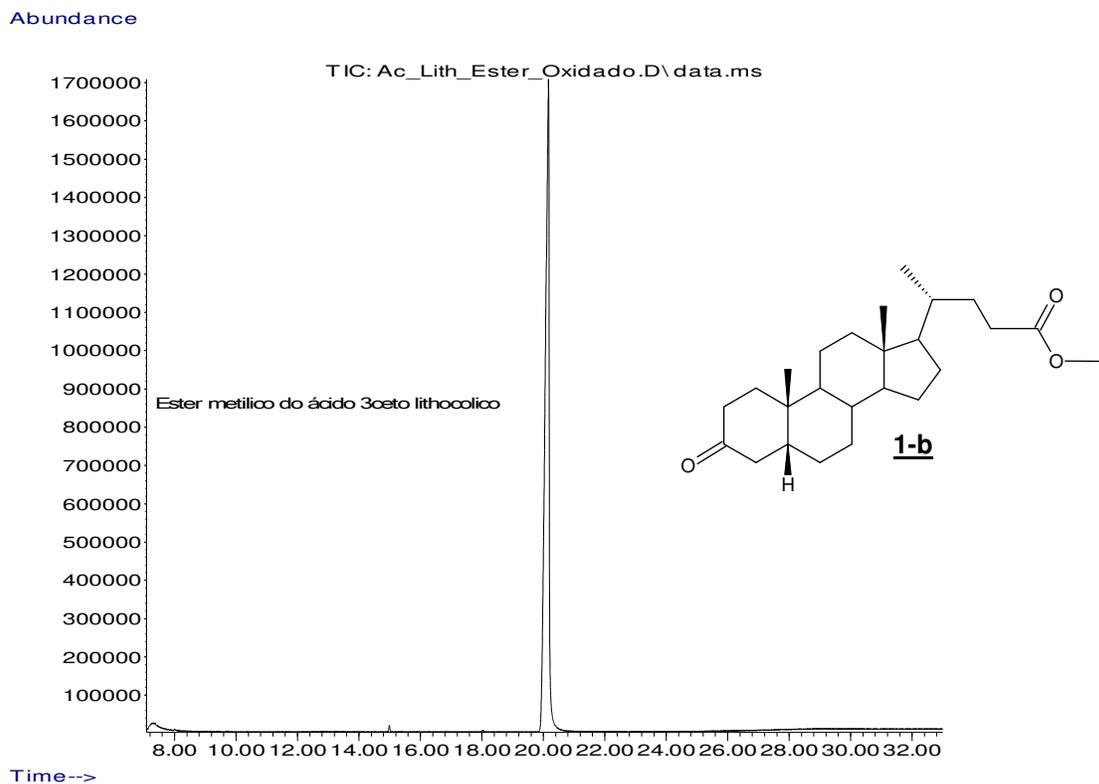


Figura 8-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

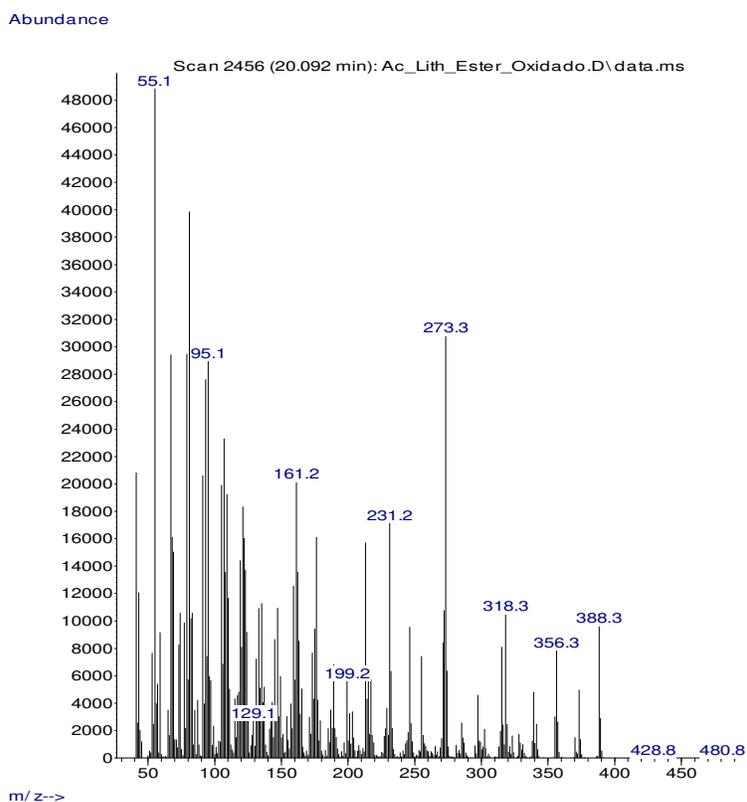


Figura 9-I: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

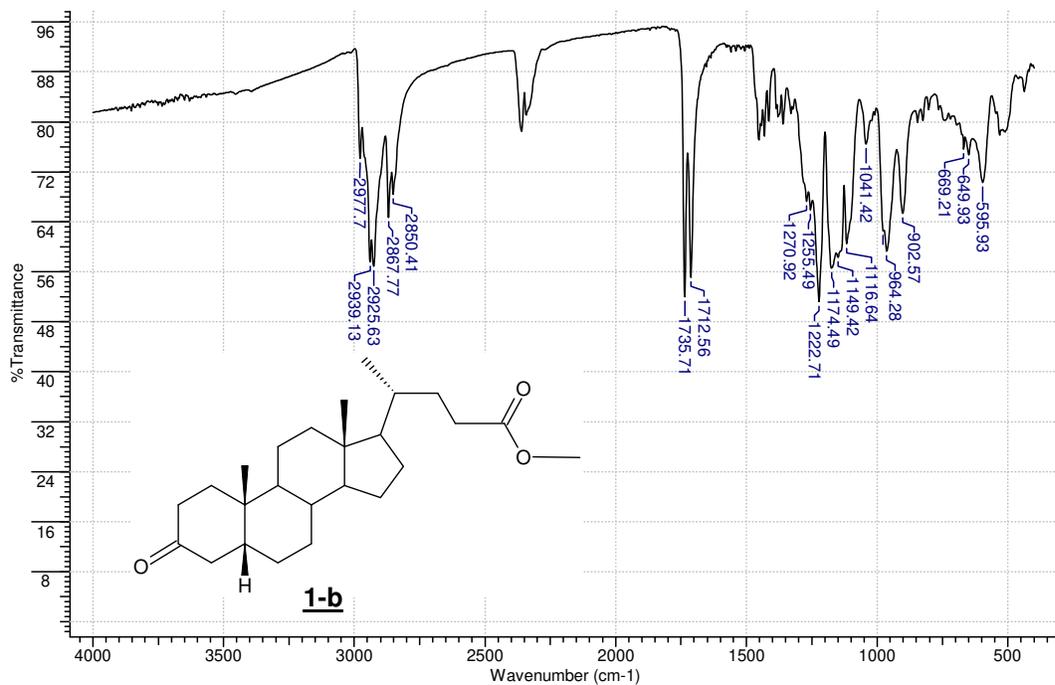


Figura 10-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

1b_rmn_C13
Luis Fernando "3KCMeEster" cdc3/250Mhz ago09lukC

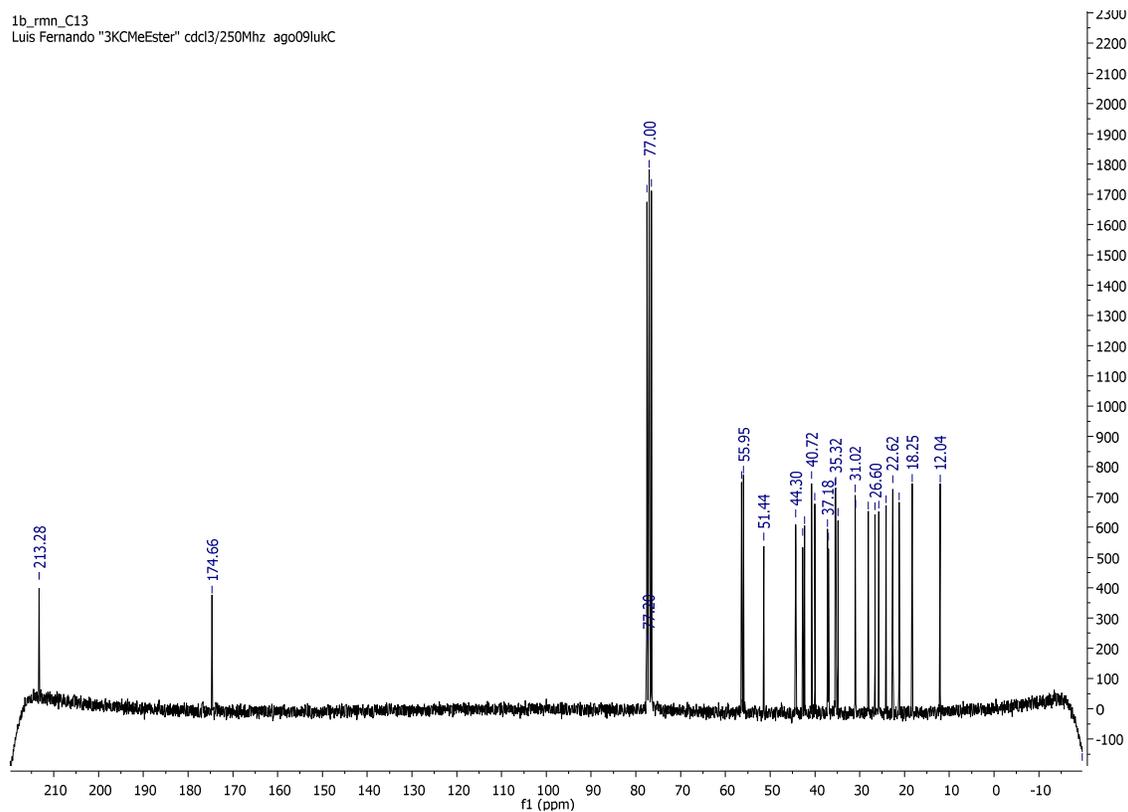


Figura 11-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

1b_rmn_C13
Luis Fernando "3KCMester" cdc13/250Mhz ago09lukC

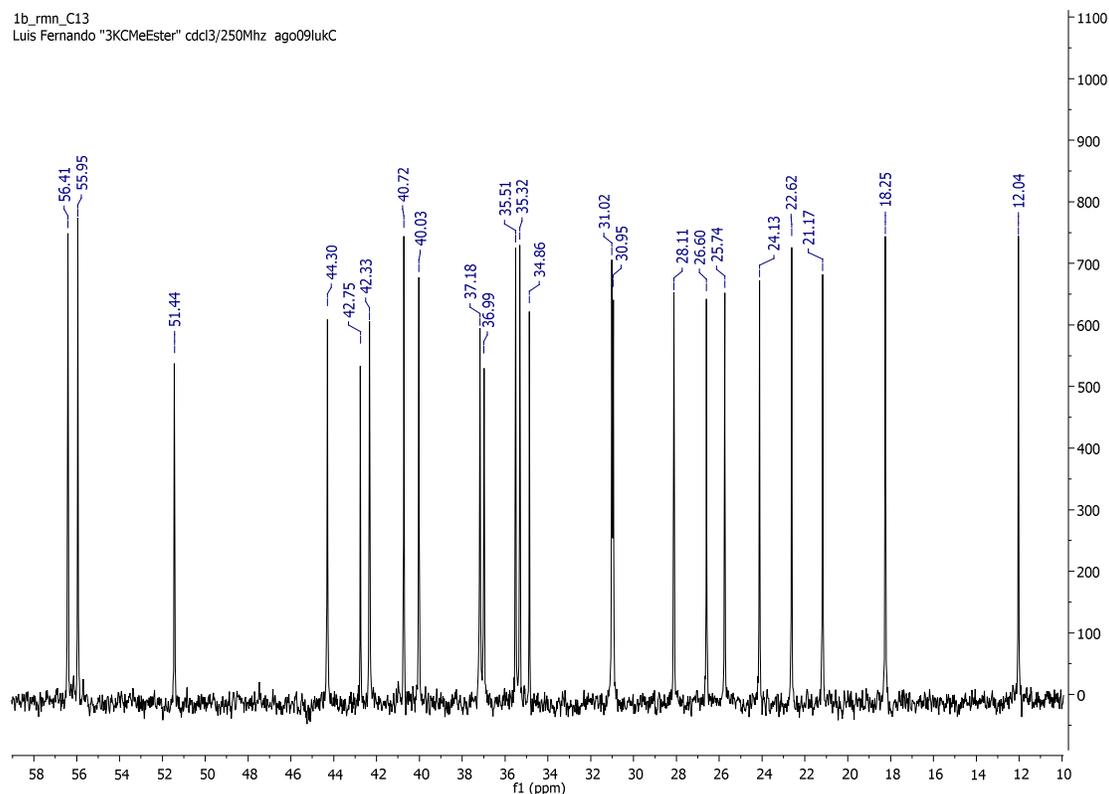


Figura 12-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.

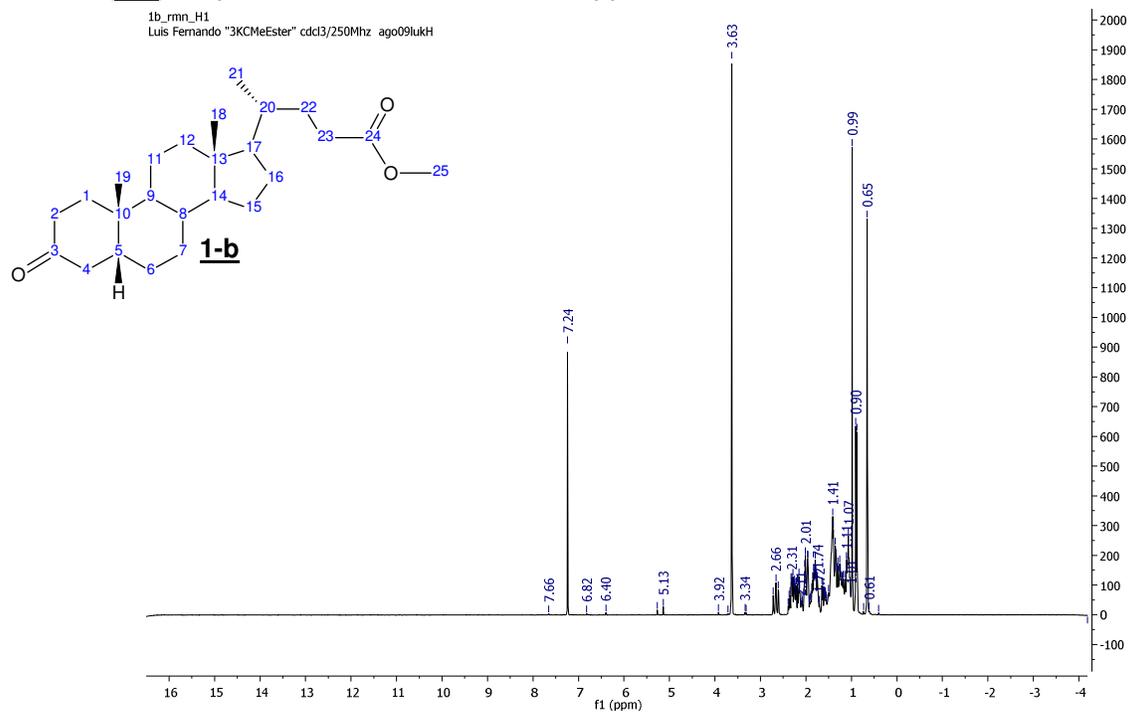


Figura 13-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

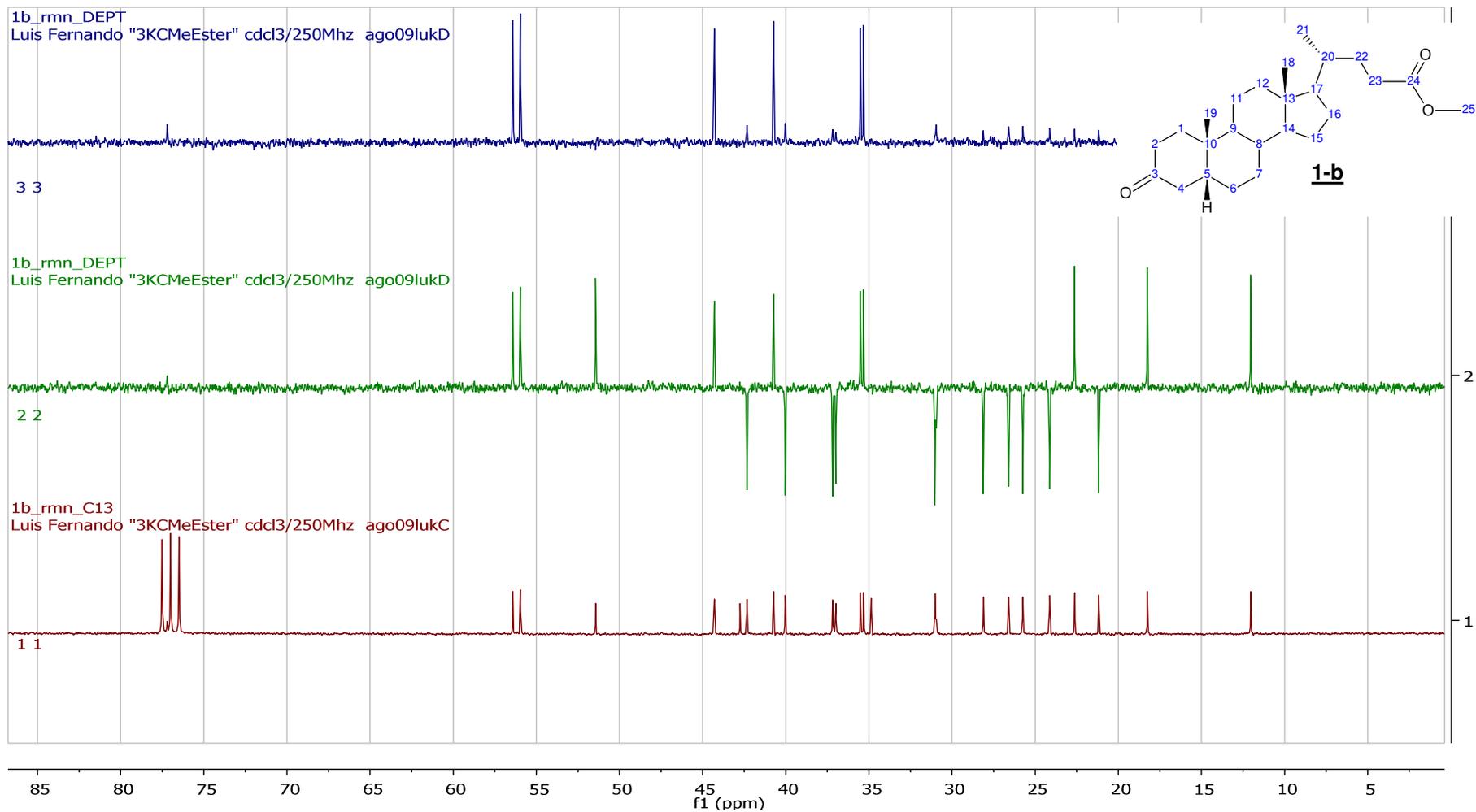
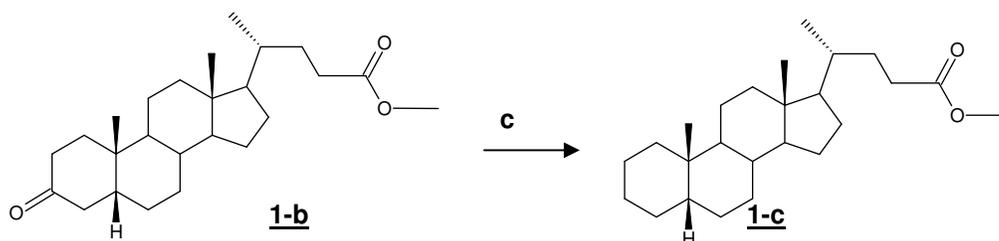


Figura 14-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto litocólico (**1-b**).

I.3. Preparação e caracterização do intermediário éster metílico do ácido 5 β (H) colânico (1-c)



(c) Zn/HgCl₂, HCl, refluxo, 8h (98%).

Esquema 3-I: Preparação do éster metílico do ácido 5 β (H) colânico (**1-c**).

Para redução da carbonila direto para hidrocarboneto preparou-se uma amálgama de Zn e Hg na hora da reação (10 g Zn tratado em aparas, 0,750 g HgCl₂, 0,5 mL HCl concentrado e 12,5 mL H₂O). Adicionou-se o composto a amálgama e deixou-se em refluxo por 8 h. Adicionou-se a cada hora 1,5mL HCl. A CCDA (eluente: Hexano/ Acetato de Etila [80:20]) mostrou que a reação se completou. Extraiu-se com clorofórmio e a amostra foi seca em evaporador rotativo e obteve-se o produto de interesse **1-c** com 98% de rendimento.

Ponto de fusão: 87,7 – 88,2 °C;

[α_D]: +21,00 ° (5,62 g/100 mL CHCl₃);

Infravermelho (cm⁻¹): 1735 (carbonila de éster);

Espectro de massas (m/z): 374, 359, 217.

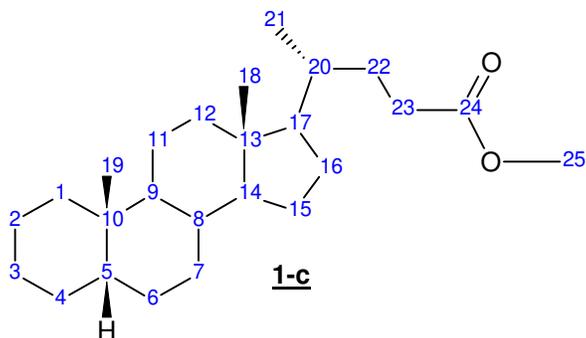


Tabela 3-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido $5\beta(\text{H})$ colânico (**1-c**).

C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	37,84	2,32-0,97, m, 2H
2	21,59	2,32-0,97, m, 2H
3	27,29	2,32-0,97, m, 2H
4	27,76	2,32-0,97, m, 2H
5	43,98	2,32-0,97, m, 1H
6	27,49	2,32-0,97, m, 2H
7	26,80	2,32-0,97, m, 2H
8	36,14	2,32-0,97, m, 1H
9	40,77	2,32-0,97, m, 1H
10	35,61	-
11	21,08	2,32-0,97, m, 2H
12	40,53	2,32-0,97, m, 2H
13	43,01	-
14	56,86	2,32-0,97, m, 1H
15	24,48	2,32-0,97, m, 2H
16	28,45	2,32-0,97, m, 2H
17	56,24	2,32-0,97, m, 1H
18	12,29	0,89, s, 3H
19	24,51	0,62, s, 3H
20	35,63	2,32-0,97, m, 1H
21	18,52	0,89, d, 3H
22	31,31	2,32-0,97, m, 2H
23	31,28	2,32-0,97, m, 2H
24	175,02	-
25	51,69	3,63, s, 3H

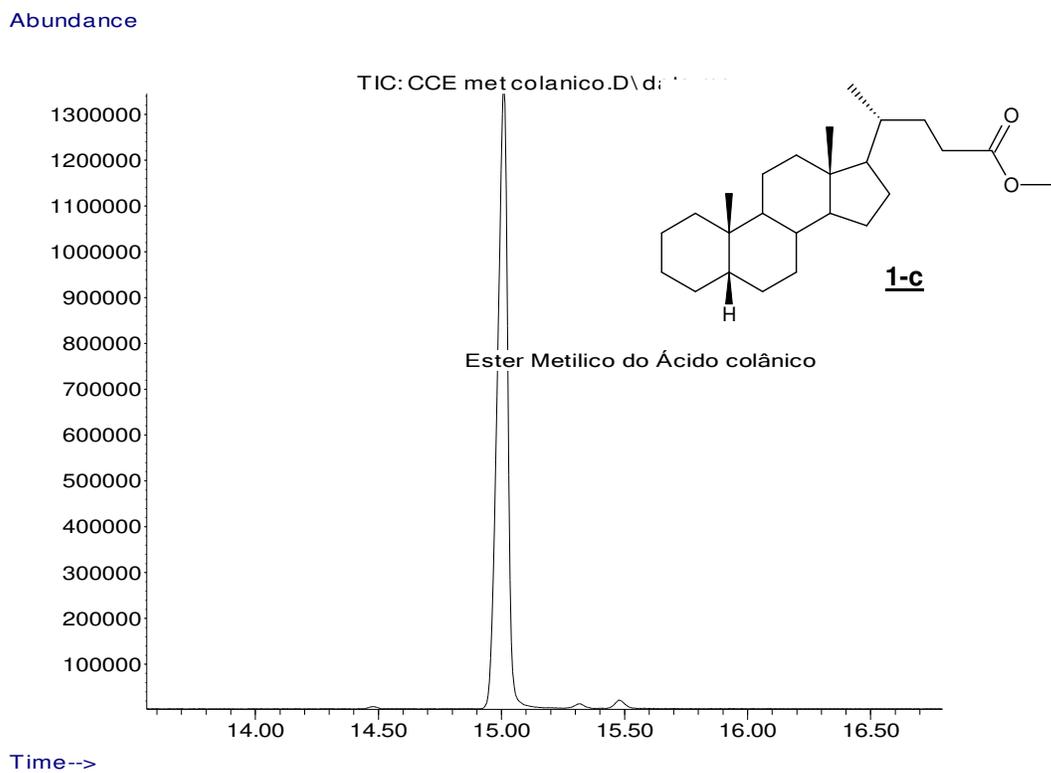


Figura 15-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 5 β (H) colânico (**1-c**).

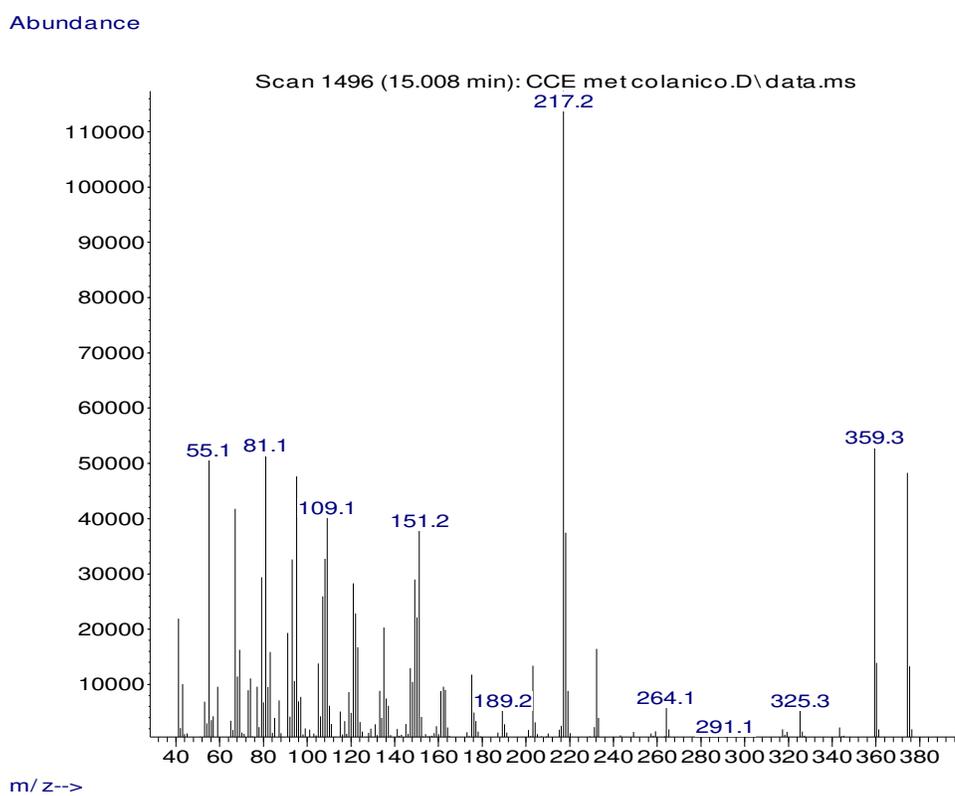


Figura 16-I: Espectro de massas do éster metílico do ácido 5 β (H) colânico (**1-c**).

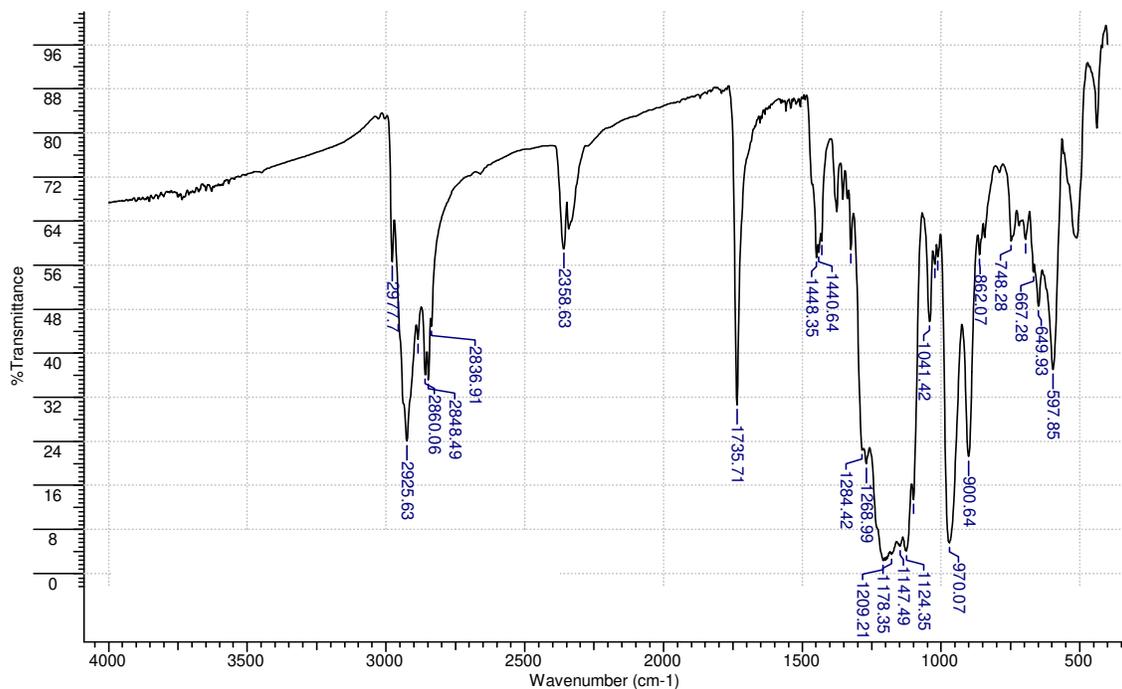


Figura 17-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (**1-c**).

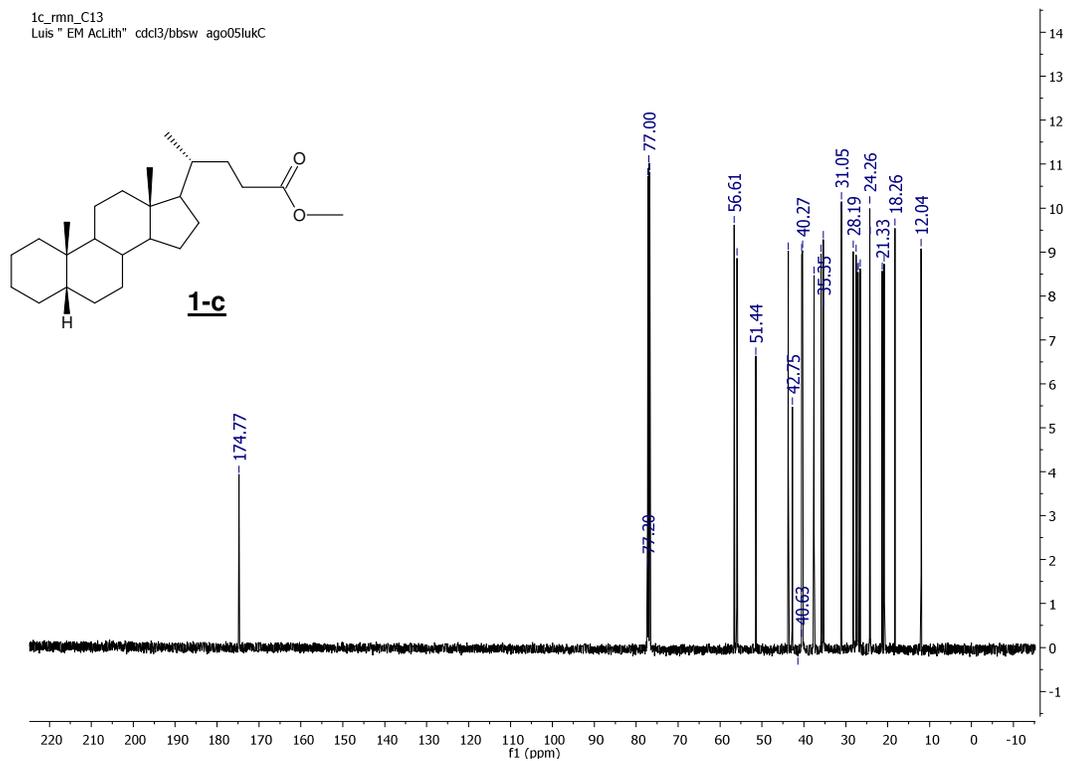


Figura 18-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (**1-c**).

1c_rm_n_C13
Luis "EM AcLith" cdc13/bbsw ago05lukC

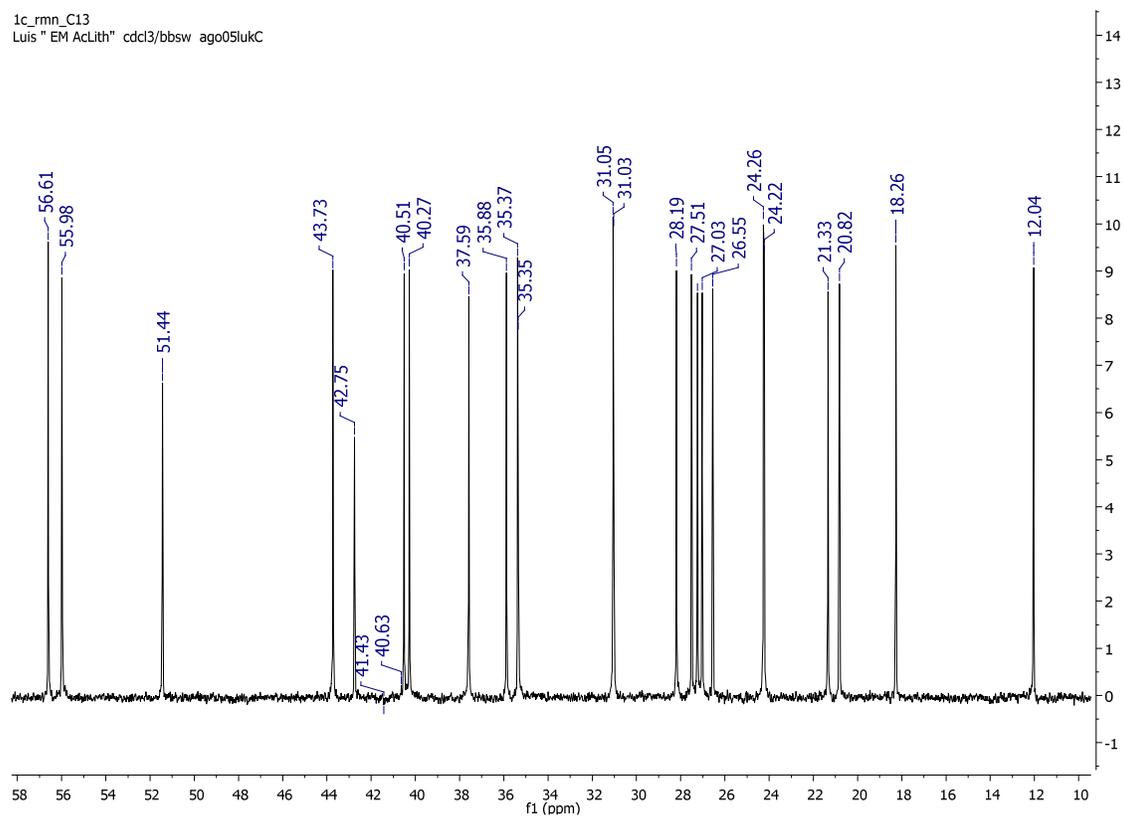


Figura 19-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (**1-c**) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.

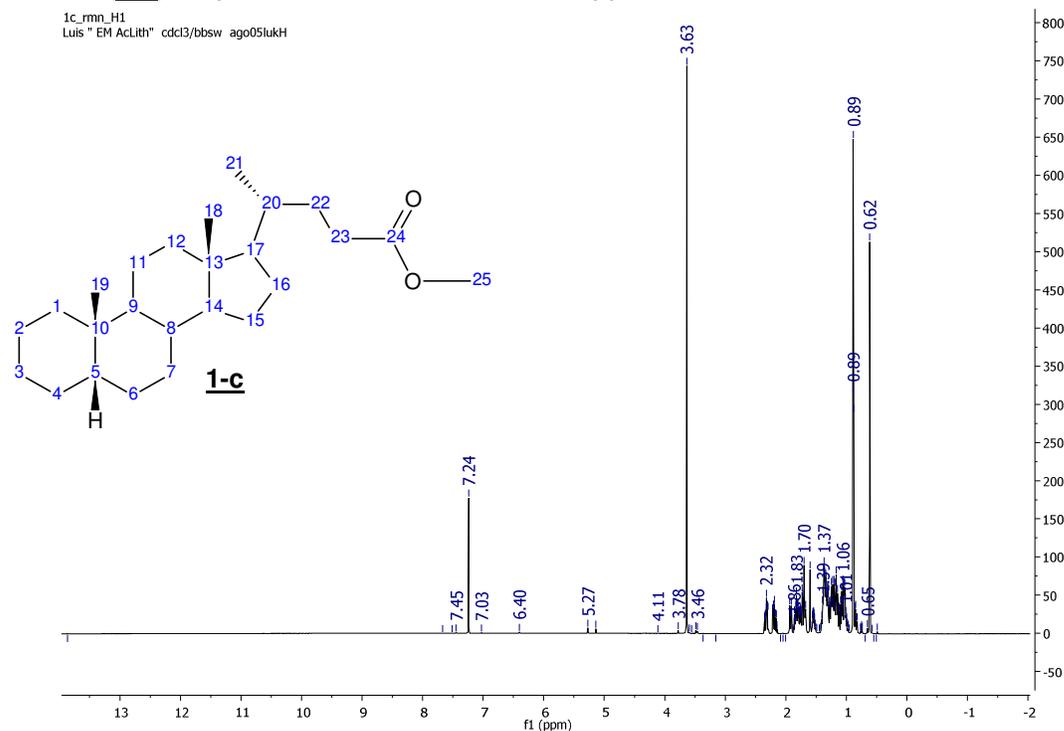


Figura 20-I: Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5β(H) colânico (**1-c**).

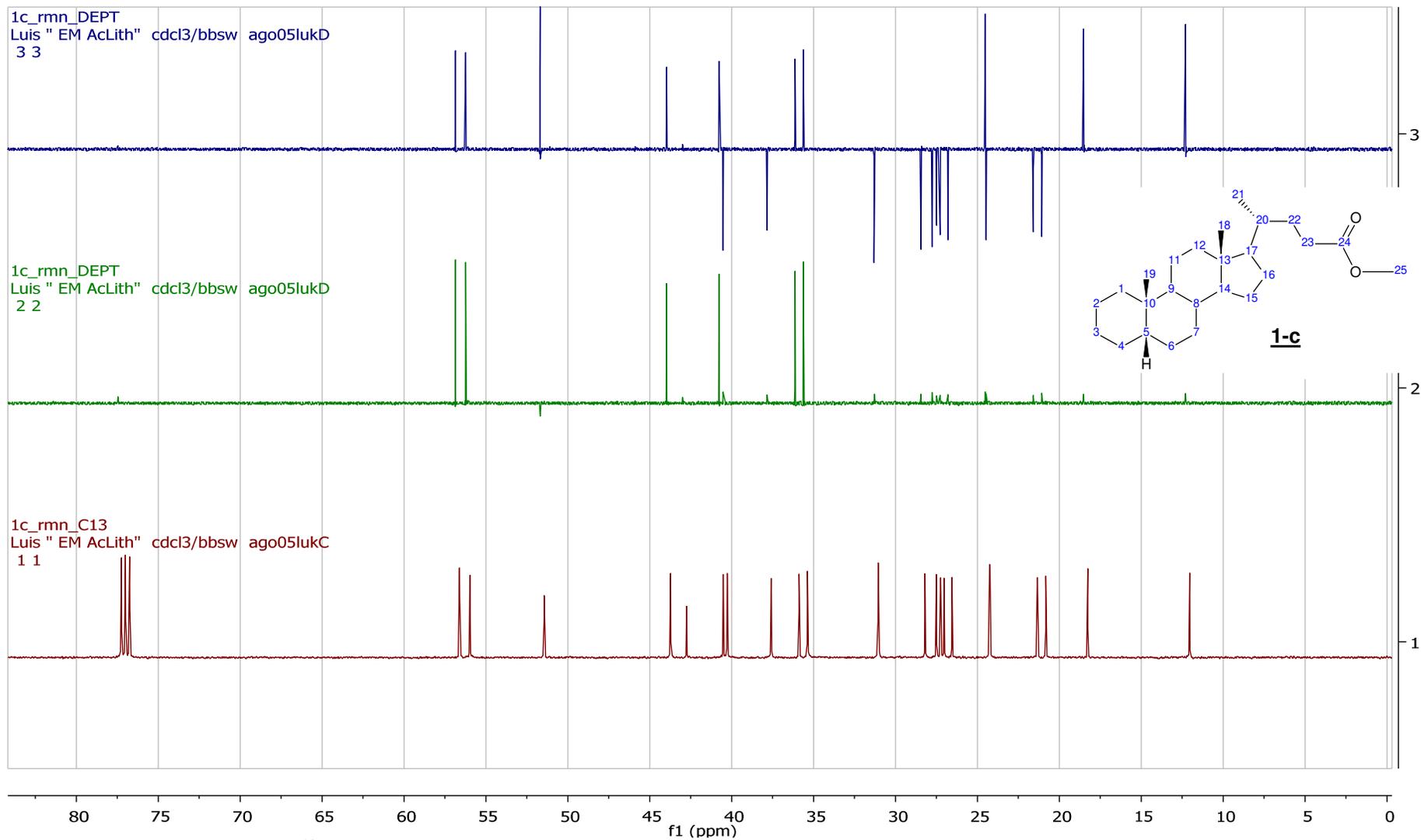
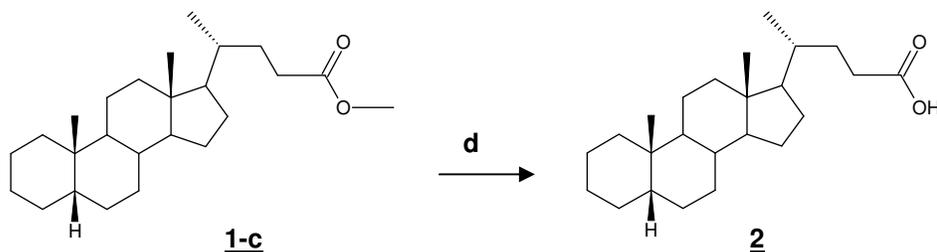


Figura 21-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido $5\beta(\text{H})$ colânico (**1-c**).

I.4. Preparação e caracterização do ácido 5 β (H) colânico (2)



(d) KOH/MeOH 10%, refluxo, 2h (99 %).

Esquema 4-I: Preparação do ácido 5 β (H) colânico (2).

Num balão de 100 mL de capacidade, foram adicionados 10 mL de metanol, 0,790 mg de KOH em pastilhas e 419 mg do éster metílico do ácido colânico (1-c). A seguir foram refluxados durante 2 h sob agitação magnética. Ao final, foi retirada uma alíquota da reação e acidificada com uma gota de HCl concentrado. Em seguida, adicionaram-se pequenas quantidades de éter etílico e água e foi feita uma placa CCDA (Hexano:Acetato de etila [70-30]) e o éster metílico do ácido colânico como referência. A CCDA apresentou duas manchas: o padrão com $r_f = 0,43$ e a reação com $r_f = 0,22$, indicando a ocorrência da hidrólise.

A seguir foram adicionados 15 mL de água e acidificada a pH 1 com HCl concentrado e extraída com éter. A fase etérea foi lavada com água entre pH 6-7, secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotativo, produzindo 399 mg de 2 com 99 % de rendimento. O espectro de RMN de carbono foi atribuído considerando a mudança de função para ácido, desproteção da carbonila $\Delta \delta +5,3\text{ppm}$.

Ponto de fusão: 167,5 – 167,8 °C;

[α_D]: +17,00 ° (6,00 g/100 mL CHCl₃);

Infravermelho (cm⁻¹): 1727 (carbonila de ácido);

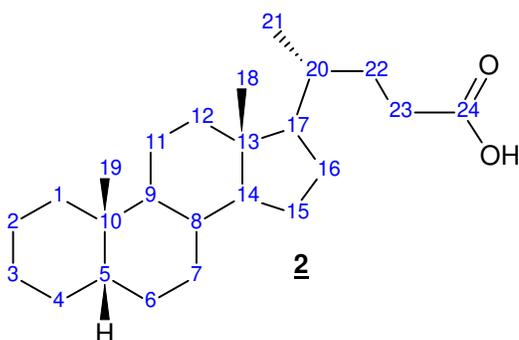


Tabela 4-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido $5\beta(\text{H})$ colânico (**2**).

C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	37,58	1,94-1,01, m, 2H
2	21,33	1,94-1,01, m, 2H
3	26,54	1,94-1,01, m, 2H
4	27,51	1,94-1,01, m, 2H
5	43,72	1,94-1,01, m, 1H
6	27,03	1,94-1,01, m, 2H
7	28,18	1,94-1,01, m, 2H
8	35,88	1,94-1,01, m, 1H
9	40,51	1,94-1,01, m, 1H
10	35,35	-
11	20,82	1,94-1,01, m, 2H
12	40,27	1,94-1,01, m, 2H
13	42,77	-
14	55,96	1,94-1,01, m, 1H
15	24,22	1,94-1,01, m, 2H
16	27,24	1,94-1,01, m, 2H
17	56,60	1,94-1,01, m, 1H
18	12,05	0,89, s, 3H
19	24,26	0,62, s, 3H
20	35,31	1,94-1,01, m, 1H
21	18,24	0,90, d, 3H
22	31,01	2,23, m, 2H
23	30,77	2,37, m, 2H
24	180,35	-

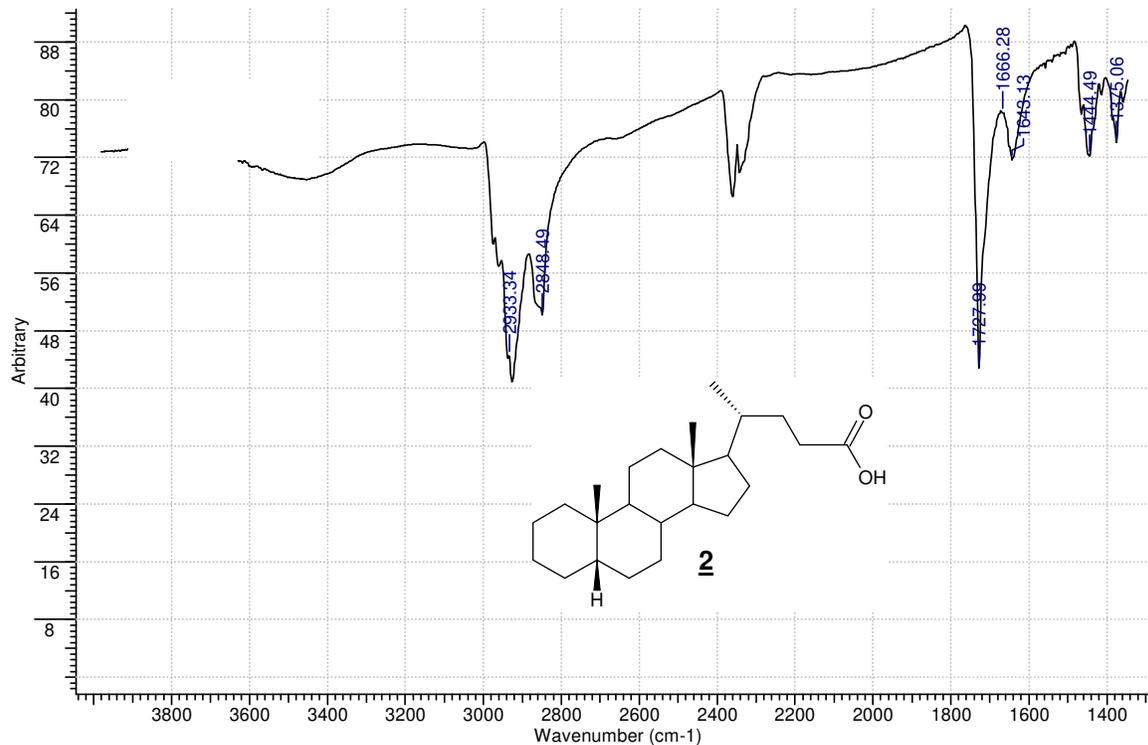


Figura 22-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do ácido 5β(H) colânico (**2**).

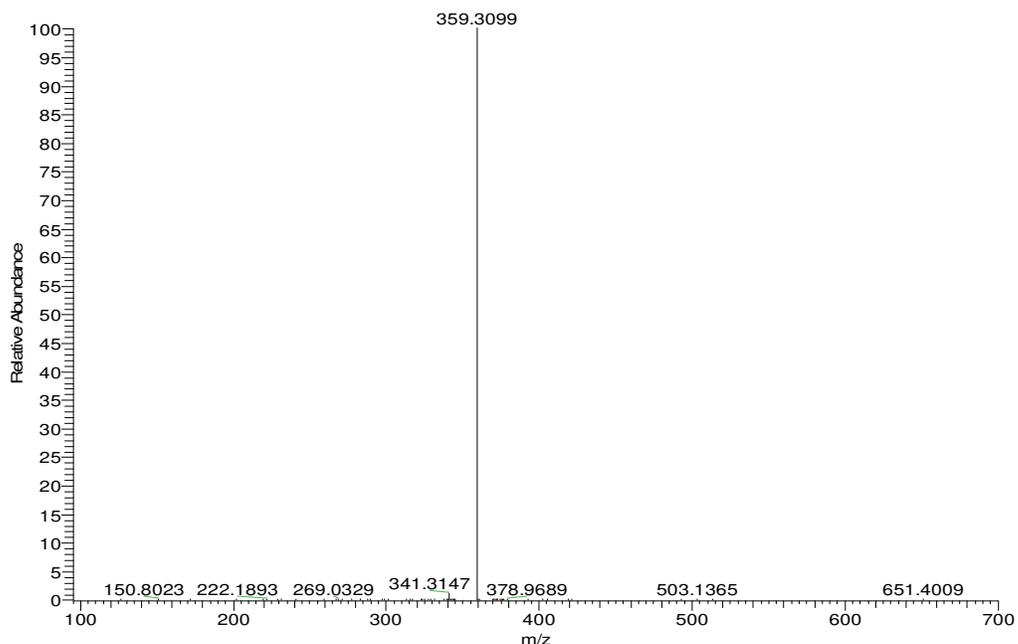


Figura 23-I: Espectro de massas do ânion correspondente ao ácido 5β(H) colânico (**2**) obtido por infusão direta no APCI (-) e detecção no Orbitrap na faixa de m/z entre 95 e 700 com resolução de 100.000.

2_rmn_C13
Luiz Fernando AcCola cdcl3/Bruker avance III 400MHz ago17lukC2

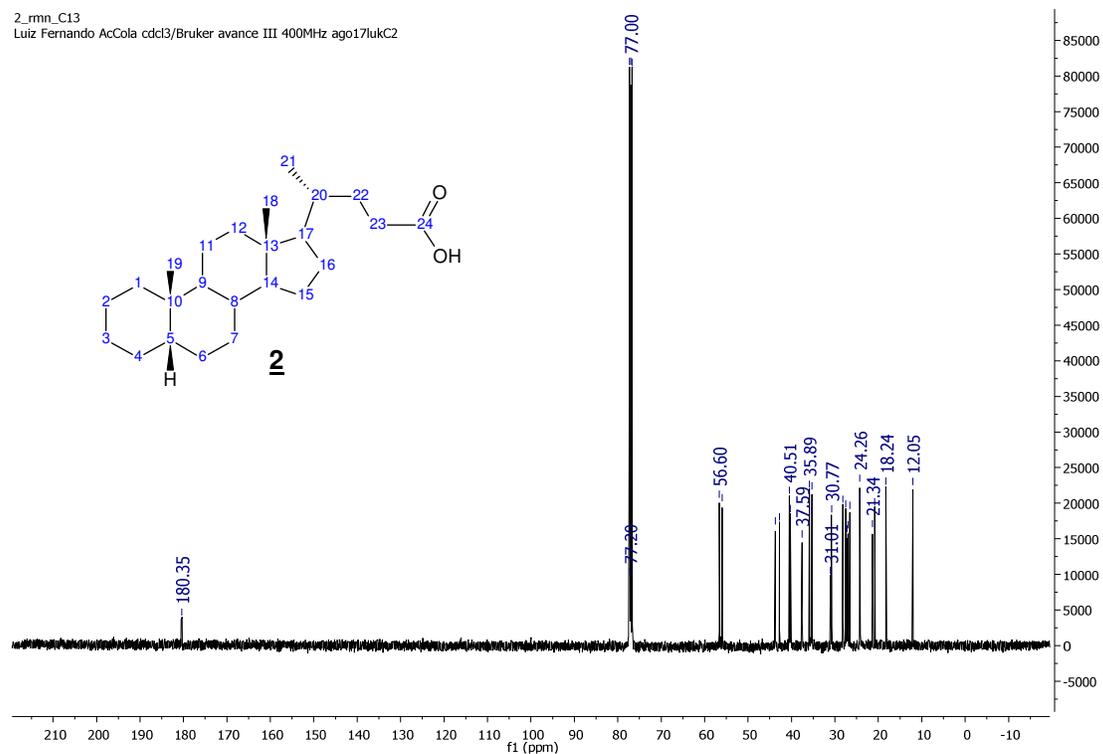


Figura 24-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do ácido 5β(H) colânico (**2**).

2_rmn_C13
Luiz Fernando AcCola cdcl3/Bruker avance III 400MHz ago17lukC2

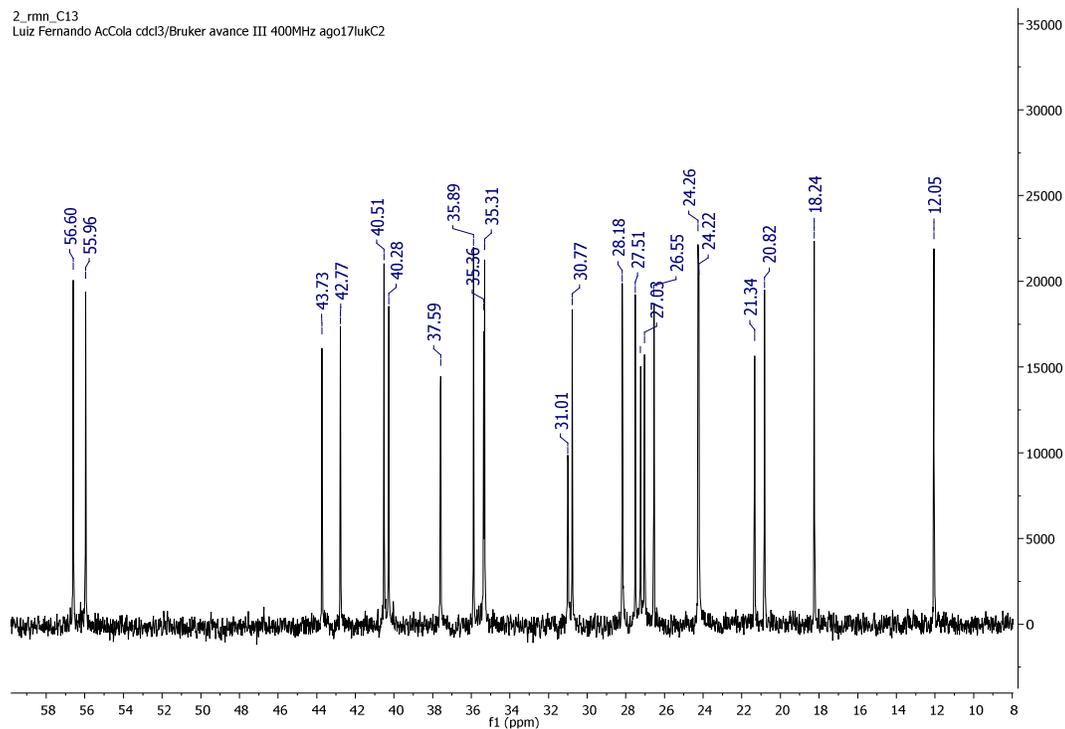


Figura 25-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do ácido 5β(H) colânico (**2**) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.

2_mn_H1
Luiz Fernando AcCola cdcl3/Bruker avance III 400MHz ago17lukH2

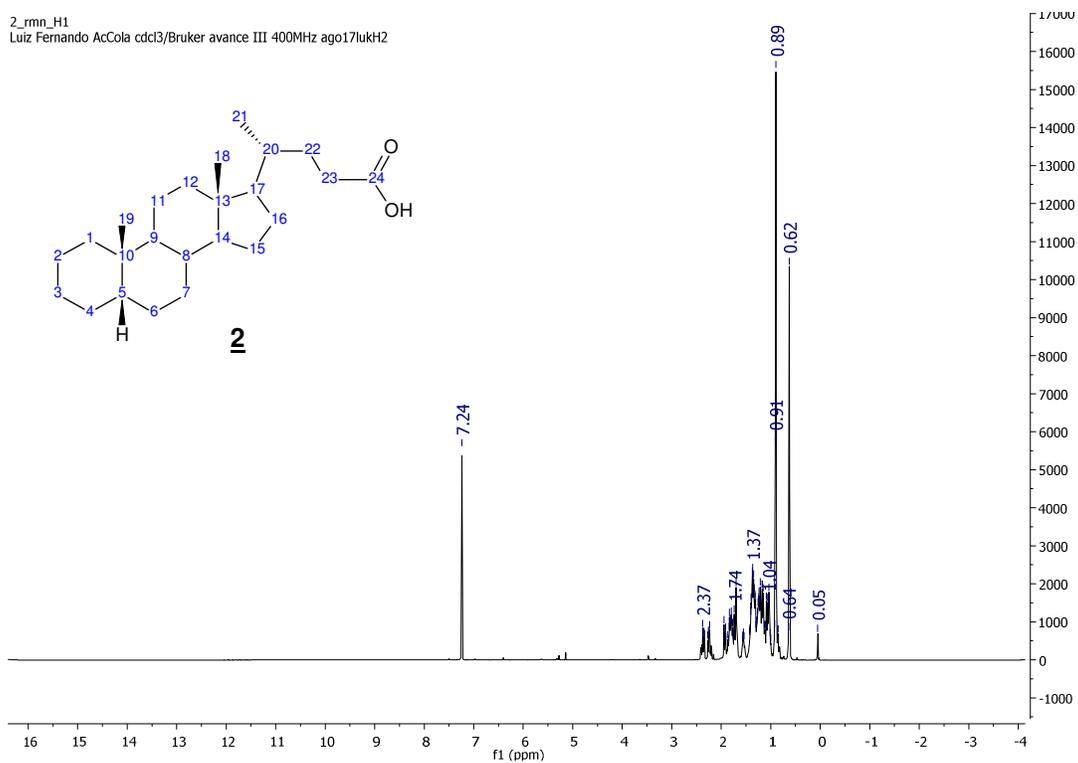


Figura 26-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 5 β (H) colânico (**2**).

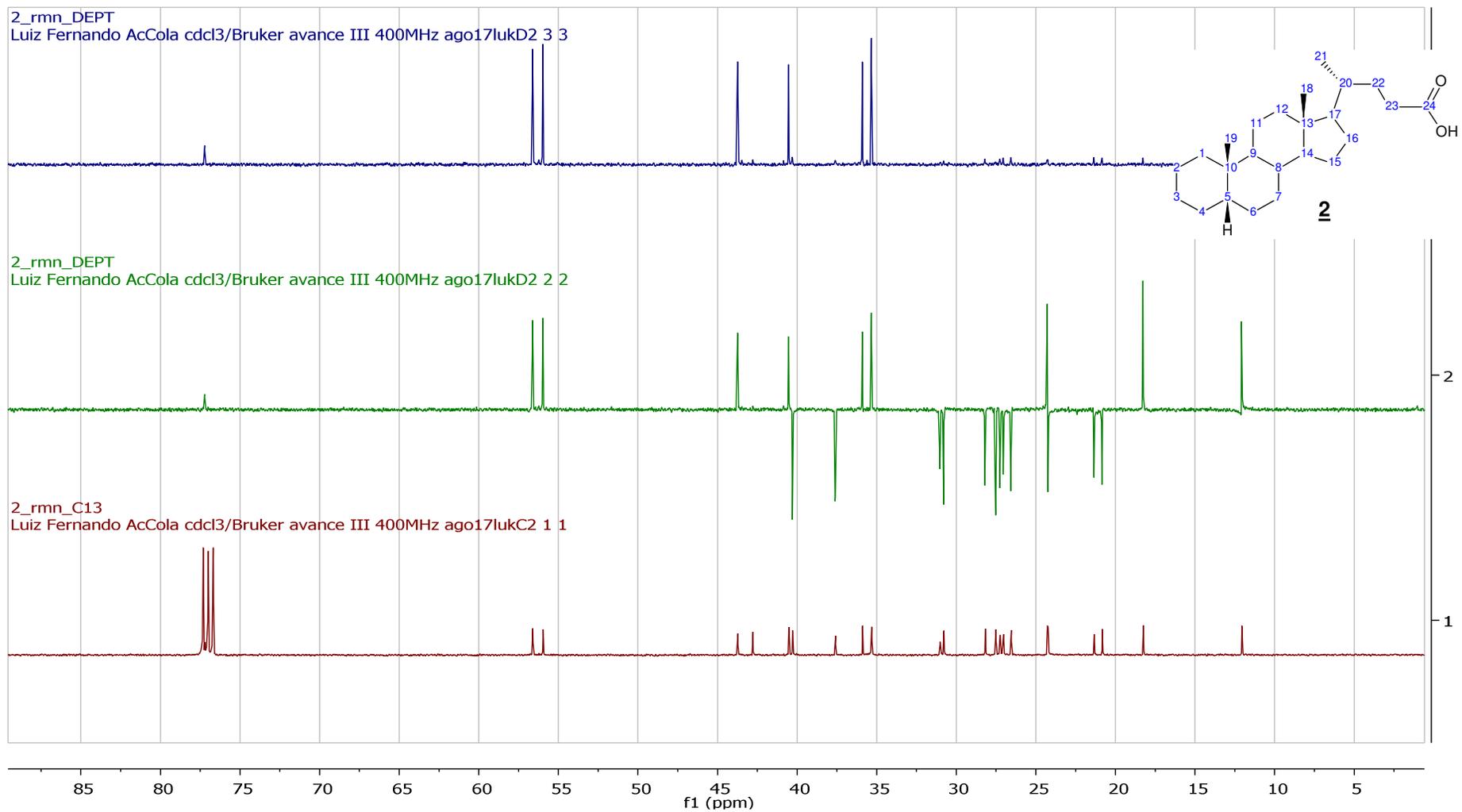
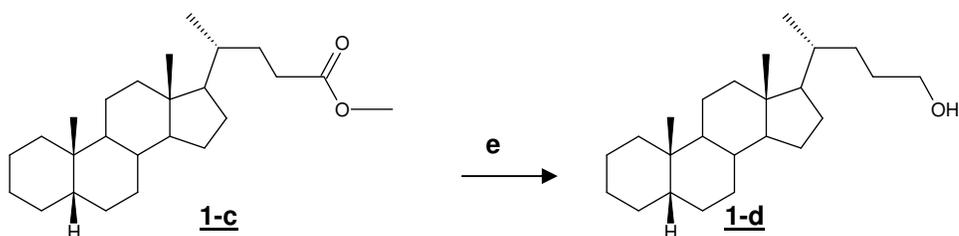


Figura 27-I:Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido $5\beta(\text{H})$ colânico (**2**).

I.5. Preparação e caracterização do 5 β (H) colanol (**1-d**)



(e) LiAlH₄, THF anidro, refluxo, 24h (75 %).

Esquema 5-I: Preparação do 5 β (H) colanol (**1-d**).

Num balão de 2 bocas foram adicionados 50 mL de THF anidro, 2,0 g de LiAlH₄ e 300 mg do composto a ser reduzido (**1-c**). O sistema foi mantido sob refluxo e atmosfera de N₂ por 1 dia. A reação foi acompanhada por CCDA (CHCl₃/MeOH (95:5)). Após o término da reação, montou-se um banho de água gelada e, vagarosamente gotejou-se água gelada dentro do balão para eliminação do possível hidreto restante. Quando não houver mais evolução de H₂, adicionou-se aproximadamente 30 mL de HCl para dissolução de Al(OH)₃. Realizou-se uma extração com CH₂Cl₂ (3x 30mL), secou-se com MgSO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotativo. Obteve-se o produto com rendimento 75% após limpeza para retirada de reagente remanescente.

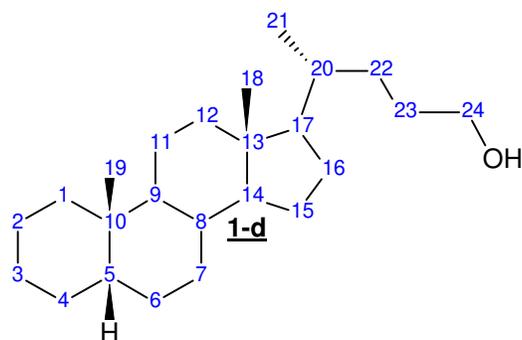


Tabela 5-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colanol (**1-d**).

C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	37,60	1,90-1,11, m, 2H
2	21,34	1,90-1,11, m, 2H
3	27,04	1,90-1,11, m, 2H
4	28,32	1,90-1,11, m, 2H
5	43,74	1,90-1,11, m, 1H
6	27,53	1,90-1,11, m, 2H
7	26,69	1,90-1,11, m, 2H
8	35,58	1,90-1,11, m, 1H
9	40,53	1,90-1,11, m, 1H
10	35,37	-
11	20,83	1,90-1,11, m, 2H
12	40,31	1,90-1,11, m, 2H
13	42,73	-
14	56,64	1,90-1,11, m, 1H
15	26,57	1,90-1,11, m, 2H
16	27,25	1,90-1,11, m, 2H
17	56,22	1,90-1,11, m, 1H
18	12,05	0,89, s, 3H
19	24,27	0,62, s, 3H
20	35,89	1,90-1,11, m, 1H
21	18,64	0,92, d, 3H
22	31,85	1,90-1,11, m, 2H
23	29,41	1,90-1,11, m, 2H
24	63,63	3,59, t, 2H

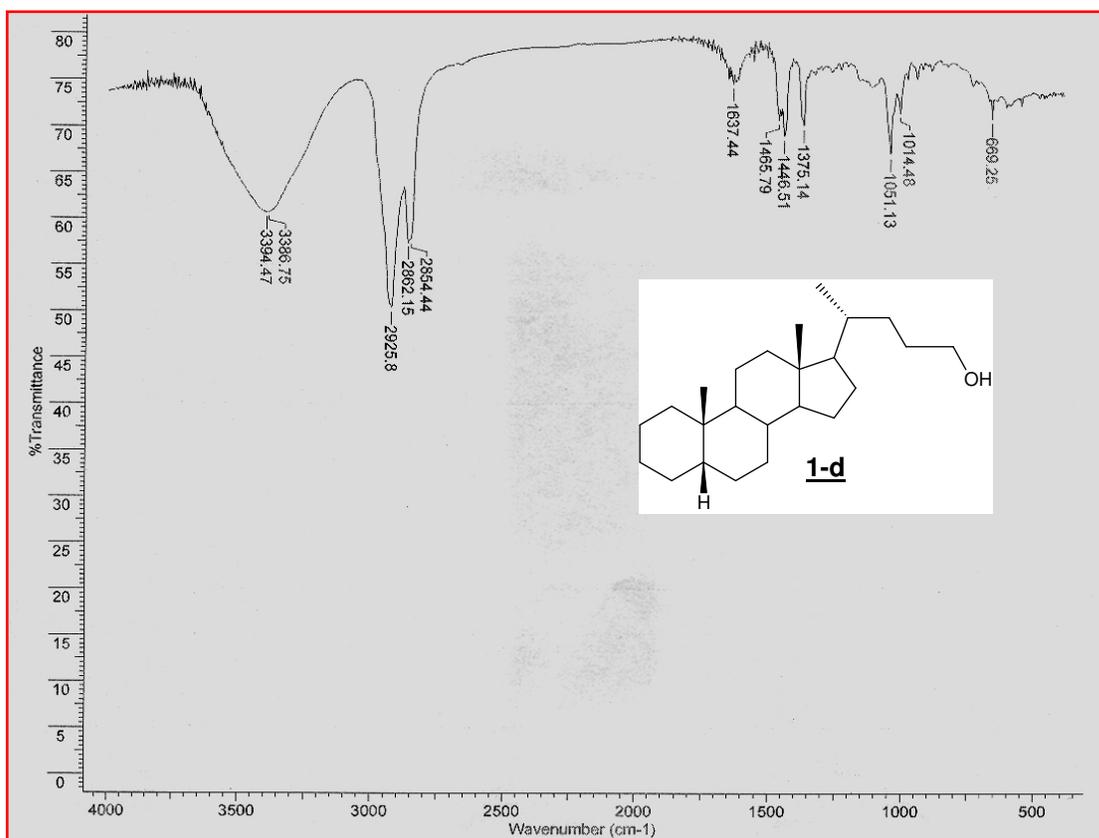


Figura 28-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do 5 β (H) colanol (**1-d**).

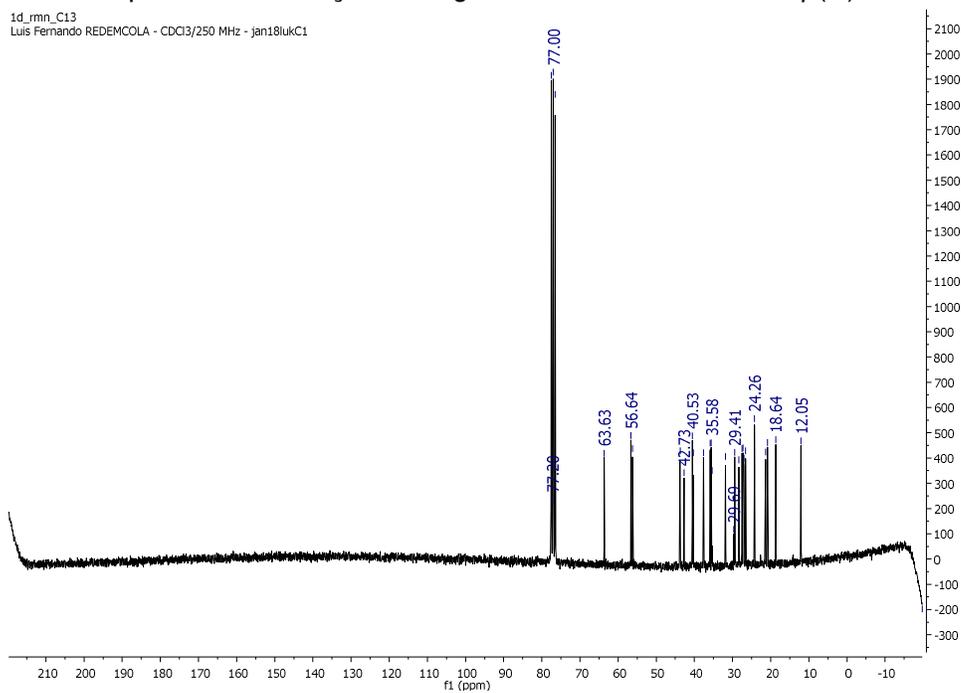


Figura 29-I: Espectro de RMN ¹³C (64,5 MHz, CDCl₃) do 5 β (H) colanol (**1-d**).

1d_rmn_C13
Luis Fernando REDEMCOLO - CDCl₃/250 MHz - jan18lukC1

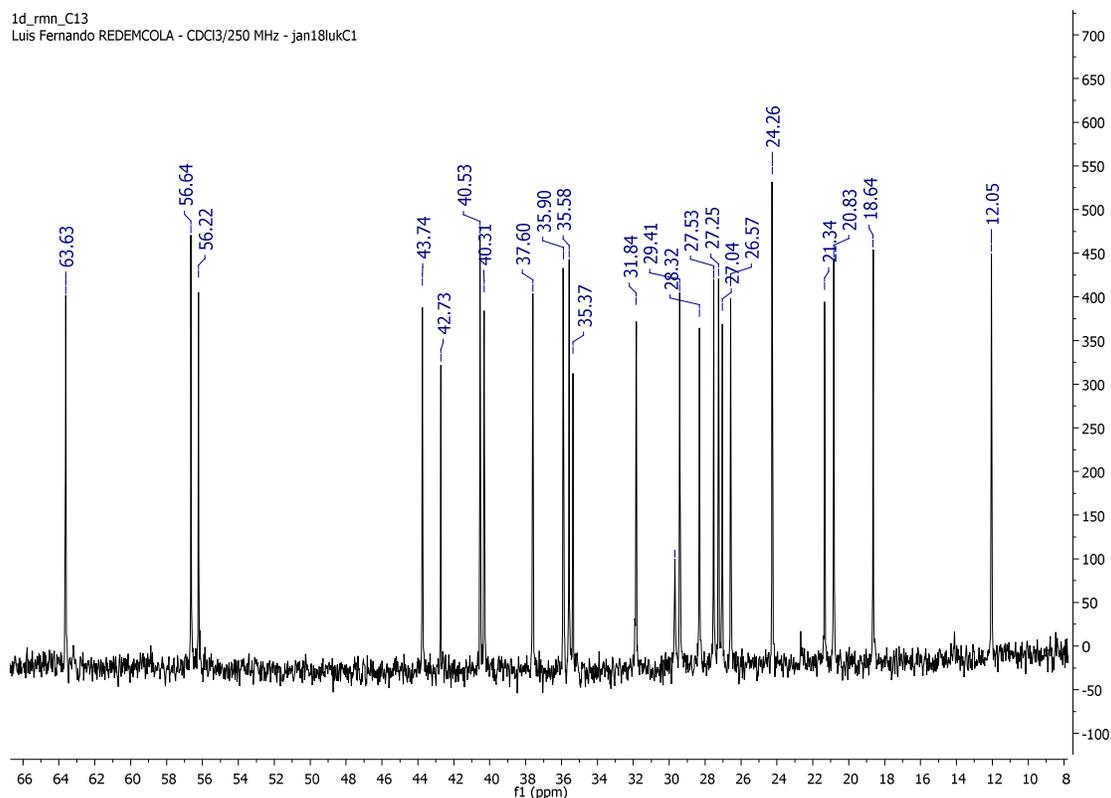


Figura 30-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do 5β(H) colanol (**1-d**) ampliado na faixa entre 8 e 66 ppm.

1d_rmn_H1
Luis Fernando REDEMCOLO - CDCl₃/250 MHz - jan18lukH1

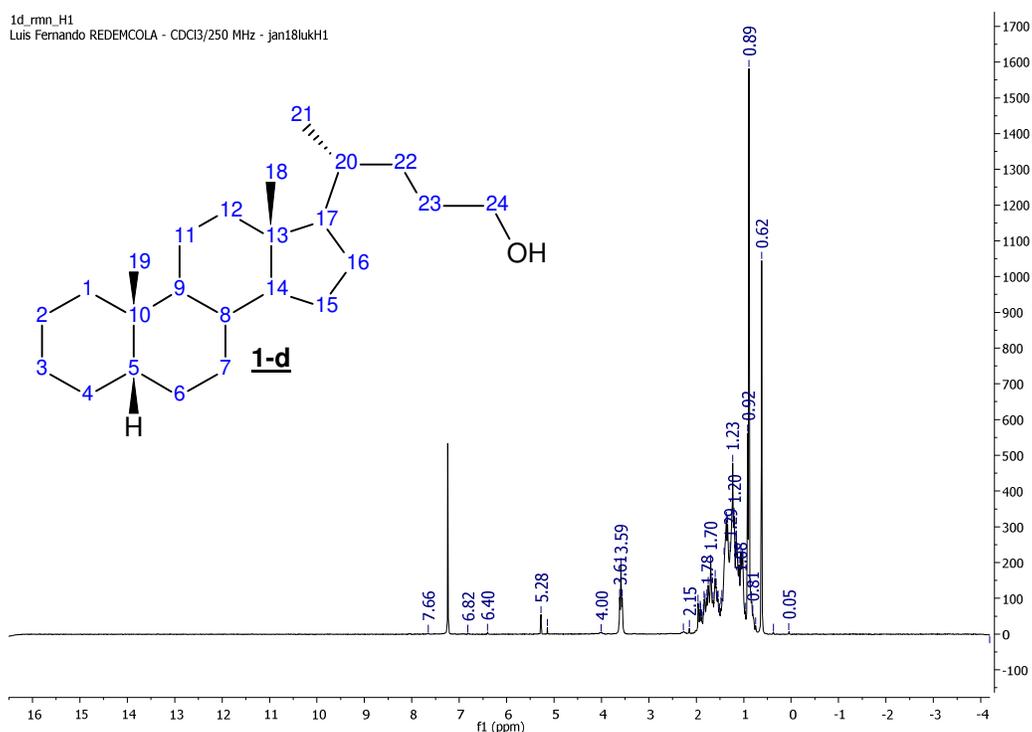


Figura 31-I: Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 5β(H) colanol (**1-d**).

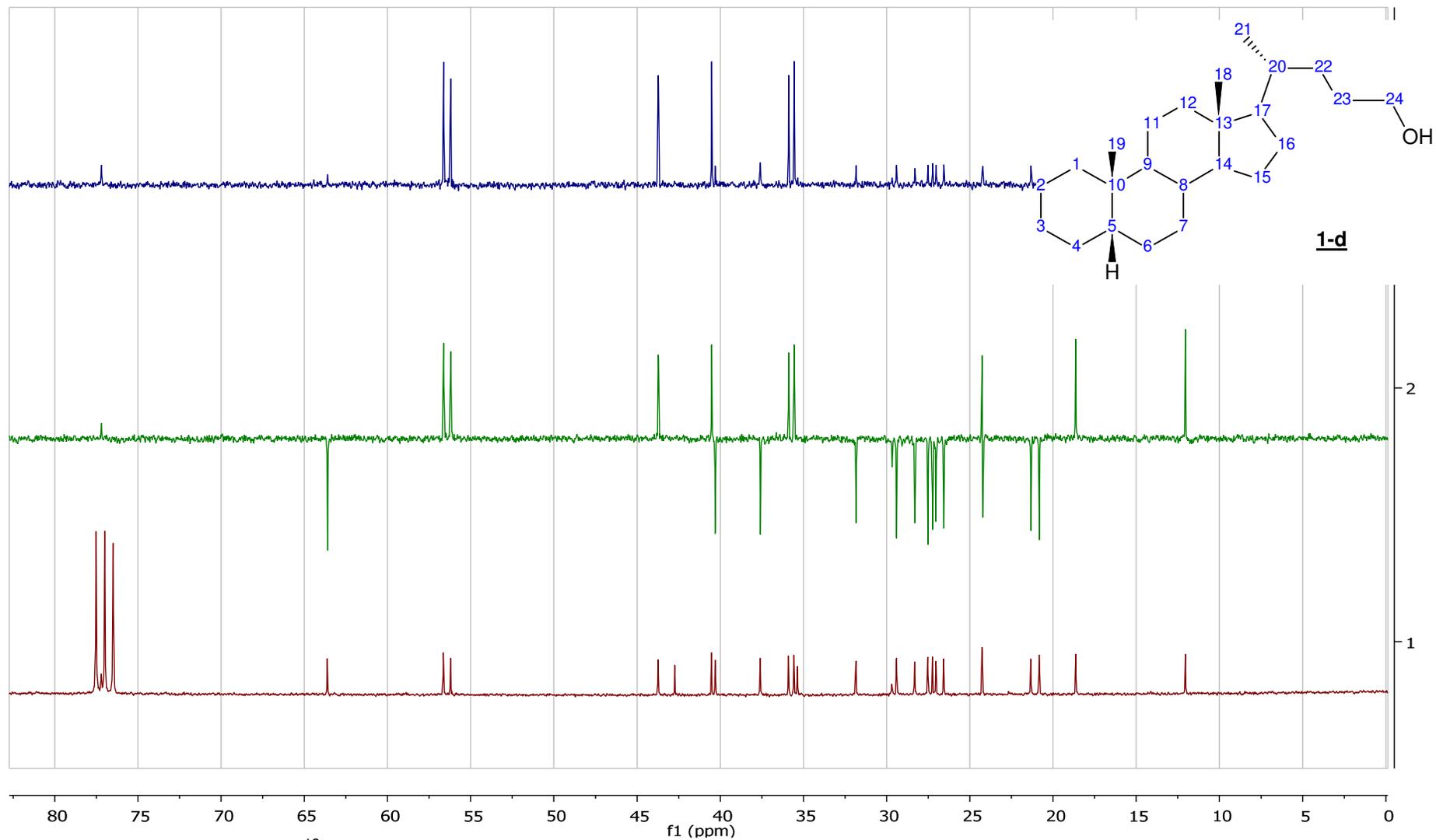
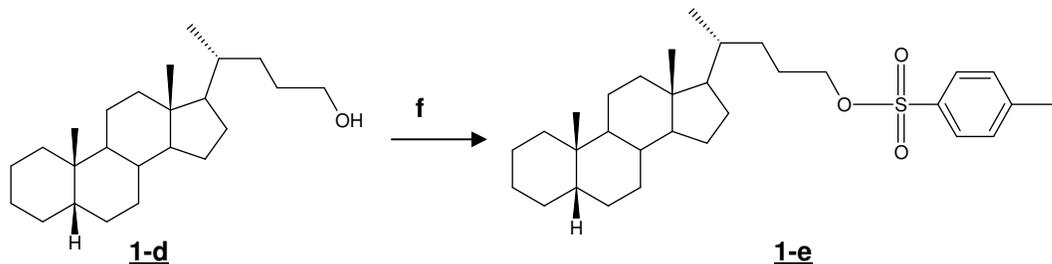


Figura 32-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (64,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colanol (**1-d**).

I.6. Preparação e caracterização do 5 β (H) colano tosil (1-e)



(f) TsCl/CH₂Cl₂, 0°C, 1h de agitação, 6 dias de repouso sob refrigeração (100 %).

Esquema 6-I: Preparação do 5 β (H) colano tosil (1-e).

Uma solução do composto **1-d** (103 mg, 0,3 mol), em diclorometano (10 mL) e piridina (1,5 mL), foi adicionada, gota a gota, a uma solução de cloreto de tosilato (300 mg), em diclorometano (5 mL) e piridina (0,5 mL), sob agitação e resfriada em um banho de água-gelo. A solução foi agitada durante 1h, a 0°C, e depois foi mantida em refrigerador a 3°C por 6 dias . O excesso de cloreto de tosilato foi hidrolisado, adicionando-se gelo triturado-água à mistura reacional e deixando-a em agitação durante 3h. Em seguida, a mistura foi extraída com CHCl₃ (5x30 mL). As frações clorofórmicas foram reunidas e lavadas com solução aquosa de HCl 10% (3x20 mL) e em seguida lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO₃-NaCl até pH neutro. Após secagem com MgSO₄ anidro, o solvente foi removido em evaporador rotativo. O rendimento obtido foi de 100%.

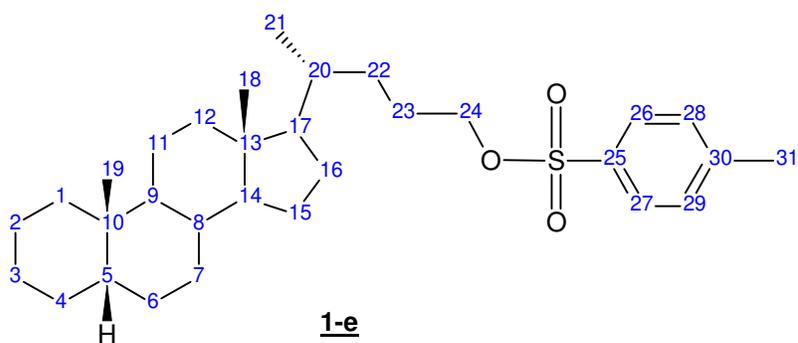


Tabela 6-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano tosil (**1-e**).

C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	37,56	1,88-0,97, m, 2H
2	21,31	1,88-0,97, m, 2H
3	27,00	1,88-0,97, m, 2H
4	27,21	1,88-0,97, m, 2H
5	43,69	1,88-0,97, m, 1H
6	26,53	1,88-0,97, m, 2H
7	27,48	1,88-0,97, m, 2H
8	35,18	1,88-0,97, m, 1H
9	40,48	1,88-0,97, m, 1H
10	35,32	-
11	20,78	1,88-0,97, m, 2H
12	40,24	1,88-0,97, m, 2H
13	42,68	-
14	56,56	1,88-0,97, m, 1H
15	24,17	1,88-0,97, m, 2H
16	25,52	1,88-0,97, m, 2H
17	56,01	1,88-0,97, m, 1H
18	11,99	0,88, s, 3H
19	24,23	0,58, s, 3H
20	35,85	1,88-0,97, m, 1H
21	18,39	0,82, d, 3H
22	31,42	1,88-0,97, m, 2H
23	28,19	1,88-0,97, m, 2H
24	71,21	3,97, m, 2H
25	133,31	-
26,27	127,82	7,77-7,75, dd, 1H
28,29	129,74	7,32-7,31, dd, 1H
30	144,53	-
31	21,59	2,42, s, 3H

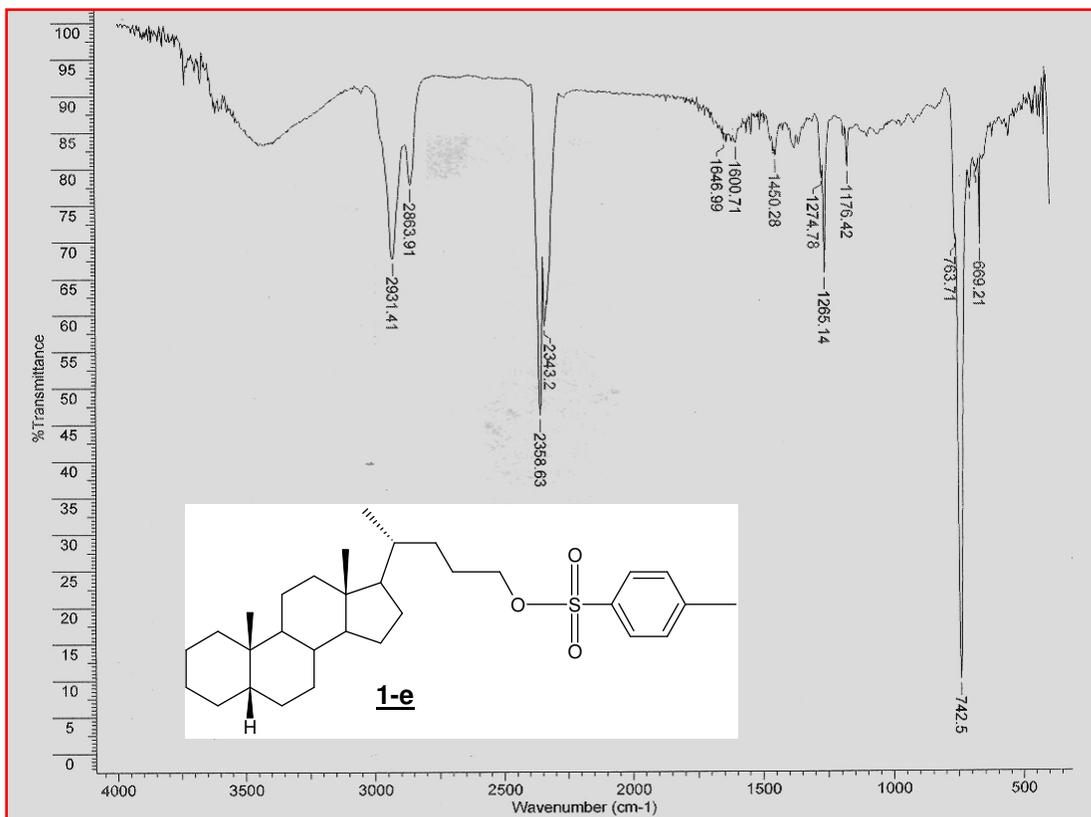


Figura 33-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do 5 β (H) colano tosil (**1-e**).

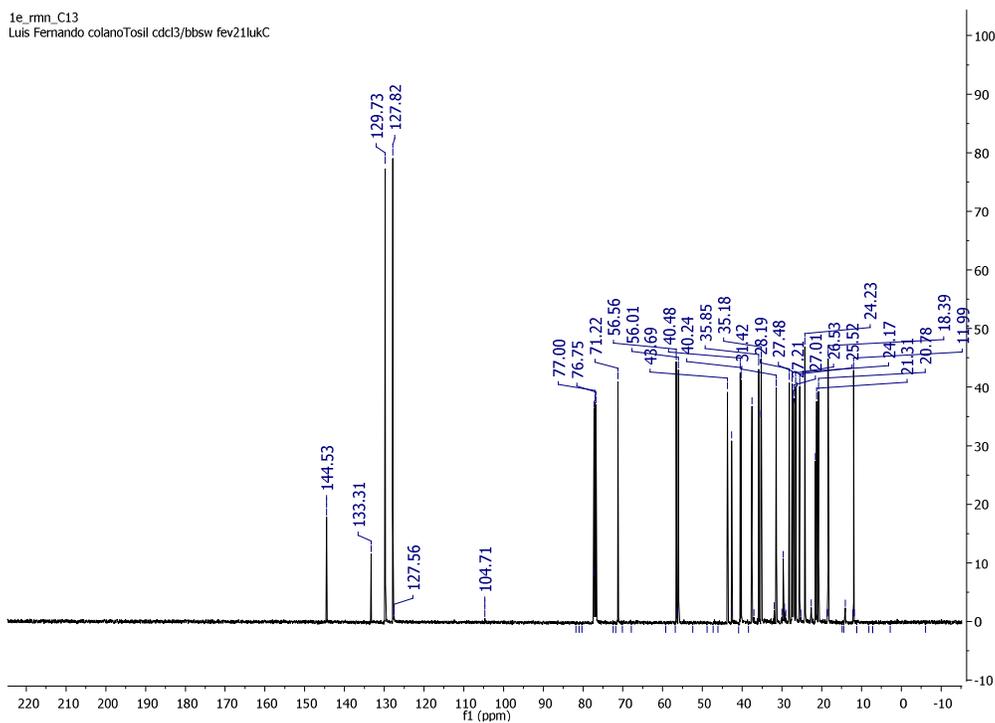


Figura 34-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 5 β (H) colano tosil (**1-e**).

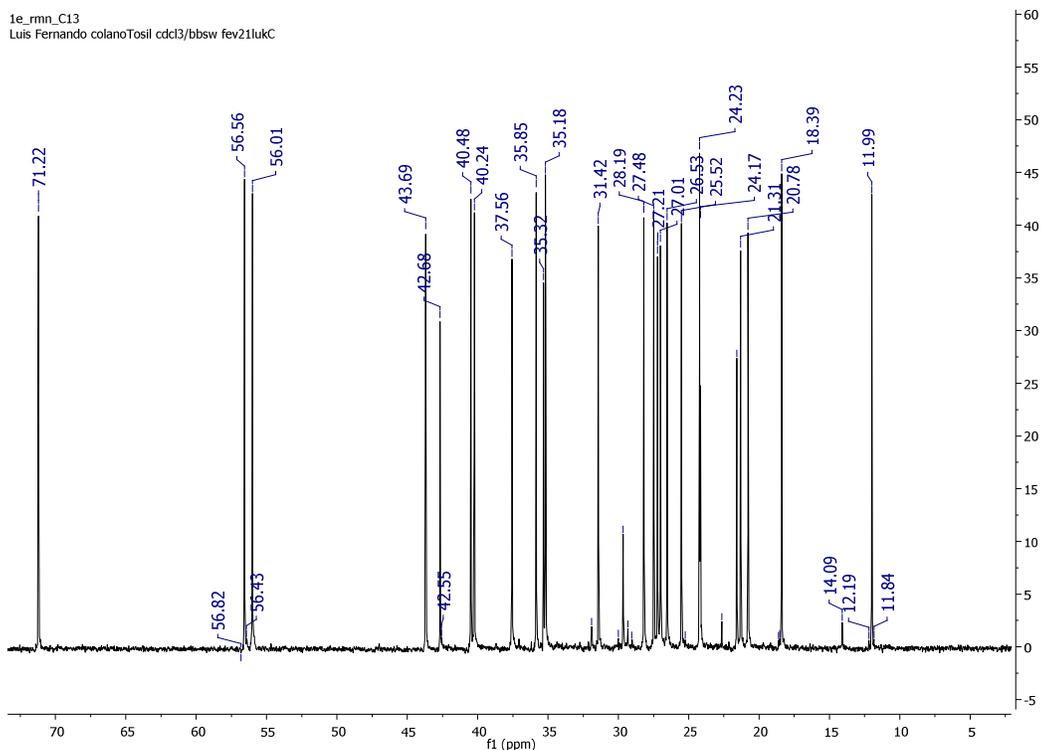


Figura 35-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano tosil (**1-e**) ampliado na faixa entre 4 e 75 ppm.

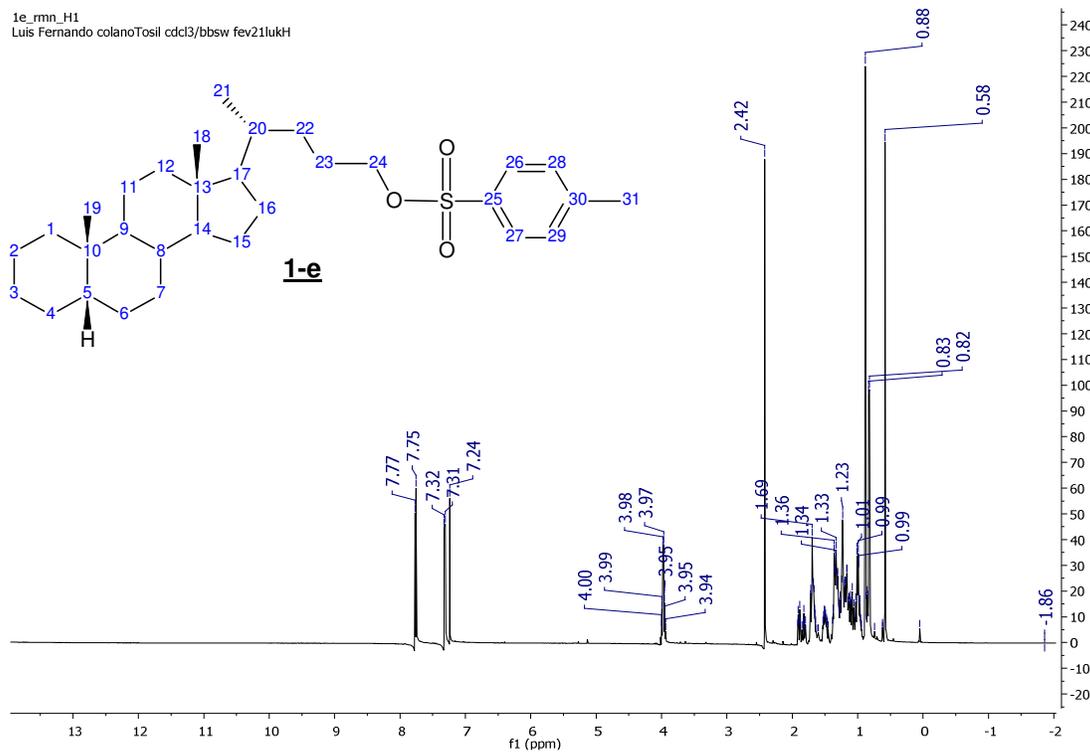


Figura 36-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano tosil (**1-e**).

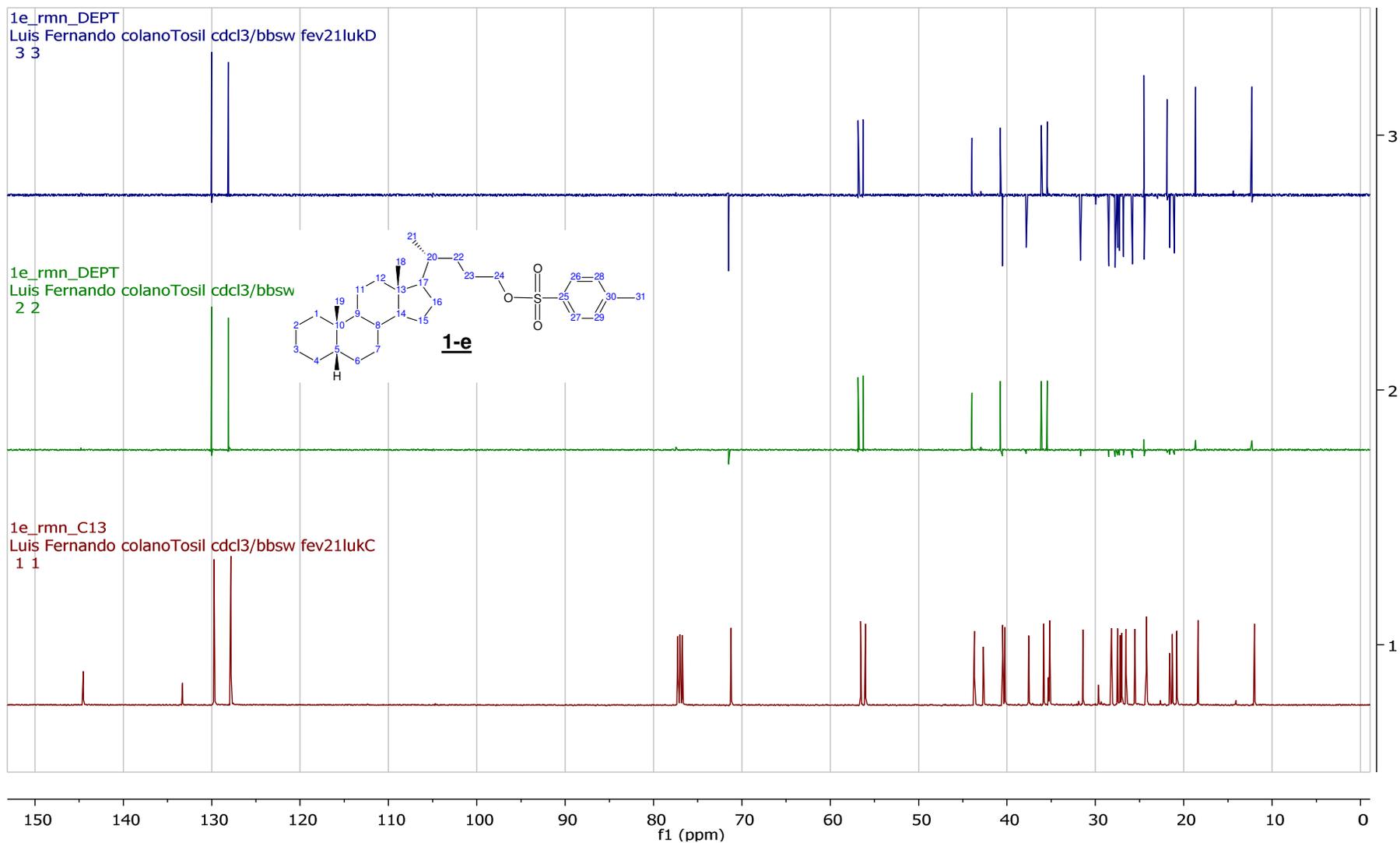
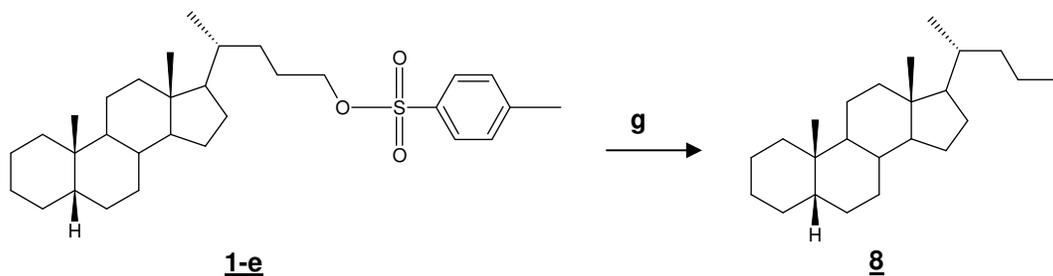


Figura 37-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano tosil (**1-e**).

I.7. Preparação e caracterização do 5 β (H) colano (**8**)



(g) LiAlH₄, THF anidro, refluxo, 24h (90 %).

Esquema 7-I: Preparação do 5 β (H) colano (**8**).

Num balão de 2 bocas, foram adicionados 50 mL de THF (anidro), 2 g de LiAlH₄ e 300 mg do composto a ser reduzido. O sistema foi mantido sob refluxo e atmosfera de N₂ por 1 dia. A reação foi acompanhada por CCDA (CHCl₃/ MeOH (95:5)). Após o término da reação, montou-se um banho de água gelada e, vagarosamente gotejou-se água gelada dentro do balão para eliminação do possível hidreto restante. Quando não houver mais evolução de H₂, adicionou-se aproximadamente 30 mL de HCl para dissolução de Al(OH)₃. Realizou-se uma extração com CH₂Cl₂ (3x 30mL), secou-se com MgSO₄ e o solvente foi removido em evaporador rotativo. Rendimento 90%.

Ponto de fusão: 88-89 °C

[α _D]: + 16,8 ° (5,0 g/100 mL CH₂Cl₂);

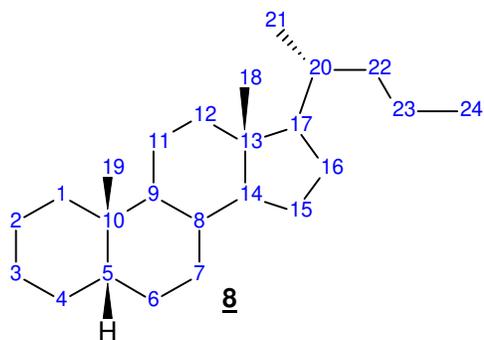


Tabela 7-I: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano (**8**).

C	^{13}C (δ , ppm)
1	38,37
2	21,36
3	27,06
4	28,34
5	43,77
6	27,56
7	26,60
8	35,92
9	40,57
10	35,38
11	20,86
12	40,57
13	42,73
14	56,68
15	24,28
16	27,27
17	56,43
18	12,04
19	24,29
20	35,60
21	18,64
22	37,62
23	19,23
24	14,57

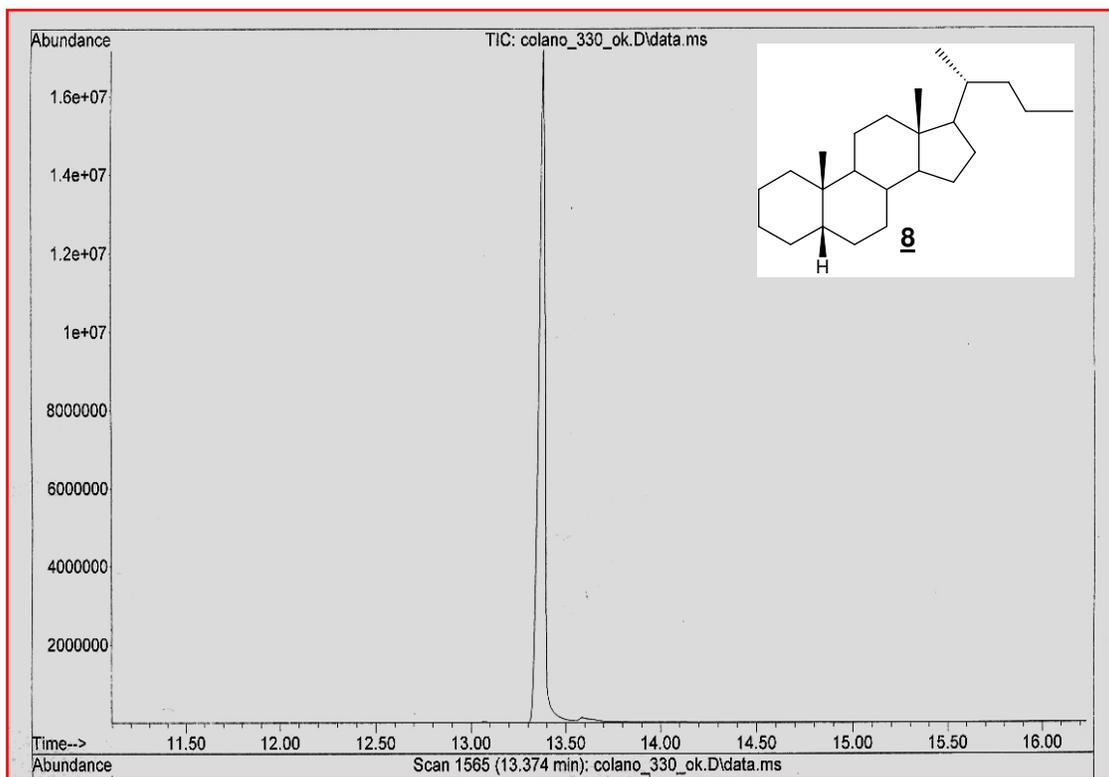


Figura 38-I: Cromatograma total de íons do éster metílico do 5β(H) colano (**8**).

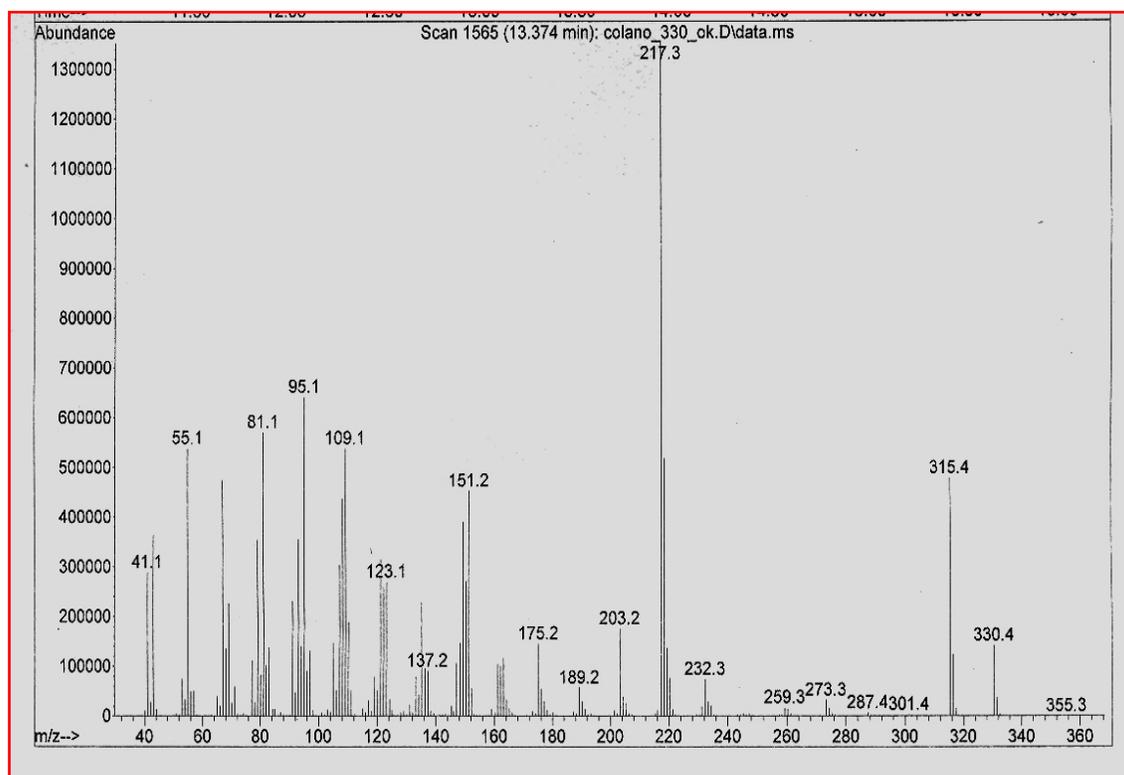


Figura 39-I: Espectro de massas do éster metílico do 5β(H) colano (**8**).

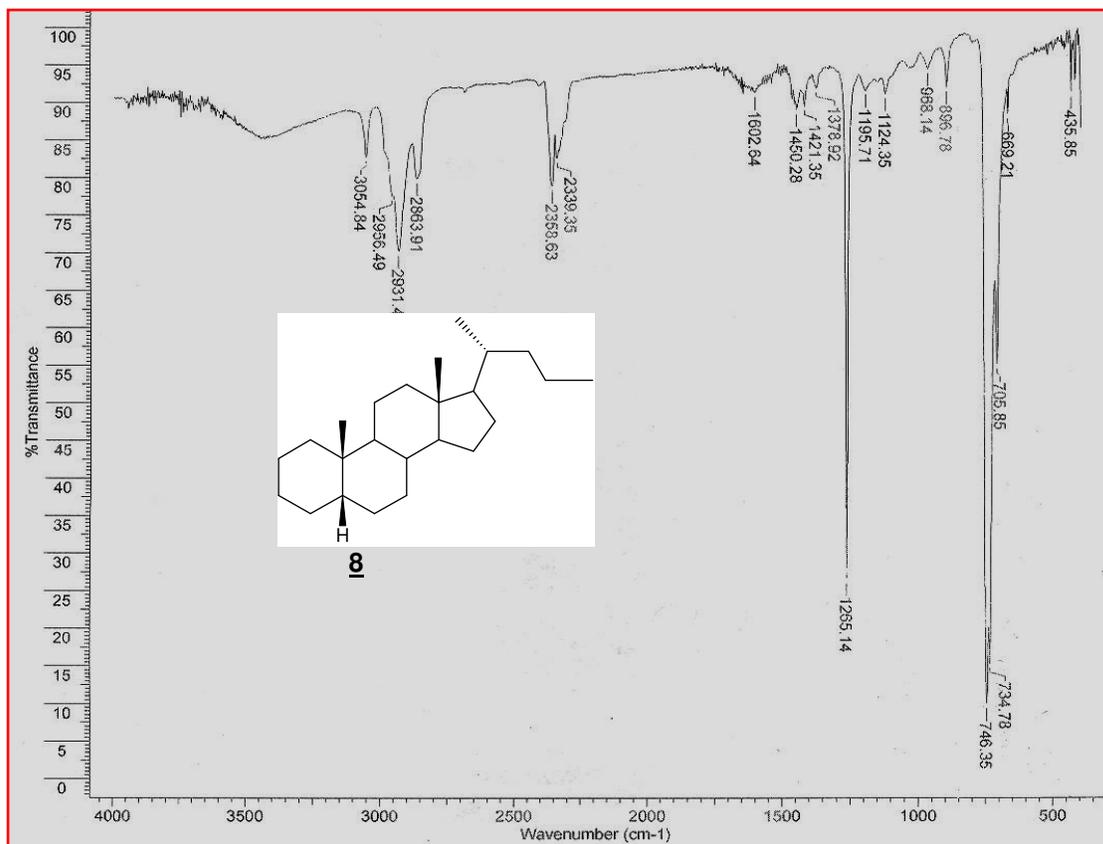


Figura 40-I: Espectro de absorção na região do Infravermelho do 5β(H) colano (**8**).

11_rmn_C13
Luis fernando "colano" cdc13/bbsw mar25lukC2

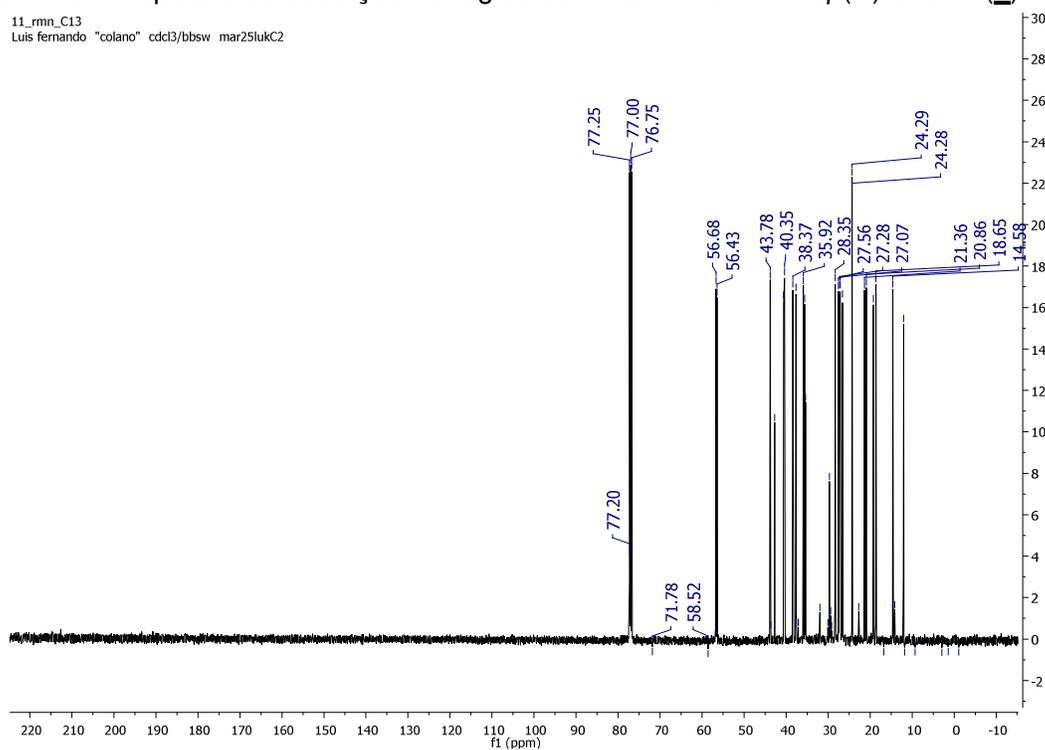


Figura 41-I: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do 5β(H) colano (**8**).

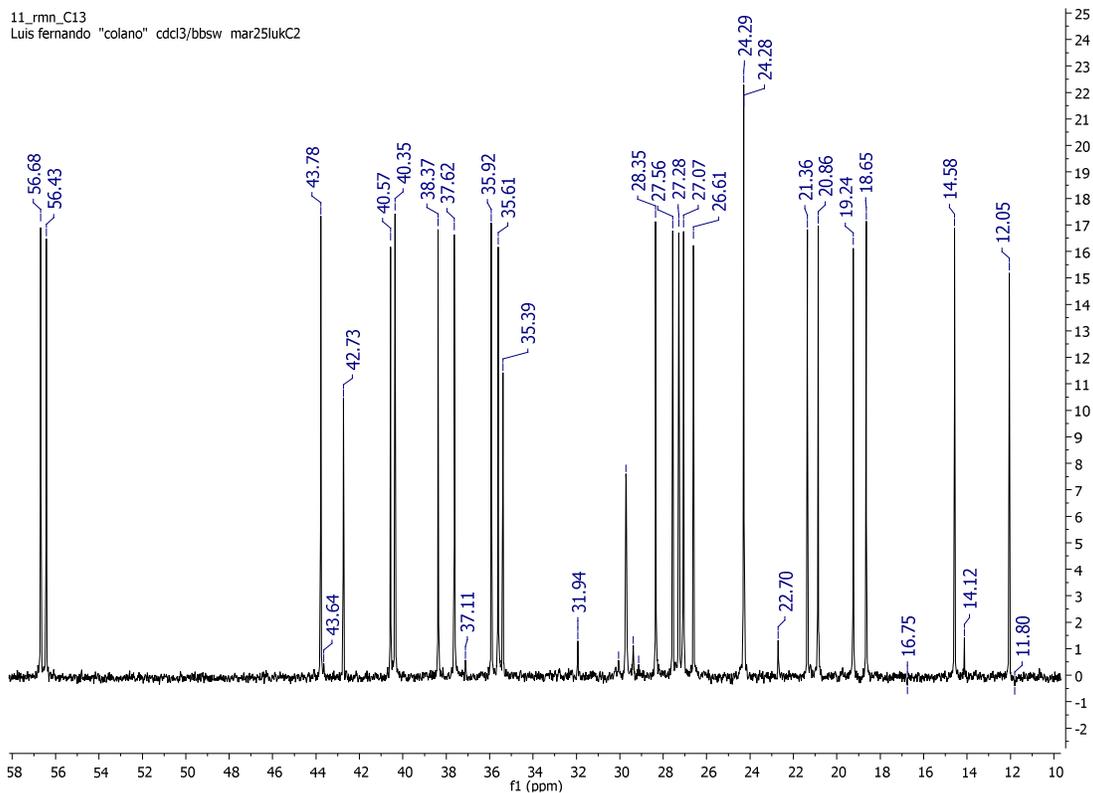


Figura 42-I: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano (**8**) ampliado na faixa entre 10 e 55 ppm.

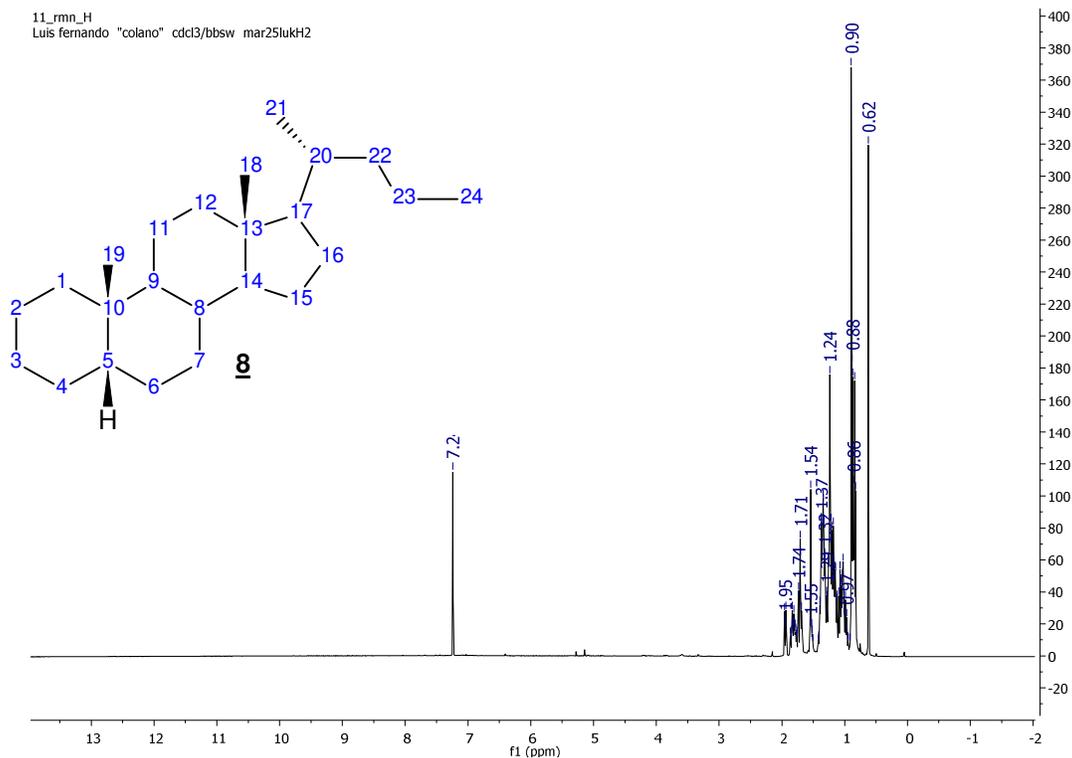


Figura 43-I: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano (**8**).

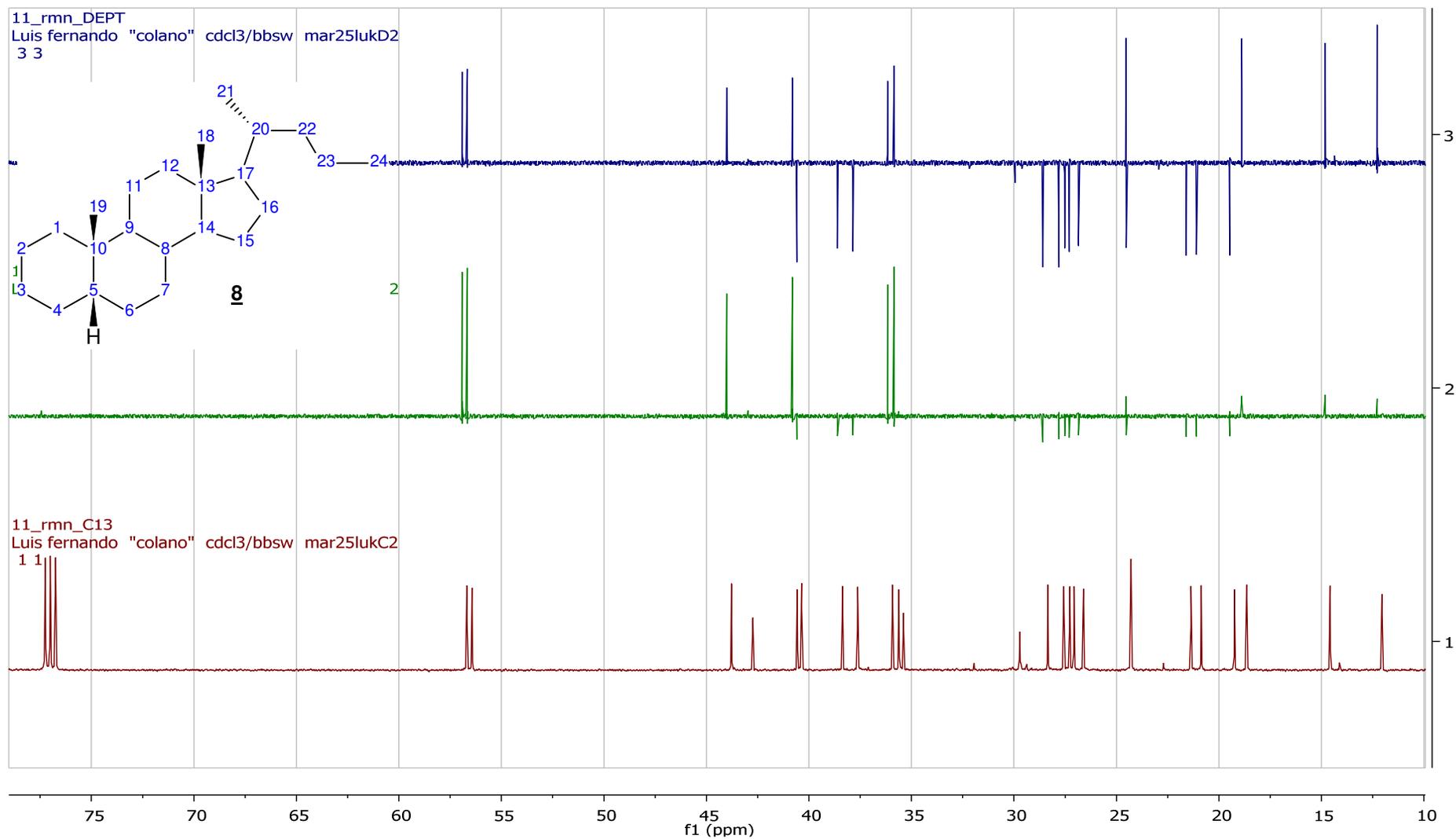
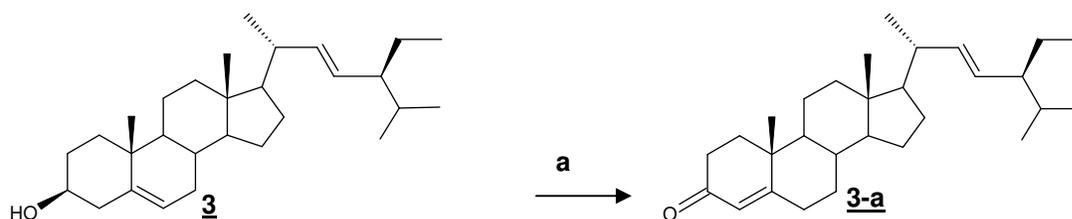


Figura 44-I: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do $5\beta(\text{H})$ colano (**8**).

ANEXO II

II-1. Preparação e caracterização do intermediário 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (**3-a**)



(a) Isopropóxido de alumínio, ciclohexanona, benzeno, refluxo, 24h (69 %).

Esquema 8-II: Preparação da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (**3-a**).

Colocou-se 5,7g de estigmasterol (**3**) em 100 mL de benzeno seco dentro de um balão de 2 bocas com agitador magnético e deixou-se o sistema acoplado a um extrator *Dean-Stark* com 25 mL de benzeno seco, sob refluxo. Após 2 h retirou-se todo o solvente do *Dean-Stark* e adicionou-se mais 25 mL de benzeno seco e aproximadamente 60 mL de ciclohexanona anidra. Após iniciar o refluxo, adicionou-se isopropóxido de alumínio (2,5 moles maior em relação ao composto **3**). Deixou-se reagir por aproximadamente 24 horas, adicionando-se novamente isopropóxido de alumínio (10% em relação à primeira adição) depois de 15 h de reação. Após o término da reação, extraiu-se a fase orgânica em funil de separação utilizando-se éter. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio e filtrou-se em papel de filtro. Evaporou-se o solvente em evaporador rotativo e deixou-se na estufa a vácuo por 1 hora. O produto desejado foi obtido após purificação utilizando-se CCDP de sílica gel (Hexano:Acetato de etila (68:32)) com rendimento de 69 %.

Ponto de fusão: 120-122 °C

[α_D]: +37,7 ° (4,35 g/100 mL CH₂Cl₂)

Infravermelho (cm⁻¹): 1676,93 (carbonila conjugada)

Espectro de massas (m/z): 271,367, 410

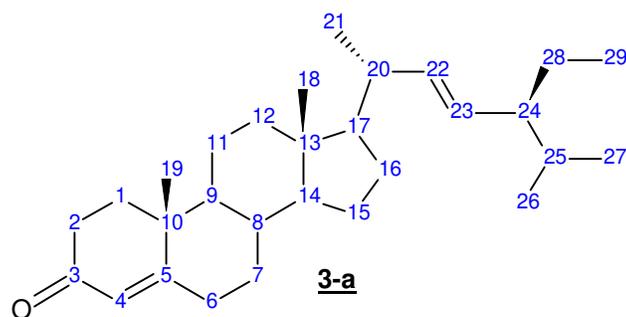


Tabela 8-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-4,22-dienestigmastenona (**3-a**).

C	^{13}C (δ, ppm)
1	35,93
2	34,42
3	199,86
4	123,98
5	171,89
6	33,18
7	32,27
8	35,85
9	51,17
10	38,85
11	21,25
12	39,76
13	42,51
14	56,23
15	24,48
16	29,09
17	56,14
18	12,38
19	17,62
20	40,70
21	19,22
22	128,35
23	129,69
24	51,47
25	32,10
26	21,32
27	21,40
28	25,63
29	12,48

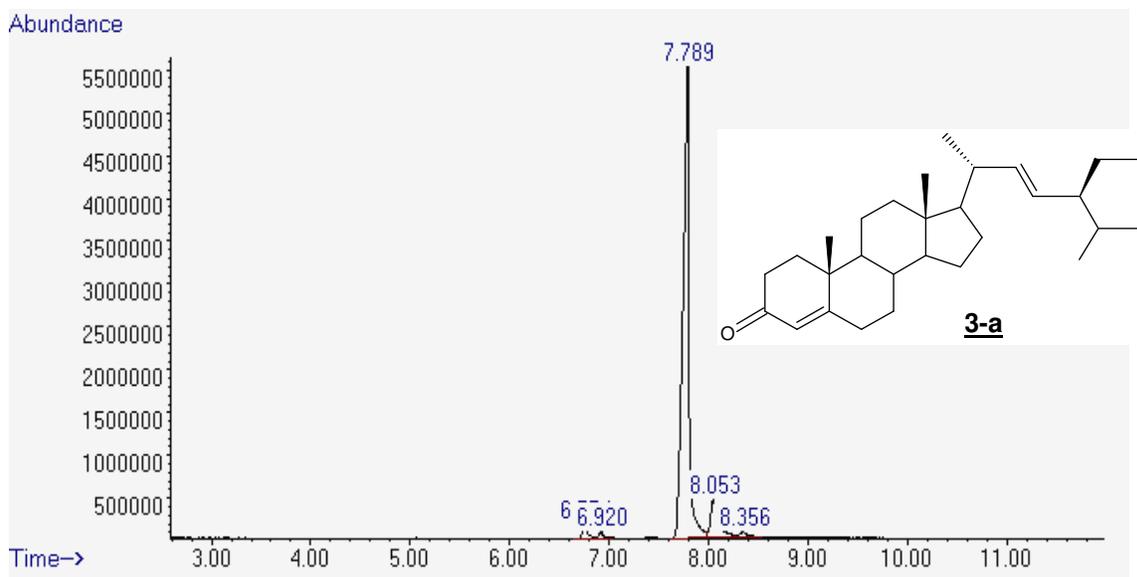


Figura 45-II: Cromatograma total de íons da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (**3-a**).

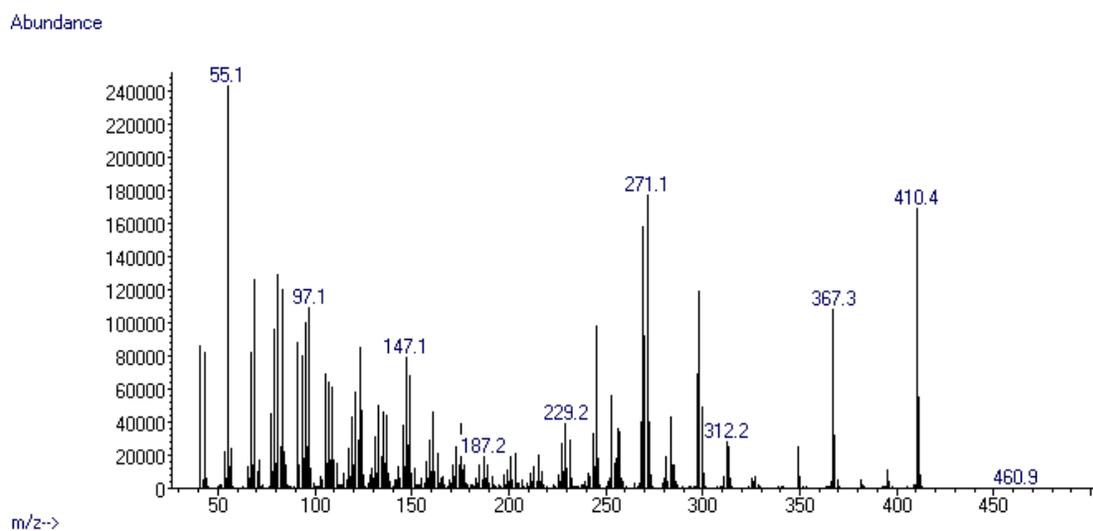


Figura 46-II: Espectro de massas da 3-ceto-4,22-dien-estigmastenona (**3-a**).

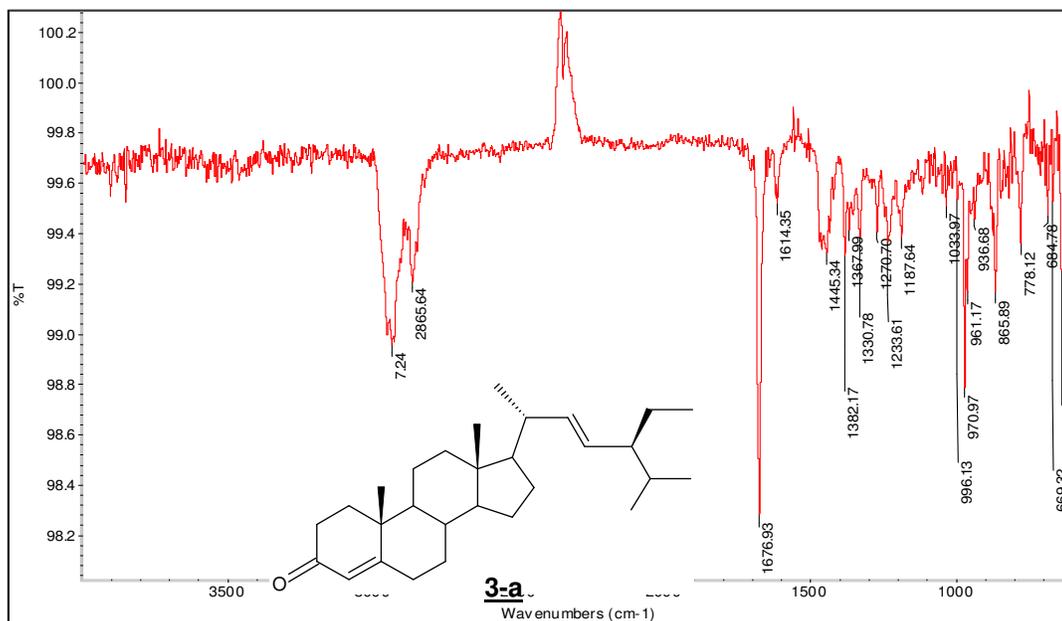


Figura 47-II: Espectro de absorção na região do Infravermelho da 3-ceto-4,22-dienestigmastenona (**3-a**).

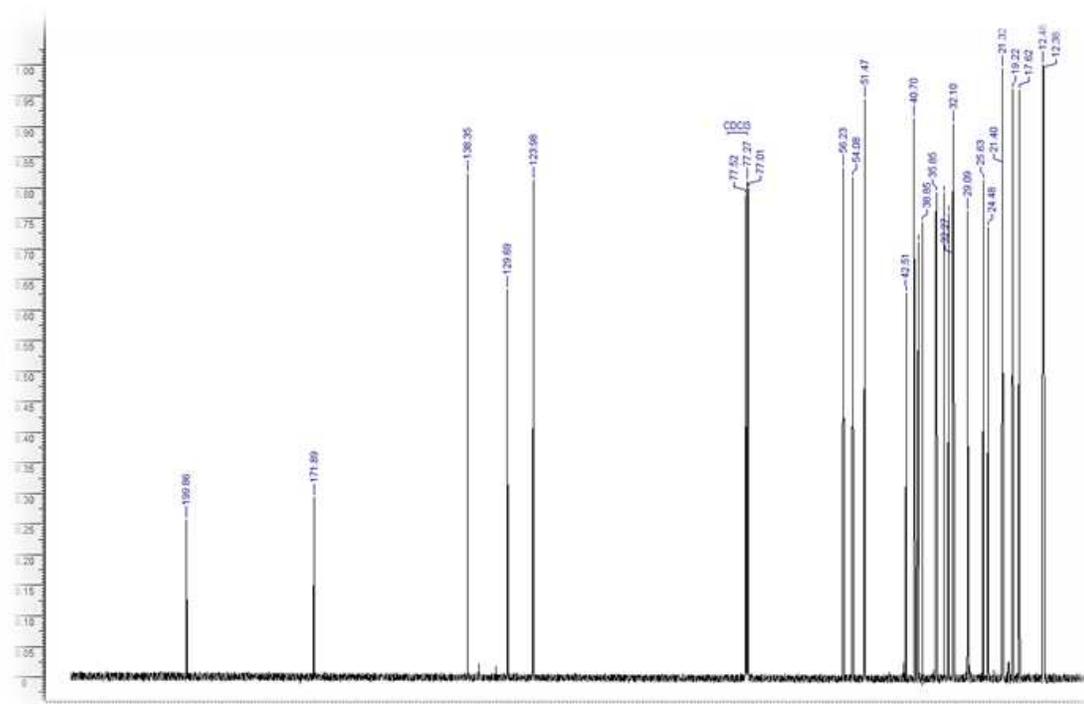


Figura 48-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-4,22-dienestigmastenona (**3-a**).

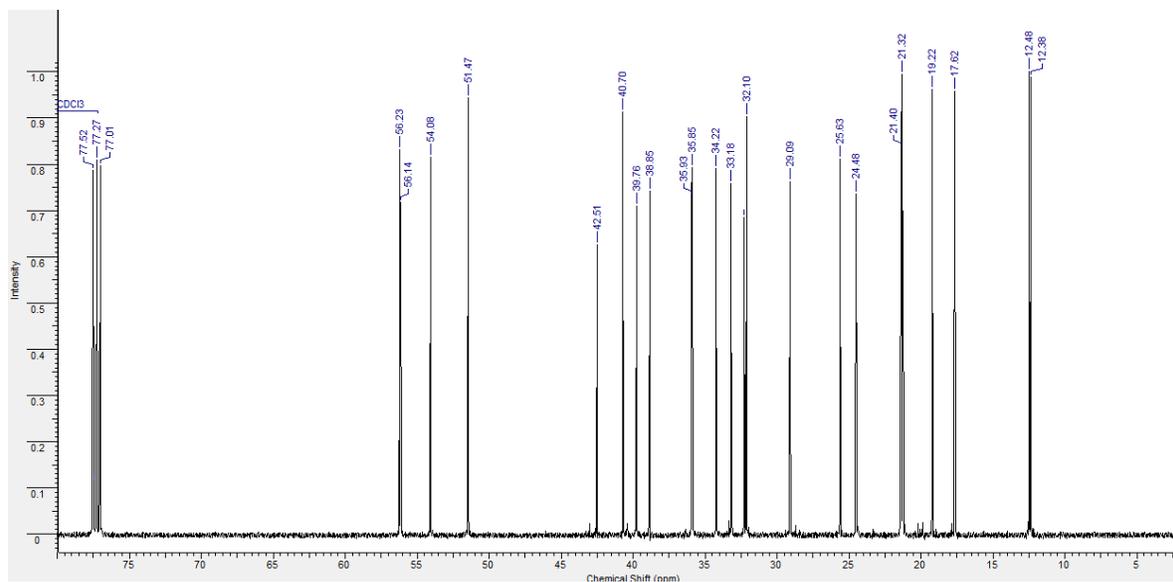
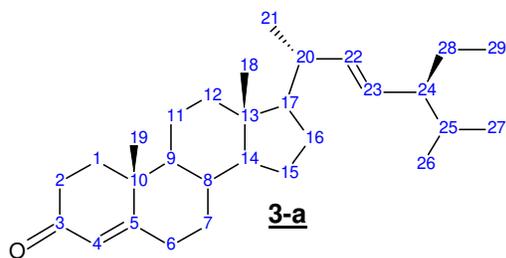
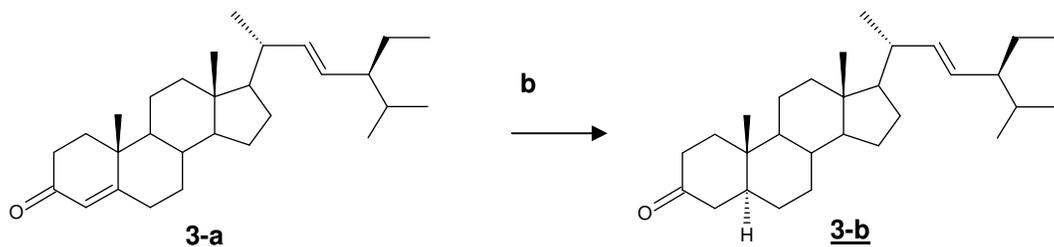


Figura 49-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-4,22-dienstigmasterona (**3-a**) ampliado na faixa entre 0 e 80 ppm.

II.2. Preparação e caracterização do intermediário 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**)



(b) Li/NH₃, THF anidro, -78 °C, 3 h (65%).

Esquema 9-II: Preparação do 3-ceto-22-estigmastenona (**3b**).

Em um balão de 3 bocas de 250 mL de capacidade conectou-se uma entrada de argônio e um condensador de amônia ligado a um borbulhador com óleo de silicone. A terceira a boca foi fechada. Purgou-se o sistema com argônio durante cinco minutos e em seguida colocou-se o sistema em um banho de gelo com acetona (-78 °C). Purgou-se o sistema com argônio novamente por mais 3 min, sob agitação magnética. Após esse tempo substituiu-se a entrada de argônio por amônia que estava conectada a um cilindro para que a amônia condensasse dentro do balão. Depois de se obter o volume desejado de amônia, aproximadamente 450 mL, o fluxo de argônio foi reconectado. Em um béquer contendo hexano tratado, pesou-se aproximadamente 900 mg de lítio metálico cortado em pedaços pequenos e, em seguida, transferiu-se para o balão. Observou-se a formação de uma coloração azul marinha intensa, indicando a formação do LiNH₃ que permaneceu sob agitação por 30 min. Em outro balão, que continha o material de partida com 3,05 g previamente seco em estufa a vácuo, foi adicionado 100 mL de THF anidro e transferido para um funil de adição e este foi acoplado à terceira boca do balão, de modo que gotejasse lentamente no sistema. Após o término da adição, retirou-se o funil de adição e a boca foi fechada com septo de borracha. A reação ficou sob constante agitação por aproximadamente 3

horas. Ao final da reação, acompanhada por placas de CCDA, adicionou-se 27 g de NH_4Cl e abriu-se o sistema de modo a deixar a amônia evaporar de um dia para o outro. Extraiu-se o sistema com 4 porções de 20 mL de éter etílico e água, para separar as fases aquosas e orgânicas. As fases orgânicas foram agrupadas e secas com Na_2SO_4 . O solvente foi removido em evaporador rotativo e forneceu uma massa de 2,27 g de bruto reacional (74,2 % de rendimento). Após obtenção do bruto da reação fez-se uma análise no CG-EM para verificar a eficiência da reação e pode-se observar que havia muitas impurezas junto com o produto de interesse. Sendo assim, fez-se uma cristalização do bruto dissolvendo-o em mínima quantidade de CH_2Cl_2 e, após dissolução, adicionou-se aproximadamente 40 mL de MeOH quente e manteve-se o balão sobre a bancada. Após três dias pode-se observar a formação de cristais, que foram removidos e lavados com 2x15 mL de MeOH gelado. Os cristais foram secos em estufa a vácuo e deram uma massa de 2,0 g do produto 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**). A síntese do composto **3-b** foi realizada através de uma reação de redução (tipo Birch), a qual é estereosseletiva quando a dupla é α, β insaturada, adicionando um hidrogênio na posição 5α , fato que vai de encontro ao objetivo deste trabalho, o qual deseja que o H_5 esteja [em α]. Esta reação de redução não ataca a dupla $\text{C}_{22}\text{-C}_{23}$, pois é preciso preservá-la para as próximas etapas. O espectro de RMN de carbono do composto **3-b** mostrou proteção γ em $\delta\Delta = -4,2$ ppm no carbono C_6 , $\delta\Delta = -0,6$ ppm no C_7 e proteção no C_{10} $\delta\Delta = -2,22$ ppm. Ocorreu uma desproteção no C_2 $\delta\Delta = +12,25$ ppm, devido à carbonila não ser mais conjugada e a desproteção de $\delta\Delta = +3,74$ ppm no C_1 .

Ponto de fusão: 166-167 °C

$[\alpha_D]$: +18,5 ° (5,35 g/100 mL CH_2Cl_2)

Infravermelho (cm^{-1}): 1711 (carbonila não conjugada)

Espectro de massas (m/z): 271, 369, 412

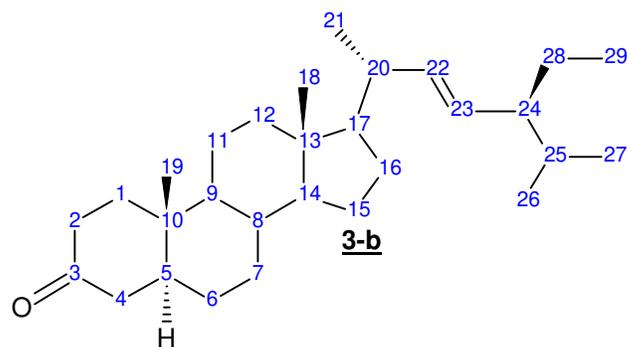


Tabela 9-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

C	^{13}C (δ , ppm)	^1H (δ , ppm)
1	38,54	2,43-1,08, m, 2H
2	38,16	2,43-1,08, m, 2H
3	212,11	-
4	44,73	2,43-1,08, m, 2H
5	46,69	2,43-1,08, m, 1H
6	28,89	2,43-1,08, m, 2H
7	31,69	2,43-1,08, m, 2H
8	35,38	2,43-1,08, m, 1H
9	51,21	2,43-1,08, m, 1H
10	36,63	-
11	21,41	2,43-1,08, m, 2H
12	39,77	2,43-1,08, m, 2H
13	42,46	-
14	56,36	2,43-1,08, m, 1H
15	24,28	2,43-1,08, m, 2H
16	28,94	2,43-1,08, m, 2H
17	56,03	2,43-1,08, m, 1H
18	11,80	0,67, s, 3H
19	18,96	0,98, s, 3H
20	40,47	2,43-1,08, m, 1H
21	21,16	0,99, d, 3H
22	138,24	5,13, dd, 1H
23	129,30	4,99, dd, 1H
24	53,81	2,43-1,08, m, 1H
25	31,85	2,43-1,08, m, 1H
26, 27	21,06, 21,07	0,82, 0,77, dd, 3H
28	24,71	2,43-1,08, m, 2H
29	12,22	0,83, t, 3H

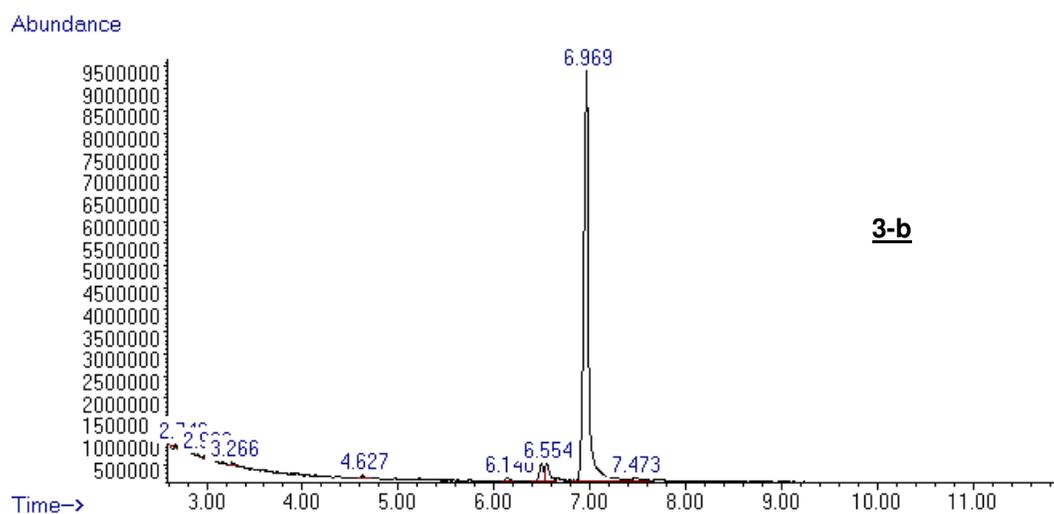


Figura 50-II: Cromatograma total de íons do éster metílico da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

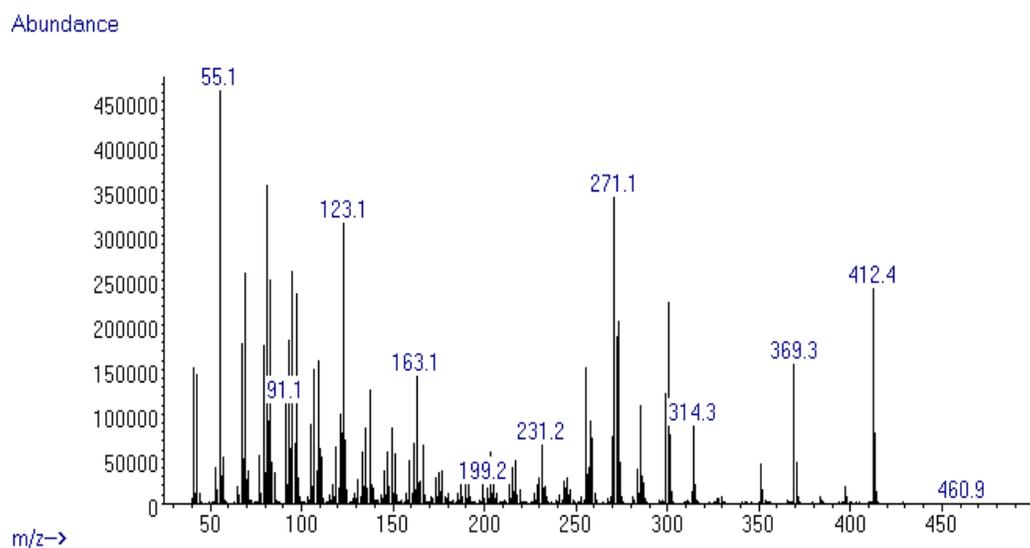


Figura 51-II: Espectro de massas de íons da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

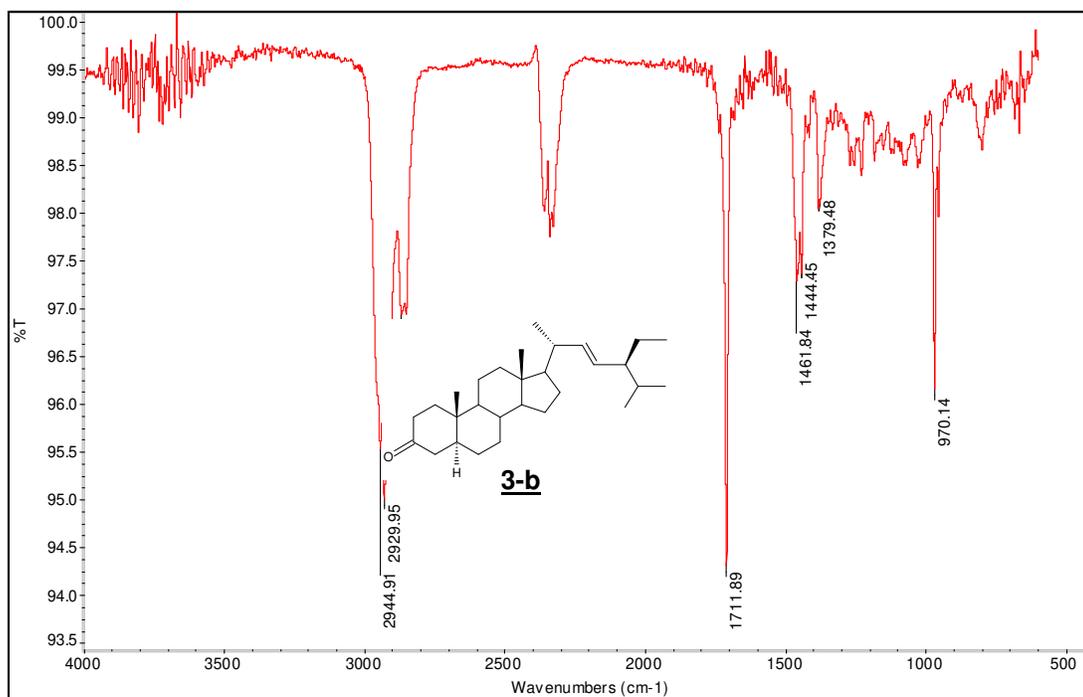


Figura 52-II: Espectro de absorção na região do Infravermelho da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

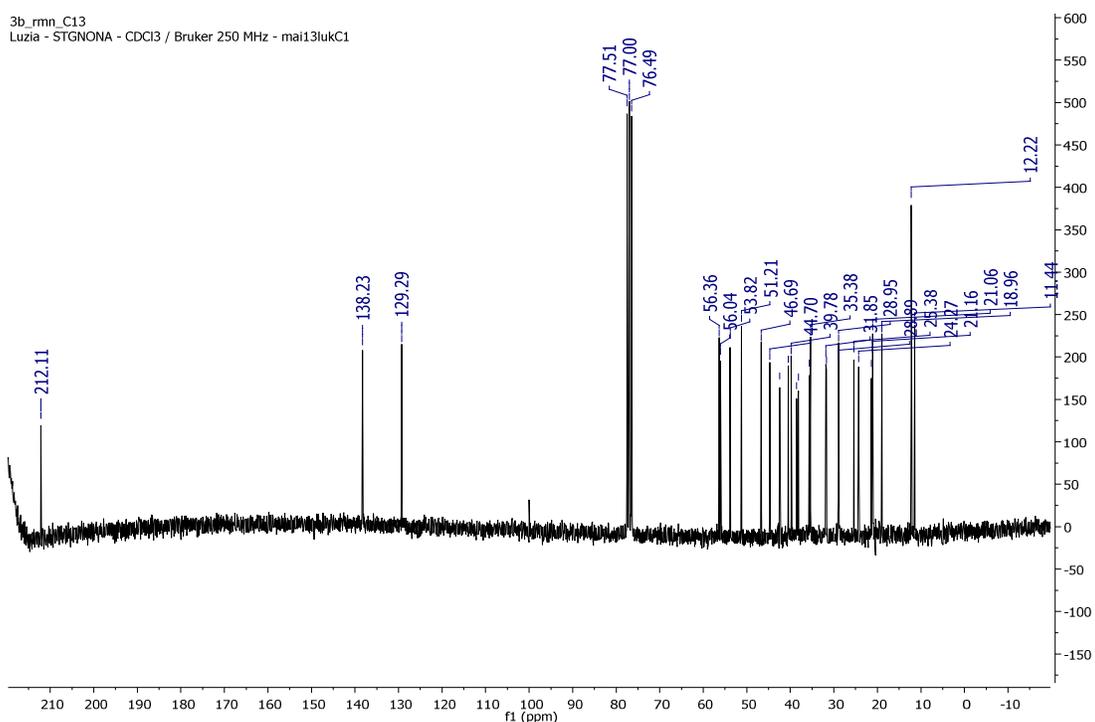


Figura 53-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

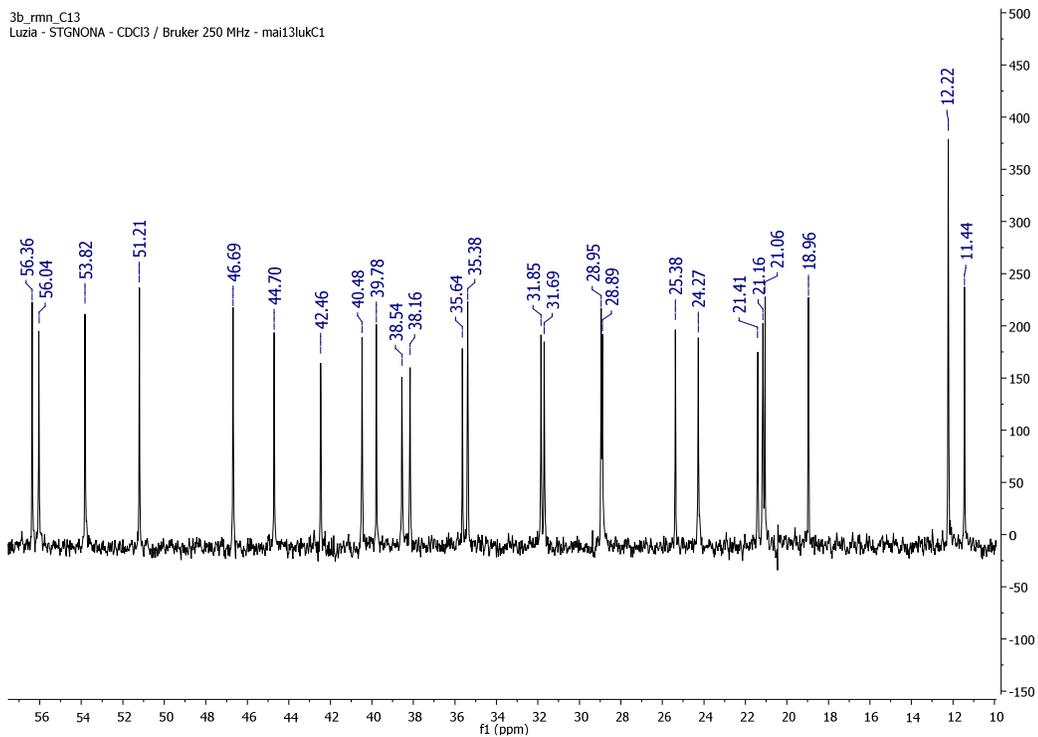


Figura 54-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**) ampliado na faixa entre 10 e 60 ppm.

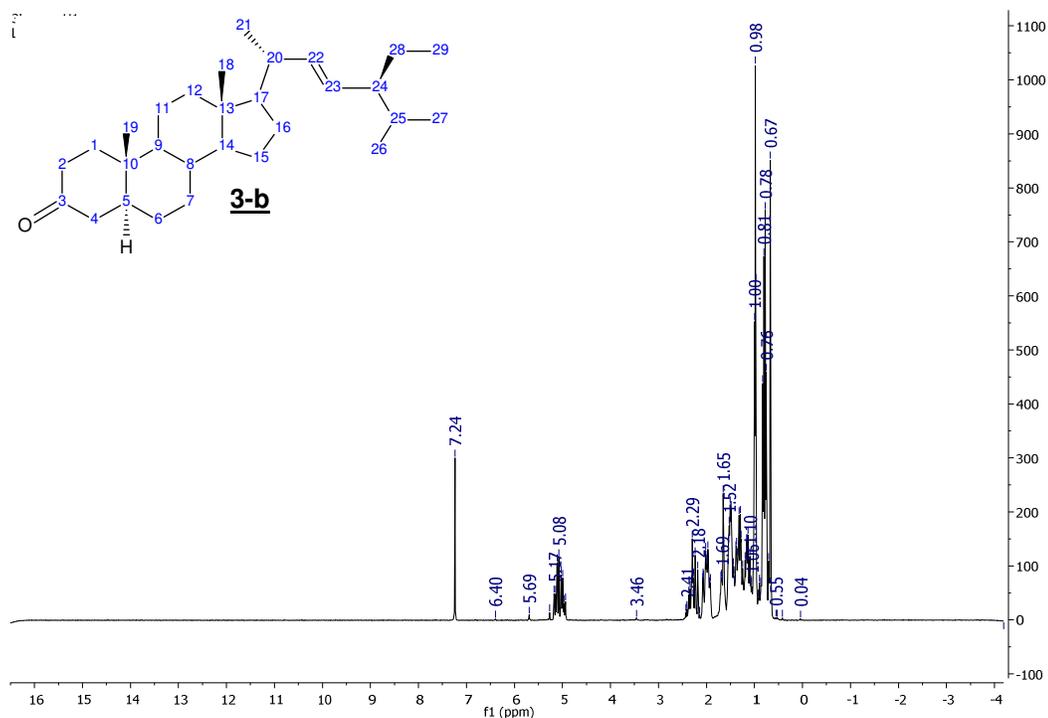


Figura 55-II: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

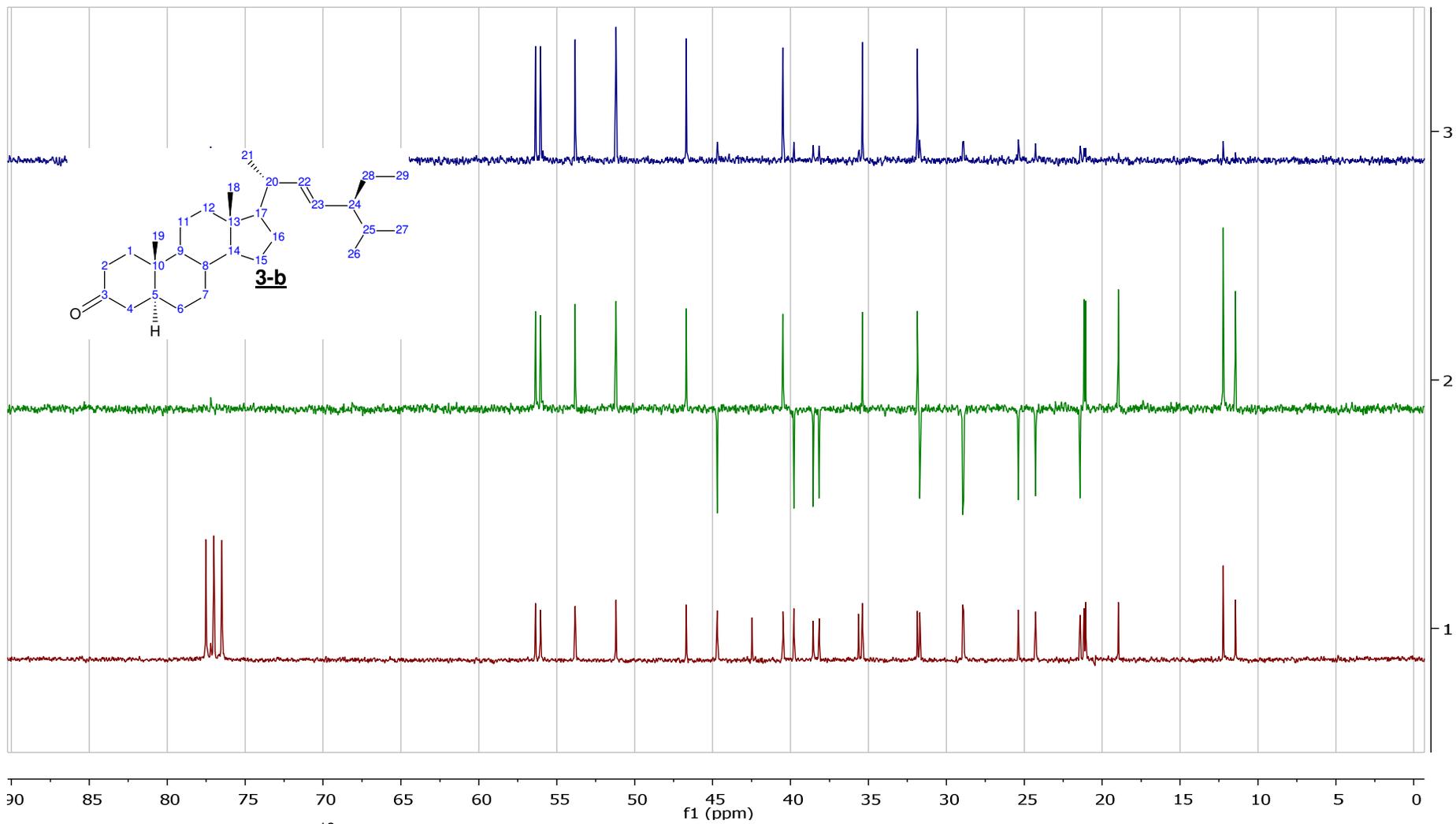
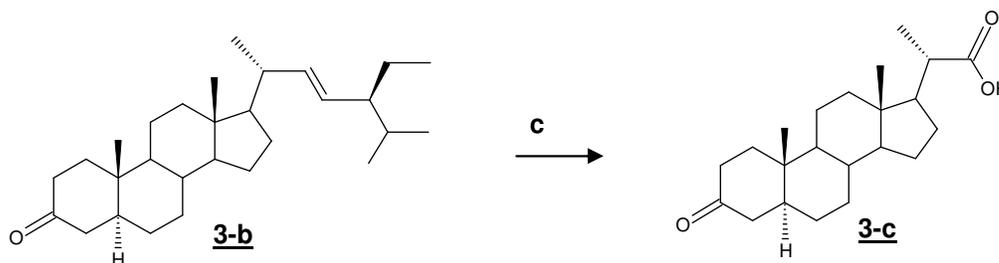


Figura 56-II: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-22-estigmastenona (**3-b**).

II.2 Preparação e caracterização do intermediário ácido-3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-c**)



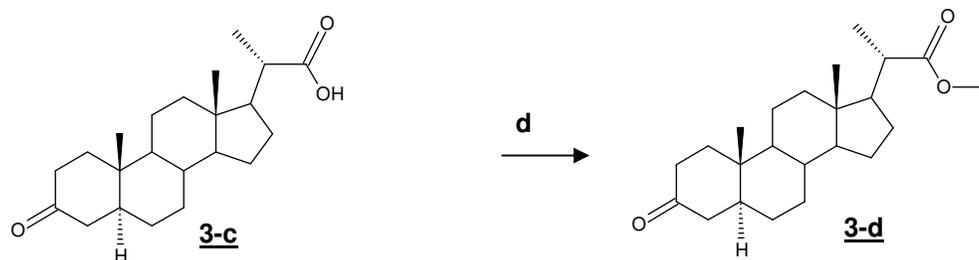
(c) O₃, H₂O₂, 2h (92%).

Esquema 10-II: Preparação do ácido-3-ceto-5 α (H)homopregnânico (**3-c**).

Para a realização desta reação pesou-se 100,4 mg de **3-b** dentro de um reator tipo frasco lavador. Em seguida, o material foi dissolvido em aproximadamente 50 mL de CH₂Cl₂. A vidraria ficou imersa em banho de álcool etílico com gelo seco e na presença de um agitador magnético para aumentar eficiência da reação. O ozônio gerado foi borbulhado na solução até o aparecimento de coloração azul, por aproximadamente 20 min. O gás de escape foi borbulhado em um tubo de ensaio de segurança, com uma solução de 10 % de HAc em água e 5 % de KI, a fim de indicar o término da reação pela a mudança de coloração da solução para o marrom.

Após o término da reação, transferiu-se a solução para um erlenmeyer com agitação magnética e, para se obter o produto ácido, adicionaram-se aproximadamente 30 mL de H₂O₂ 30 volumes, para dirigir os compostos carbonilados a ácido. Após o término da reação obteve-se uma massa de 79,42 mg de bruto de reação do ácido-3-ceto-5 α (H)homopregnânico (**3-c**), com 94,2 % de rendimento. Após a obtenção do bruto da reação de ozonólise fez-se, logo na sequência, uma reação de esterificação com diazometano para obtenção de **3-d**.

II.3. Preparação e caracterização do intermediário éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (3-d)



(d) CH_2N_2 /éter dietílico anidro, 0°C (65%).

Esquema 11-II: Preparação do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**).

Colocou-se um balão de 50 mL de capacidade, contendo o ácido (**3-c**), em um banho de água fria e gelo (5 a 10 °C). Adicionou-se 5 mL de uma solução de diazometano e agitou-se por 2 h. Após evaporação total do reagente, passou-se o bruto por uma mini-coluna filtrante de CH_2Cl_2 e foi feito uma CCDA em Hexano:Acetato de etila (70:30). Foram observadas duas manchas principais. Fez-se cromatografia em coluna aberta contendo sílica gel, para purificar o produto, utilizando-se Hexano:Acetato de etila (70:30) como fase móvel. Obteve-se o éster metílico do ácido-3-ceto-5 α (H)homopregnânico (**3-d**) puro com 65 % de rendimento.

Ponto de fusão: 174-176 °C

$[\alpha]_D$: +18,1 °(3,72 g/100 mL CH_2Cl_2)

Infravermelho (cm^{-1}): 1734 (carbonila de éster), 1712 (carbonila de cetona)

Espectro de massas (m/z): 231, 290, 360

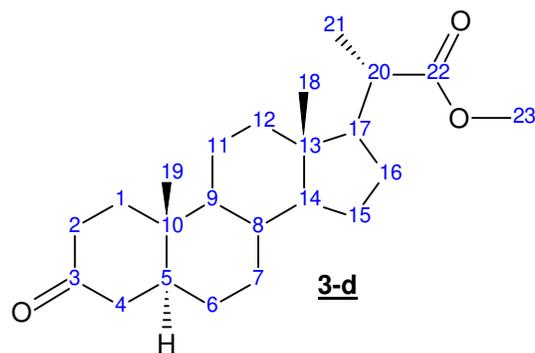


Tabela 10-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) da 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**).

C	^{13}C (δ, ppm)	^1H (δ, ppm)
1	38,47	2,49-0,71, m, 2H
2	38,11	2,49-0,71, m, 2H
3	211,96	-
4	44,64	2,49-0,71, m, 2H
5	46,58	2,49-0,71, m, 1H
6	28,86	2,49-0,71, m, 2H
7	31,60	2,49-0,71, m, 2H
8	35,37	2,49-0,71, m, 1H
9	52,93	2,49-0,71, m, 1H
10	35,61	-
11	21,34	2,49-0,71, m, 2H
12	39,61	2,49-0,71, m, 2H
13	42,64	-
14	55,83	2,49-0,71, m, 1H
15	24,22	2,49-0,71, m, 2H
16	27,10	2,49-0,71, m, 2H
17	53,69	2,49-0,71, m, 1H
18	12,19	0,66, s, 3H
19	17,04	0,97, s, 3H
20	42,41	2,49-0,71, m, 1H
21	12,19	1,16, d, 3H
22	117,25	-
23	51,28	3,60, s, 3H

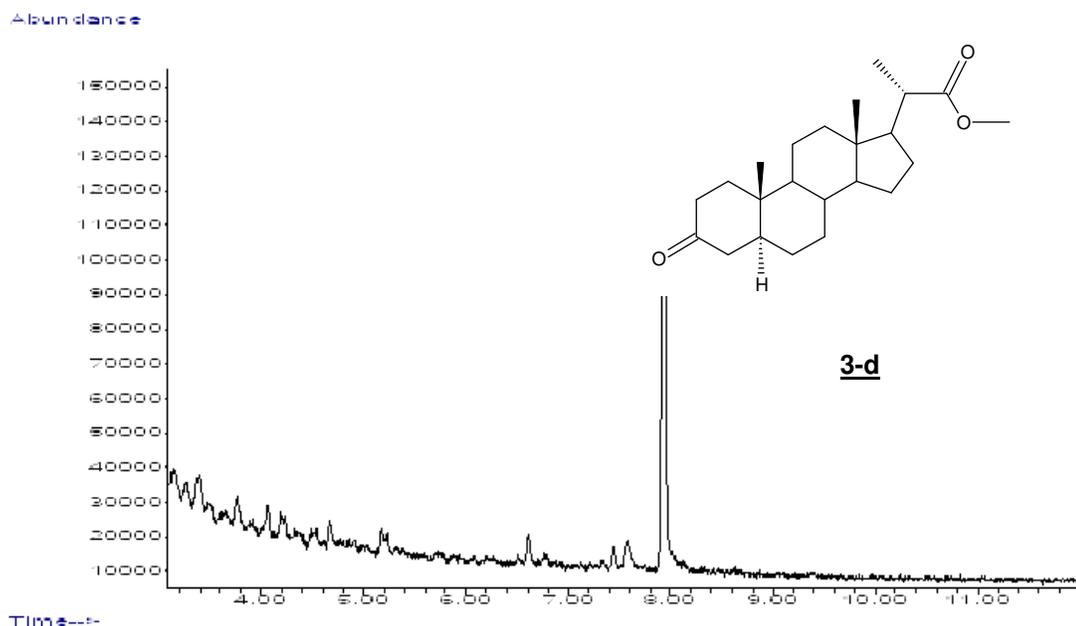


Figura 57-II: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**).

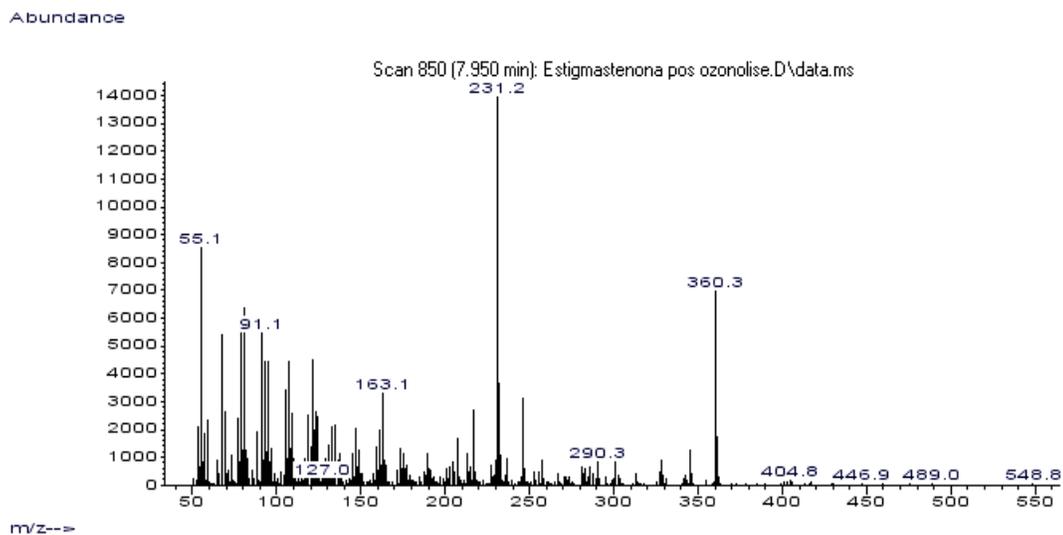


Figura 58-II: Espectro de massas do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**).

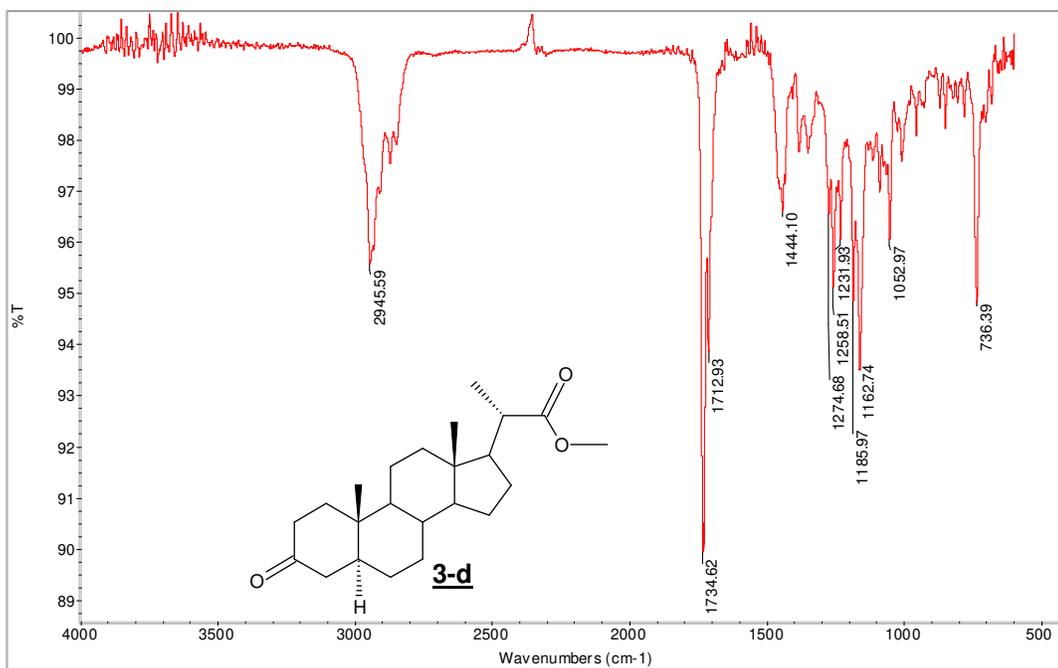


Figura 59-II: Espectro de absorção na região do infravermelho do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**).

3d_rm_n_C13
Nayara - EMOZOCCD - Bruker 250 MHz - CDCl3 - jun10lukC1

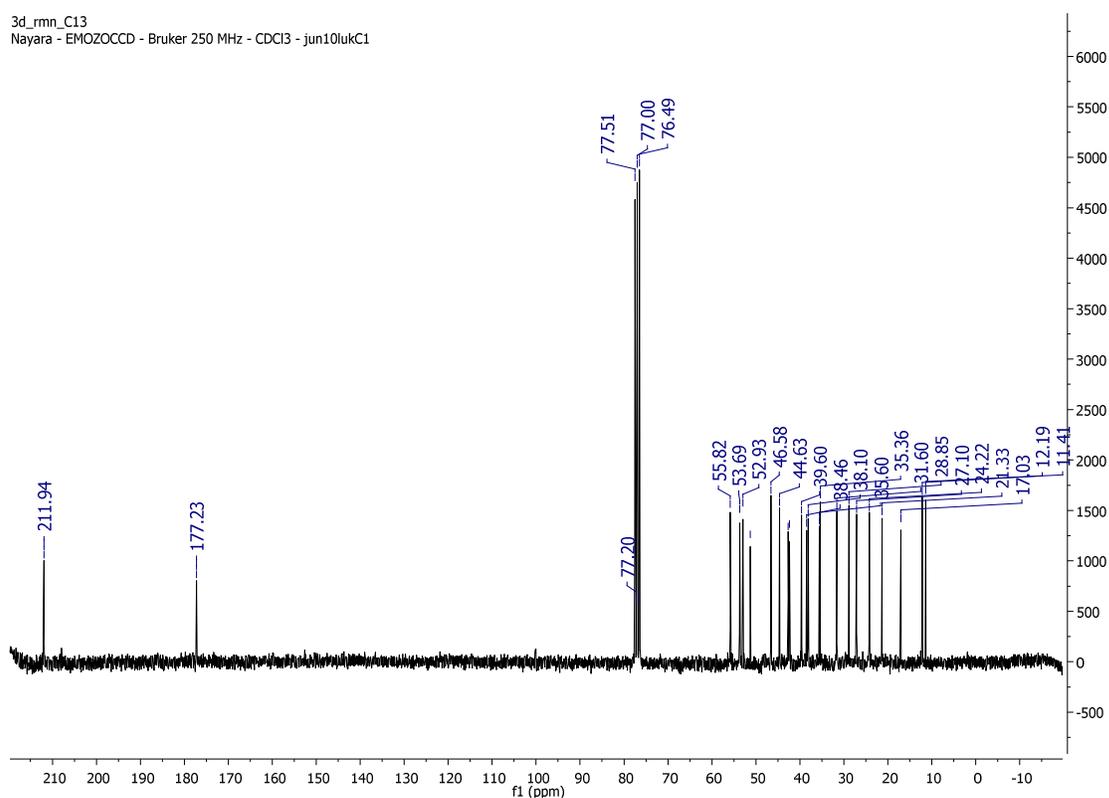


Figura 60-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**).

3d_rmn_C13
Nayara - EMOZOCCD - Bruker 250 MHz - CDCl3 - jun10lukC1

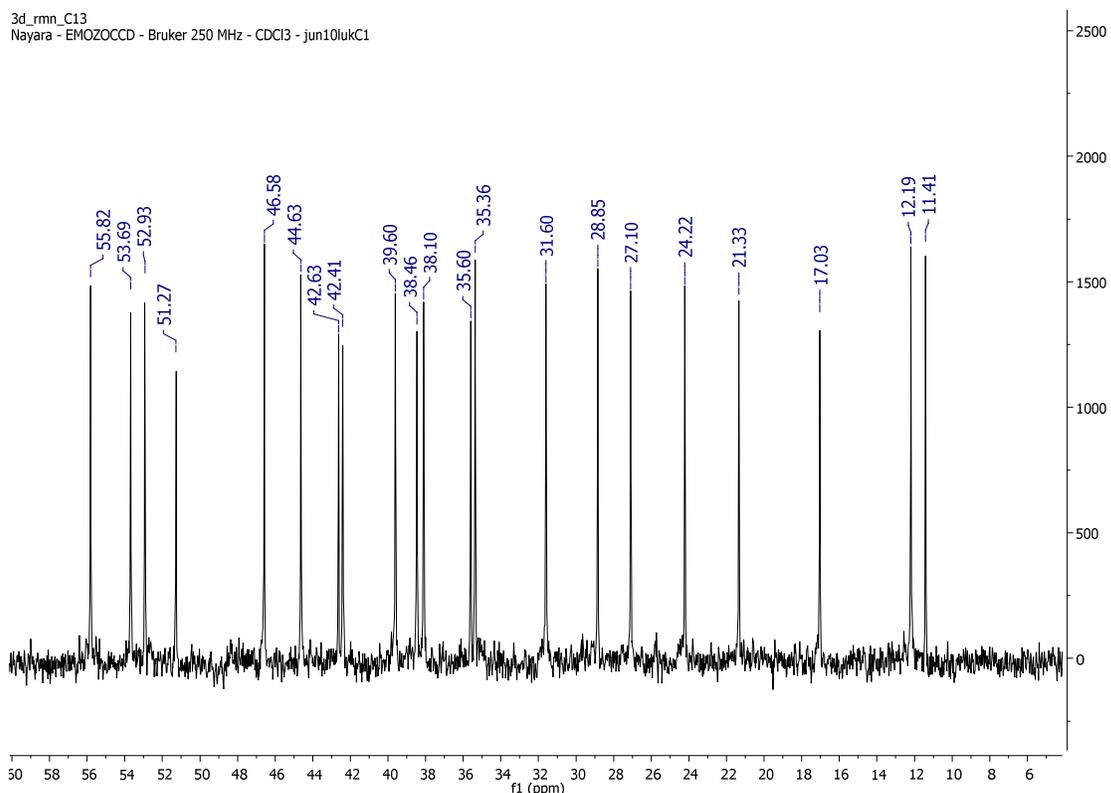


Figura 61-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**) ampliado na faixa entre 4 e 60 ppm.

3d_rmn_H1
Nayara - EMOZOCCD - Bruker 250 MHz - CDCl_3 - jun10lukH1

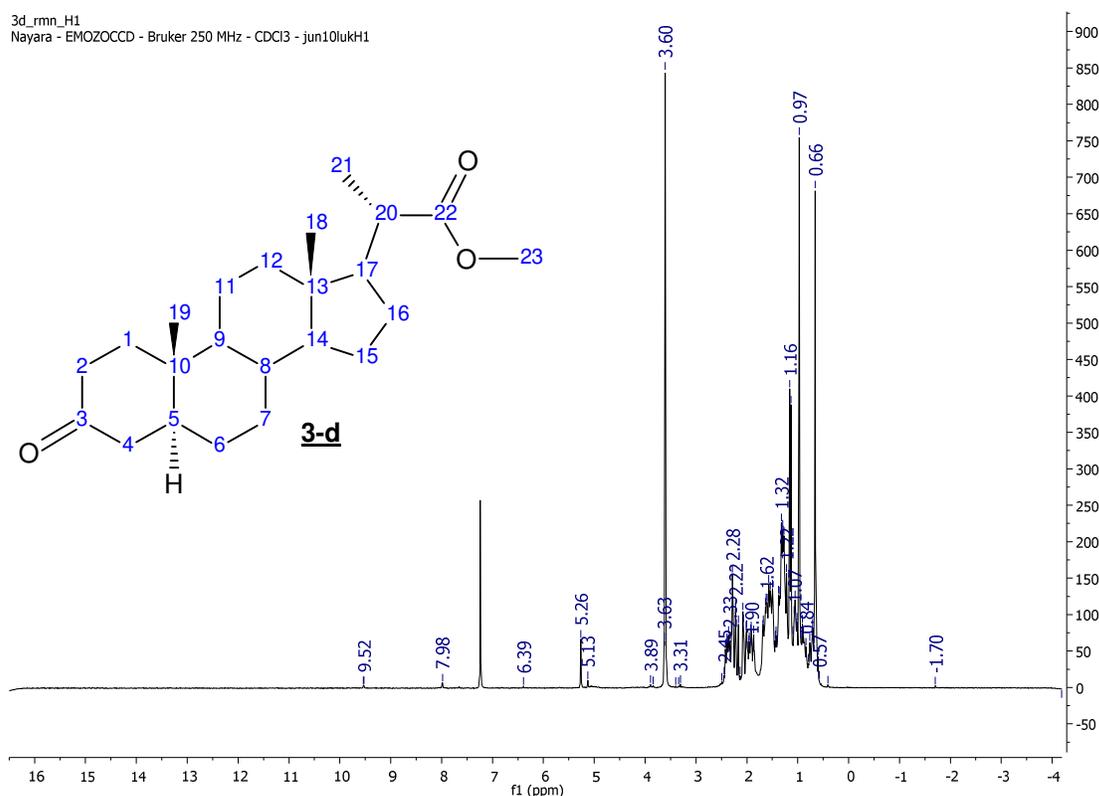


Figura 62-II: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**)

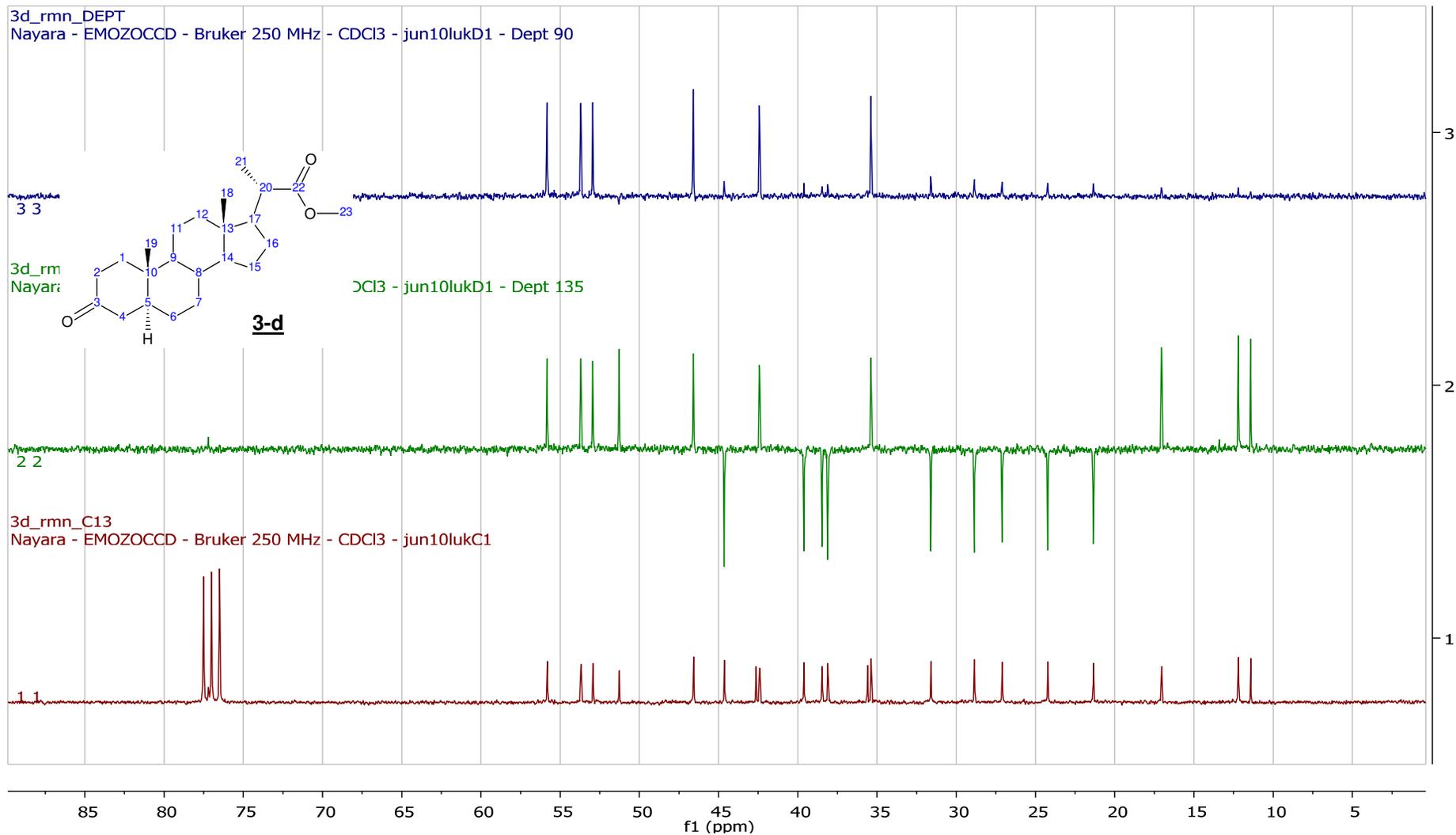
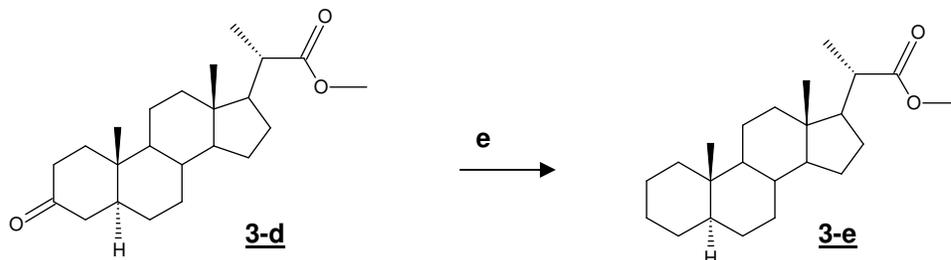


Figura 63-II: Espectro de RMN ¹³C, DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 3-ceto-5 α (H) homopregnânico (**3-d**)

II.4. Preparação e caracterização do intermediário éster metílico do ácido-5 α (H)homopregnânico (**3-e**)



(e) Zn/HgCl₂, HCl, refluxo, 8h (70%).

Esquema 12-II: Preparação do éster metílico do ácido-5 α (H)homopregnânico (**3-e**).

Em um balão de reação de duas bocas, de 50 mL de capacidade, adicionou-se 1,5 g de Zn metálico em aparas, 110,0 mg de HgCl₂, 1,0 mL de HCl concentrado e 2,0 mL de água, sob agitação magnética por 10 minutos. Após esse tempo aguardou-se a decantação da amálgama e, com uma pipeta, retirou-se o sobrenadante do balão. Cobriu-se a amálgama com 1,5 mL de água e 2,5 mL de HCl concentrado e acoplou-se um condensador de refluxo. Em seguida, 400,0 mg de **3-d** solubilizado em CH₂Cl₂ foi transferido para o balão de reação. A cada 1 hora de reação foram adicionadas 8 gotas de HCl concentrado e esta permaneceu sob refluxo por 6 horas. Ao final da reação, extraiu-se o produto com CHCl₃ (5x20 mL) e separou-se as fases orgânica e aquosa. Lavou-se a fase orgânica com água (4x30 mL) até pH 6-7, secou-se com MgSO₄ e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. O produto foi purificado utilizando-se CCDP de sílica e Hexano:Acetato de etila (80:20) como eluente, obtendo-se ao final 290 mg de **3-e**, com rendimento de 75 %.

A análise de RMN de ¹³C mostrou o desaparecimento do pico referente à carbonila da cetona em $\delta = 211,96$ ppm no C₃, e a análise de IV revelou uma banda de absorção em 1736,34 cm⁻¹, referente ao estiramento da carbonila do éster.

Ponto de fusão: 169-171 °C

[α_D]: + 8,7 ° (3,10 g/100 mL CH₂Cl₂)

Infravermelho (cm⁻¹): 1736 (carbonila do éster metílico)

Espectro de massas (m/z): 217, 331, 346

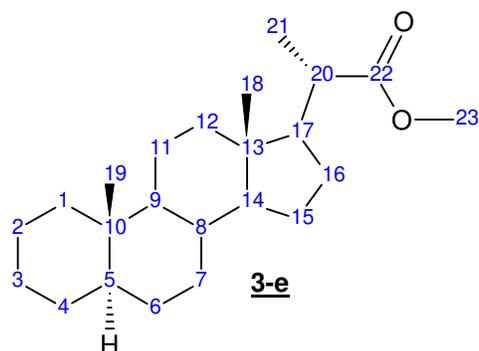


Tabela 11-II: Atribuições de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (**3-e**).

C	¹³ C (δ , ppm)
1	38,45
2	21,80
3	27,00
4	29,20
5	45,92
6	28,33
7	30,36
8	35,63
9	49,64
10	35,11
11	21,21
12	40,47
13	42,20
14	54,94
15	24,81
16	25,46
17	52,30
18	17,00
19	15,75
20	42,60
21	12,20
22	176,70
23	51,10

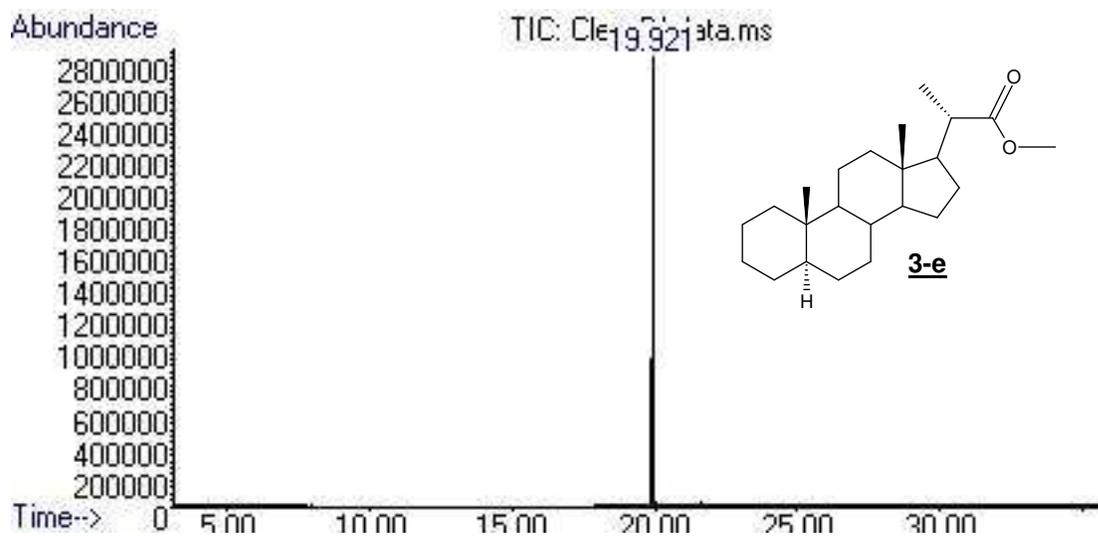


Figura 64-II: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (**3-e**).

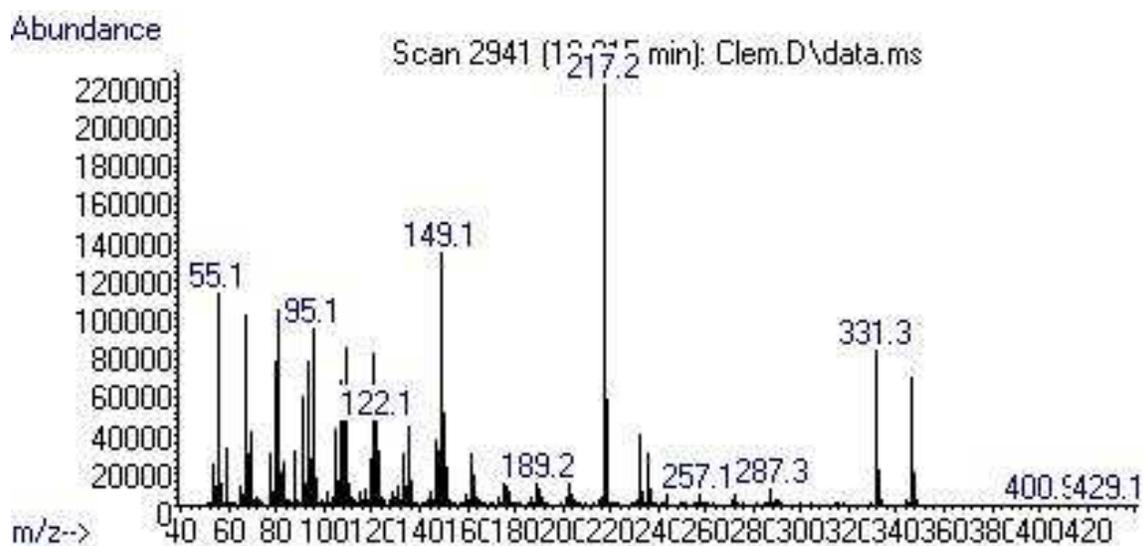


Figura 65-II: Espectro de massas do éster metílico do ácido 5 α (H) homopregnânico (**3-e**).

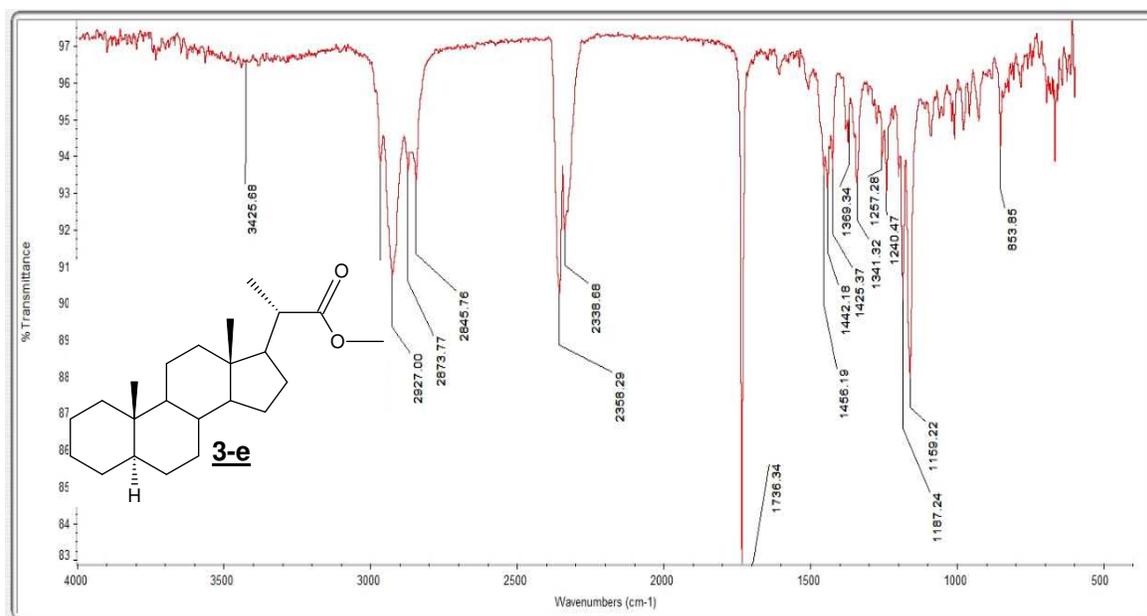


Figura 66-II: Espectro de absorção na região do infravermelho do éster metílico do ácido 5α (H) homopregnânico (**3-e**).

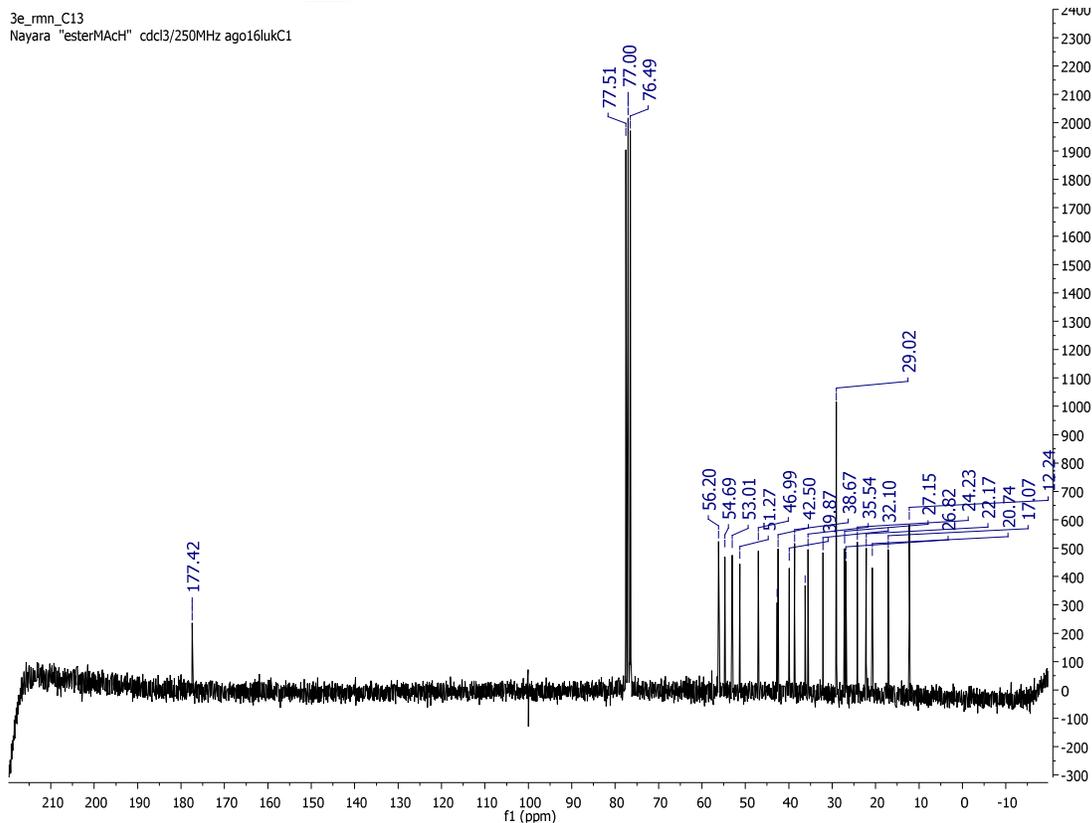


Figura 67-II: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do éster metílico do ácido 5α (H) homopregnânico (**3-e**).

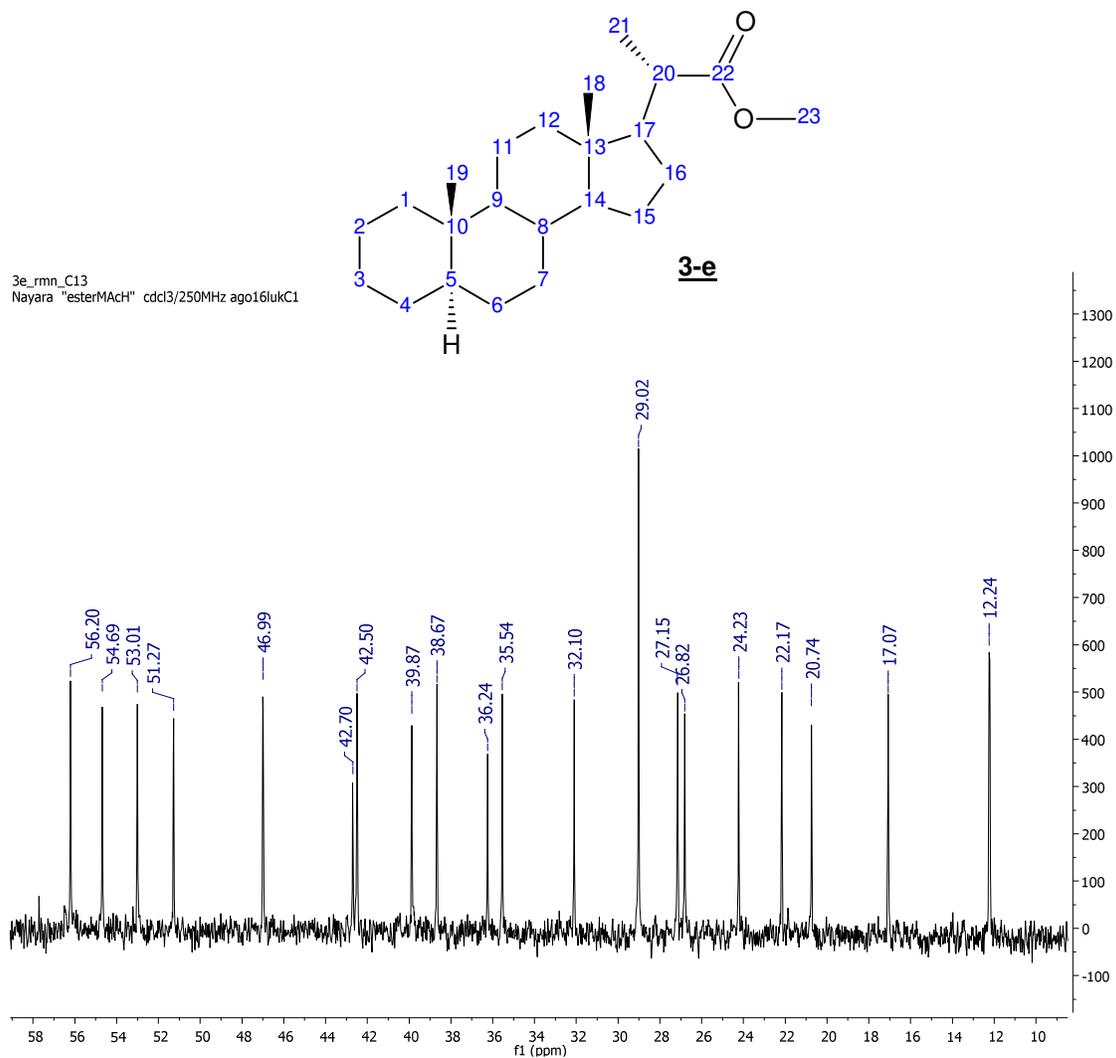
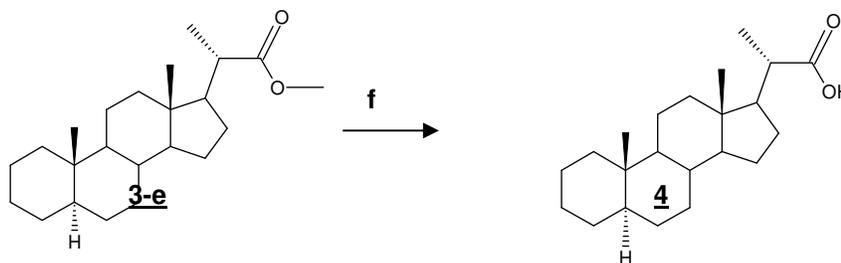


Figura 68-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido 5α (H) homopregnânico (**3-e**) ampliado na faixa entre 10 e 58 ppm.

II.5 Preparação e caracterização do ácido 5 α (H) homopregnânico (4)



(d) KOH/éter etílico 10%, refluxo, 2h (92 %).

Esquema 13-II: Preparação do ácido-5 α (H)homopregnânico (4).

A última etapa dessa rota sintética foi uma reação de hidrólise básica do éster metílico do ácido-5 α (H)homopregnânico (**3-e**), de modo a fornecer o biomarcador ácido proposto; o ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**). Em um balão de reação de duas bocas, com 50 mL de capacidade, foram adicionados 10,0 mL de MeOH, 790,0 mg de KOH em pastilhas (10 % em relação ao metanol) e 149,0 mg do material de partida (**3-e**) dissolvido em éter etílico. Acoplou-se um condensador para refluxo e a temperatura foi elevada até aproximadamente 50 °C, de modo que o éter evaporasse do meio reacional. Feito isso, permitiu-se que a reação permanecesse sob refluxo e agitação constante, por três horas.

Ao final da reação, adicionou-se 20,0 mL de água e HCl concentrado até atingir pH 1. Extraiu-se o produto com CHCl₃ (5x30 mL) e lavou-se a fase orgânica com água (6x30 mL) até pH 6-7. Secou-se com Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente, fornecendo uma massa de 137 mg (rendimento de 95 %) do biomarcador ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**).

A análise de IV mostrou o estiramento em ν 1713,93 cm⁻¹ referente à carbonila do ácido. A análise de RMN de ¹³C mostrou uma desproteção de $\delta\Delta = + 5.59$ ppm no C₂₂ devido à alteração do grupo funcional de éster para ácido carboxílico, e à ausência do pico em $\delta = 51,25$ ppm, que era presente em **3-e**, referente à metila do C₂₃.

Ponto de fusão: 196-198 °C

[α_D]: + 1,5 (4,50 g/100 mL MeOH)

Infravermelho (cm^{-1}): 1713 (carbonila de ácido carboxílico), 3428 (O-H)

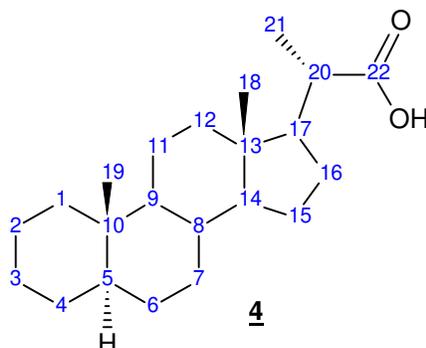


Tabela 12-II: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido $5\alpha(\text{H})$ homopregnânico (**4**).

C	^{13}C (δ, ppm)	^1H (δ, ppm)
1	38,65	1,86-0,84, m, 2H
2	22,15	1,86-0,84, m, 2H
3	27,26	1,86-0,84, m, 2H
4	29,00	1,86-0,84, m, 2H
5	46,97	1,86-0,84, m, 1H
6	29,00	1,86-0,84, m, 2H
7	32,08	1,86-0,84, m, 2H
8	35,53	1,86-0,84, m, 1H
9	52,57	1,86-0,84, m, 1H
10	36,22	-
11	20,74	1,86-0,84, m, 2H
12	42,51	1,86-0,84, m, 2H
13	42,76	-
14	56,20	1,86-0,84, m, 1H
15	24,24	1,86-0,84, m, 2H
16	26,80	1,86-0,84, m, 2H
17	54,67	1,86-0,84, m, 1H
18	12,27	0,76, s, 3H
19	16,96	0,65, s, 3H
20	39,89	2,38, m, 1H
21	12,20	1,19, d, 3H
22	182,99	-

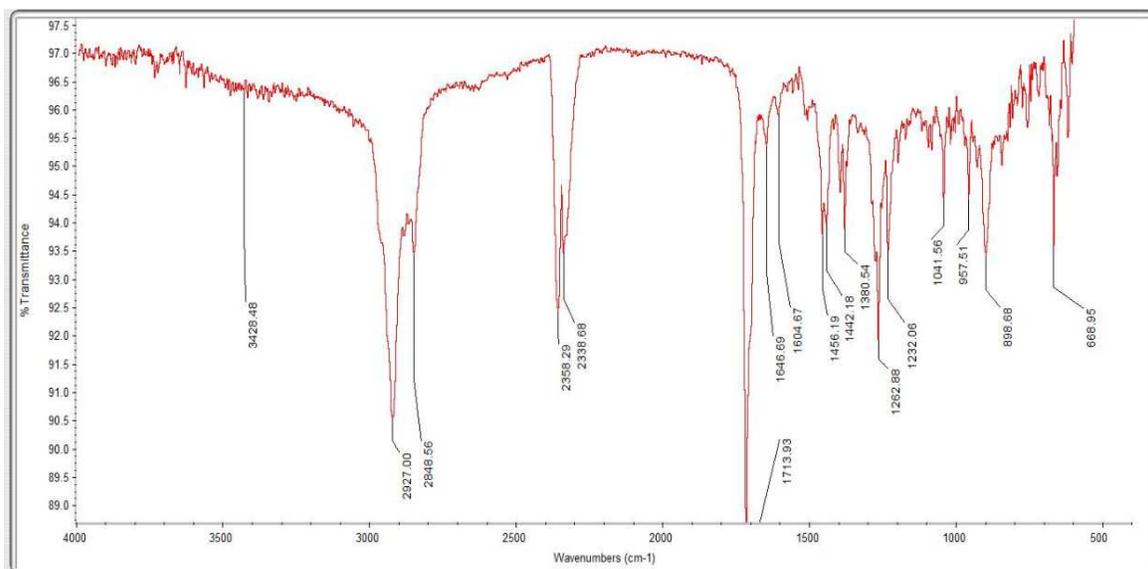


Figura 69-II: Espectro de absorção na região do infravermelho do ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**).

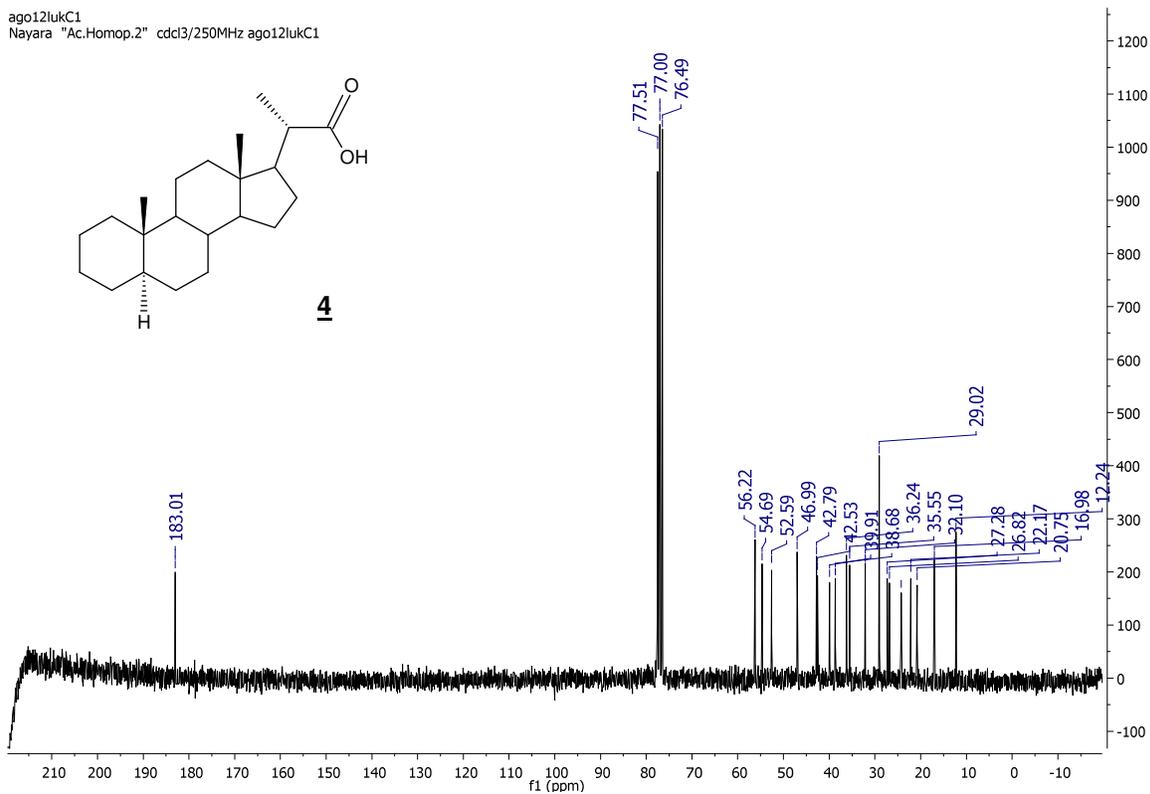


Figura 70-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido 5 α (H) homopregnânico (**4**).

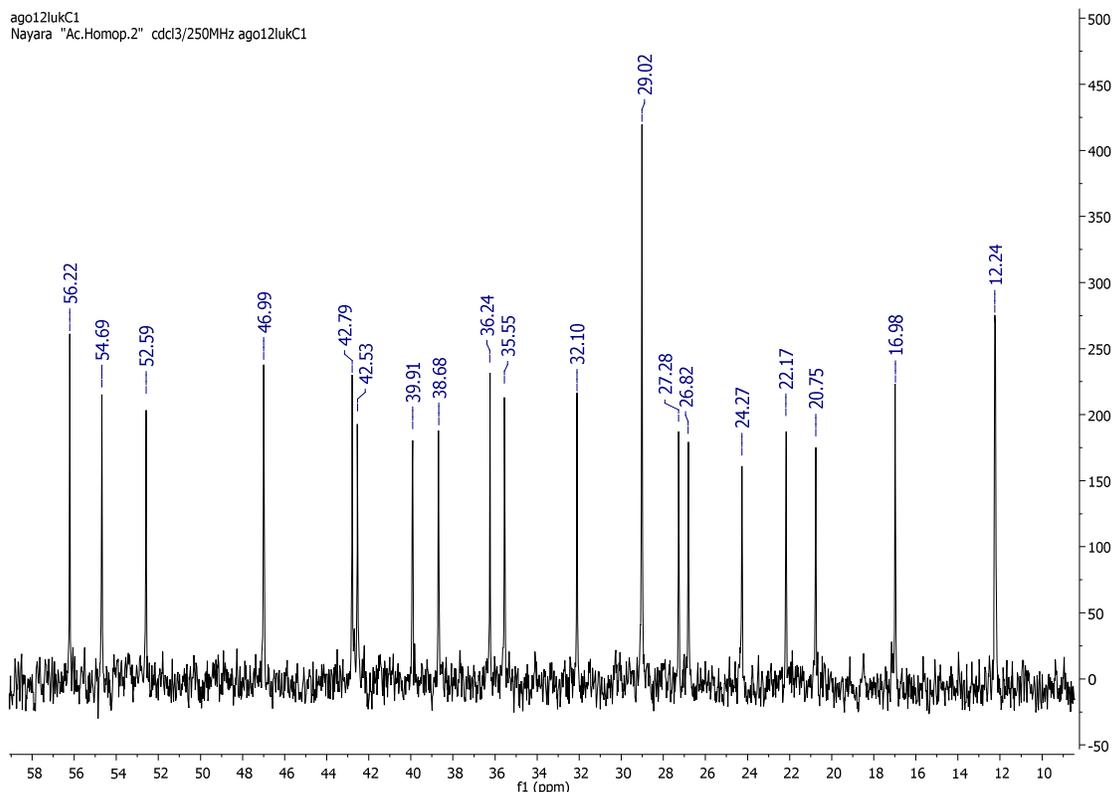


Figura 71-II: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido 5α (H) homopregnânico (**4**) ampliado na faixa entre 10 e 58 ppm.

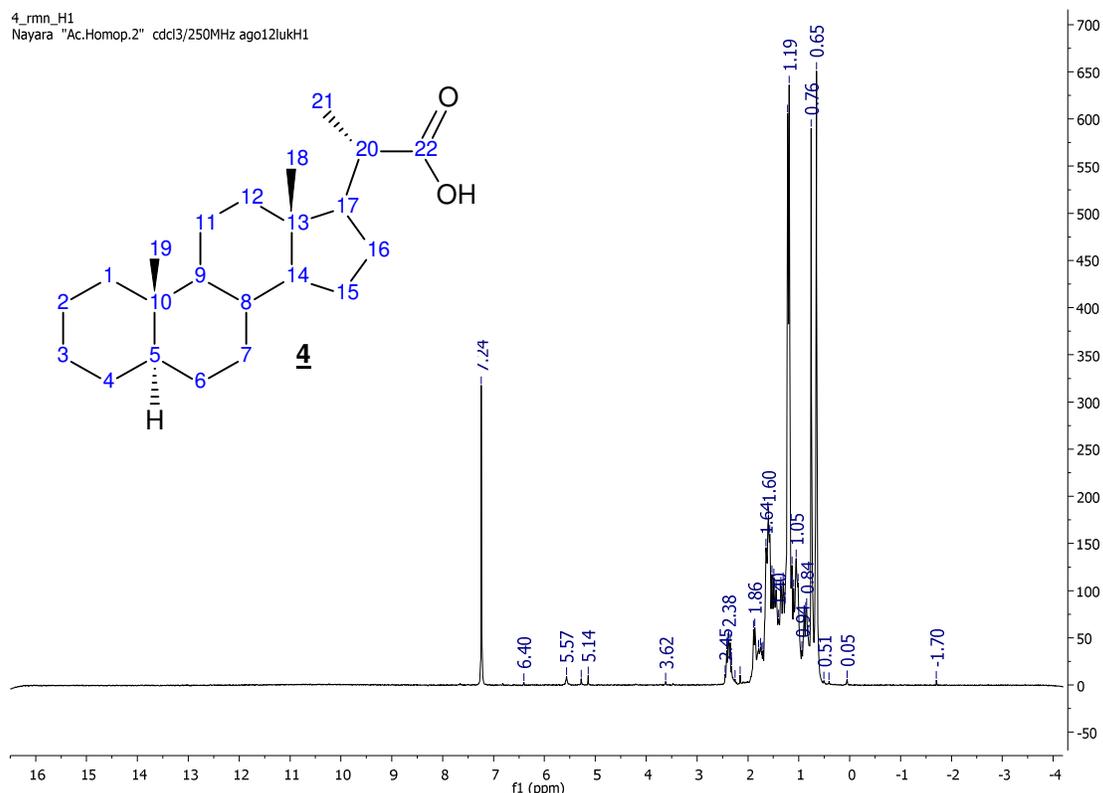


Figura 72-II: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do ácido 5α (H) homopregnânico (**4**)

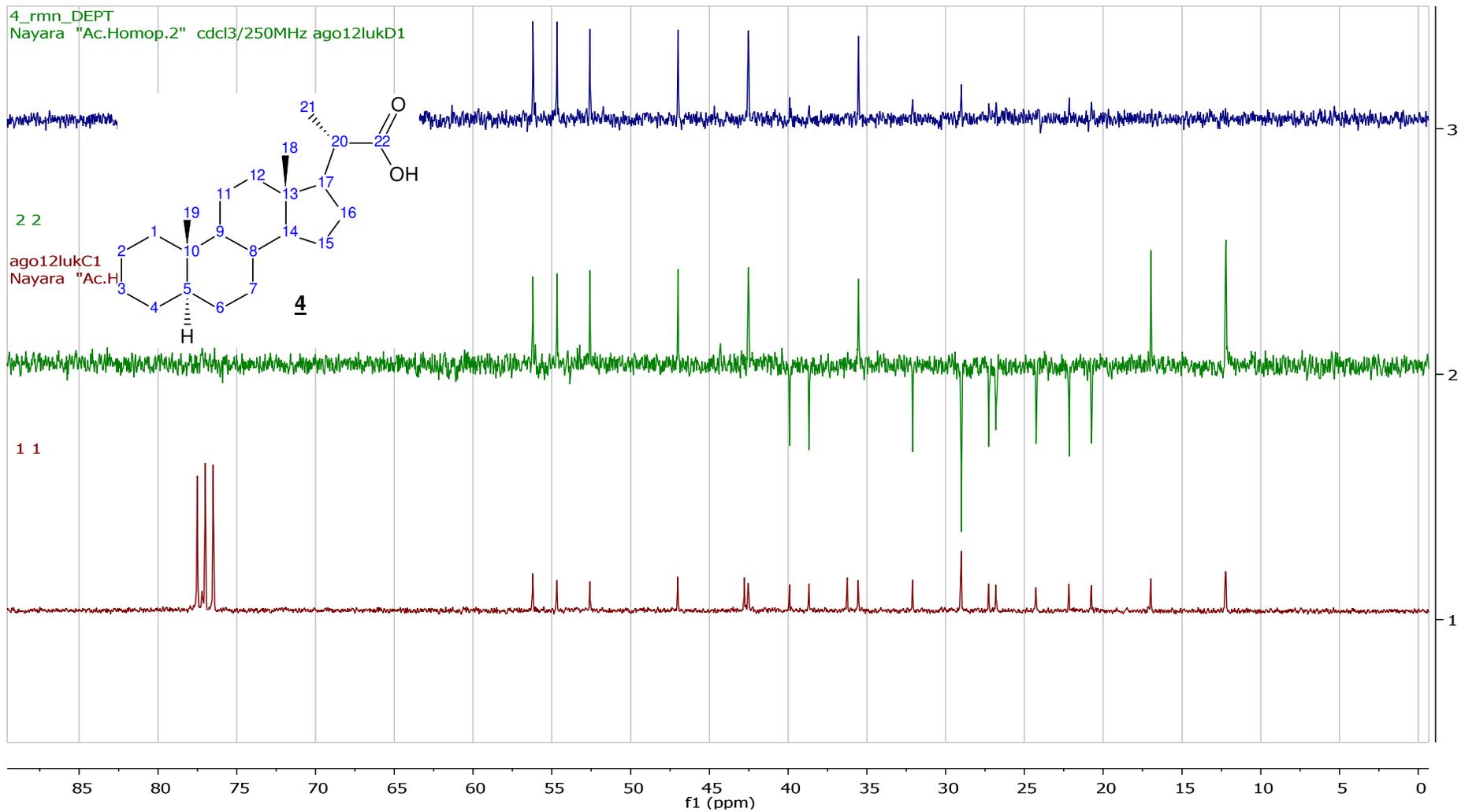
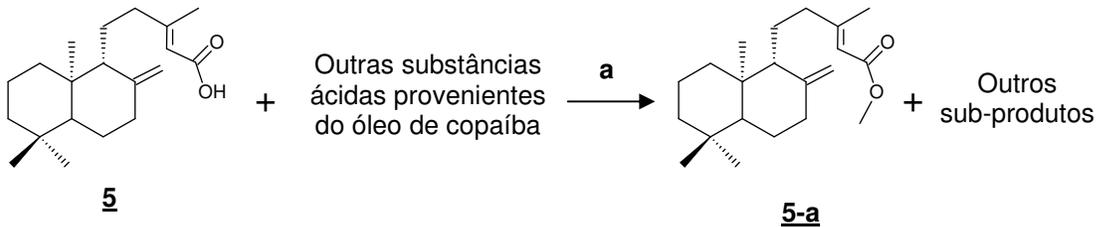


Figura 73-II: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do ácido $5\alpha(\text{H})$ homopregnânico (**4**)

ANEXO III

III.1. Esterificação da fração ácida do óleo de copaíba



(a) CH_2N_2 /éter dietílico anidro, 0 °C.

Esquema 14-III: Esterificação da fração ácida do óleo de copaíba para obtenção do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

A fração ácida do óleo de copaíba (5,0 g), previamente extraída segundo procedimento descrito por Imamura, 1981 e Miranda, 1981, foi dissolvida em éter etílico e transferida para balão de fundo redondo de 100 mL de capacidade. Posteriormente, adicionou-se cerca de 1,5 g de diazometano dissolvido em éter etílico, para a esterificação dos componentes da fração ácida do óleo de copaíba. O balão foi mantido sob agitação com banho de água a 0 °C. Após a perda da cor amarela intensa da solução de diazometano em éter etílico, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo. O produto de esterificação por diazometano foi analisado por CG-EM e os resultados foram comparados com os existentes nas referências utilizadas.

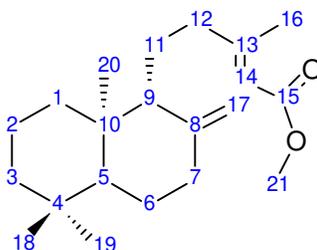
III.2. Isolamento e caracterização do éster metílico do ácido copálico (5-a)

Foram pesados aproximadamente 600 mg da fração ácida do óleo de copaíba esterificada, separados em 5 frascos contendo aproximadamente 120 mg cada. A fração esterificada contida em cada frasco foi dissolvida em uma quantidade mínima de diclorometano, e as mesmas foram aplicadas manualmente em uma placa preparativa de sílica gel. O solvente utilizado na eluição das placas preparativas foi o Hexano:acetato de etila (80:20).

Após a eluição, as placas foram reveladas com luz ultra-violeta e as faixas de interesse marcadas para posterior extração com o solvente clorofórmio:metanol (85:15). A Tabela 131-III mostra os resultados obtidos do isolamento do éster metílico do ácido copálico (5-a), das cinco placas preparativas utilizadas, de acordo com as faixas extraídas. Obteve-se 152,6 mg de 5-a.

Tabela 13-III: Resultados referentes às extrações de 5-a das placas preparativas

<i>Faixa extraída</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Fração percentual (%)</i>	<i>Recuperação em placa (%)</i>
FX 1 (5-a)	152.6	28.95	25.43
FX 2	98.5	18.69	16.42
FX 3	72.2	13.70	12.03
FX 4	60.5	11.48	10.08
restante	143.3	27.19	23.88
total extraída	527.1	100.00	87.85
total aplicada	600	-	100.00



5-a

Tabela 14-III: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

C	^{13}C (δ, ppm)	^1H (δ, ppm)
1	39,01	2,37-0,91, m, 2H
2	19,33	2,37-0,91, m, 2H
3	42,08	2,37-0,91, m, 2H
4	33,55	-
5	55,46	2,37-0,91, m, 1H
6	24,40	2,37-0,91, m, 2H
7	38,25	2,37-0,91, m, 2H
8	148,25	-
9	56,11	2,37-0,91, m, 1H
10	39,64	-
11	21,47	2,37-0,91, m, 2H
12	39,74	2,37-0,91, m, 2H
13	161,11	-
14	114,85	5,61, s, 1H
15	167,25	-
16	18,84	2,12, s, 3H
17	106,30	4,45, s, 1H, 476, s, 1H
18	33,55	0,83, s, 3H
19	21,67	0,76, s, 3H
20	14,42	0,64, s, 3H
21	50,69	3,64, s, 3H

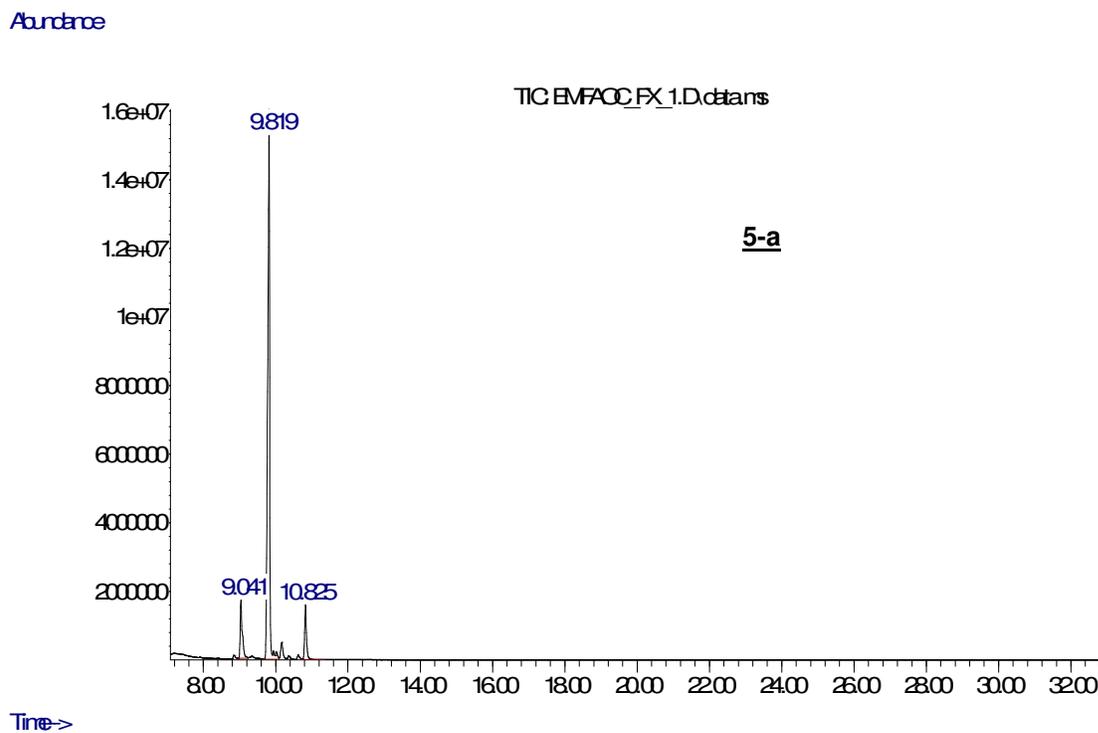


Figura 74-III: Cromatograma total de íons do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

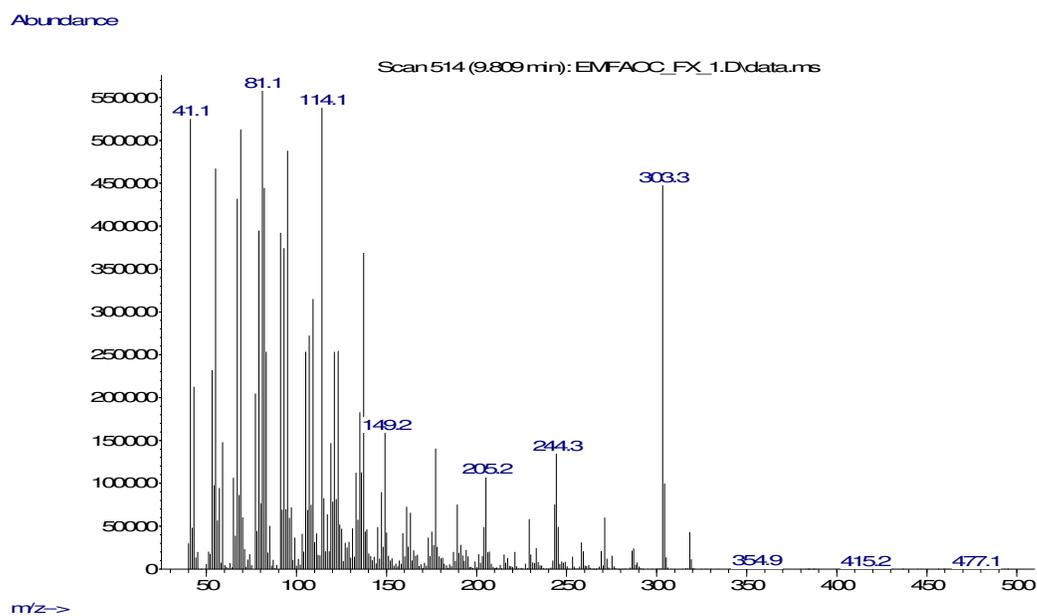


Figura 75-III: Espectro de massas do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

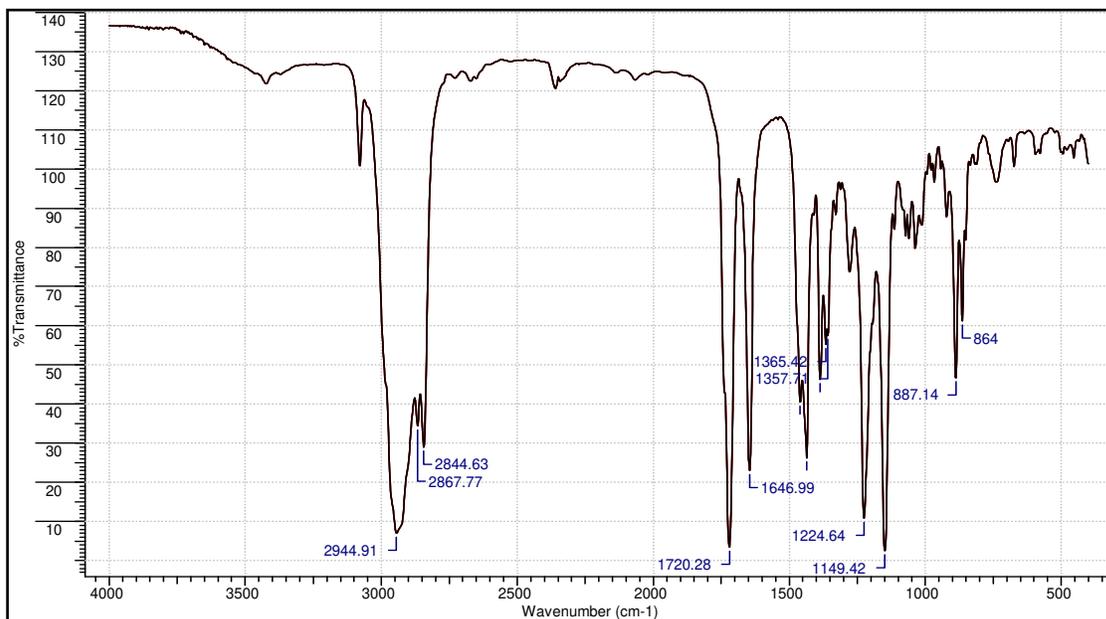


Figura 76-III: Espectro de absorção na região do infravermelho do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

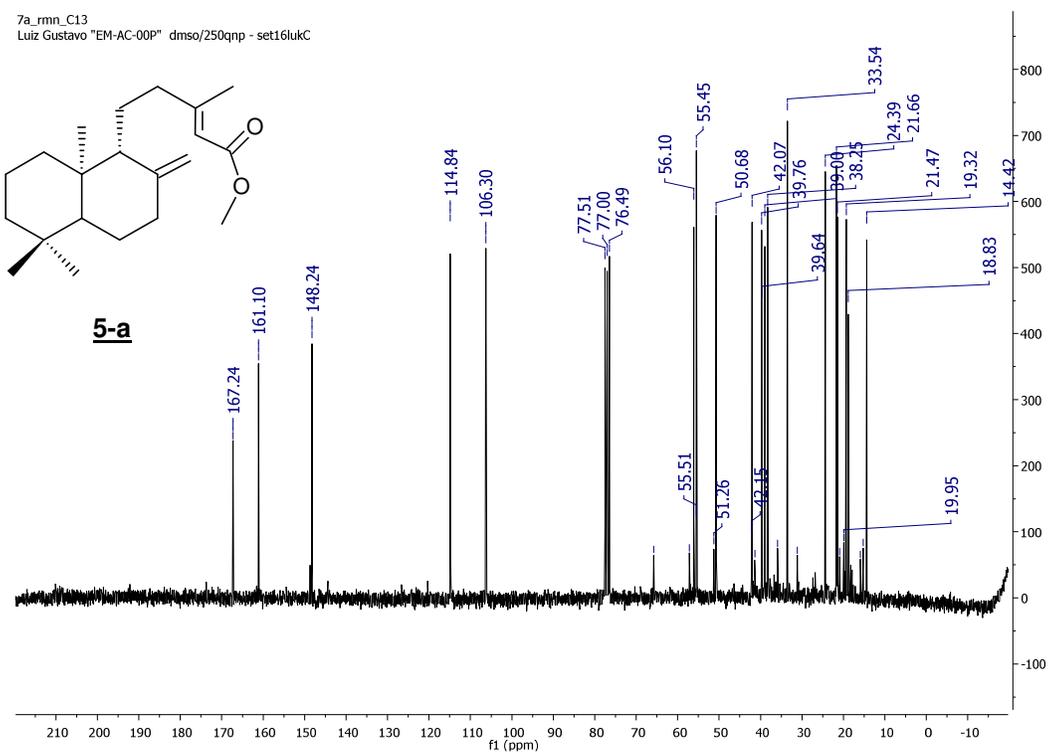


Figura 77-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

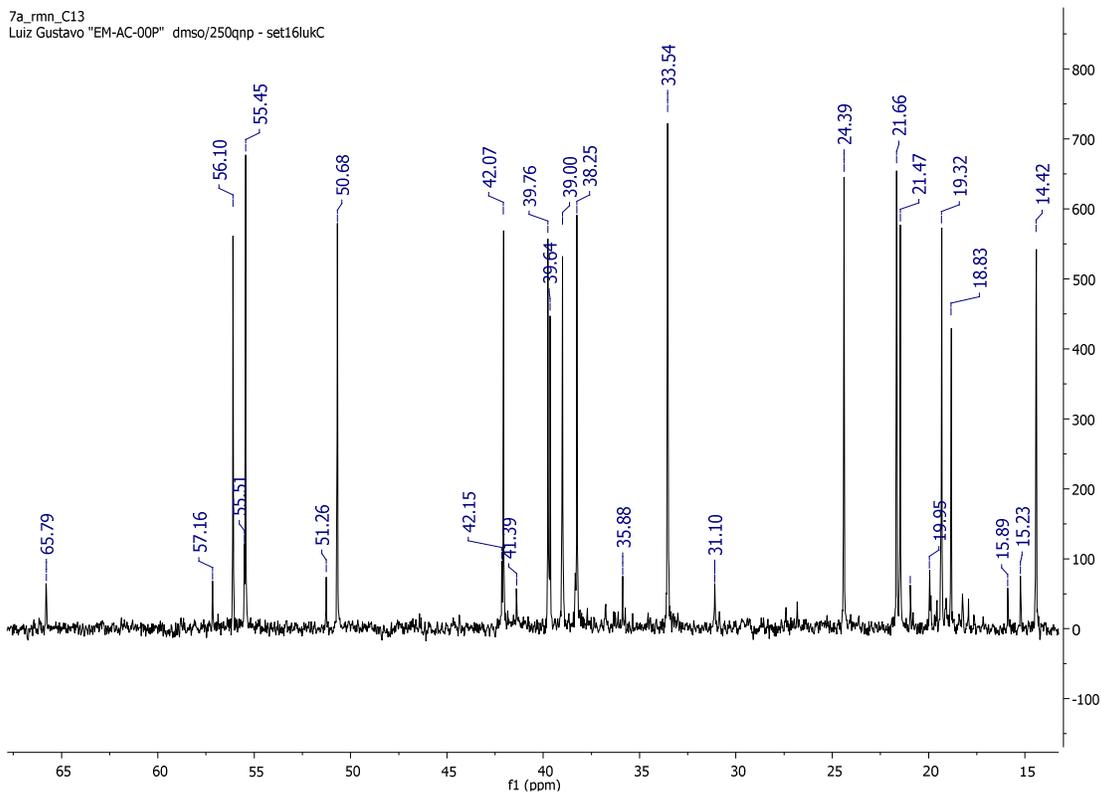


Figura 78-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (**5-a**) ampliado na faixa entre 15 e 70 ppm.

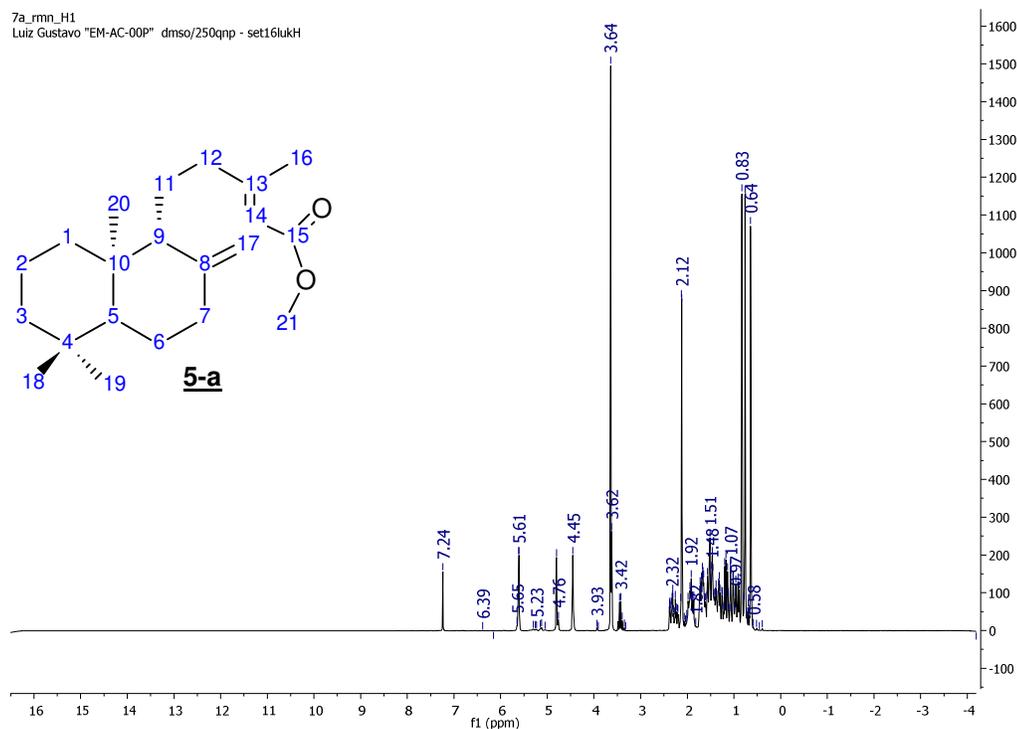


Figura 79-III: Espectro de RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

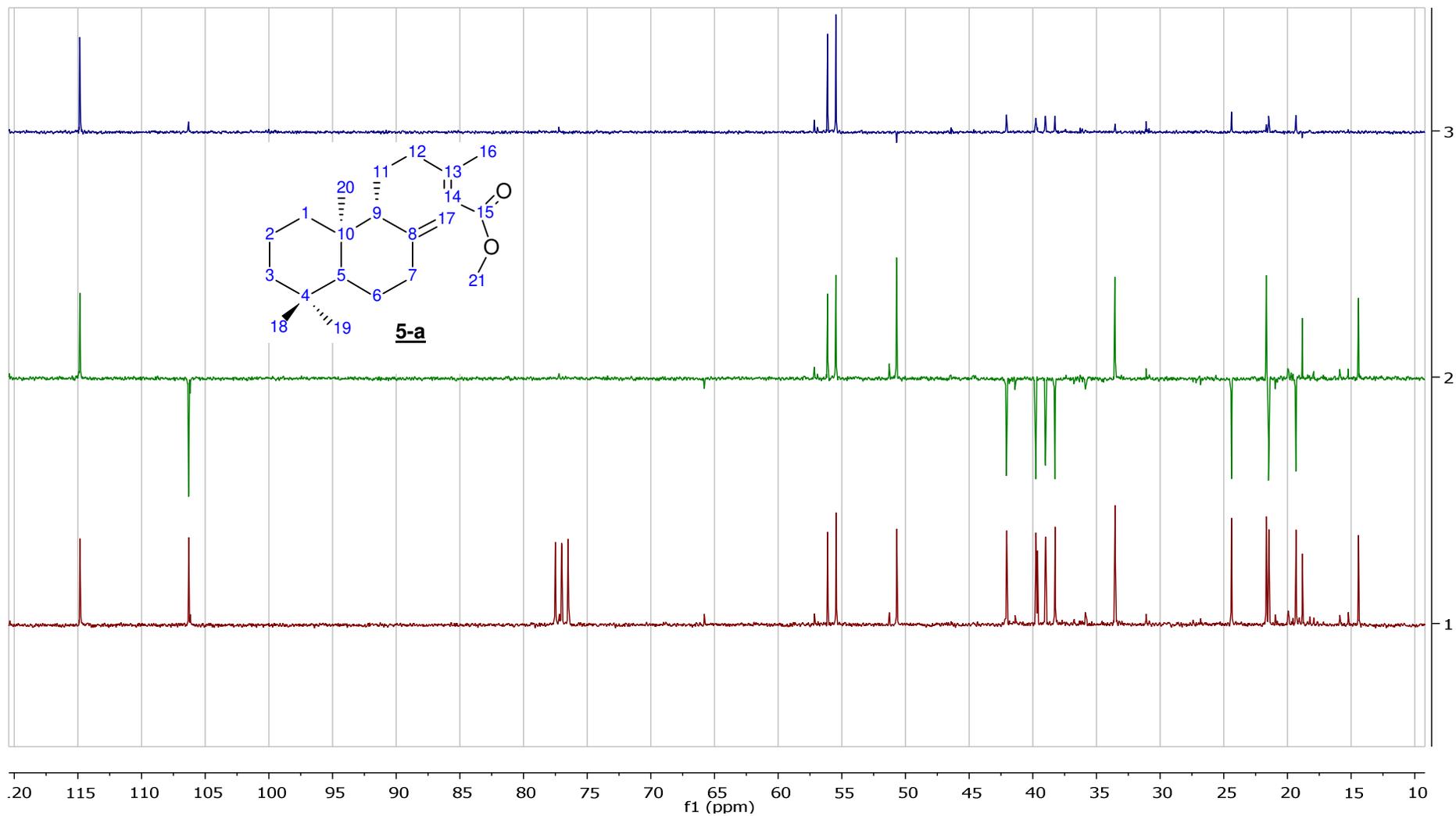
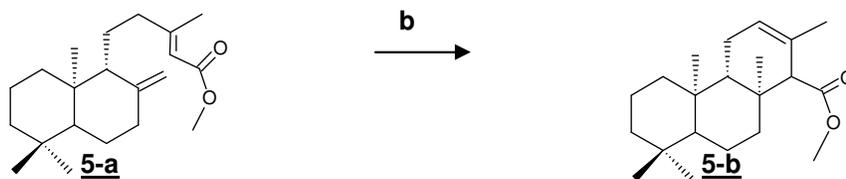


Figura 80-III: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do éster metílico do ácido copálico (**5-a**).

III.3. Preparação e caracterização do 12-isocopalen-15-oato de metila (**5-b**)



(b) HCOOH (95%), 80°C, 4h (43%)

Esquema 15-III: Preparação do 12-isocopalen-15-oato de metila (**5-b**).

Aproximadamente 140 mg de **5-a** foi dissolvido em 10 mL de ácido fórmico 99% e acondicionado em balão de fundo redondo de 100mL de capacidade. Foi acoplado um condensador de bolas ao balão e a mistura reacional foi levada a um banho de silicone à 70-80°C. A mistura foi mantida sob refluxo por um período de 4 horas.

Após o refluxo, foi evaporado o máximo de ácido fórmico possível, em evaporador rotativo. À mistura remanescente no balão, foram adicionados 5 mL de uma solução aquosa de KOH 10% e 5 mL de metanol. A mistura reacional foi submetida por mais 4 horas de refluxo.

Posteriormente, o metanol foi evaporado em evaporador rotativo. À solução aquosa remanescente, foram adicionadas três porções de 20 mL de éter etílico para extração do composto de interesse. As fases etéreas foram reunidas e lavadas com solução saturada de NaCl. Após as lavagens, a fração etérea foi seca, sob Na₂SO₄ anidro e, posteriormente, evaporada em evaporador rotativo. Após a evaporação do éter etílico, foram adicionados aproximadamente 10 mL de metanol. Posteriormente, a maior parte do metanol adicionado foi evaporado, restando aproximadamente de 3 a 5 gotas do mesmo no balão. Esperou-se o metanol evaporar lentamente, para que ocorresse a cristalização lenta do produto de ciclização, que apresentou-se como pequenos cristais incolores, com massa de aproximadamente 60 mg, correspondente a um rendimento de aproximadamente 43%.

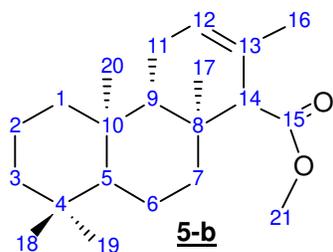


Tabela 15-III: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopalen-15-oato de metila (**5-b**).

C	^{13}C (δ , ppm)
1	39,85
2	18,58
3	41,84
4	33,12
5	56,45
6	18,45
7	41,81
8	36,44
9	54,29
10	37,36
11	22,64
12	123,98
13	128,95
14	62,56
15	173,31
16	21,16
17	15,50
18	33,37
19	21,64
20	15,72
21	50,92

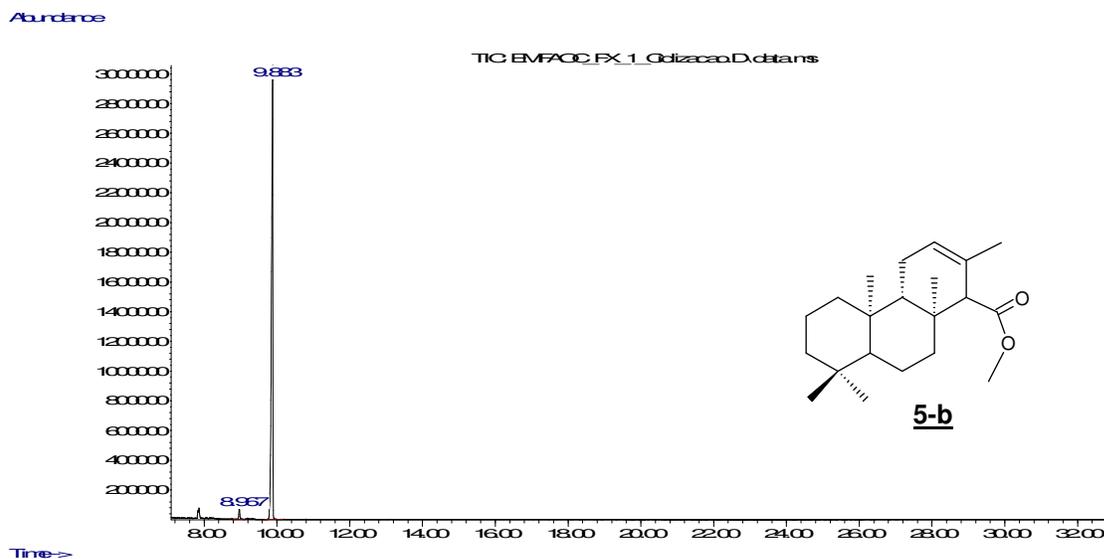


Figura 81-III: Cromatograma total de íons do 12-isocopalen-15-oato de metila (**5-b**).

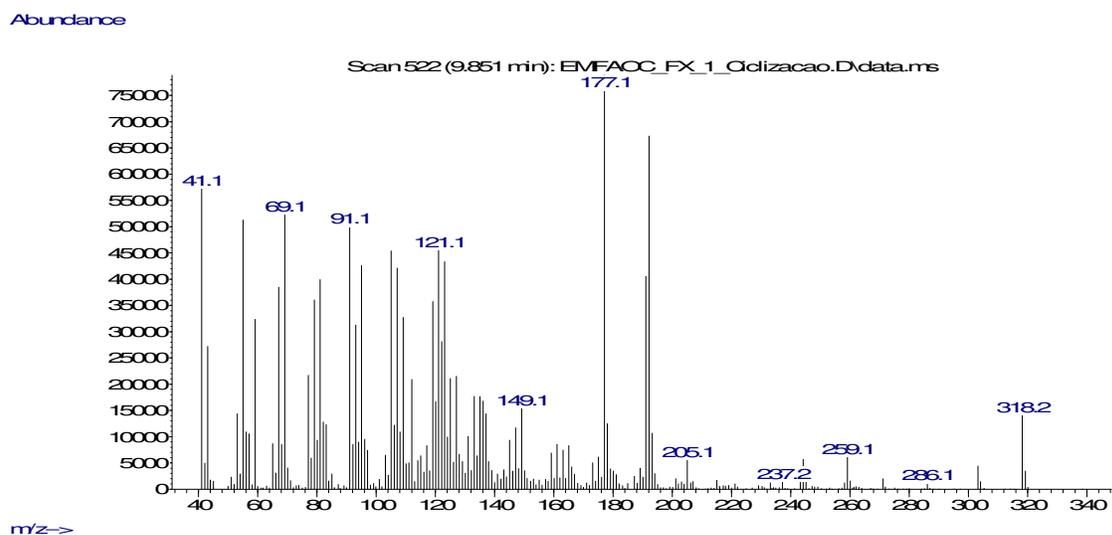


Figura 82-III: Espectro de massas do 12-isocopalen-15-oato de metila (**5-b**).

7b_rmn_C13
Luiz Gustavo "EMFAOC-FX1-CICL" cdcl3/250mhz dez07lukC

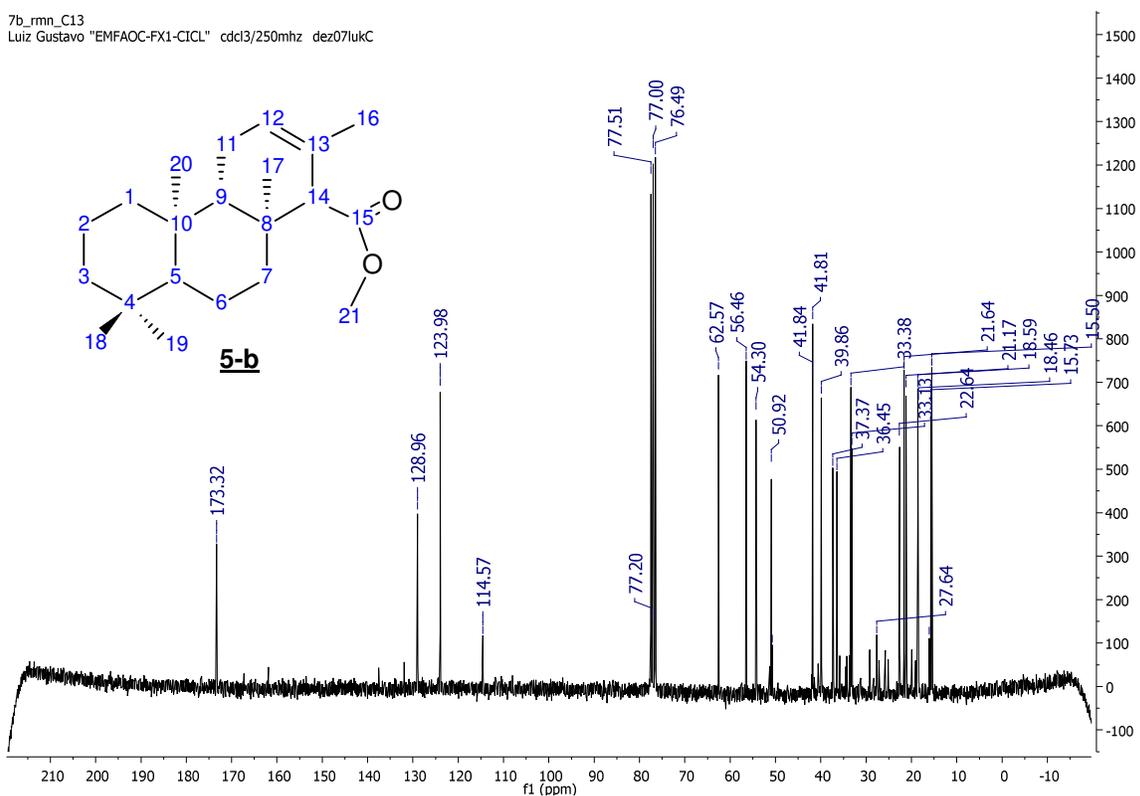


Figura 83-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopaleno-15-oato de metila (**5-b**).

7b_rmn_C13
Luiz Gustavo "EMFAOC-FX1-CICL" cdcl3/250mhz dez07lukC

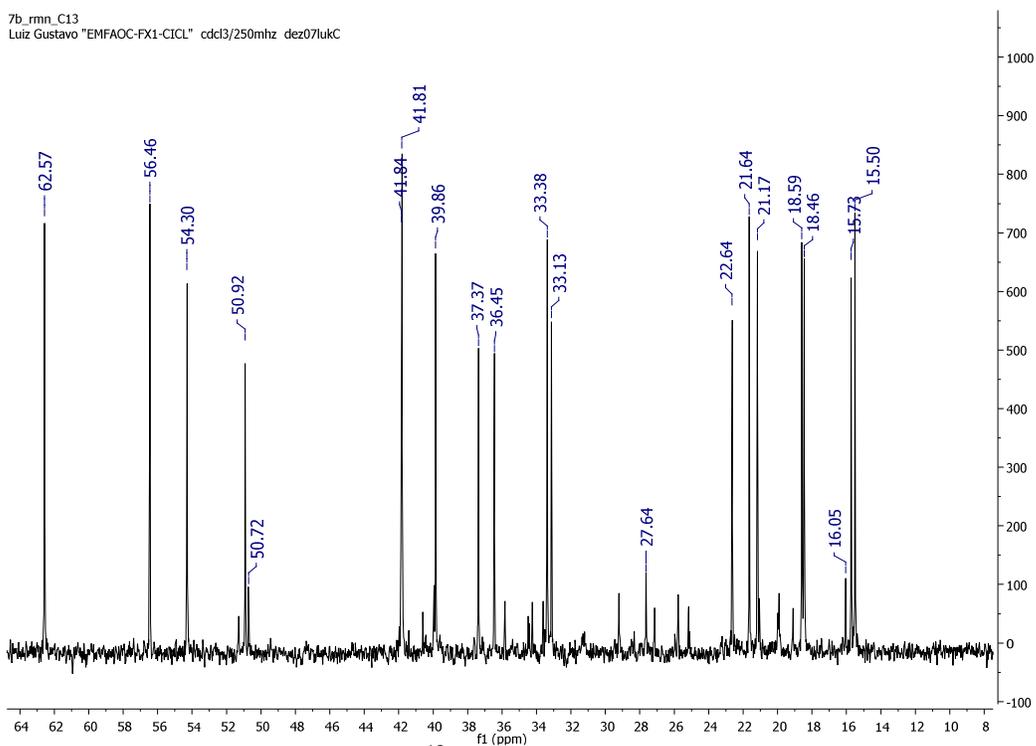


Figura 84-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopaleno-15-oato de metila (**5-b**) ampliado na faixa entre 8 e 65 ppm.

7b_rmn_H
Luiz Gustavo "EMFAOC-FX1-CICL" cdc13/250mhz dez07lukH

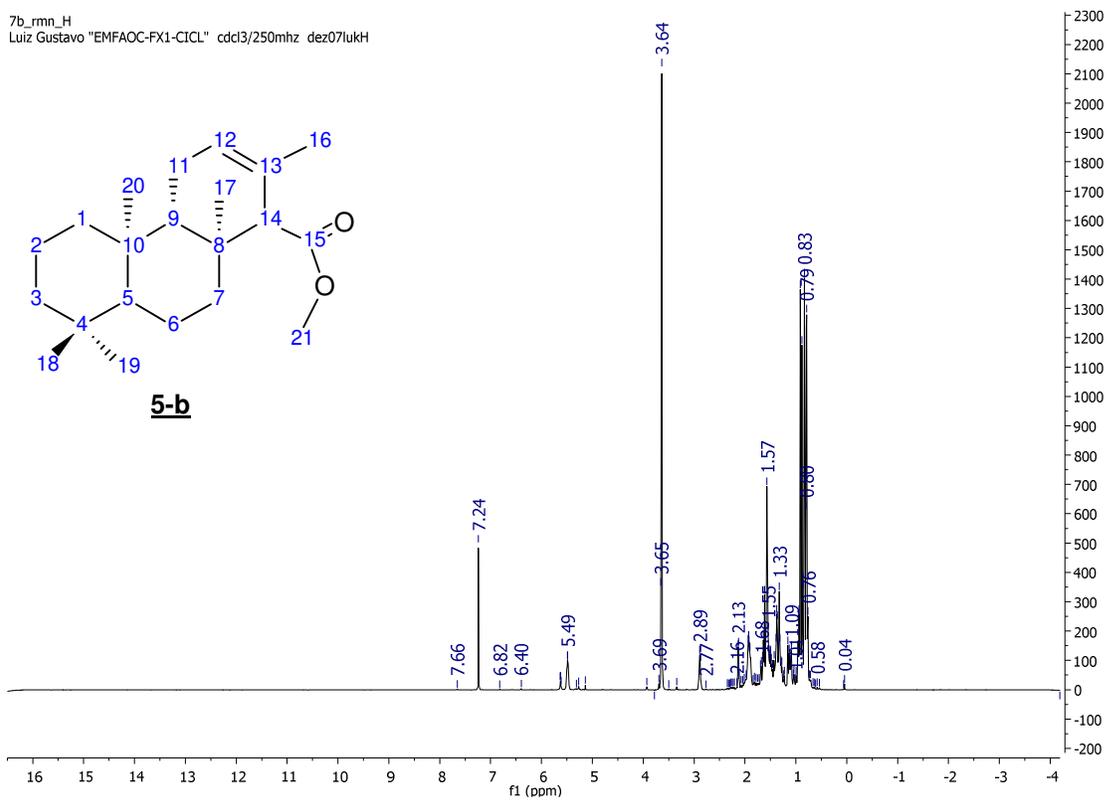


Figura 85-III: Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 12-isocopaleno-15-ato de metila (**5-b**).

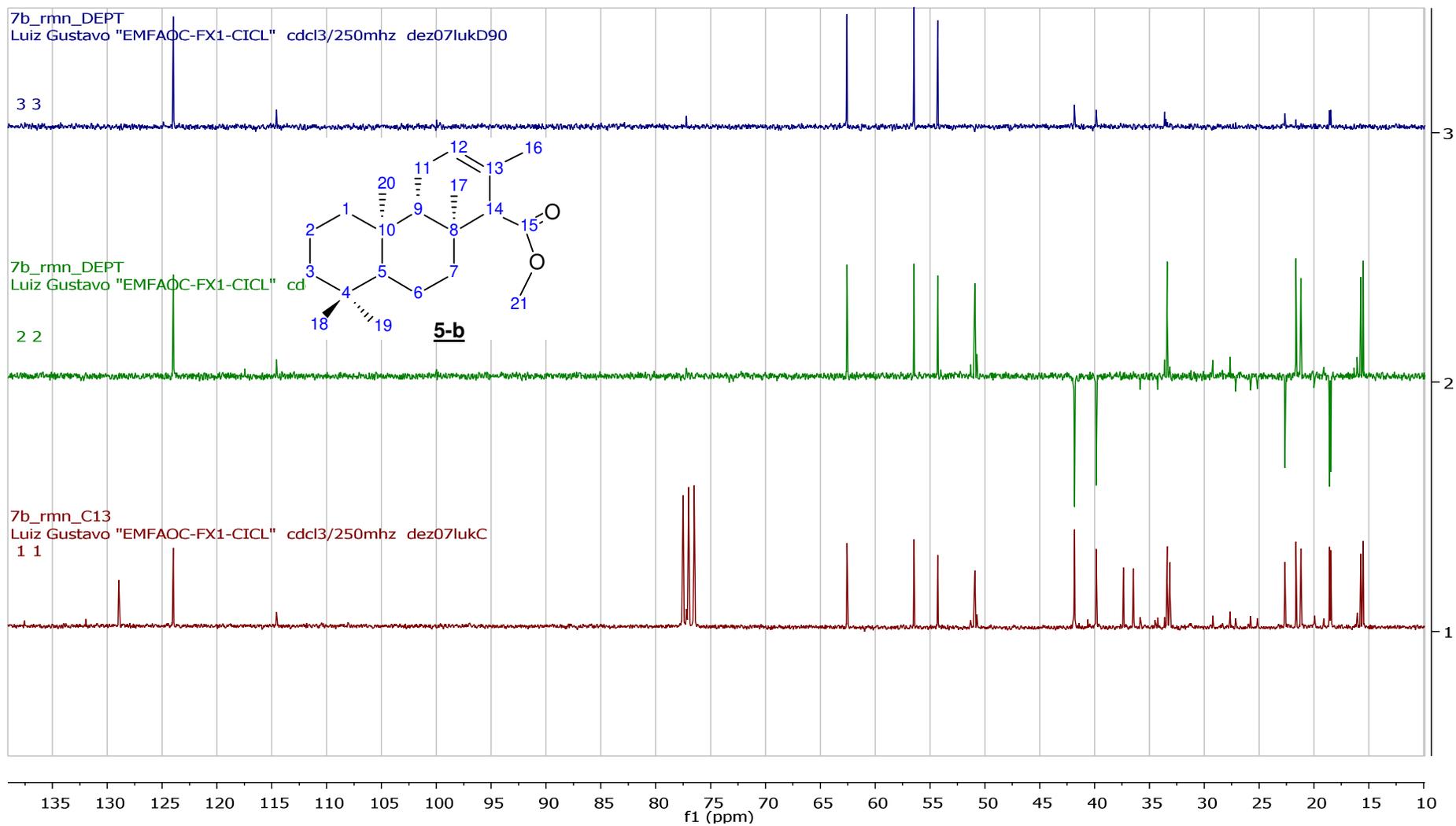
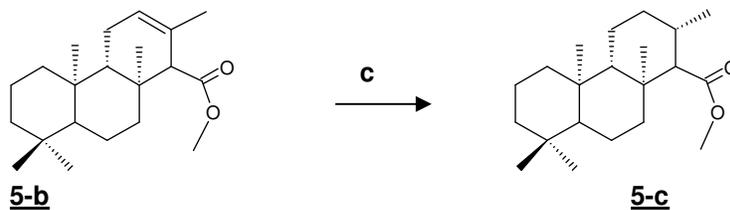


Figura 86-III: Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 e 90 (62,5 MHz, CDCl_3) do 12-isocopalen-15-oato de metila (**5-b**).

III.4. Preparação e caracterização de 15-isocopalanoato de metila (5-c)



(c) H₂, Rh/alumina 5%, 65 psi, 16h (92%)

Esquema 16-III: Preparação do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

Foram dissolvidos 175 mg de **5-b** em aproximadamente 20 mL de etanol 99%, e posteriormente a solução foi acondicionada em frasco reacional adequado. Foram adicionadas, aproximadamente, cinco pontas de espátula do catalisador Rh/alumina 5% m/m. O frasco reacional foi acoplado a um hidrogenador Parr, com pressão de 65 psi. Ligou-se o sistema de hidrogenação, mantendo-se a reação por um período de aproximadamente 16 horas.

Após o período de reação, a mistura foi filtrada em coluna de sílica gel comum, para remoção do catalisador. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de hexano:acetato de etila (75:25) para garantir a extração da maior parte do produto de reação. O produto **5-c** foi recuperado ao final fornecendo uma massa de aproximadamente 150 mg.

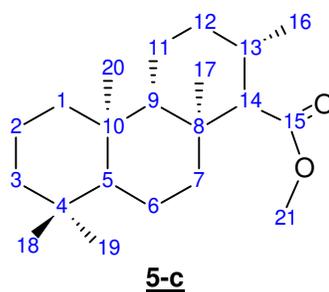


Tabela 16-III: Atribuições de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

C	^{13}C (δ, ppm)
1	40,08
2	16,40
3	42,36
4	33,55
5	57,08
6	18,81
7	41,53
8	37,87
9	59,98
10	38,09
11	18,10
12	34,26
13	31,45
14	60,79
15	174,55
16	17,53
17	16,50
18	33,56
19	21,63
20	17,30
21	50,94

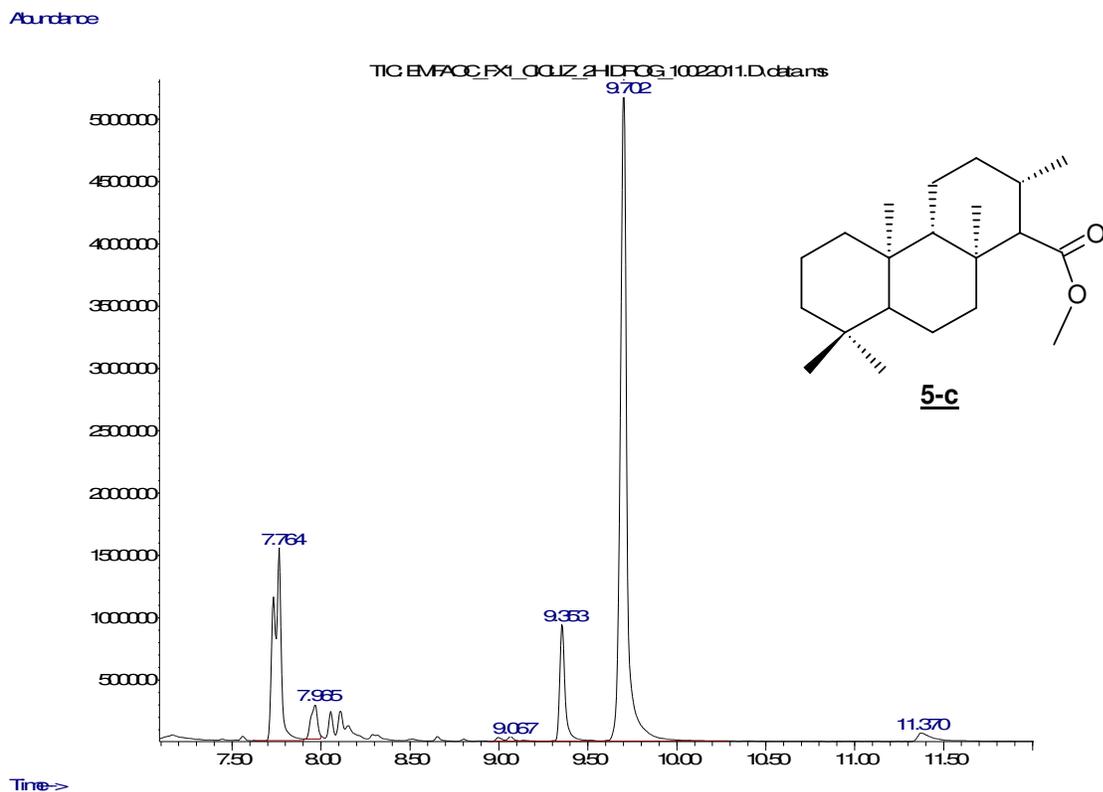


Figura 87-III: Cromatograma total de íons do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

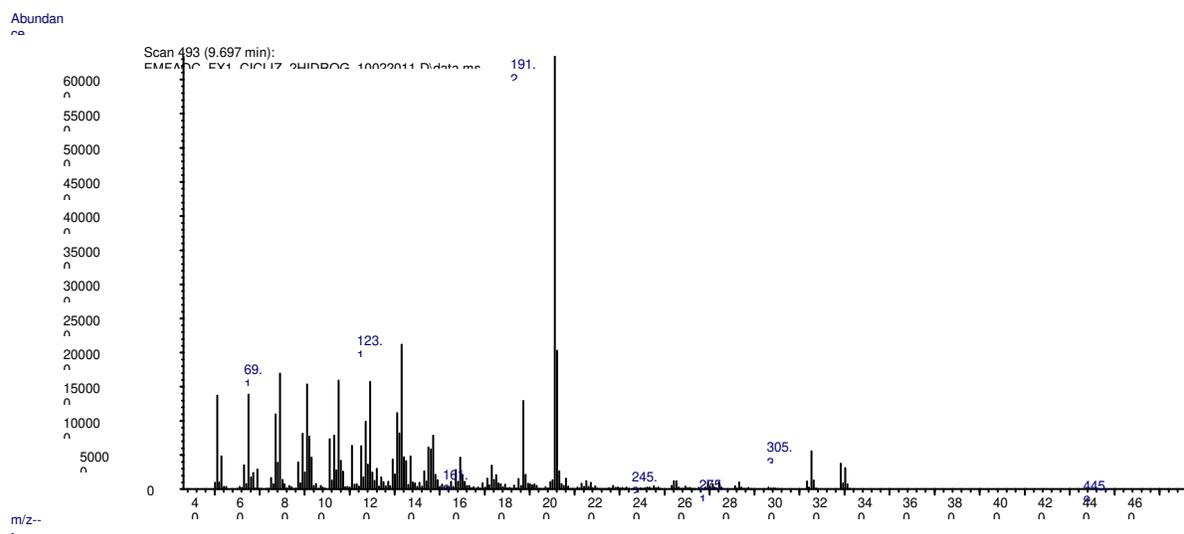


Figura 88-III: Espectro de massas do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

7c_rmn_C13
Luis Gustavo E-FX1-C-2H-P-FX1 cdcl3/bbsw fev21lukC

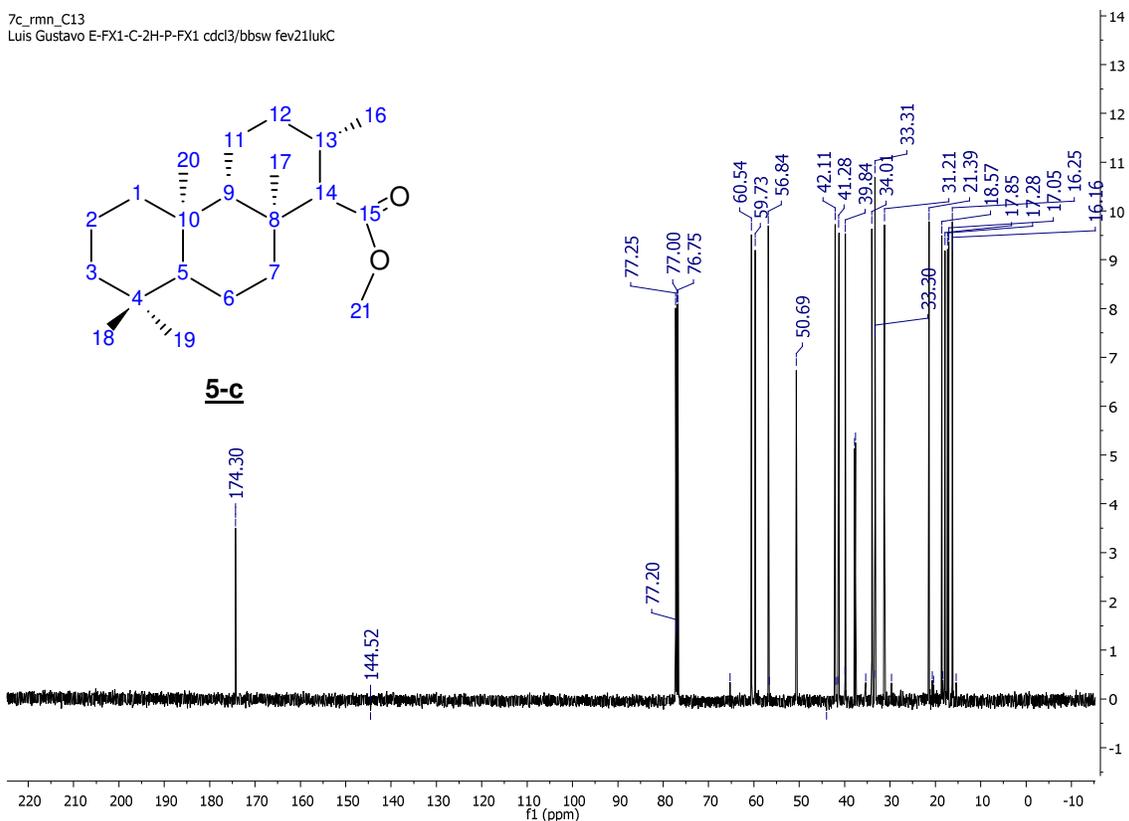


Figura 89-III: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

7c_rmn_C13
Luis Gustavo E-FX1-C-2H-P-FX1 cdcl3/bbsw fev21lukC

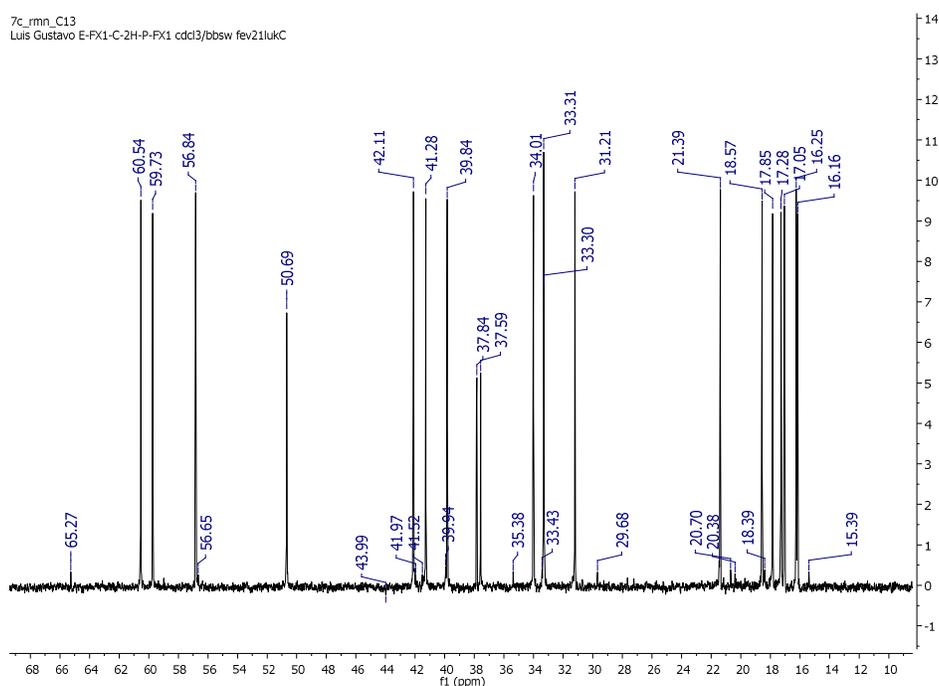


Figura 90-III: Espectro de RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**) ampliado na faixa entre 10 e 70 ppm.

7c_rmn_H1
Luis Gustavo E-FX1-C-2H-P-FX1 cdc13/bbsw fev21lukH

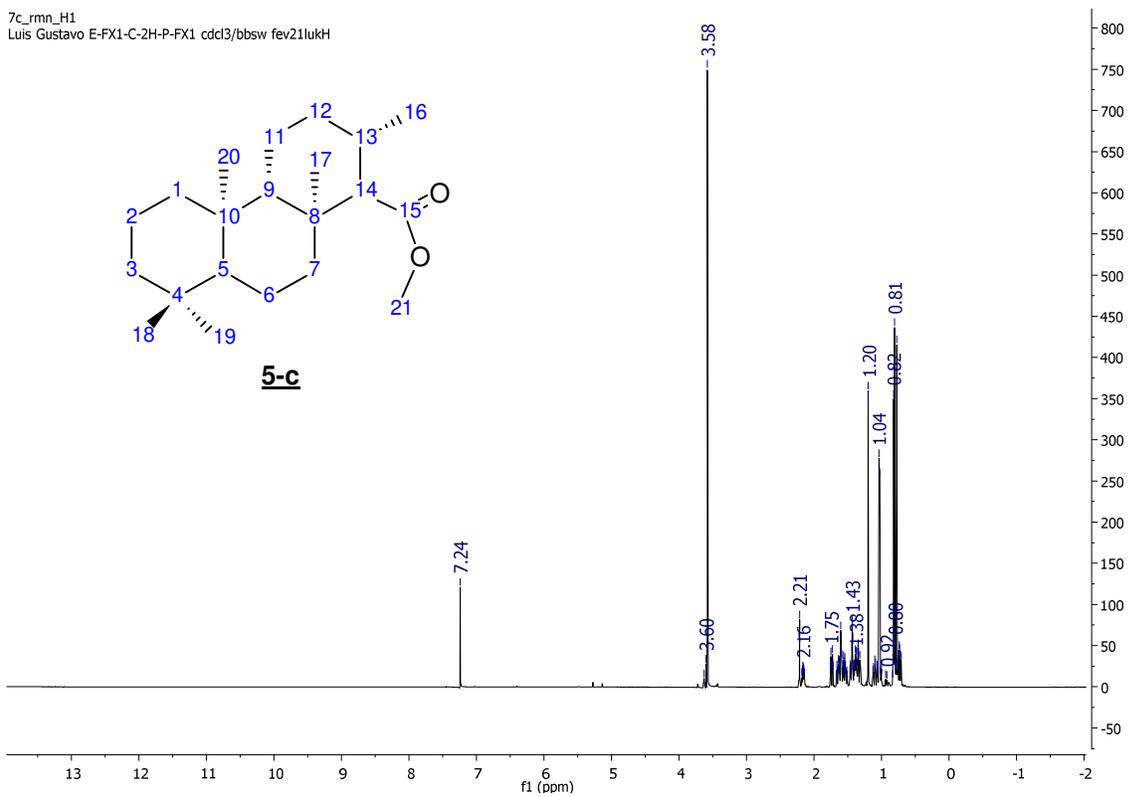


Figura 91-III: Espectro de RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

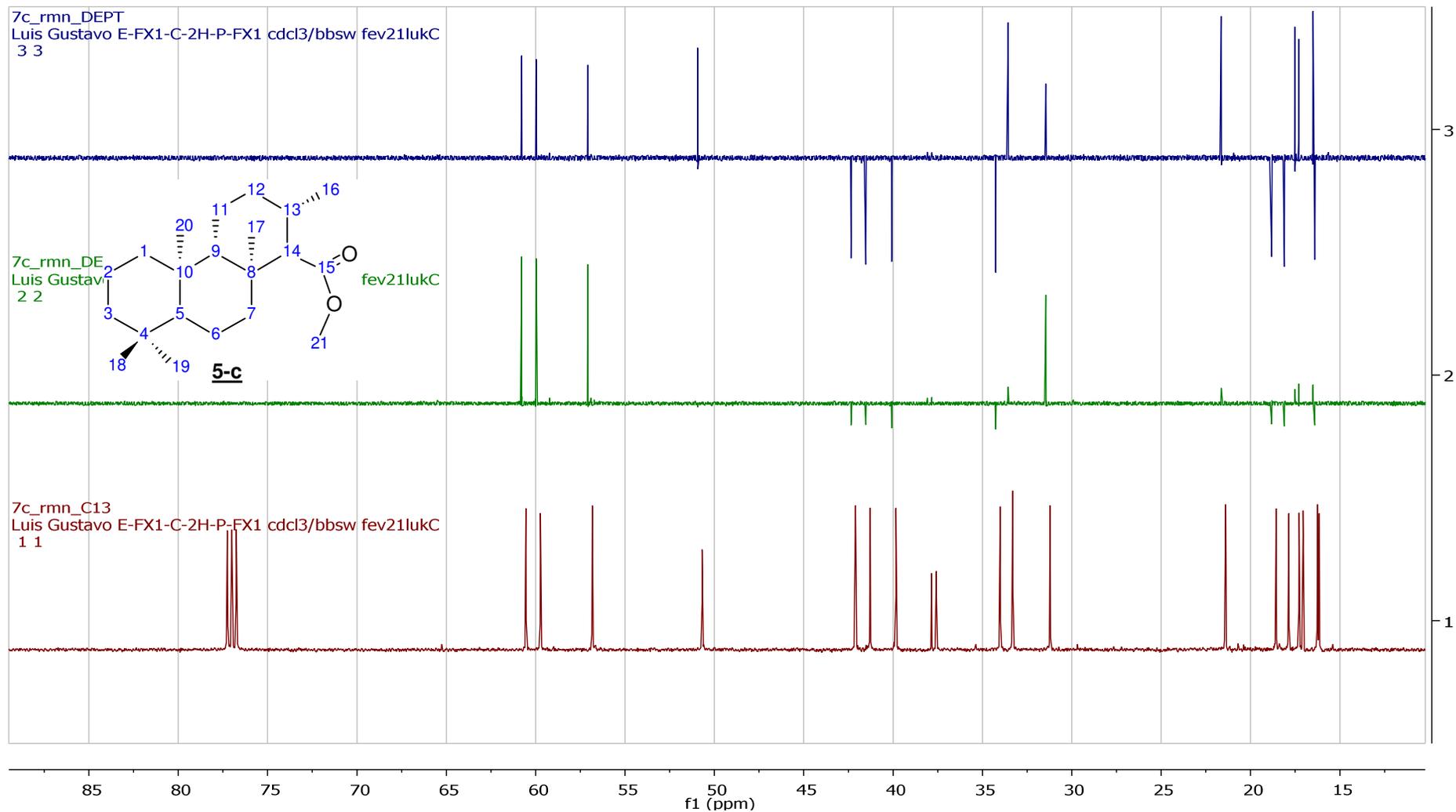
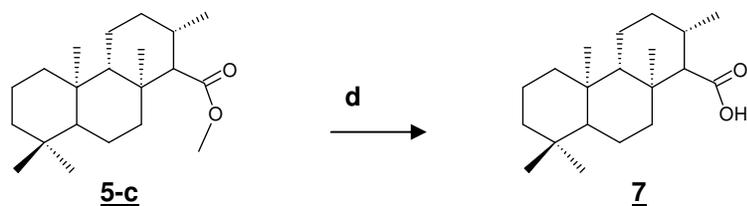


Figura 92-III: Espectro de RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) do 15-isocopalanoato de metila (**5-c**).

III.5. Preparação do ácido 15-isocopálico (7)

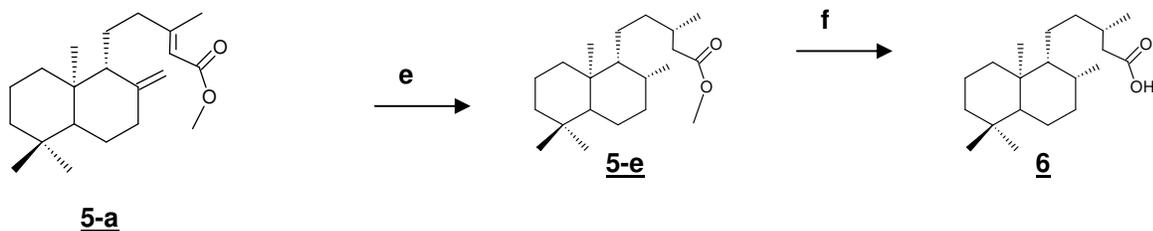


(d) KOH/MeOH 10%, refluxo, 10h (10%)

Esquema 17-III: Preparação do ácido 15-isocopálico (7).

A última etapa dessa rota sintética foi uma reação de hidrólise básica do éster metílico do ácido 15-isocopálico (5-c), de modo a fornecer o biomarcador ácido proposto. Foi uma reação difícil de ser realizada em função do arcabouço estrutural da molécula. O produto desejado (7) foi obtido em pequena quantidade, sendo o mesmo caracterizado até o momento apenas no Orbitrap e os resultados foram apresentados no item 4.5 do capítulo 4 da tese.

III.6. Preparação do ácido 8,13-tetraidrocopálico (6)



(e) H₂, Pd-C 30%, 65 psi, 2h, (f) KOH/MeOH 10%, refluxo, 5h

Esquema 18-III: Preparação do ácido tetraidrocopálico (6).

O produto 6 também foi obtido em pequena quantidade após hidrólise em meio básico do éster metílico do ácido 8,13-tetraidrocopálico (5-e), o qual foi preparado através da hidrogenação direta de 5-a. Até o presente momento o produto 6 foi caracterizado apenas utilizando-se o Orbitrap e os resultados foram apresentados no item 4.5 do capítulo 4 da tese.

ANEXO IV

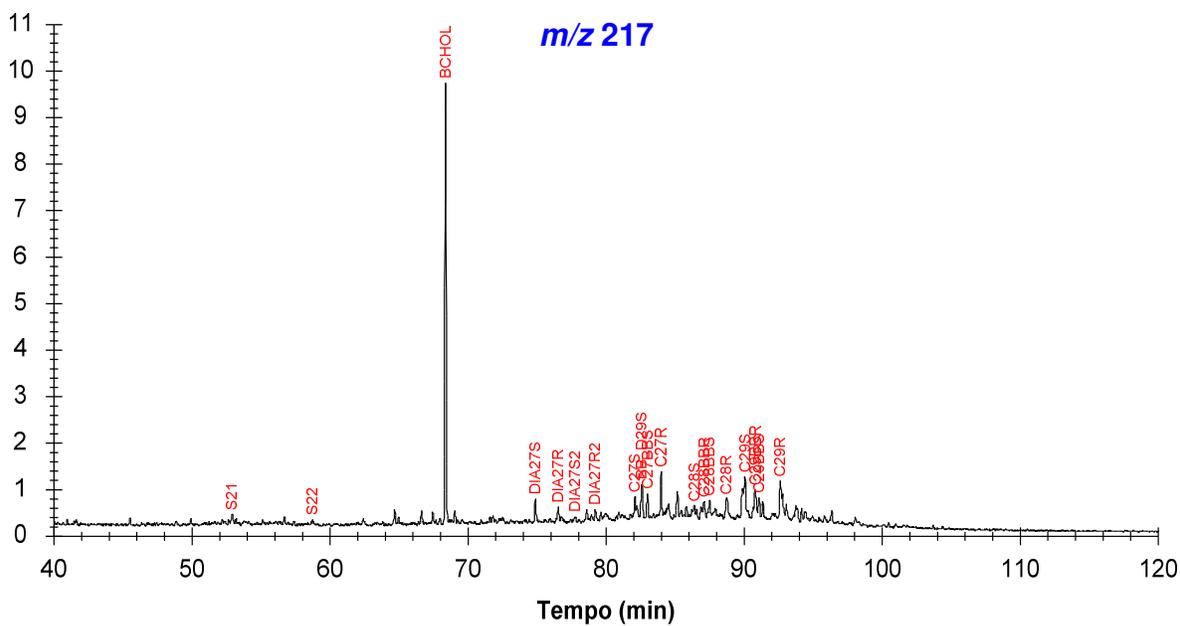
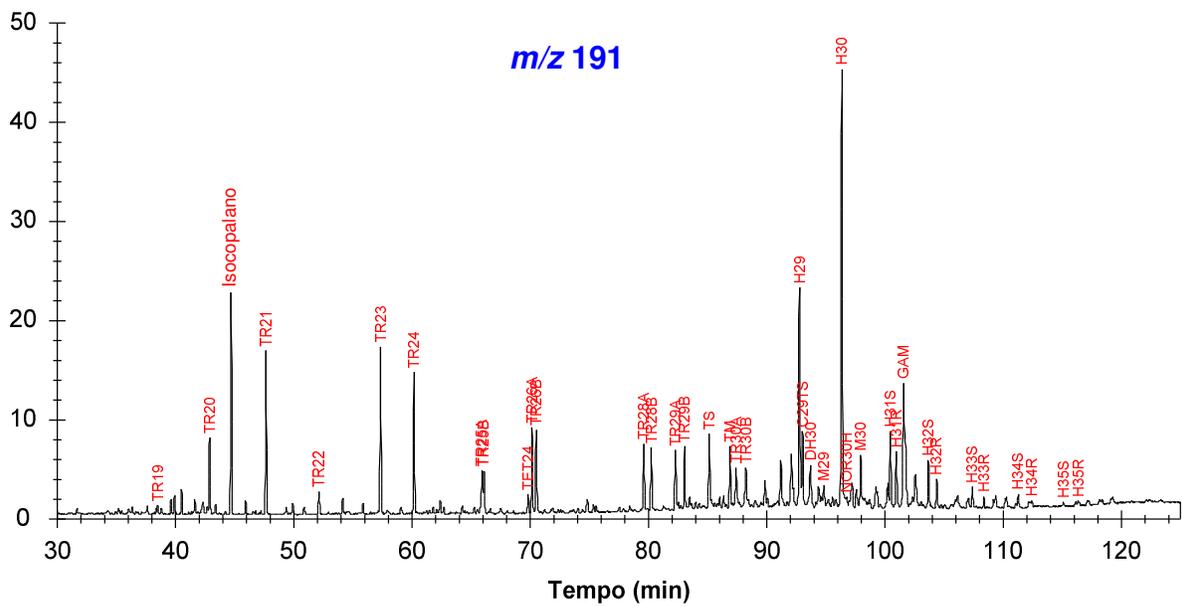


Figura 93-IV: Cromatogramas de íons de m/z 191 (terpanos) e m/z 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra LC-1.

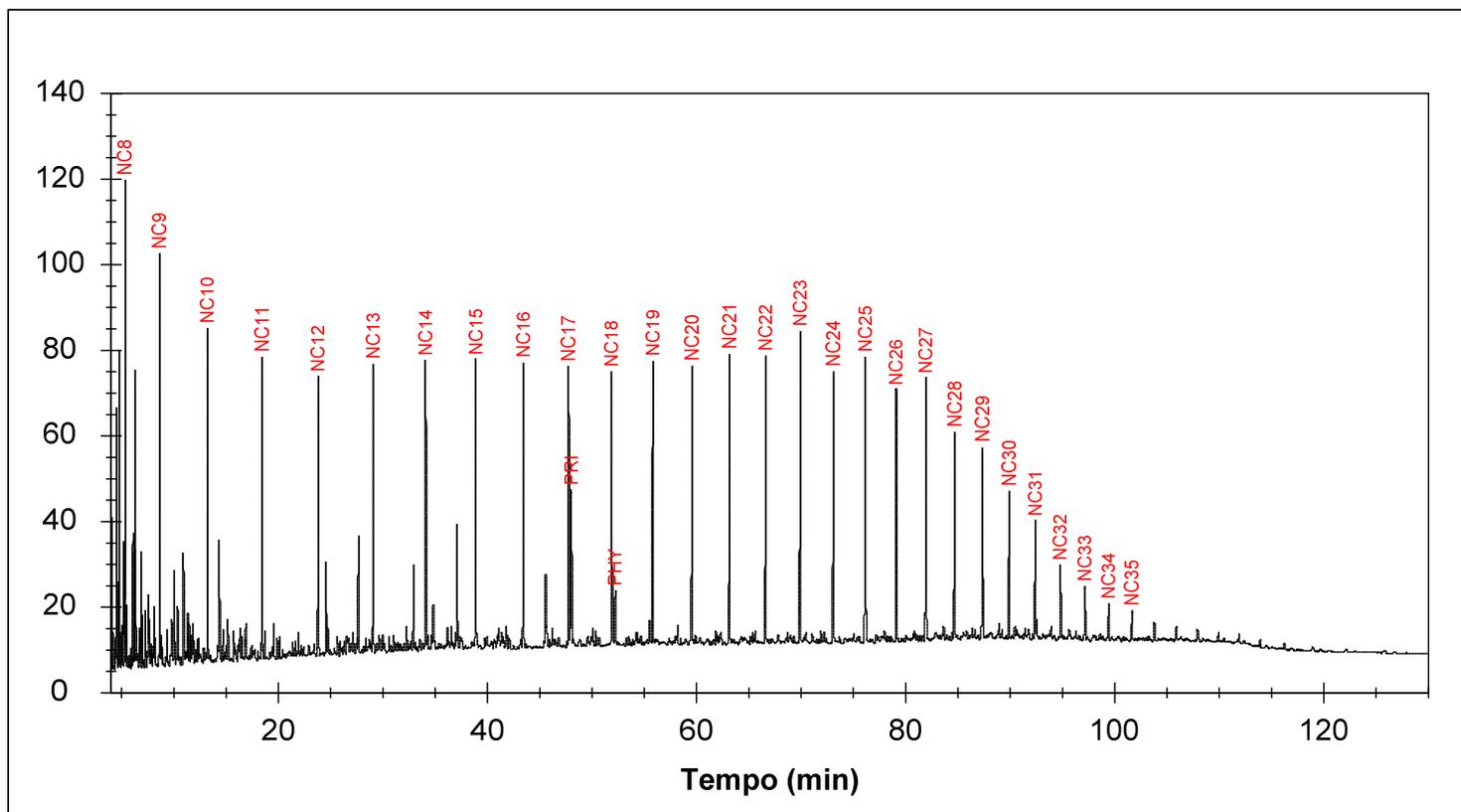


Figura 94-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total LC-1.

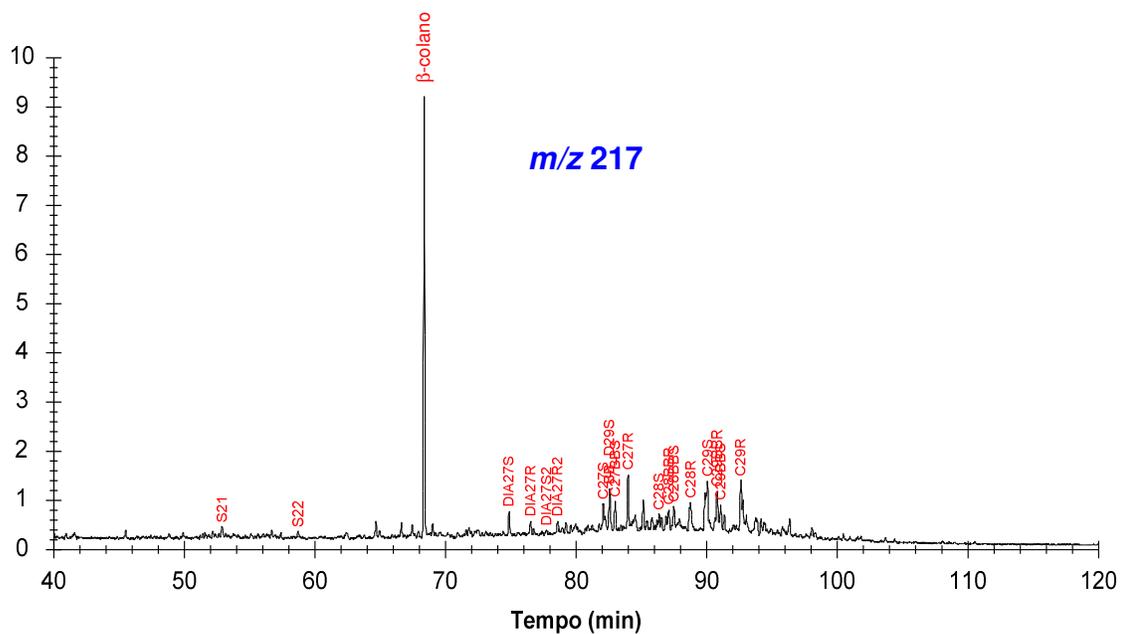
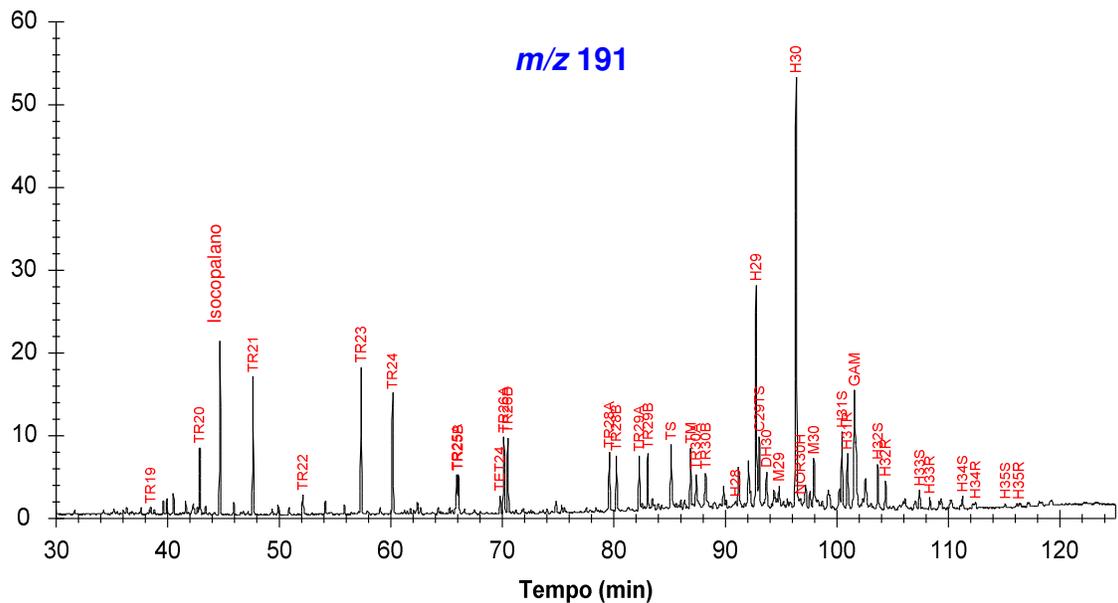


Figura 95-IV: Cromatogramas de íons de m/z 191 (terpanos) e m/z 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra **LC-2**.

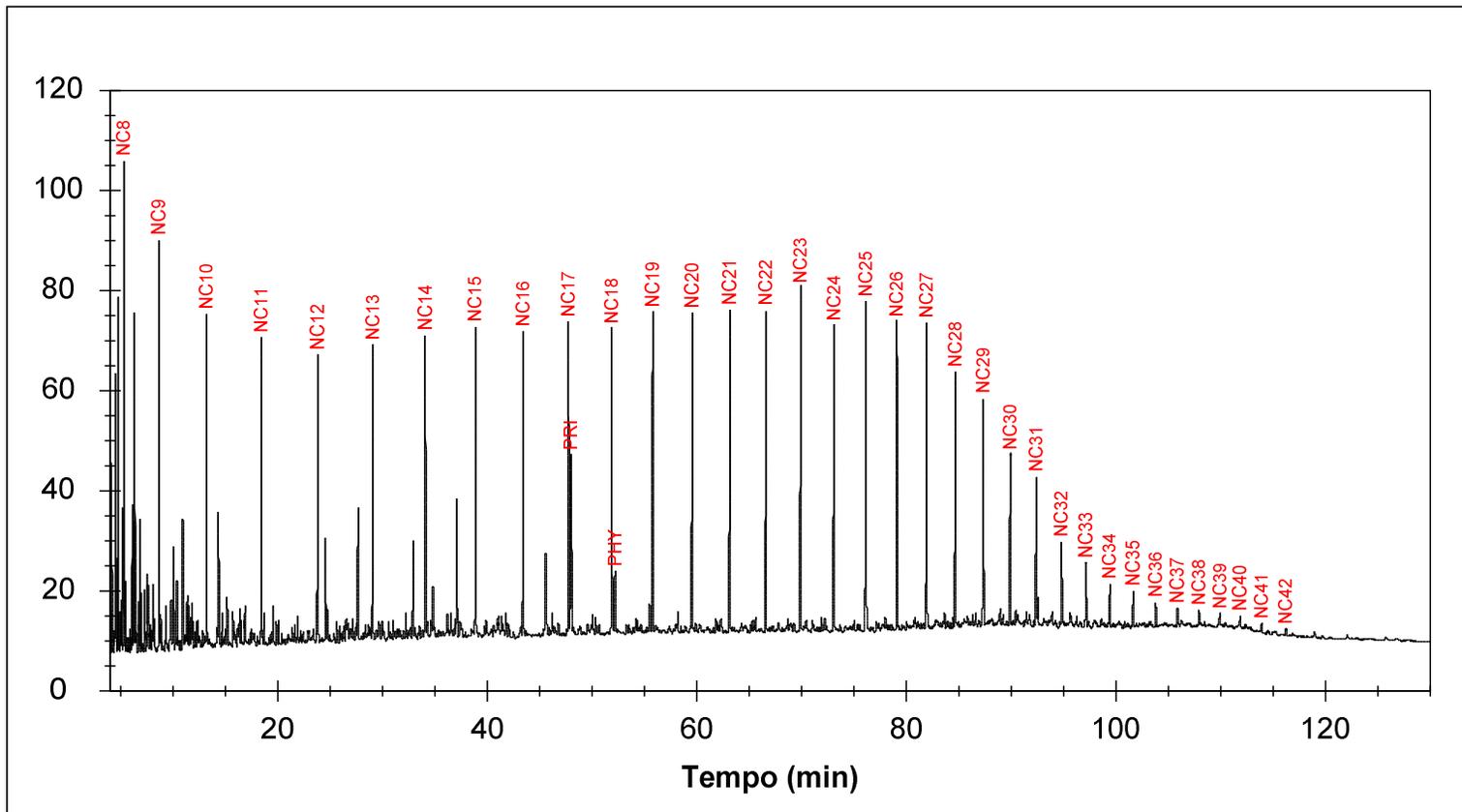


Figura 96-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total LC-2.

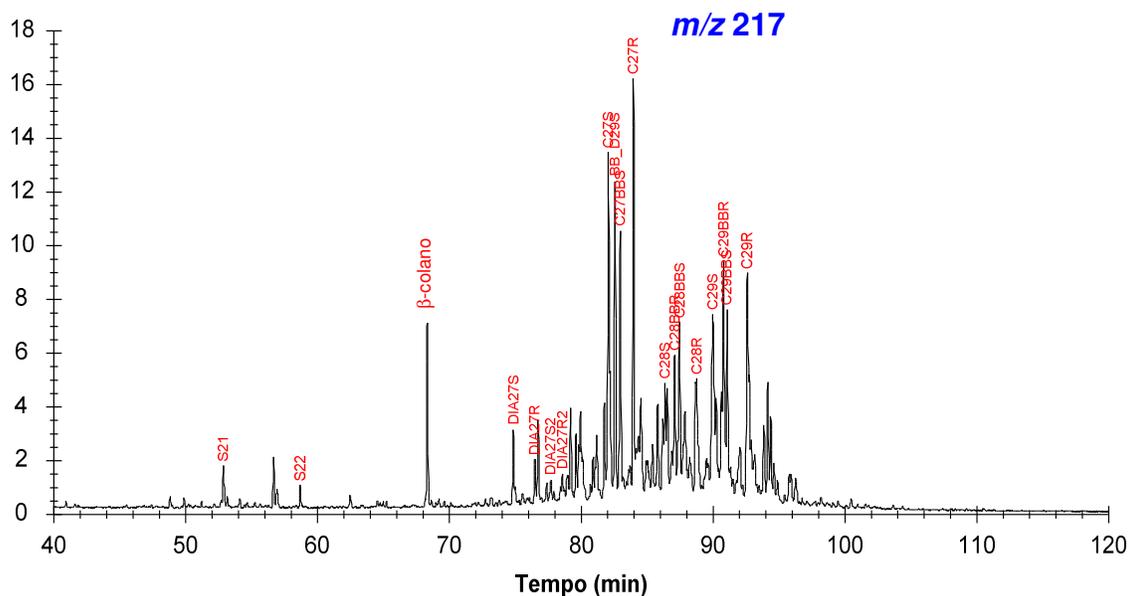
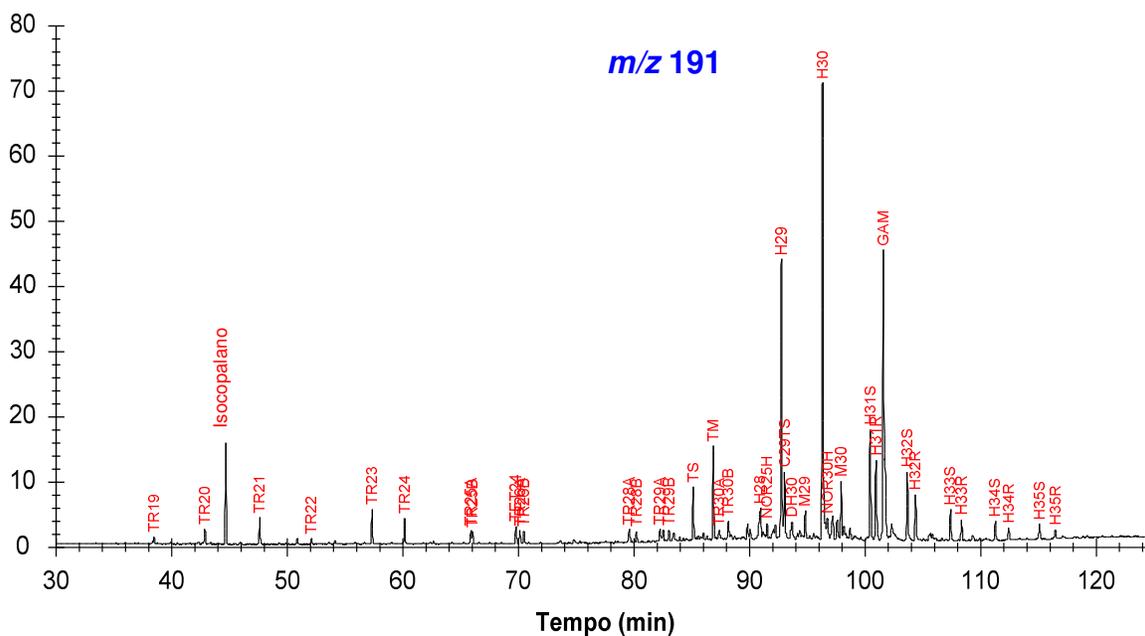


Figura 97-IV: Cromatogramas de íons de m/z 191 (terpanos) e m/z 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra **M-1**.

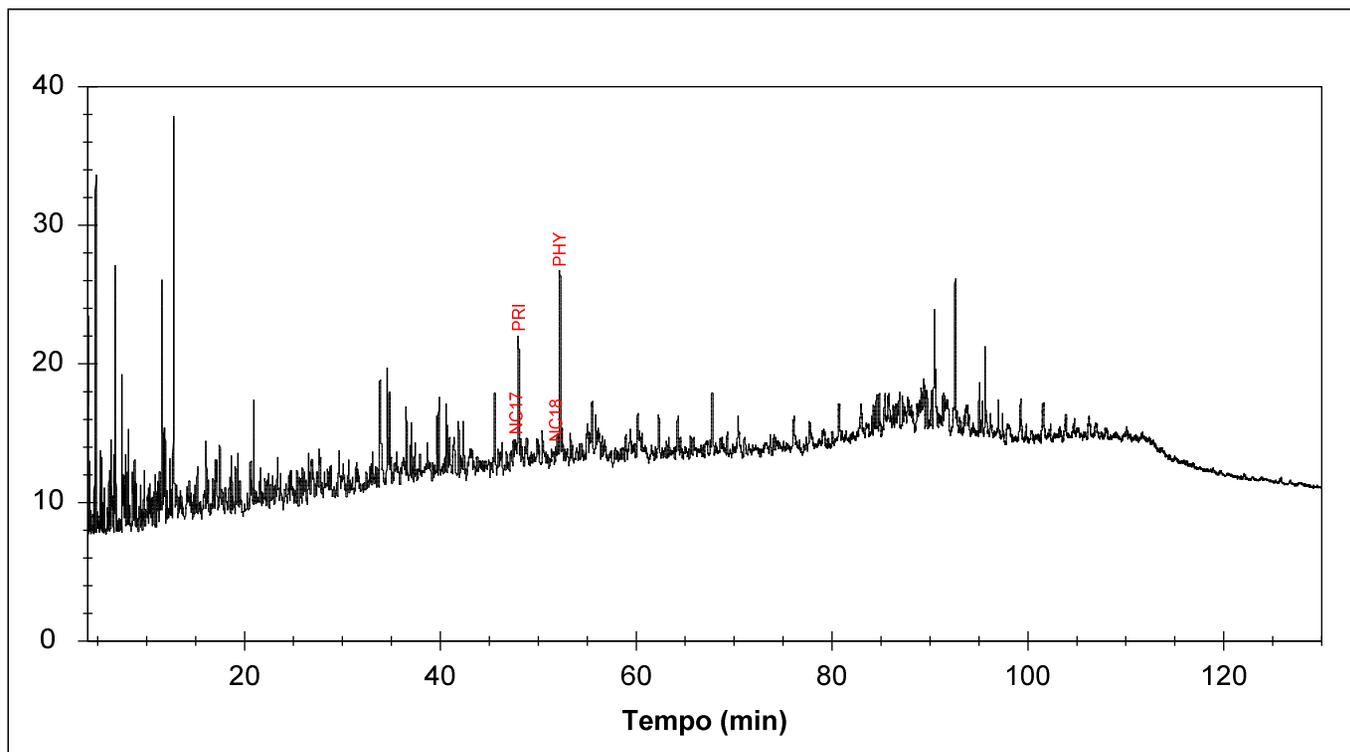


Figura 98-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total **M-1**.

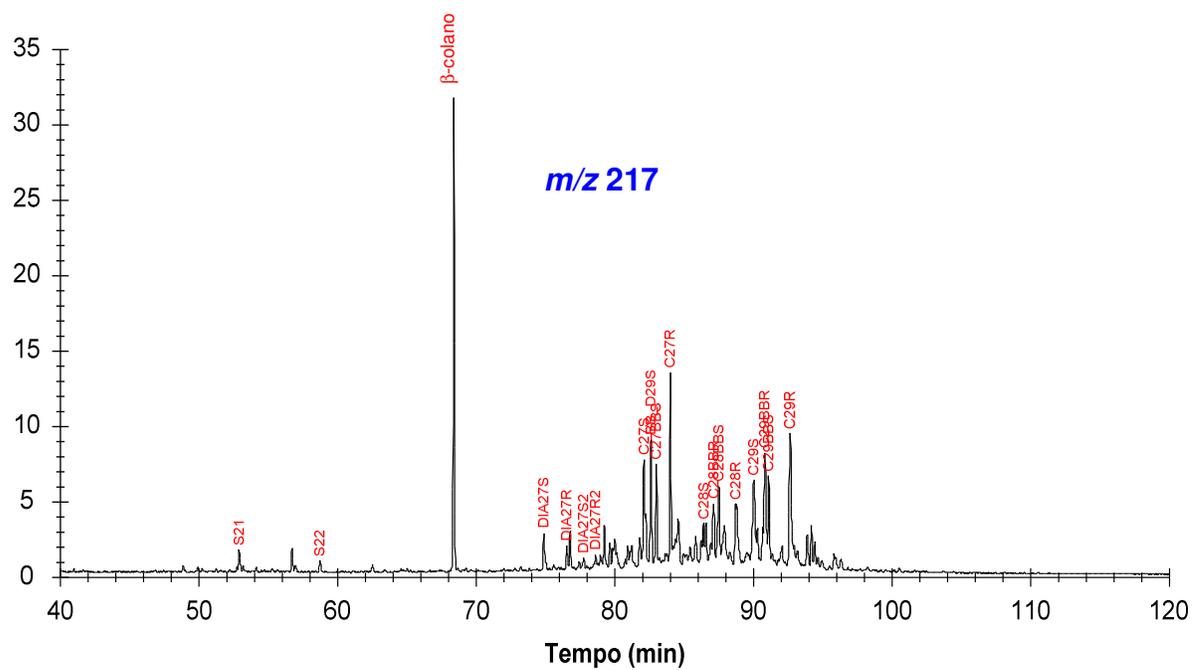
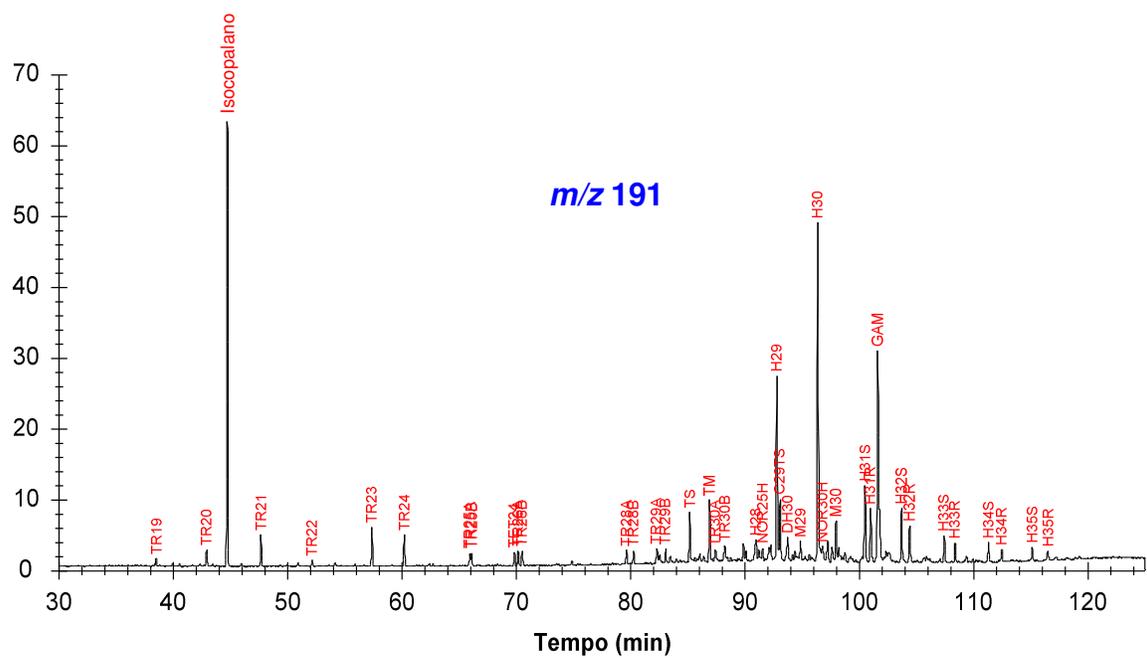


Figura 99-IV: Cromatogramas de íons de m/z 191 (terpanos) e m/z 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra **M-2**.

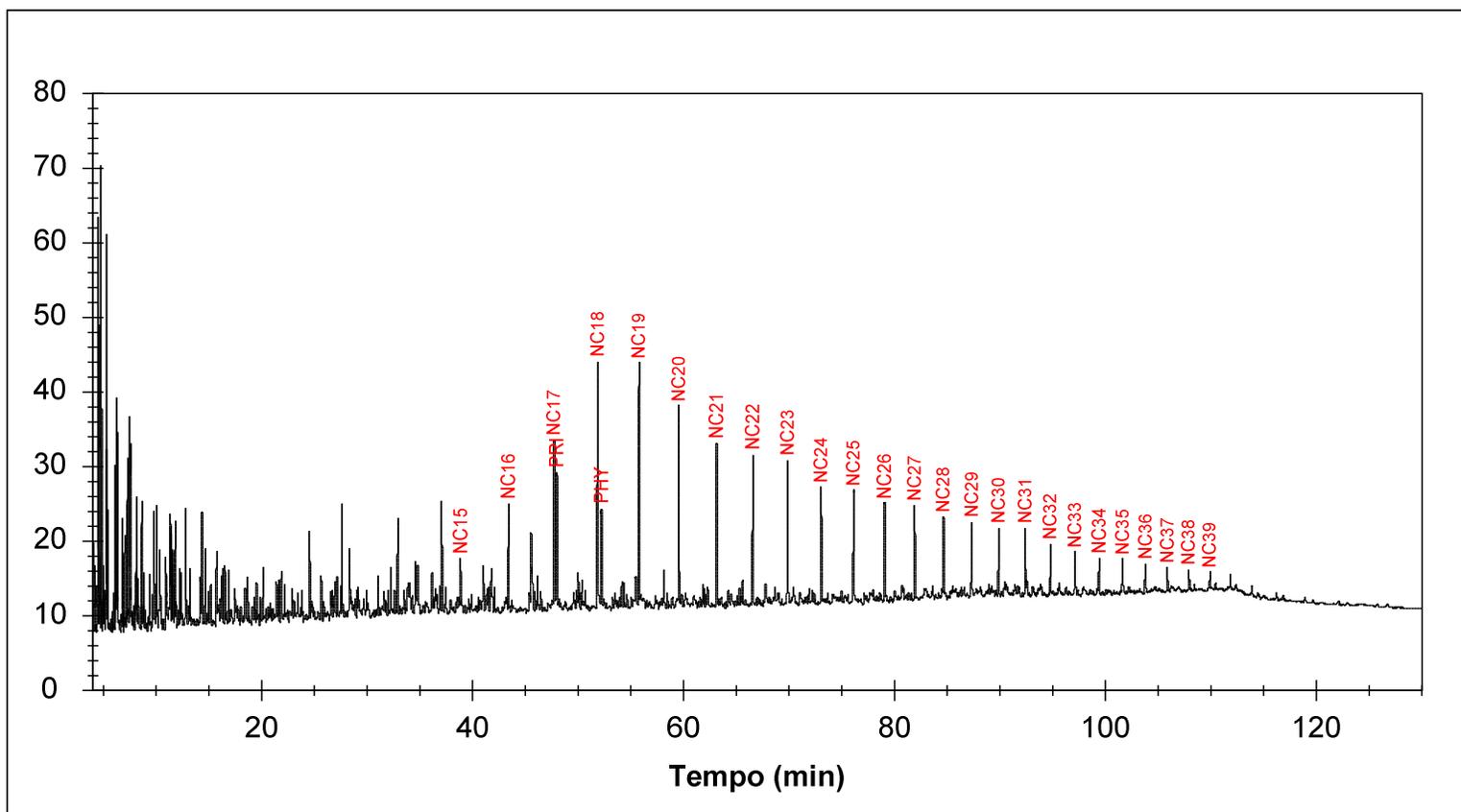


Figura 100-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total M-2.

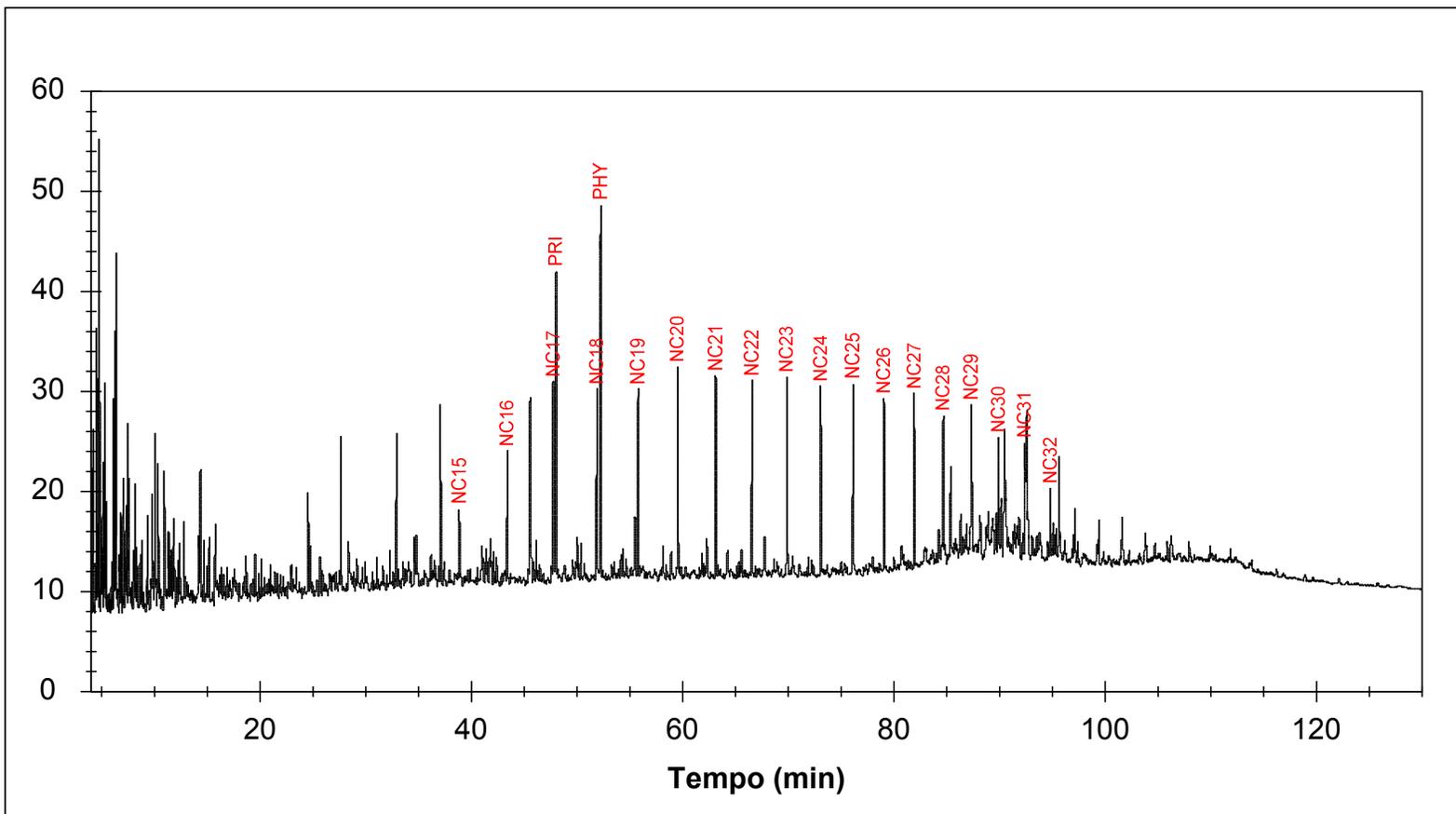


Figura 102-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total ME.

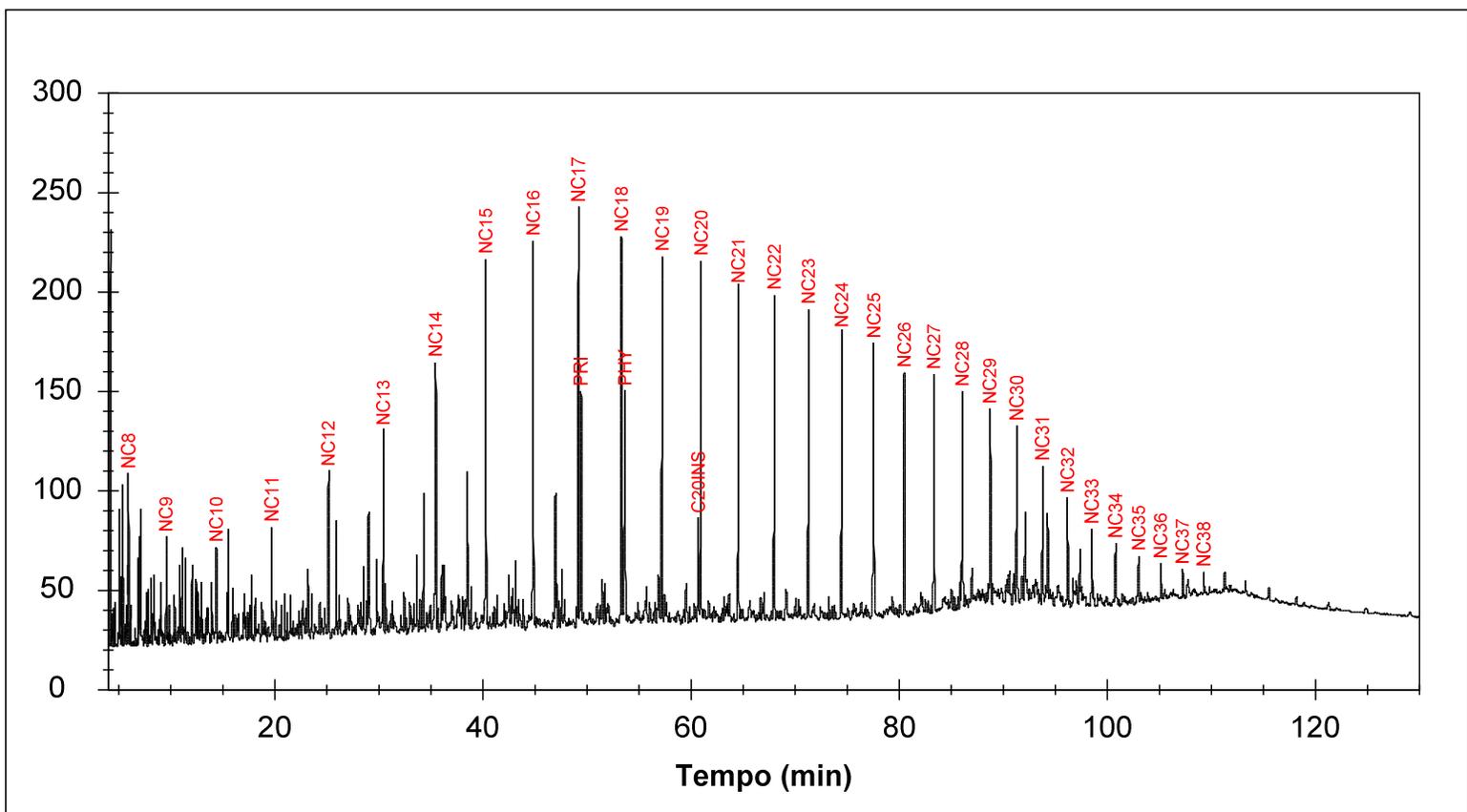
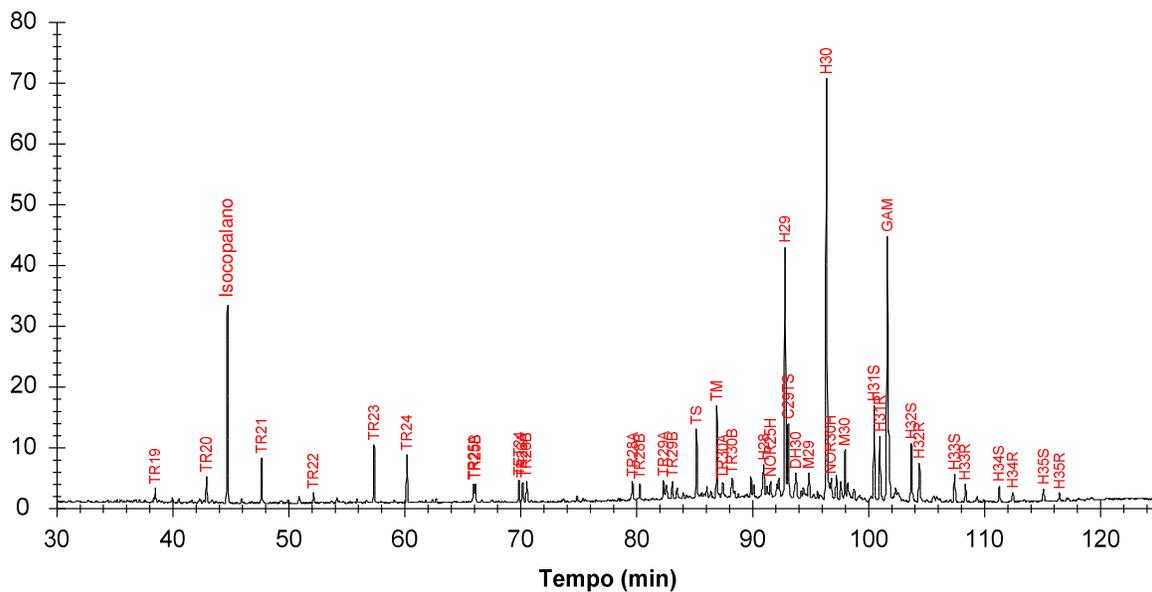


Figura 104-IV : Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total **ME-a**.

m/z 191



m/z 217

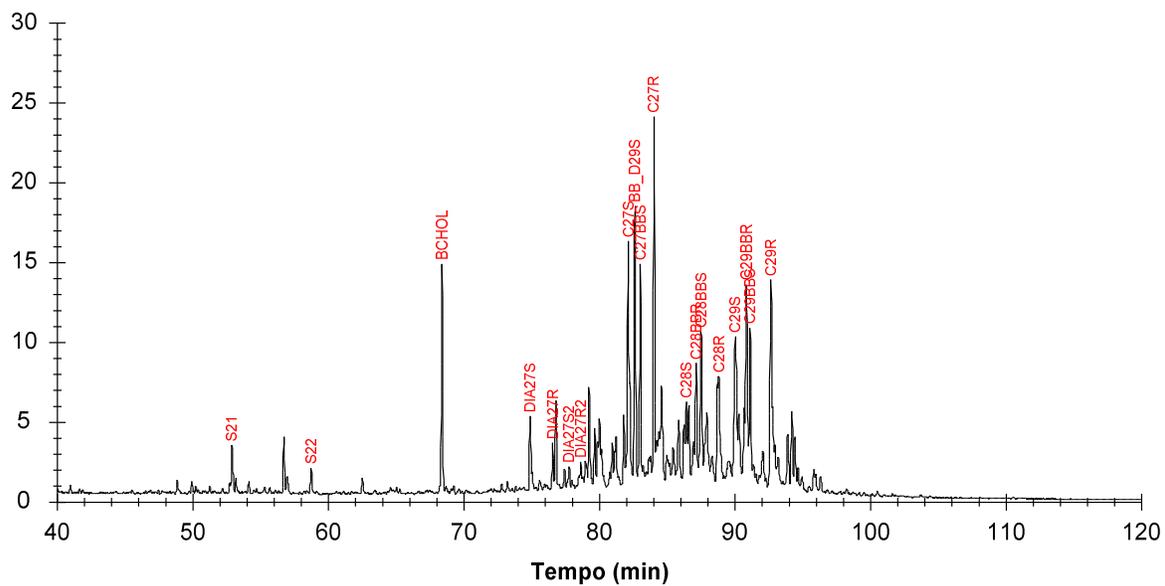


Figura 105-IV: Cromatogramas de íons de m/z 191 (terpanos) e m/z 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra **ME-b**.

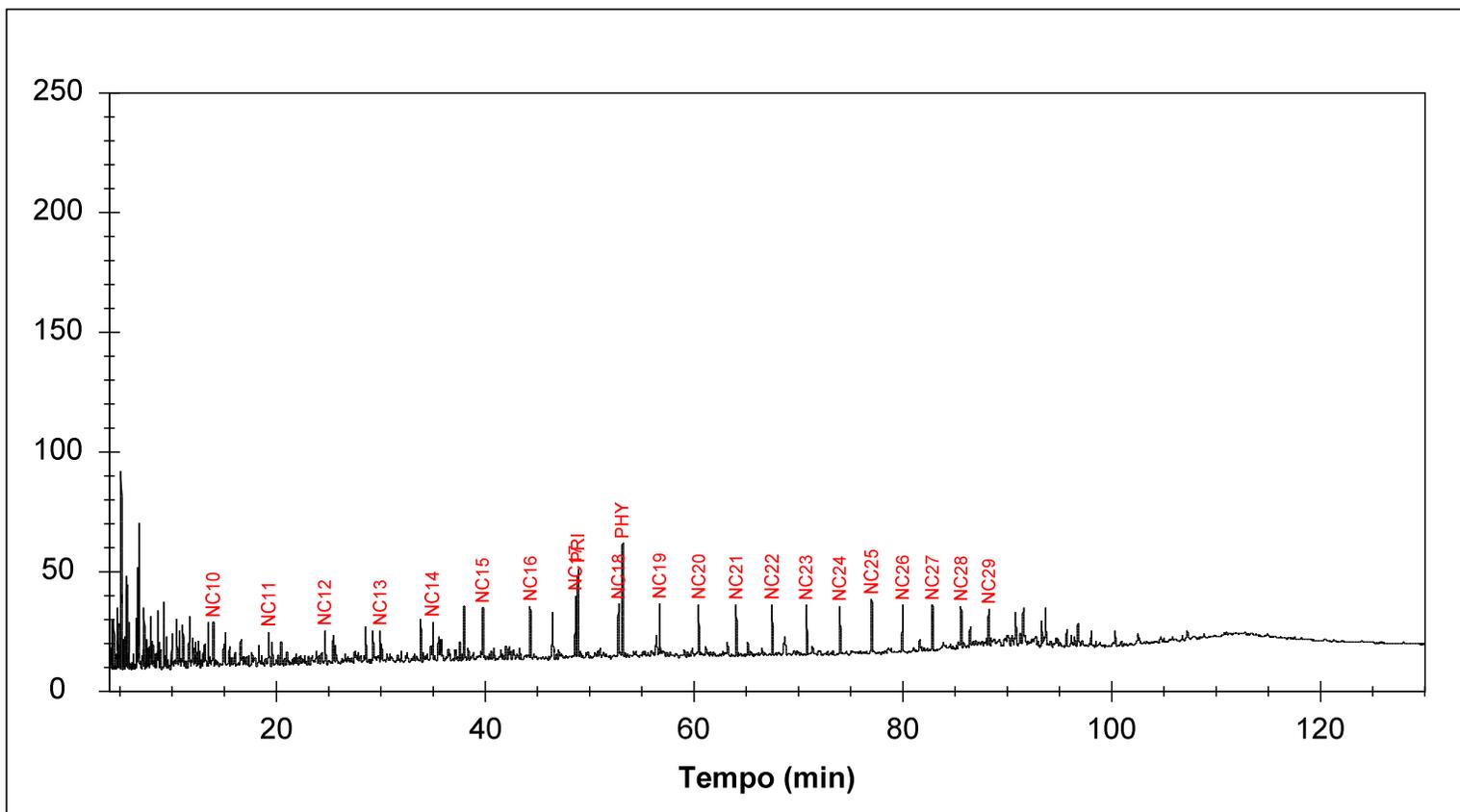
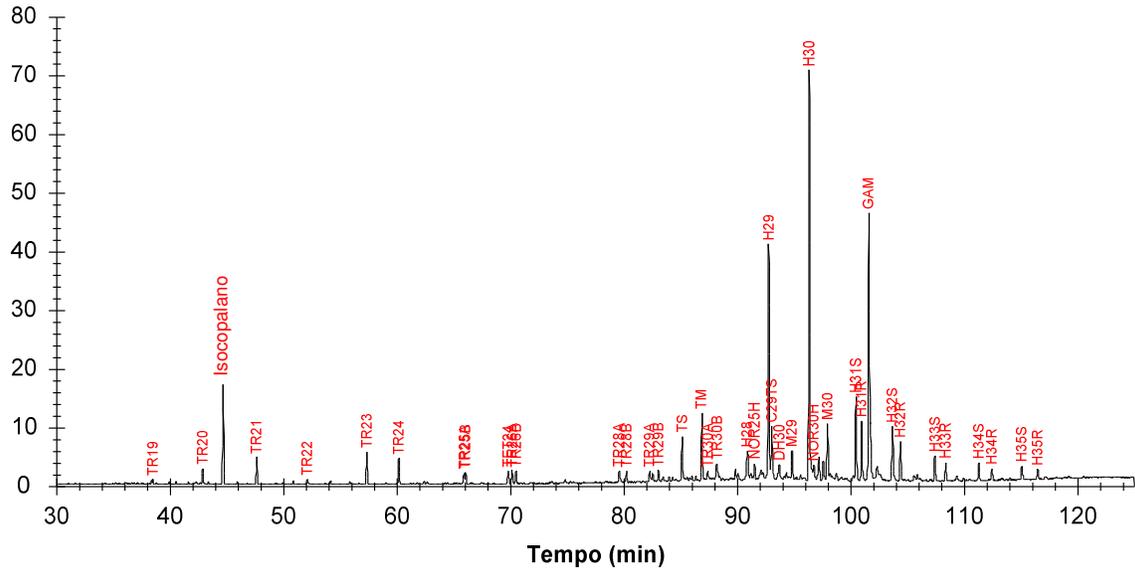


Figura 106-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total **ME-b**.

m/z 191



m/z 217

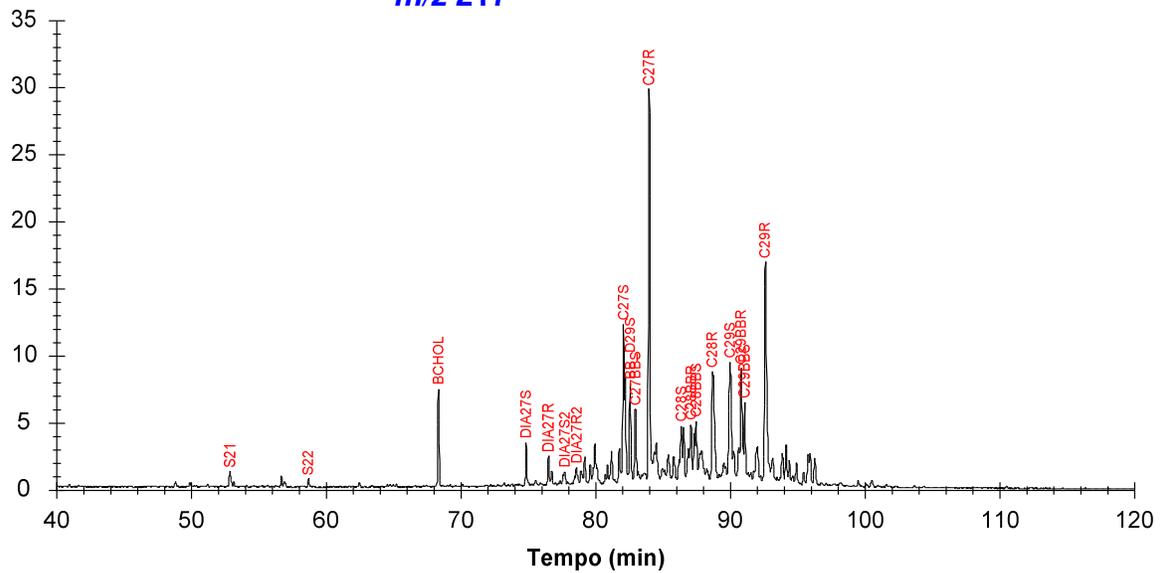


Figura 107-IV: Cromatogramas de íons de m/z 191 (terpanos) e m/z 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra **ME-c**.

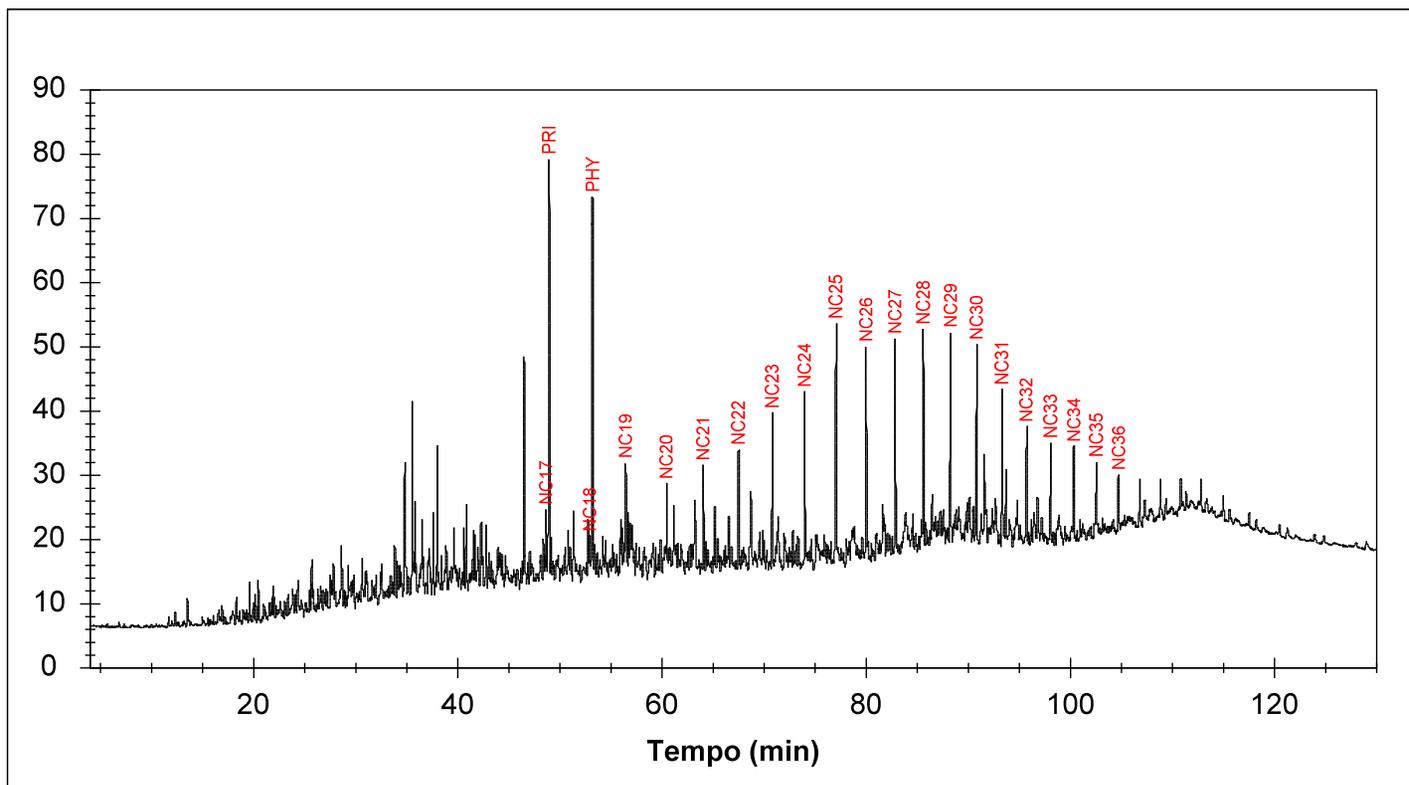
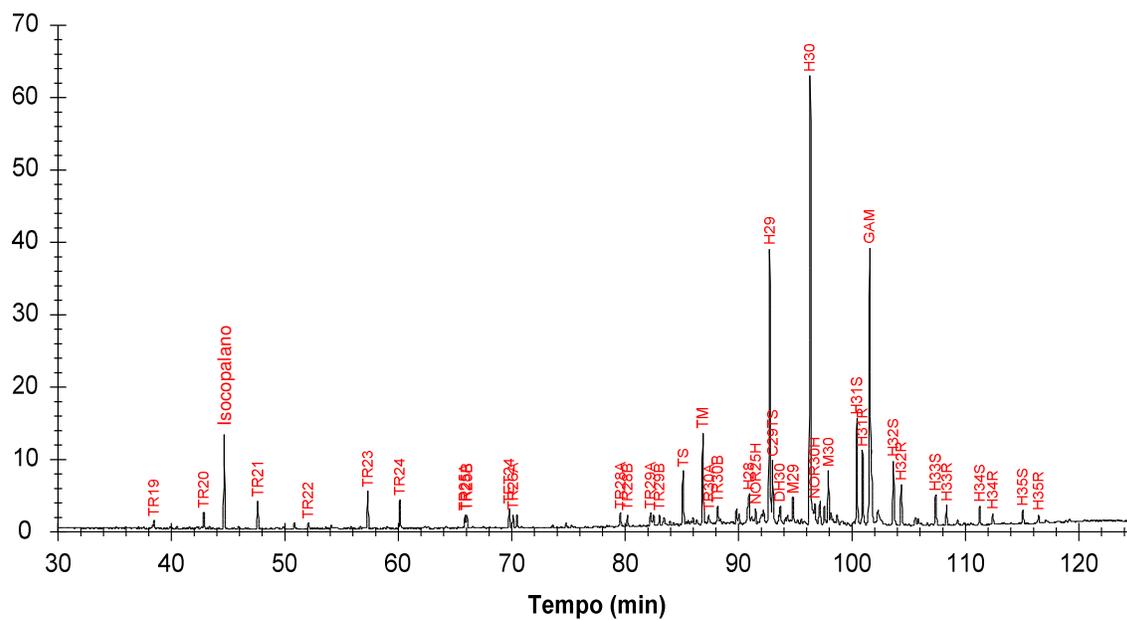


Figura 108-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total **ME-c**.

***m/z* 191**



***m/z* 217**

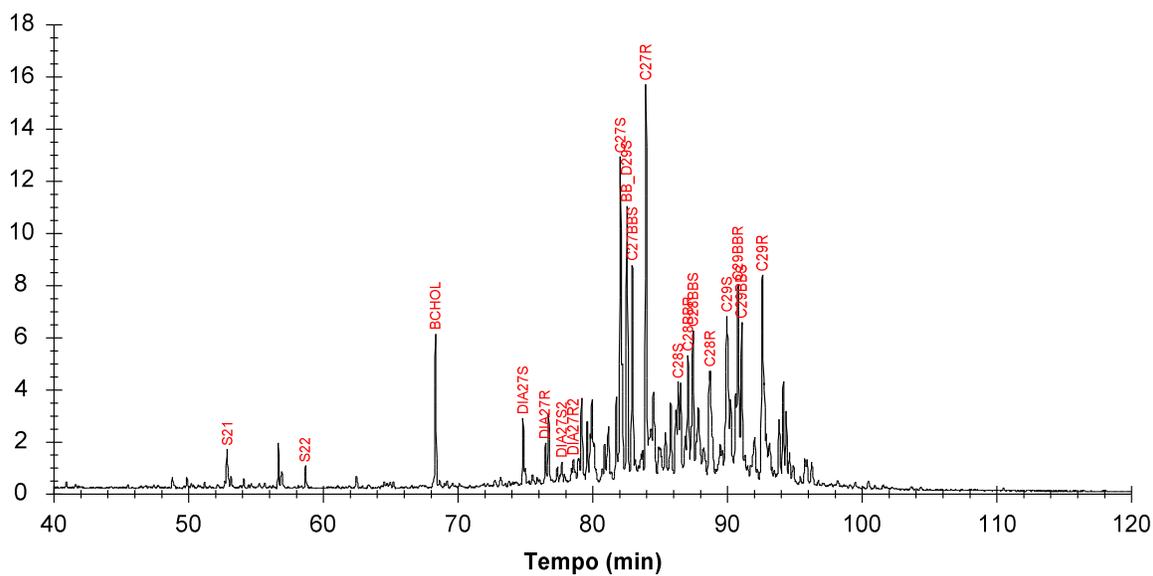


Figura 109-IV: Cromatogramas de íons de *m/z* 191 (terpanos) e *m/z* 217 (esteranos) correspondentes a uma das triplicatas da amostra **ME-d**.

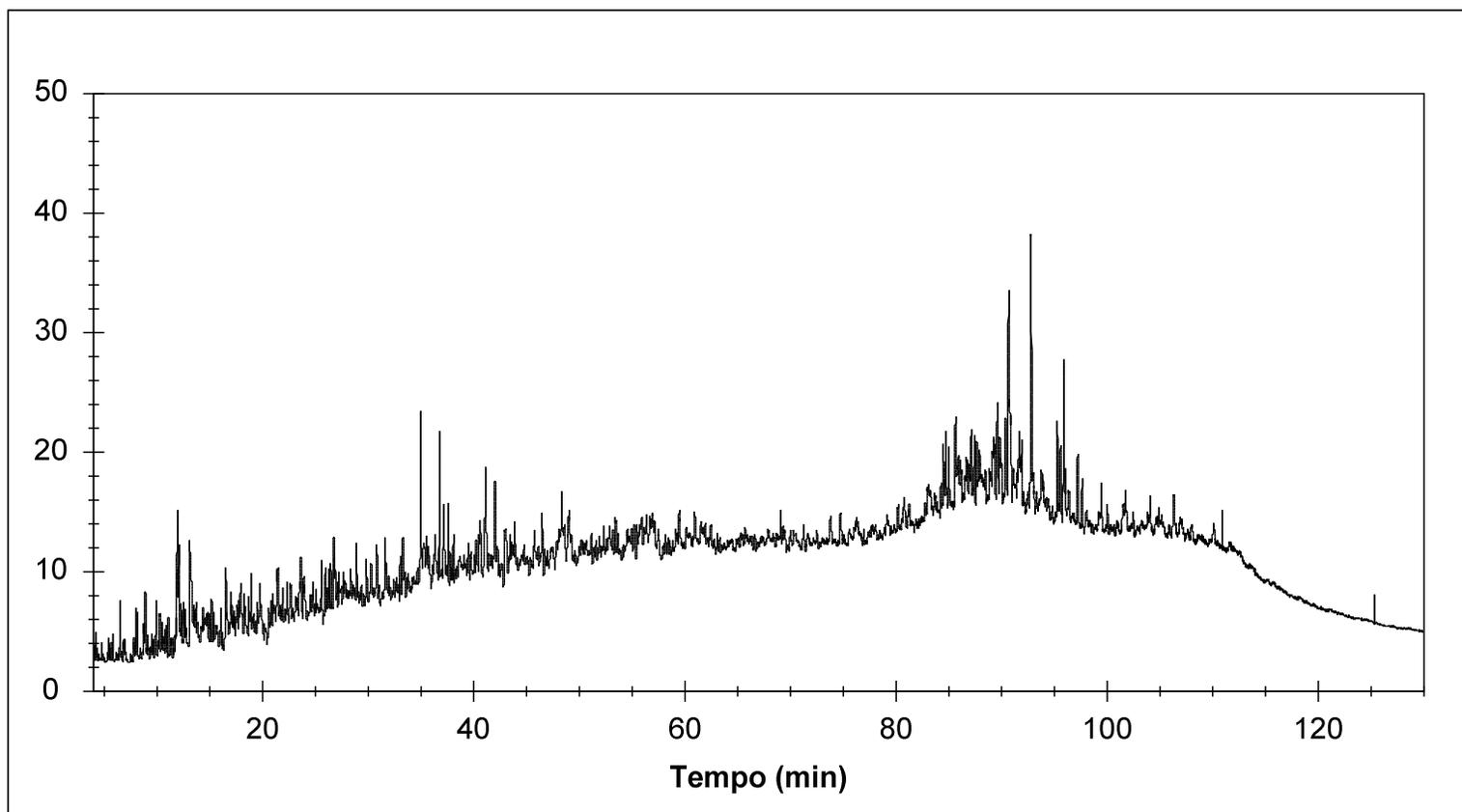
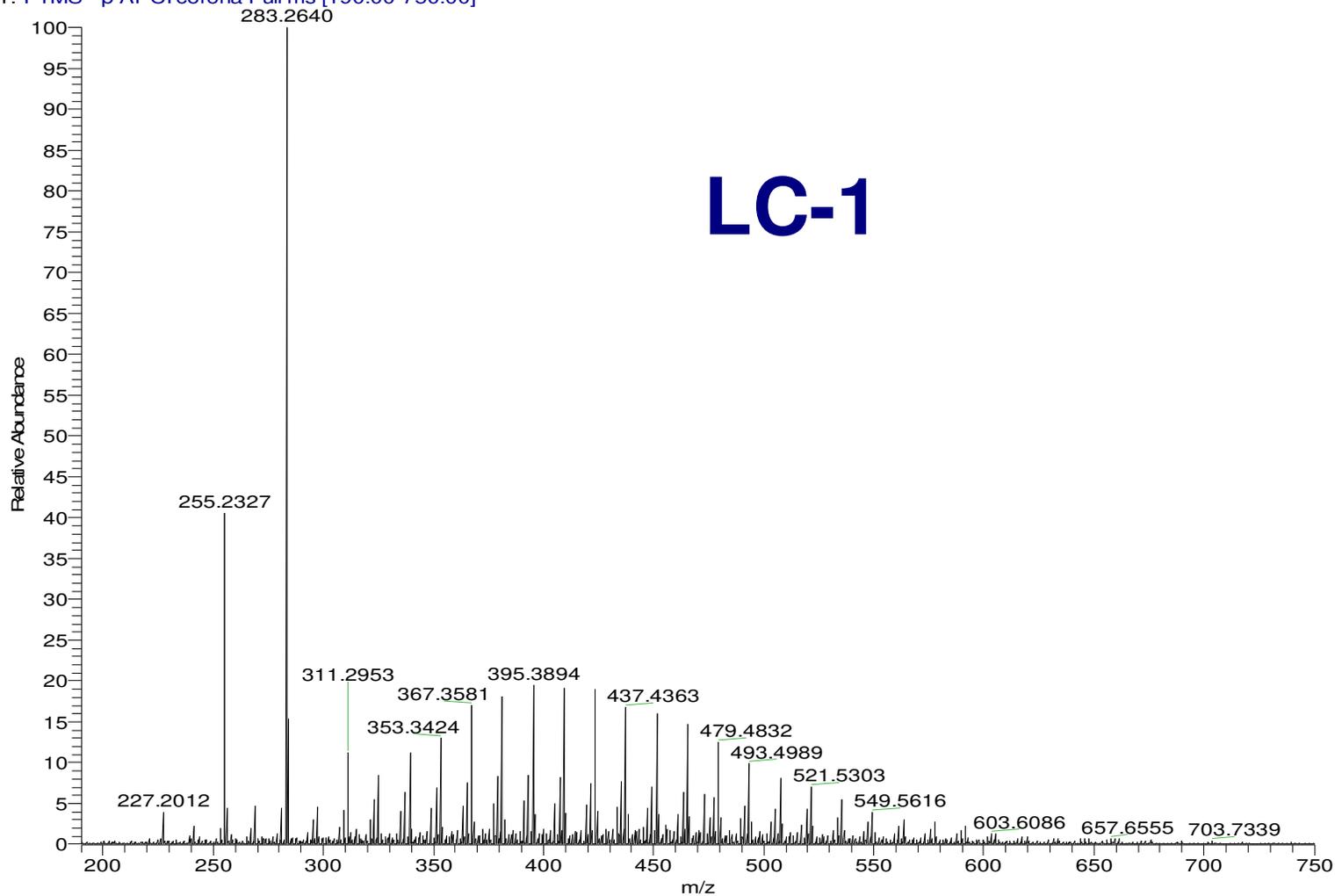


Figura 110-IV: Cromatograma em fase gasosa (CG-DIC) do óleo total **ME-d**.

ANEXO V

PTS_01_FT_24_03_11 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 4.48E7
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]



LC-1

Figura 111-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra LC-1.

PTS_01_IT_24_03_11 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.09E5
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

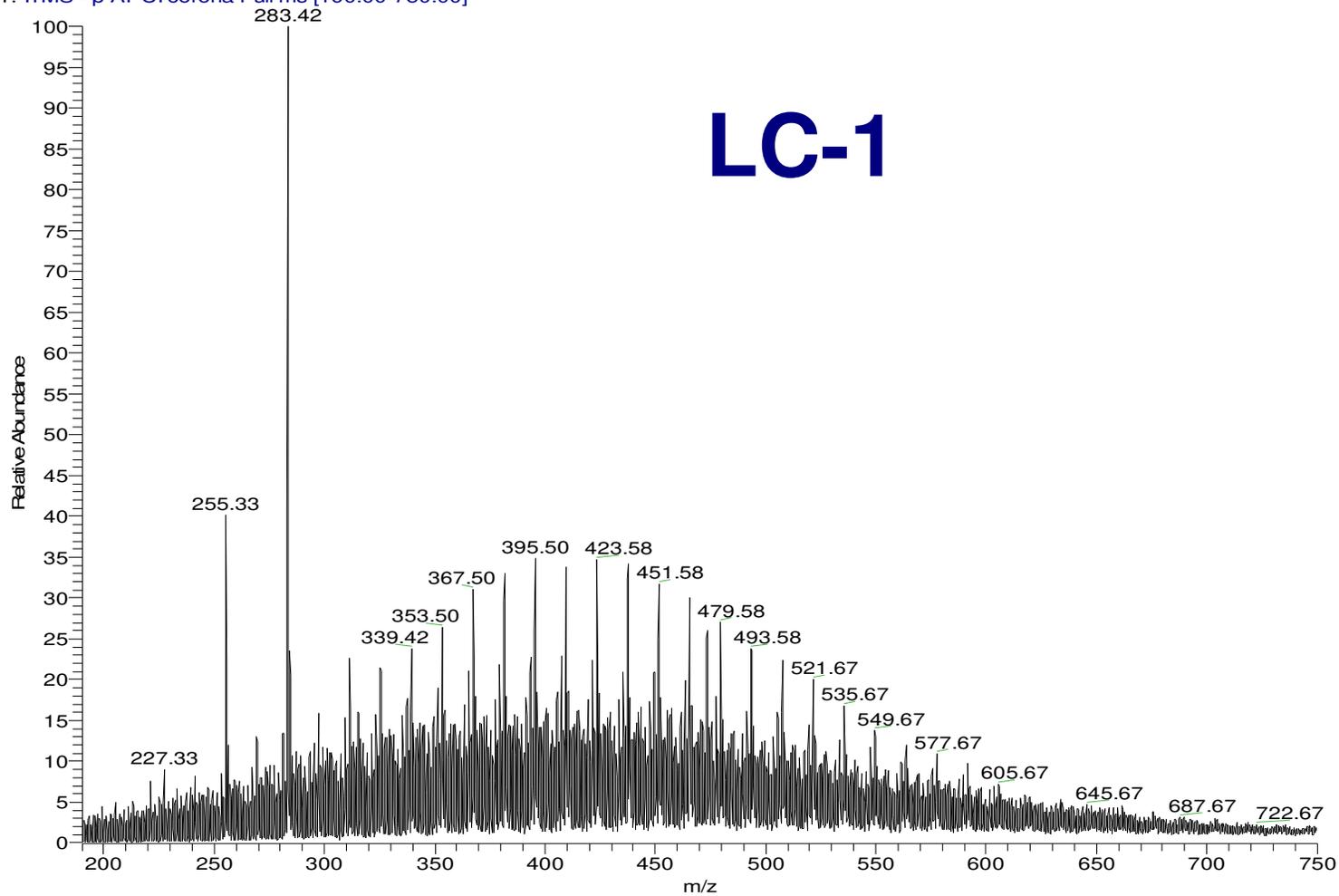


Figura 112-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra LC-1.

PTS_02_FT_24_03_11 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 5.63E7
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

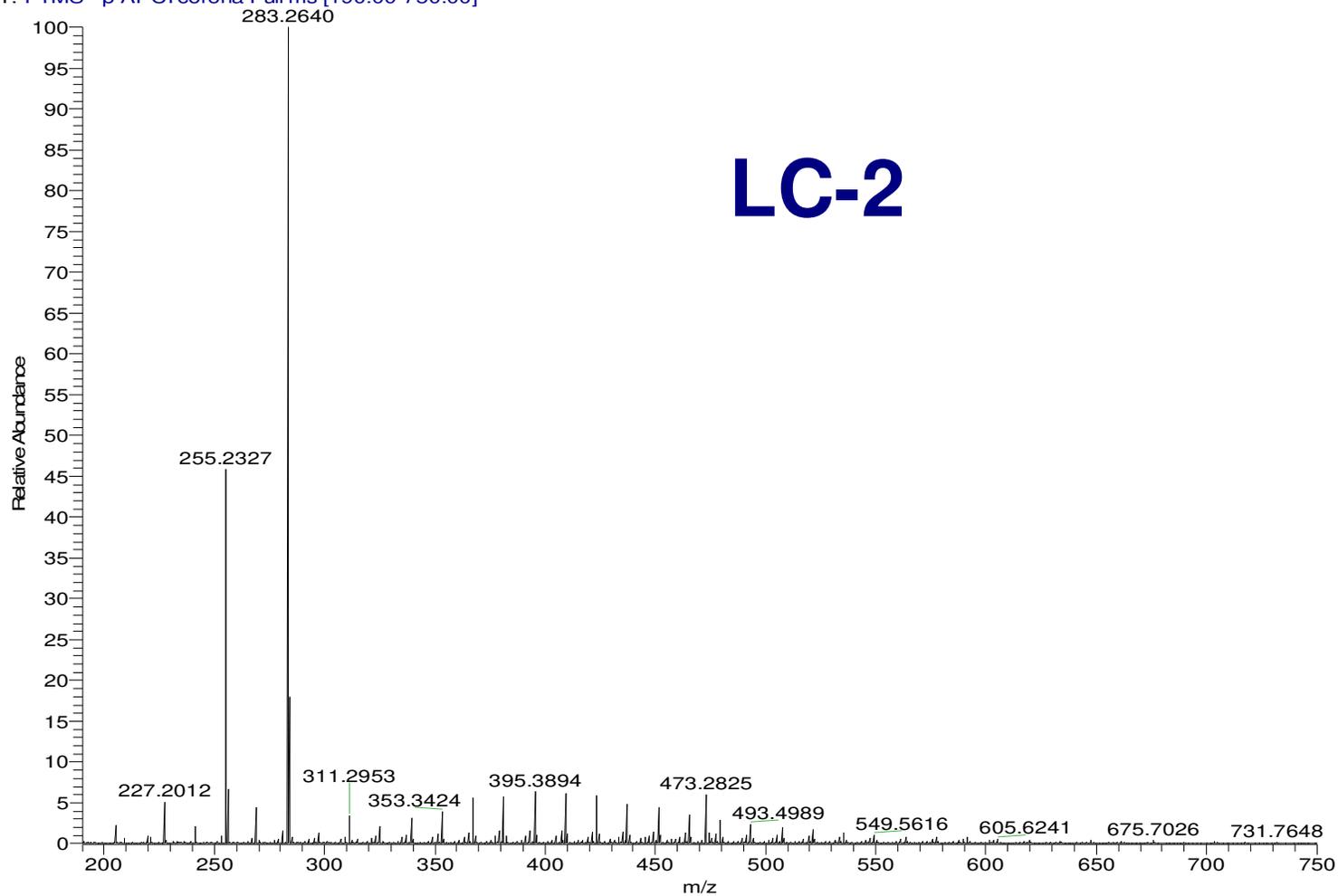
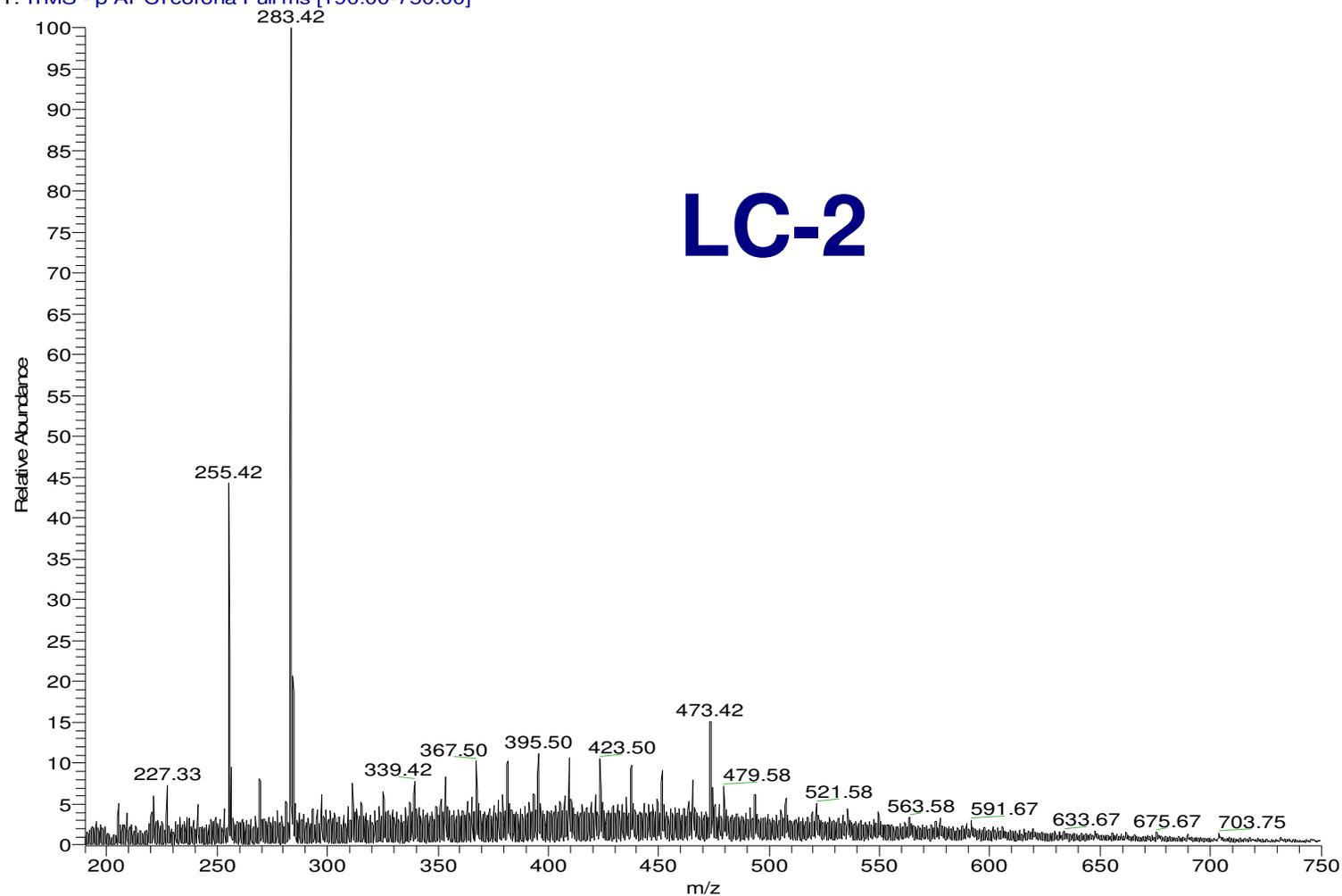


Figura 113-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra LC-2.

PTS_02_IT_24_03_11 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.94E5
T: ITMS -p APCI corona Full ms [190.00-750.00]



LC-2

Figura 114-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra LC-2.

71C_FT_24_03_11 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 9.92E6
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

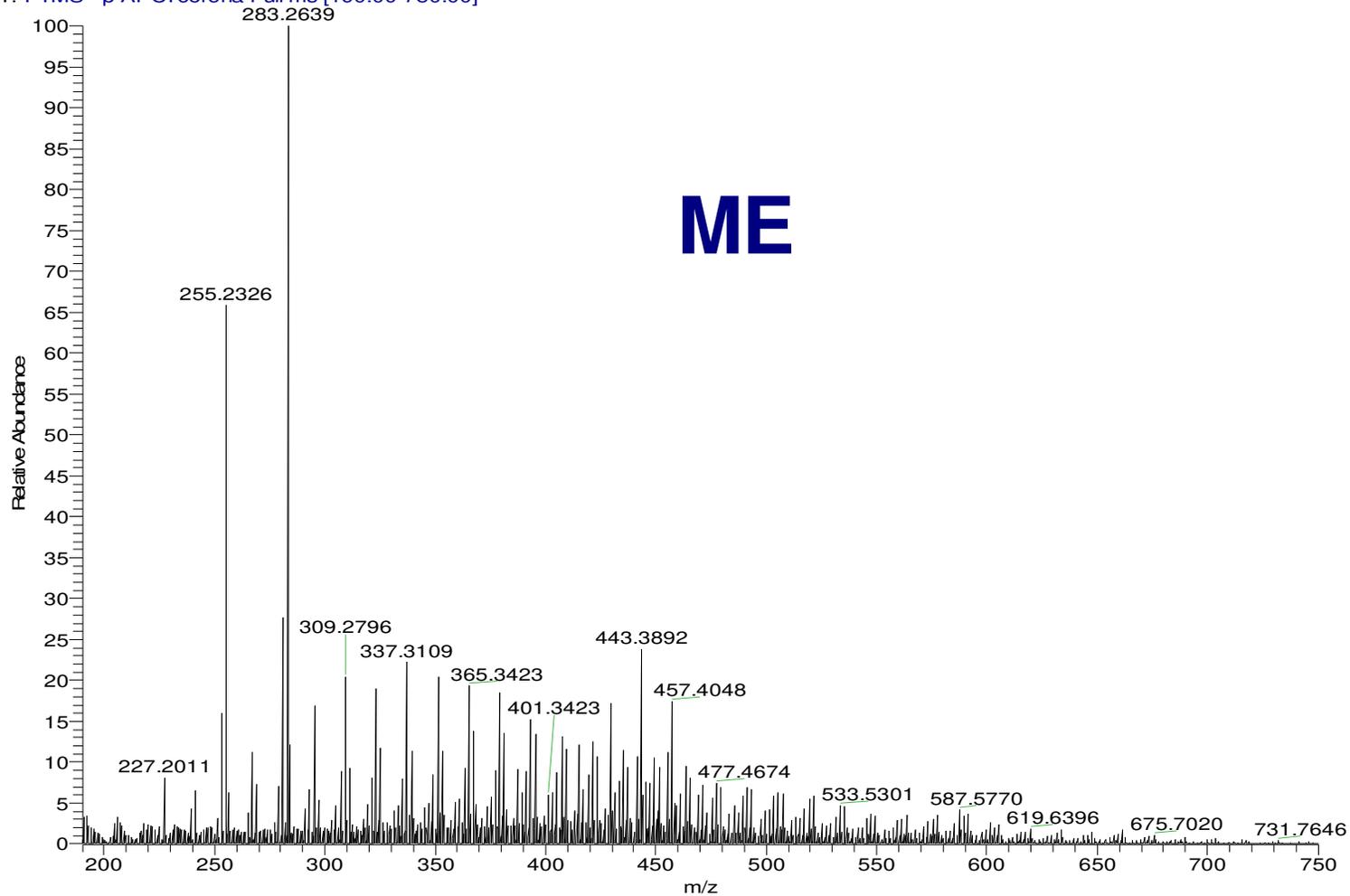


Figura 115-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME.

7IC_IT_24_03_11 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.17E5
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

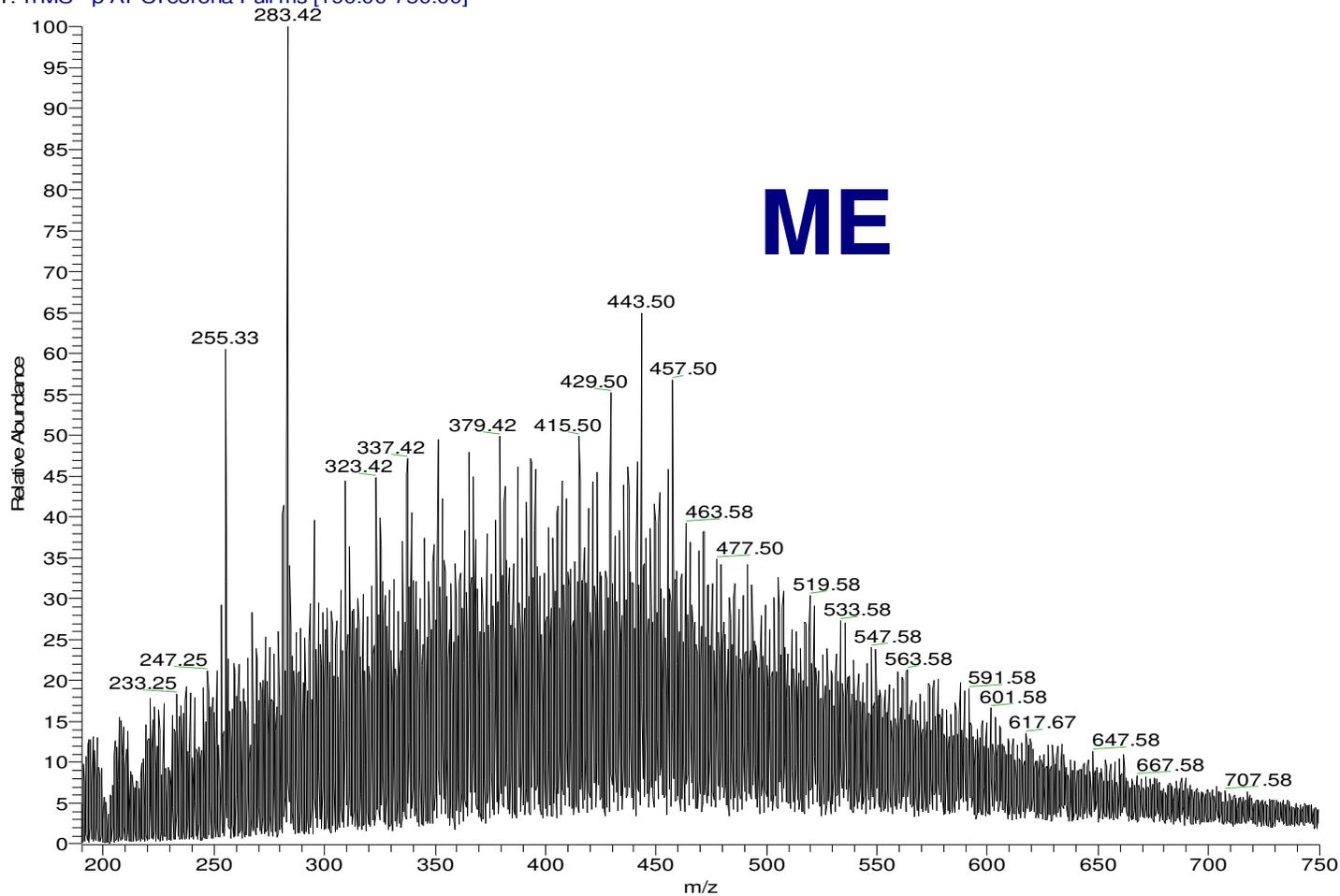
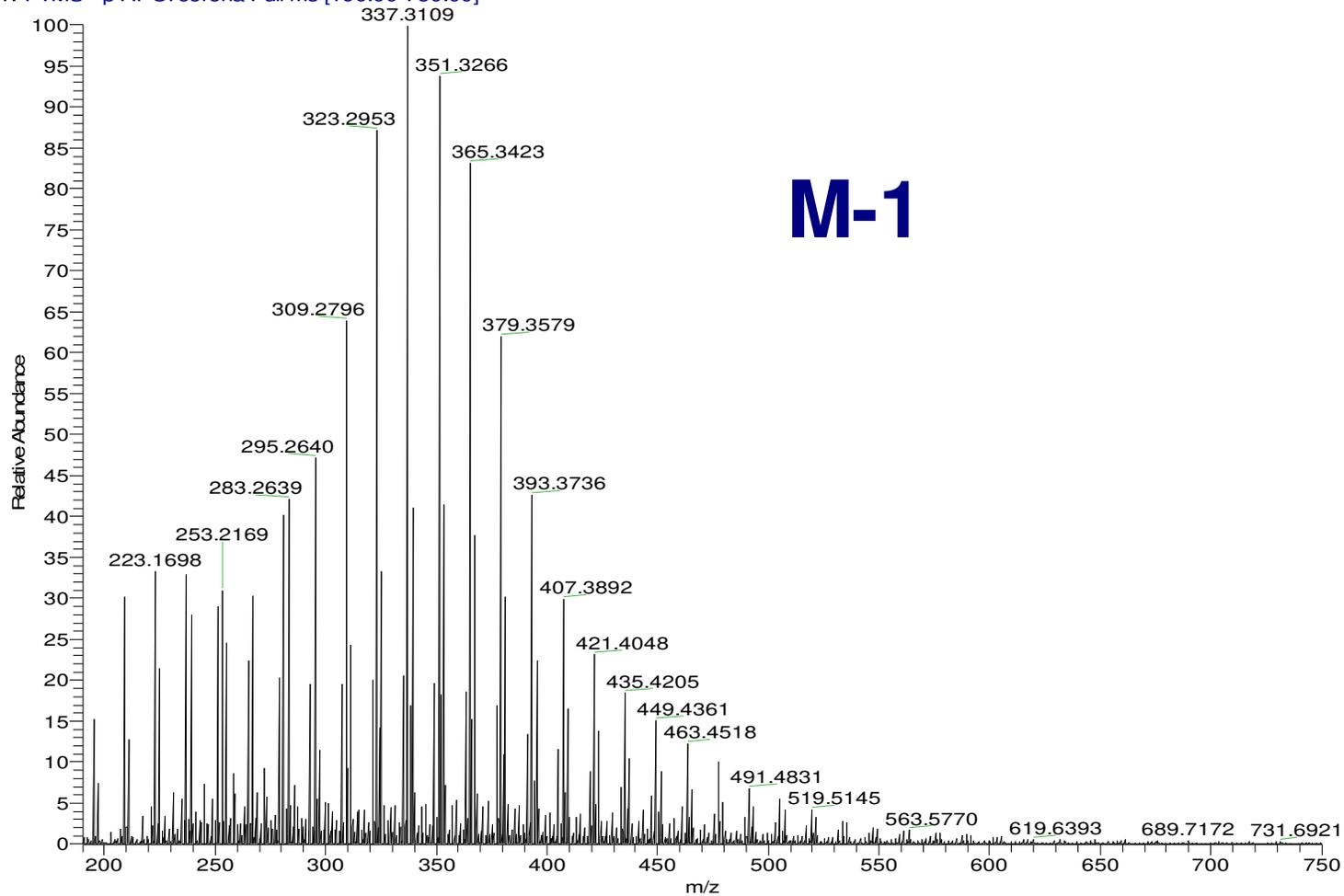


Figura 116-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME.

3GRM_FT_24_03_11 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.50E7
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]



M-1

Figura 117-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap)da amostra **M-1**.

3GRM_IT_24_03_11 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.99E5
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

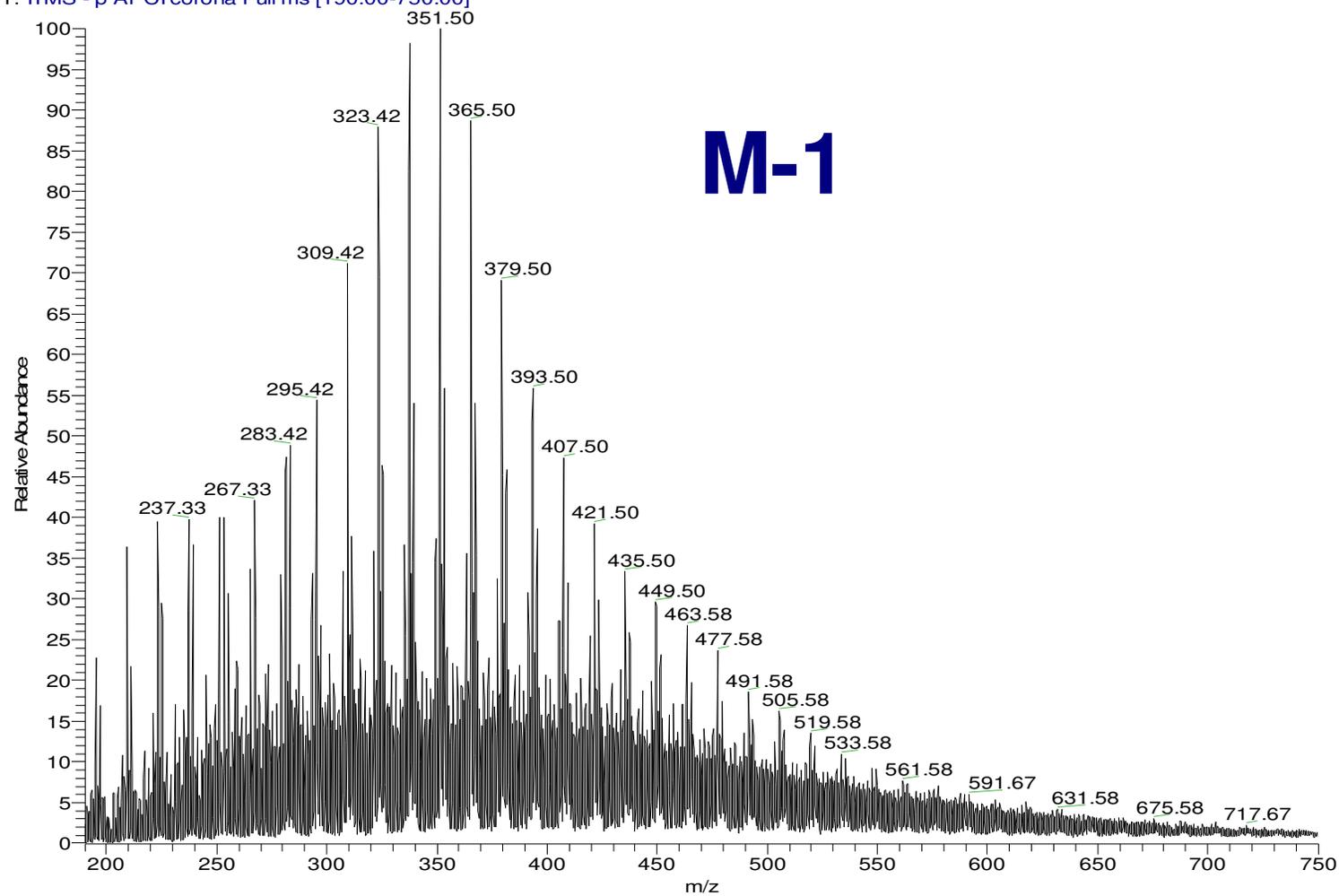
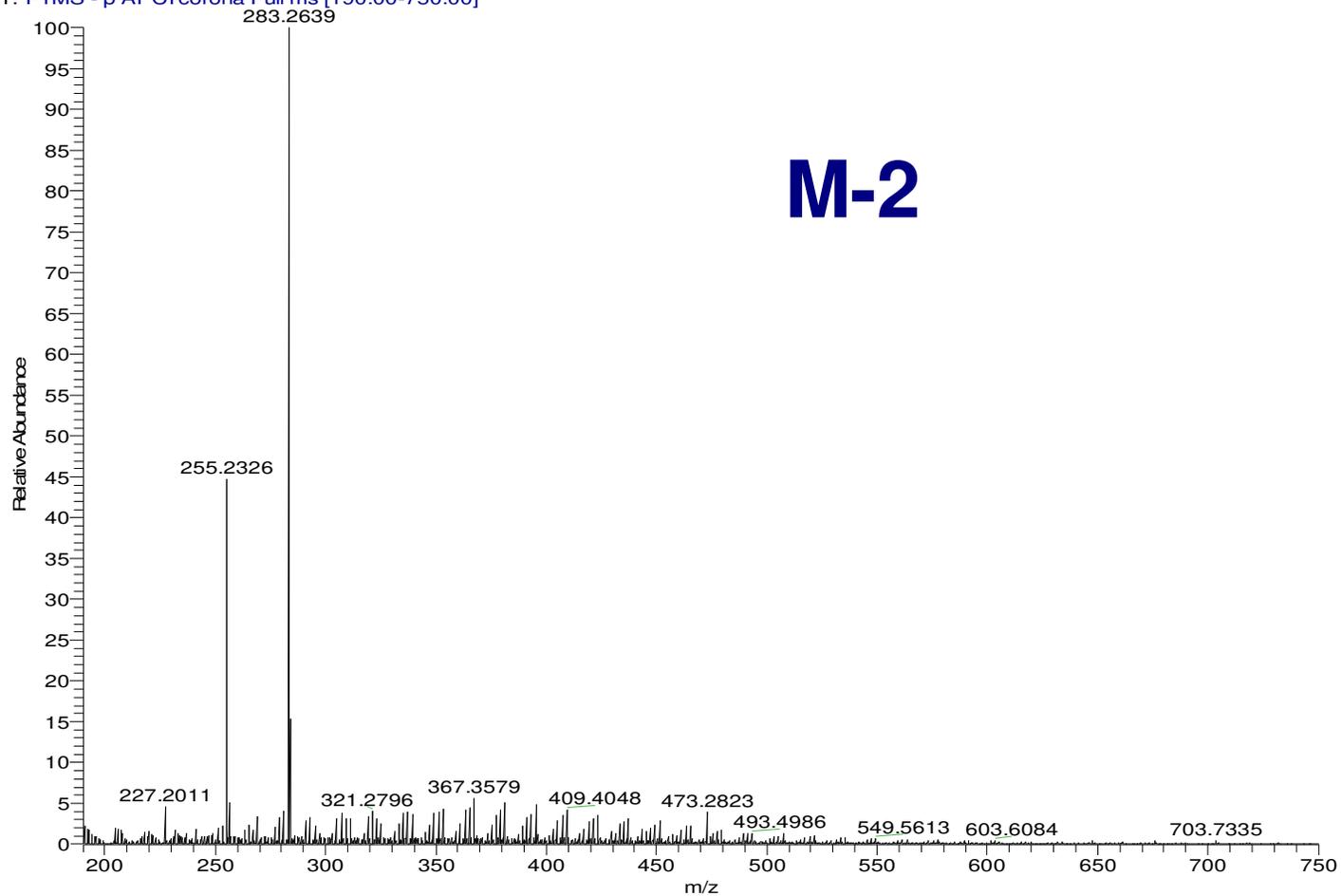


Figura 118-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra **M-1**.

7SER_FT_24_03_11 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.14E7
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]



M-2

Figura 119-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra **M-2**.

7SER_IT_24_03_11 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.19E5
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

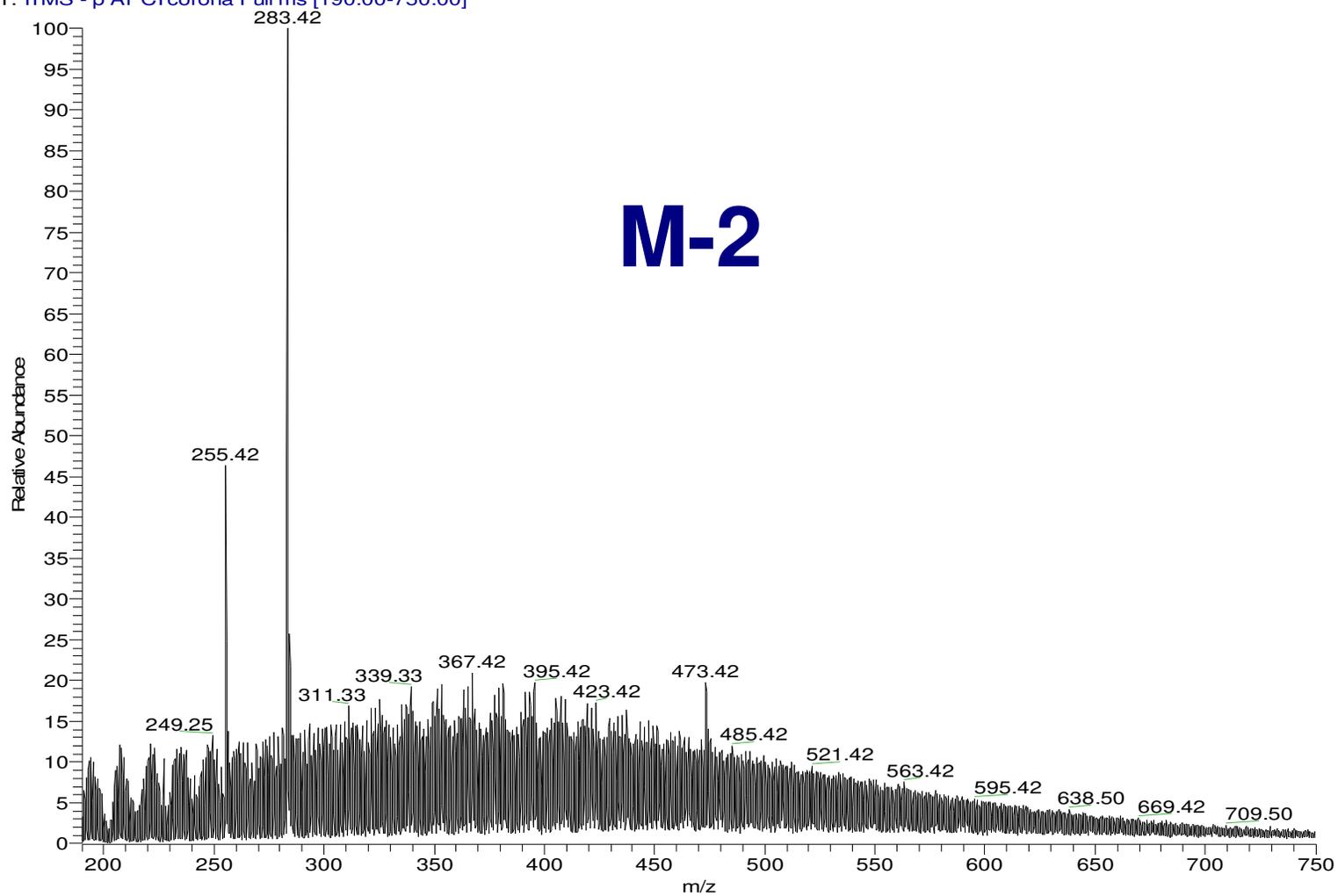


Figura 120-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra **M-2**.

oleo_A_FT_2#1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 3.34E6
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

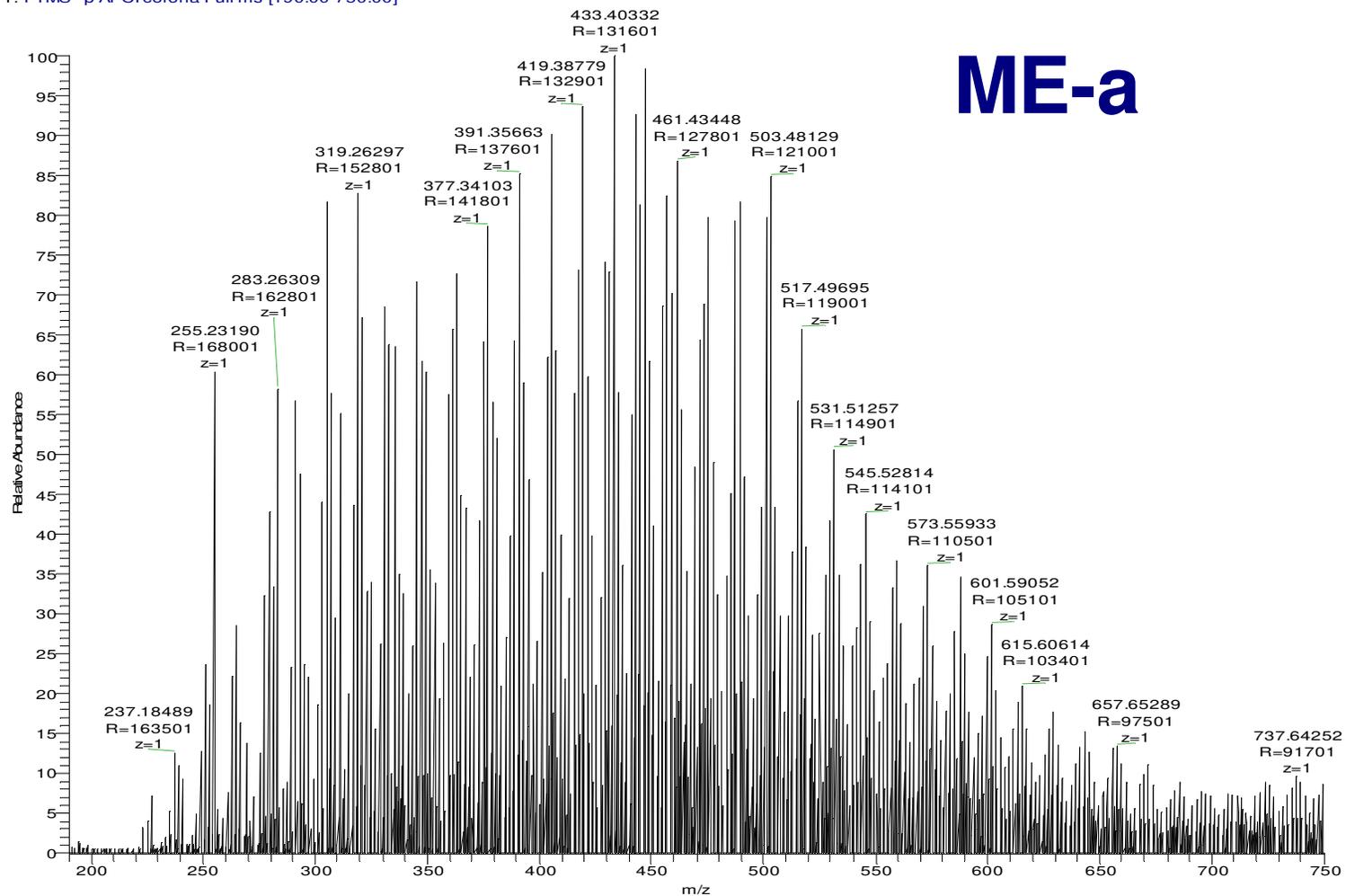


Figura 121-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra **ME-a**.

oleo_A_IT_2#1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.07E5
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

ME-a

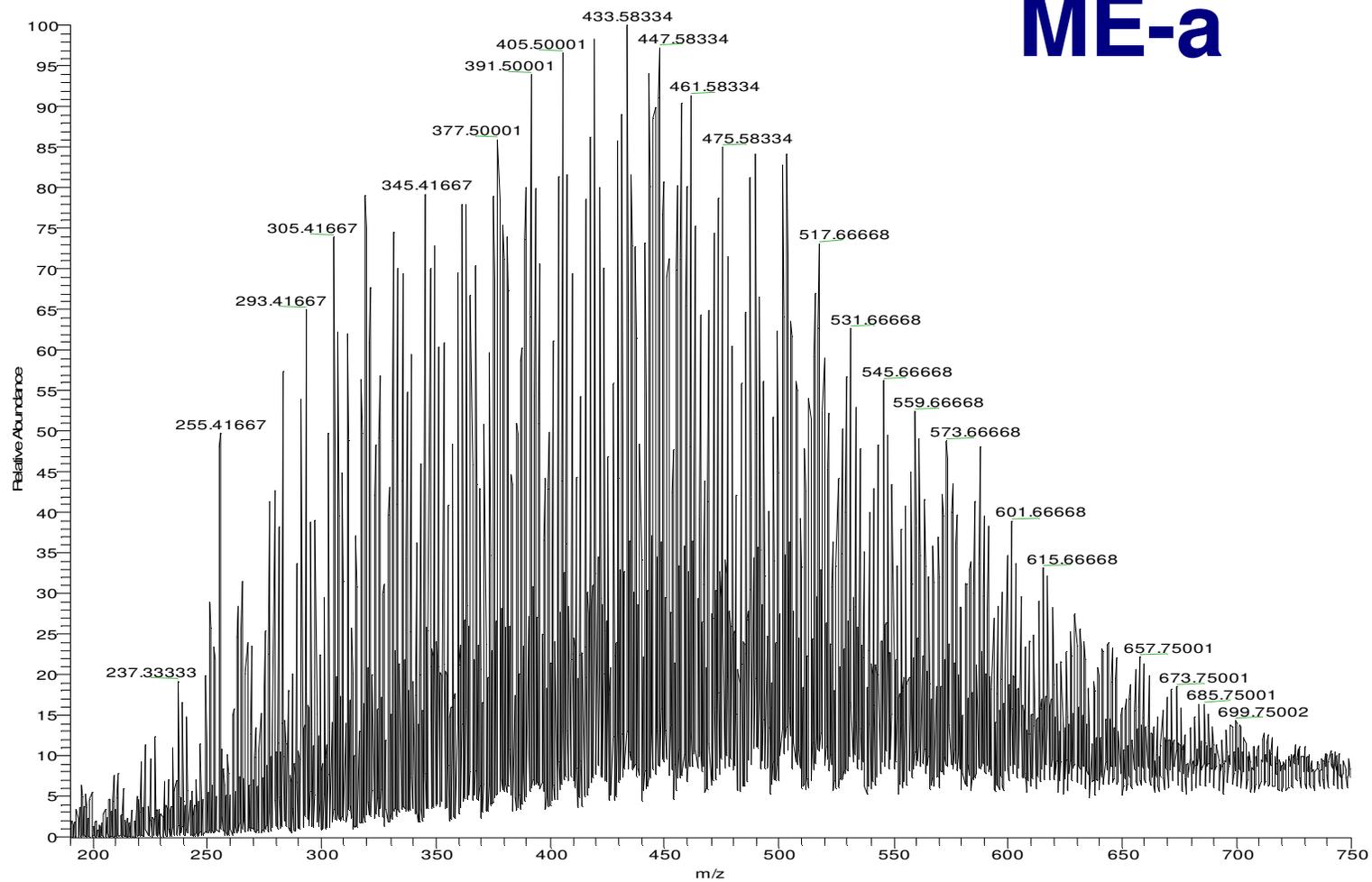
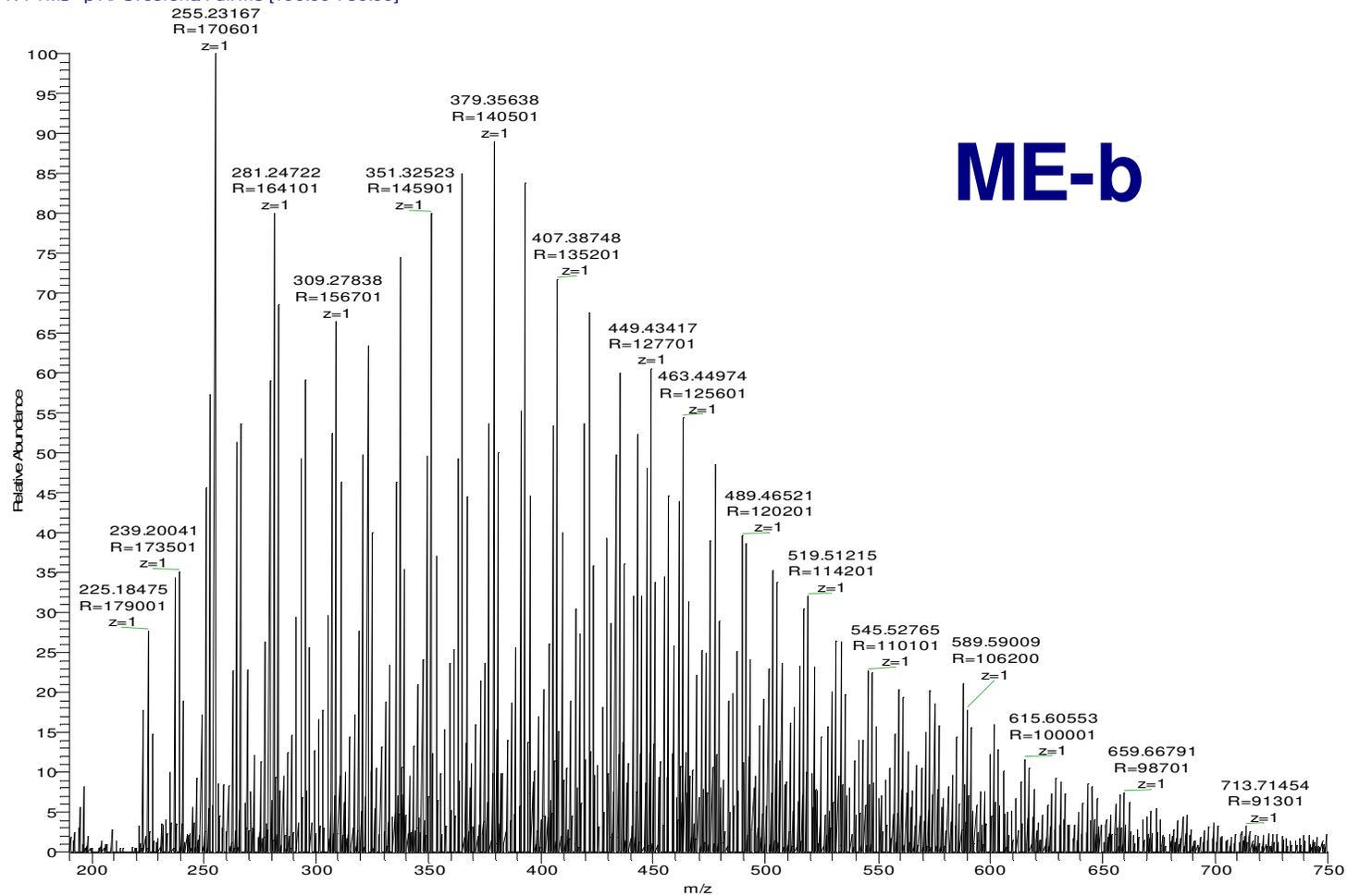


Figura 122-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra **ME-a**.

oleo_B_FT#1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 2.86E6
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]



ME-b

Figura 123-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME-b.

oleo_B_IT #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.56E4
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

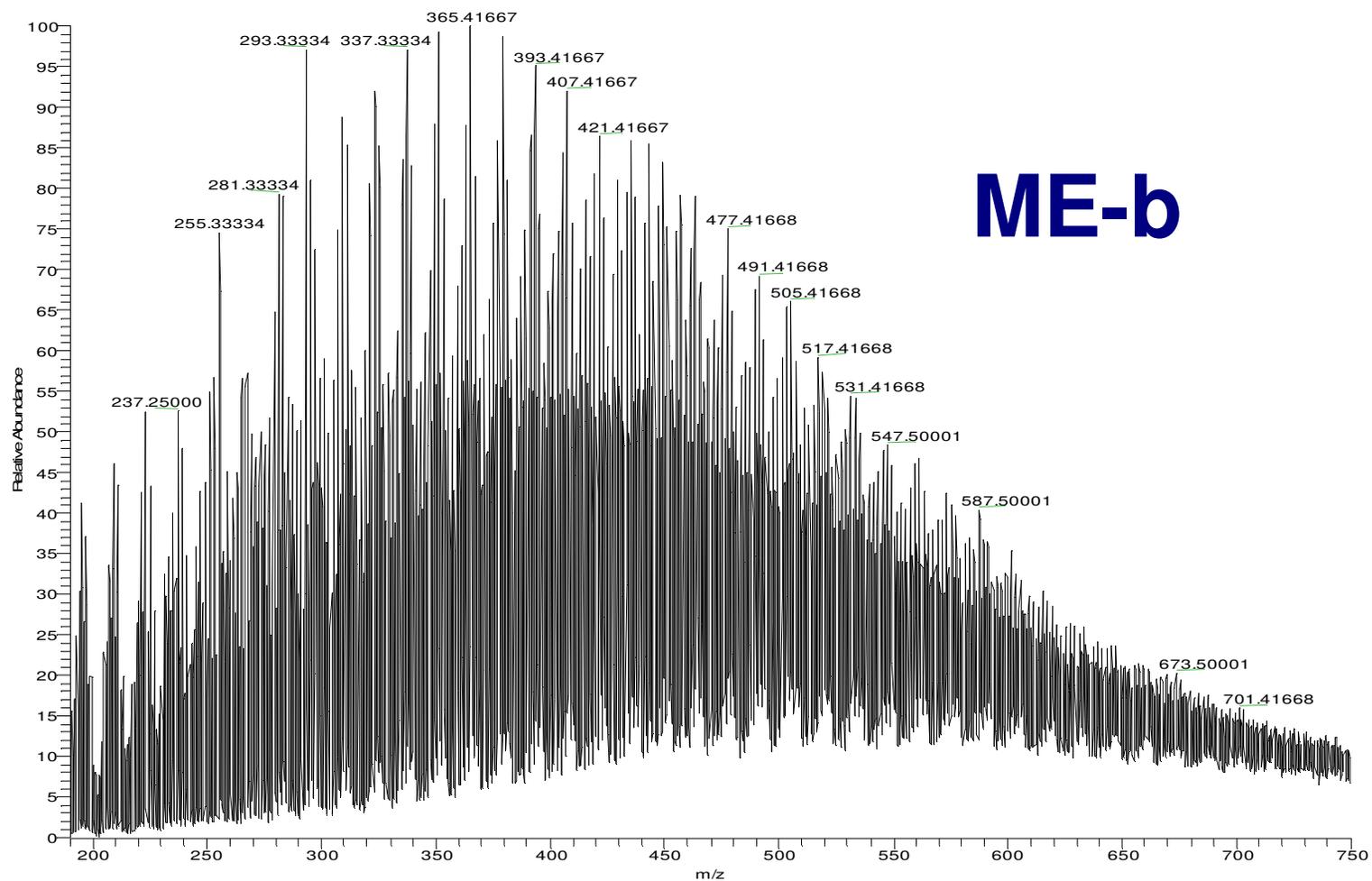
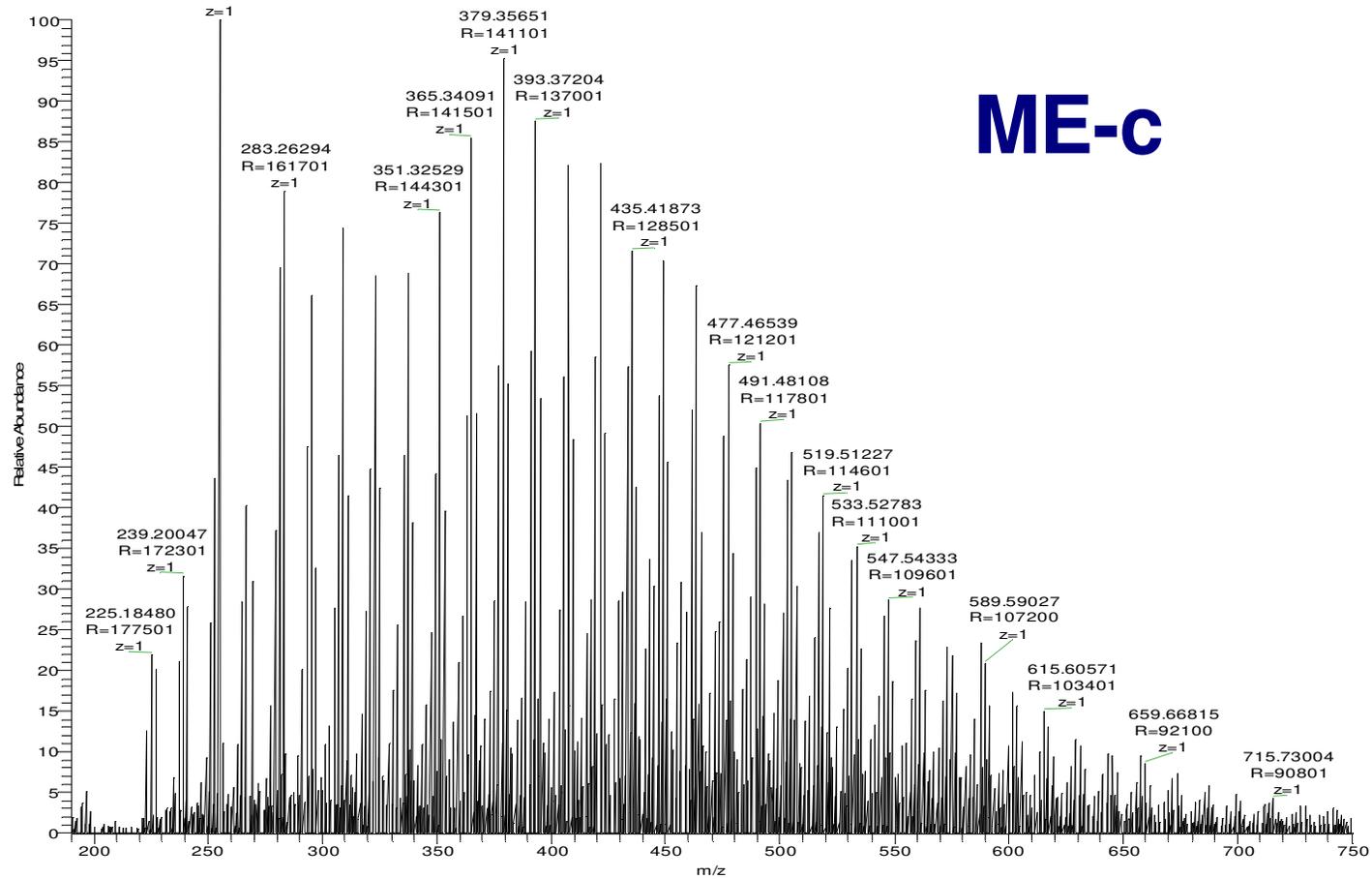


Figura 124-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra **ME-b**.

oleo_C_FT#1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 2.72E6
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]
255.23174
R=171401
z=1



ME-c

Figura 125-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra ME-c.

oleo_C_IT #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 7.29E4
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

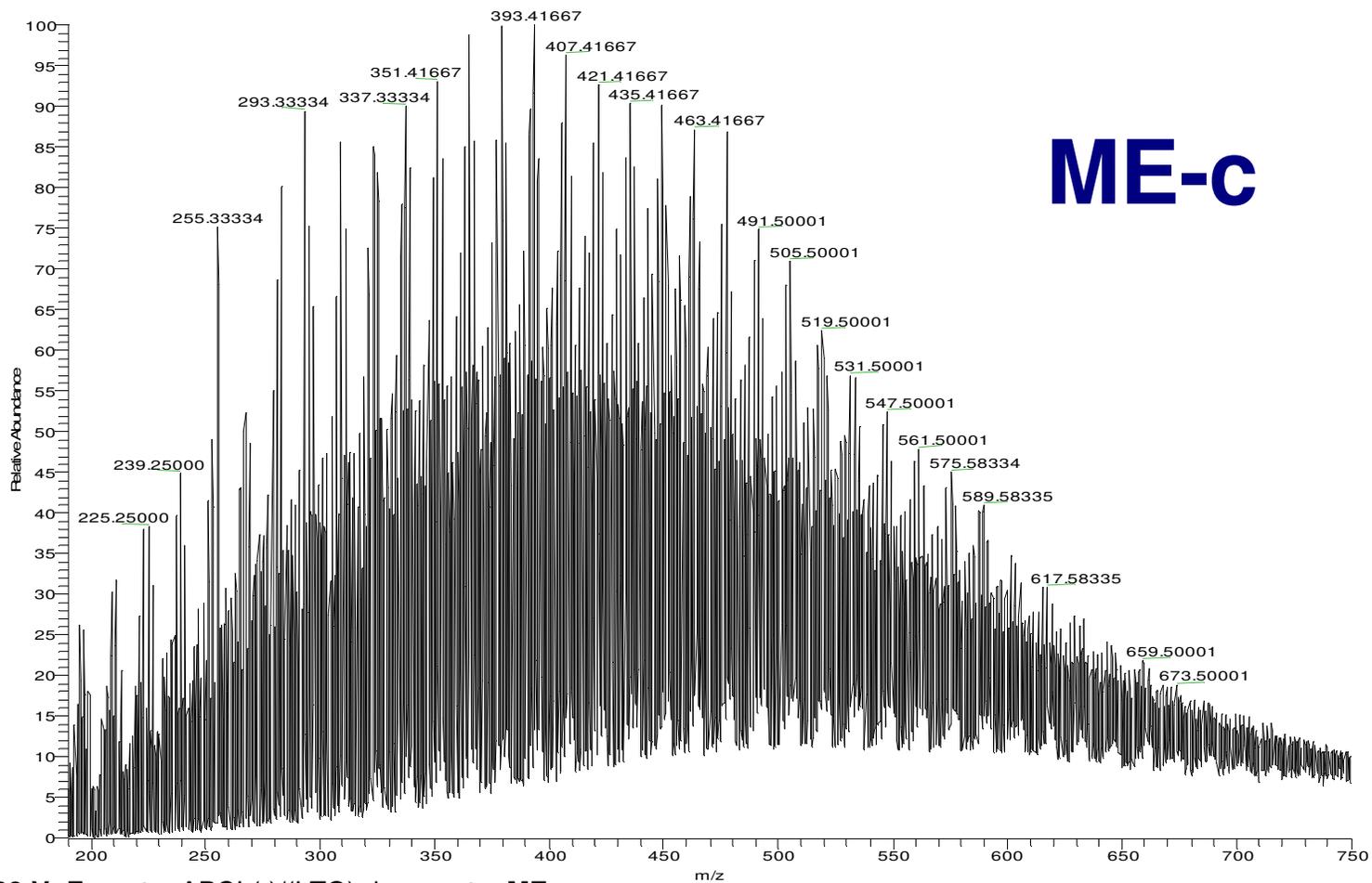
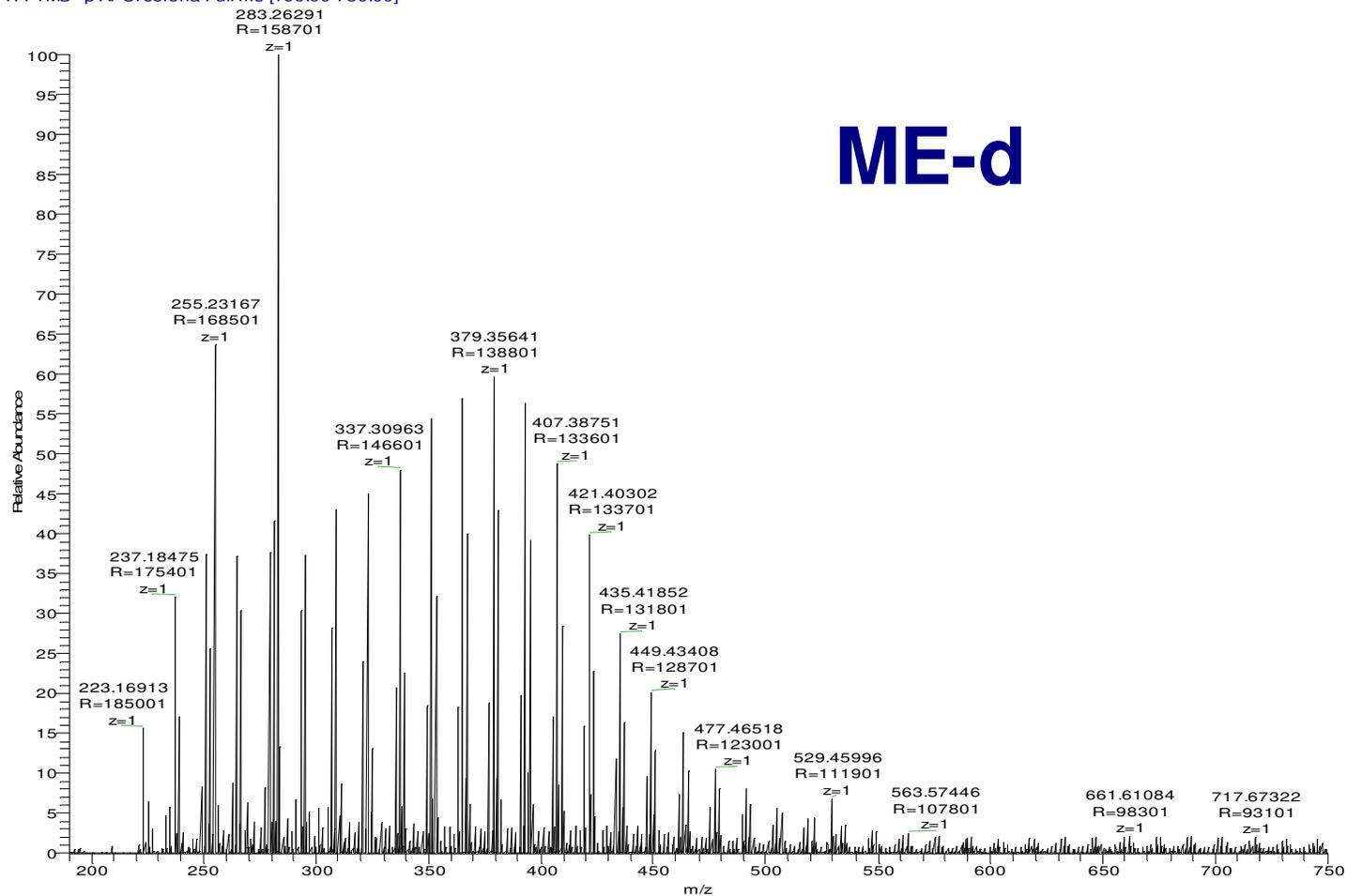


Figura 126-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra **ME-c**.

oleo_D_FT#1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.57E7
T: FTMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]



ME-d

Figura 127-V: Espectro APCI (-)/(Orbitrap) da amostra **ME-d**.

oleo_D_IT #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.91E5
T: ITMS - p APCI corona Full ms [190.00-750.00]

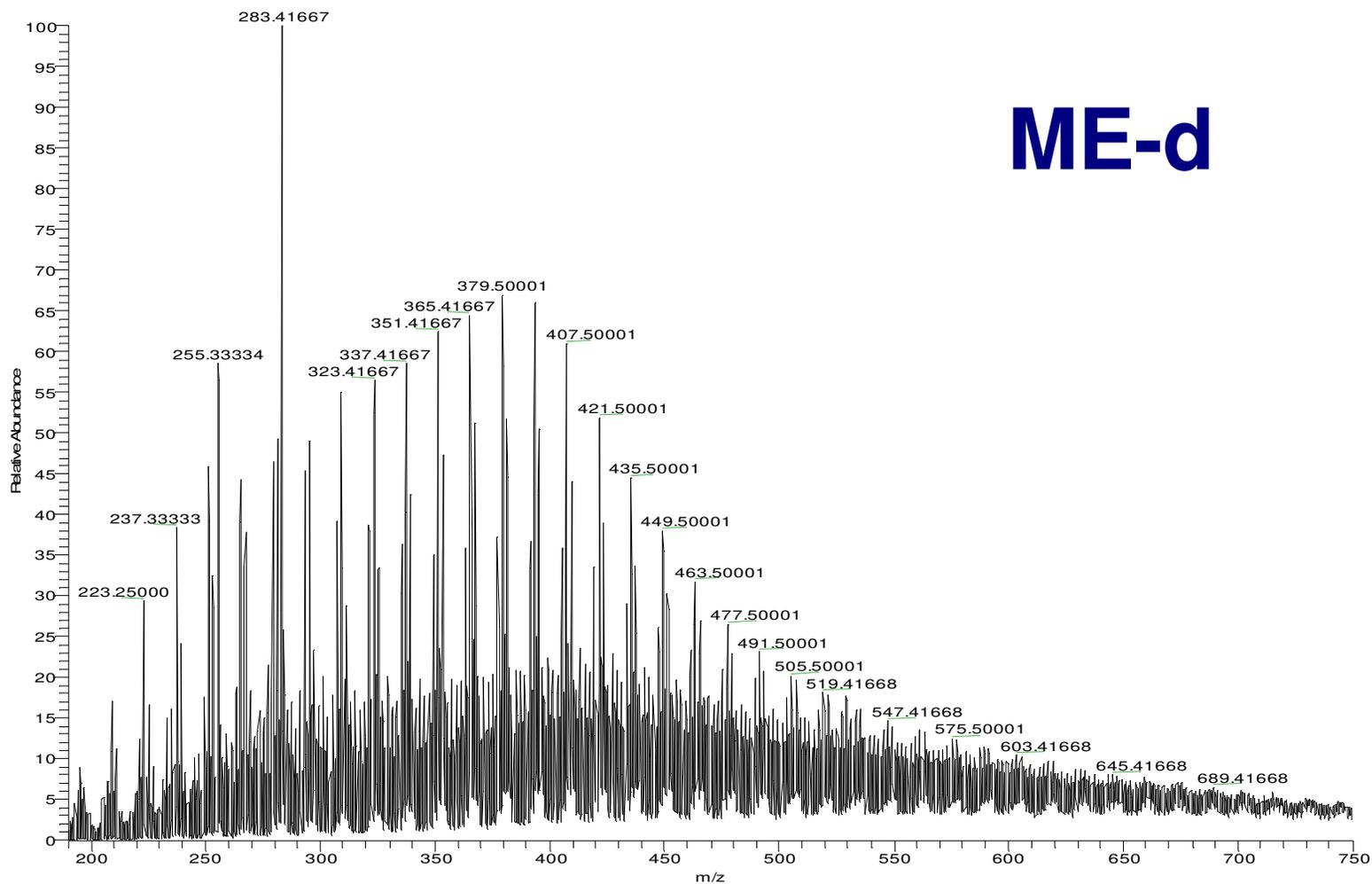


Figura 128-V: Espectro APCI (-)/(LTQ) da amostra ME-d.

ANEXO VI

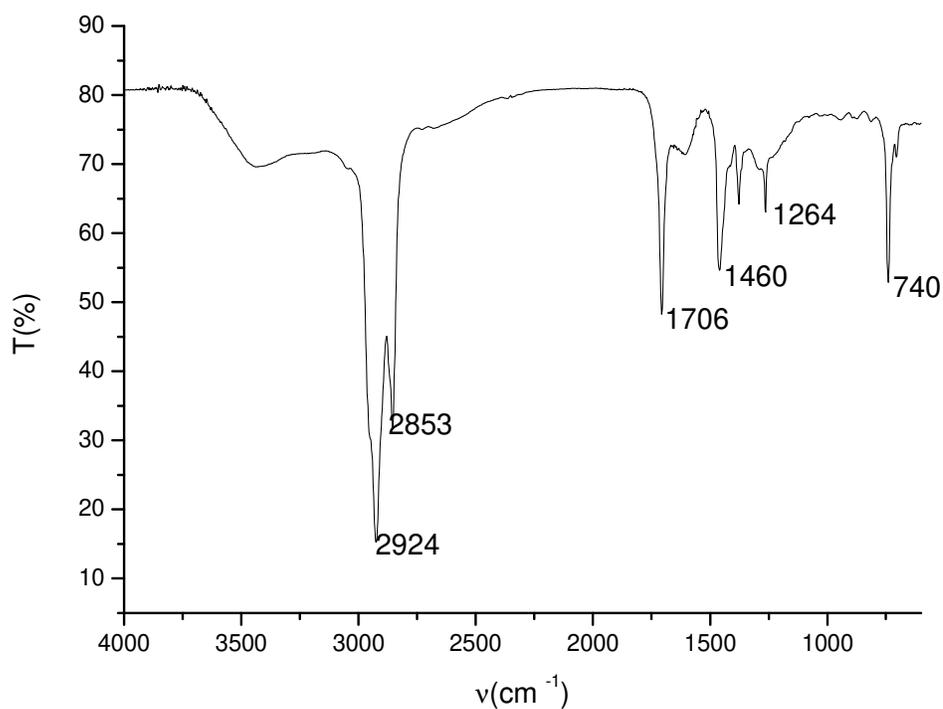


Figura 129-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida bruta do óleo ME-a.

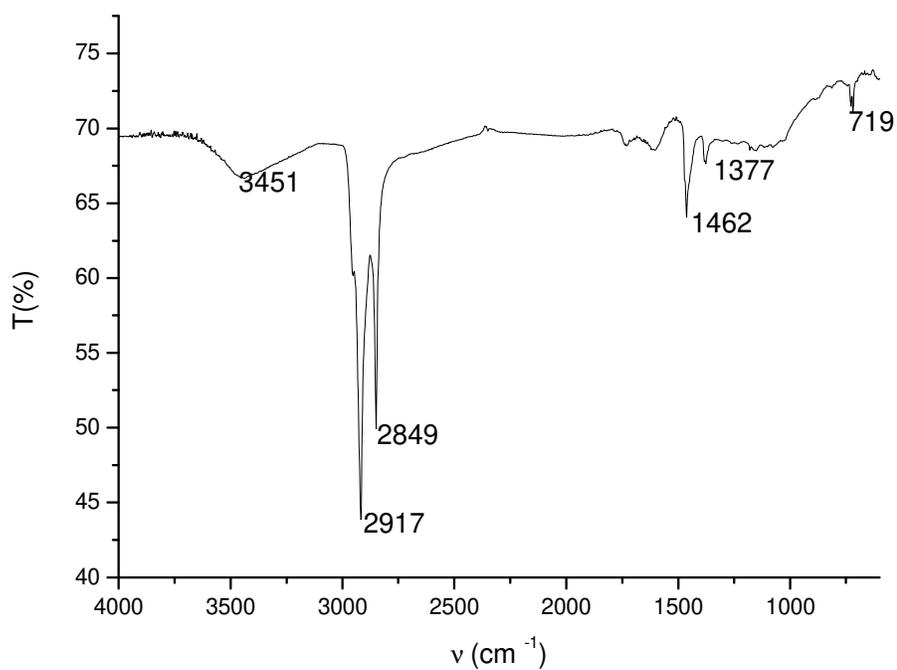


Figura 130-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-a.

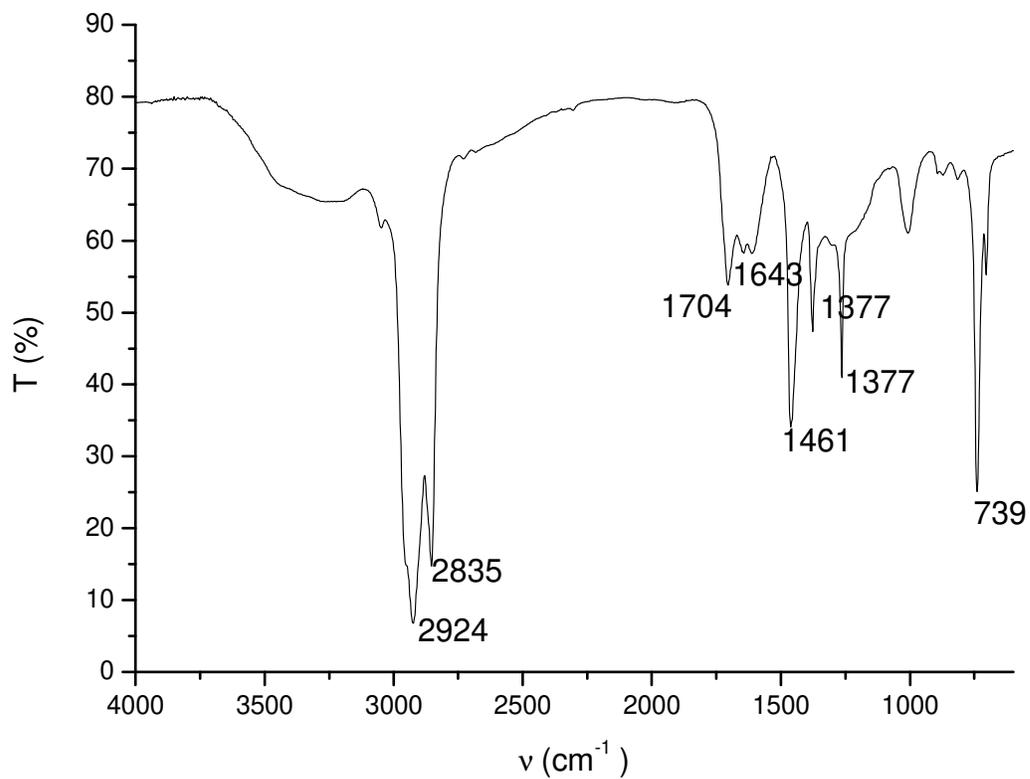


Figura 131-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida bruta do óleo ME-b.

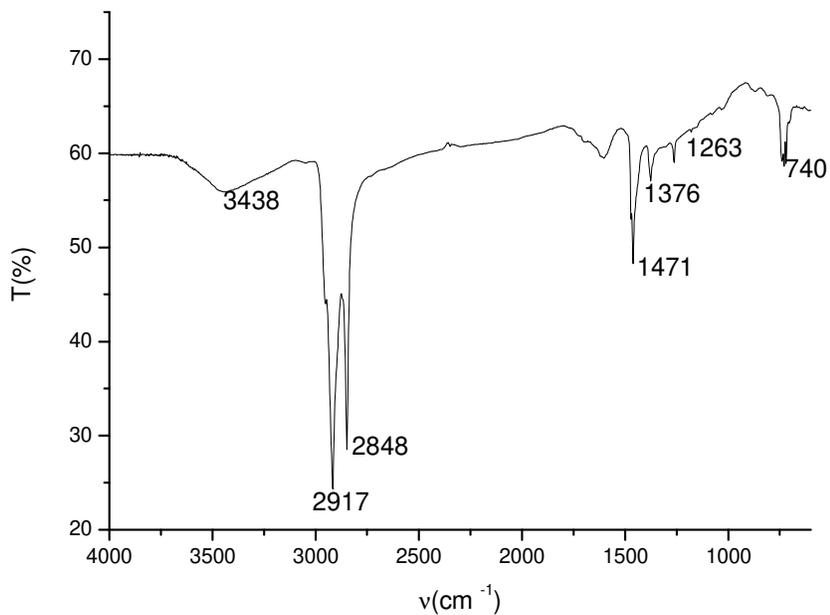


Figura 132-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-b.

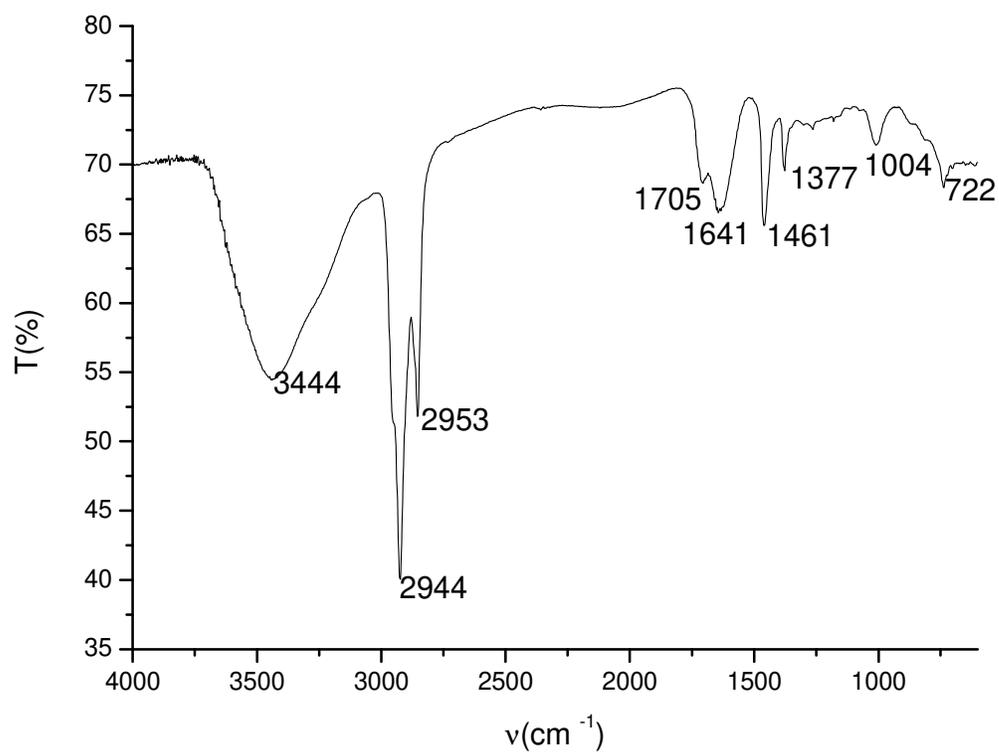


Figura 133-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo ME-c.

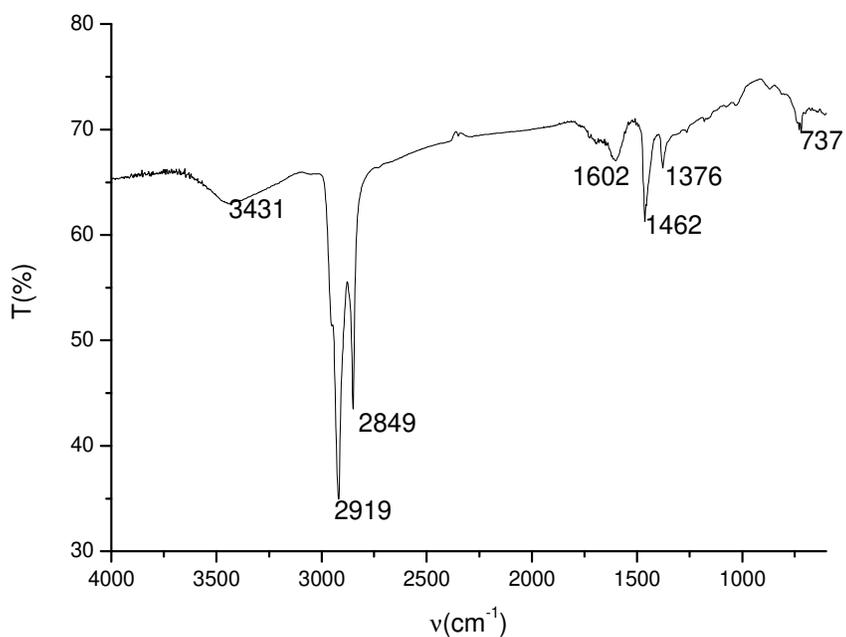


Figura 134-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-c.

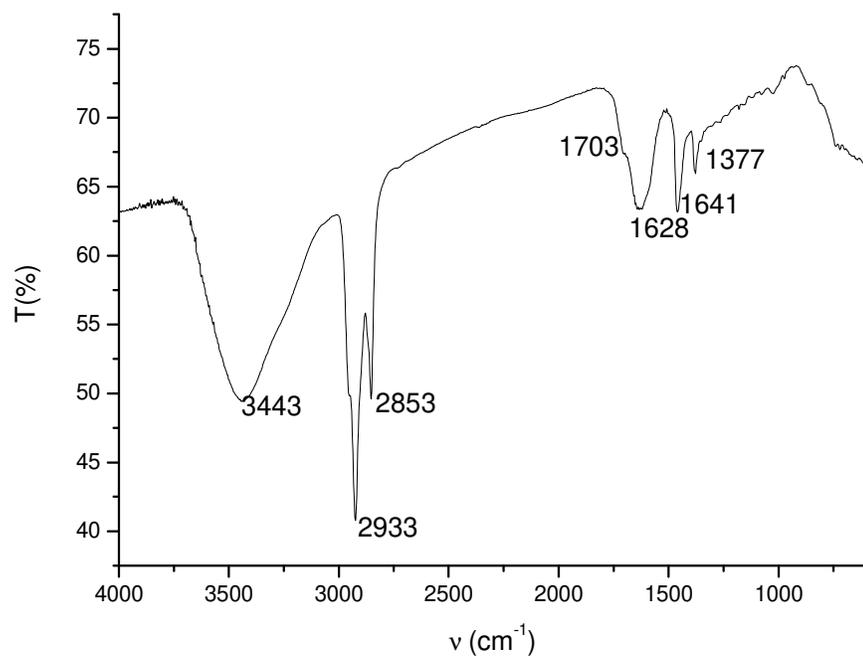


Figura 135-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo ME-d.

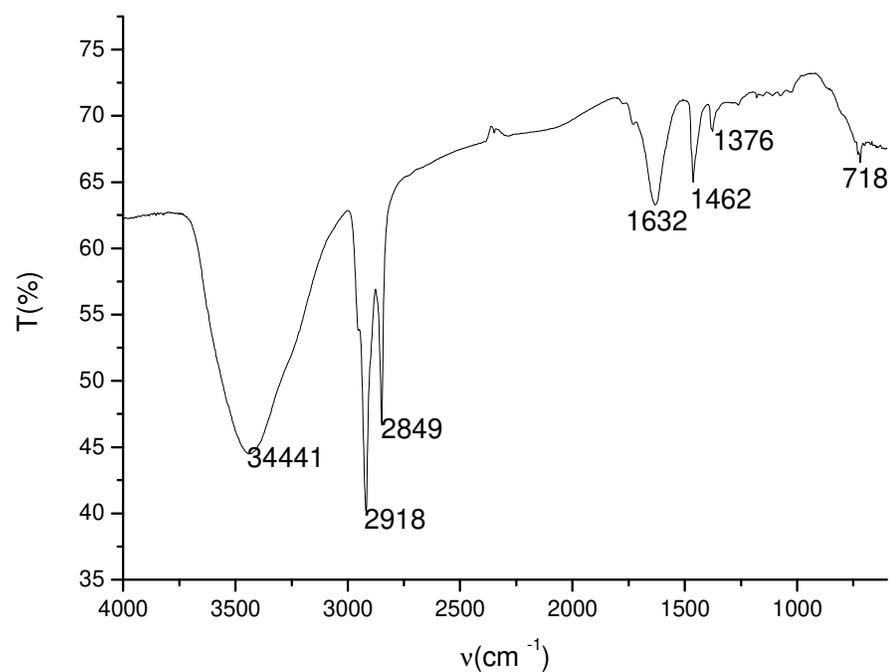


Figura 136-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME-d.

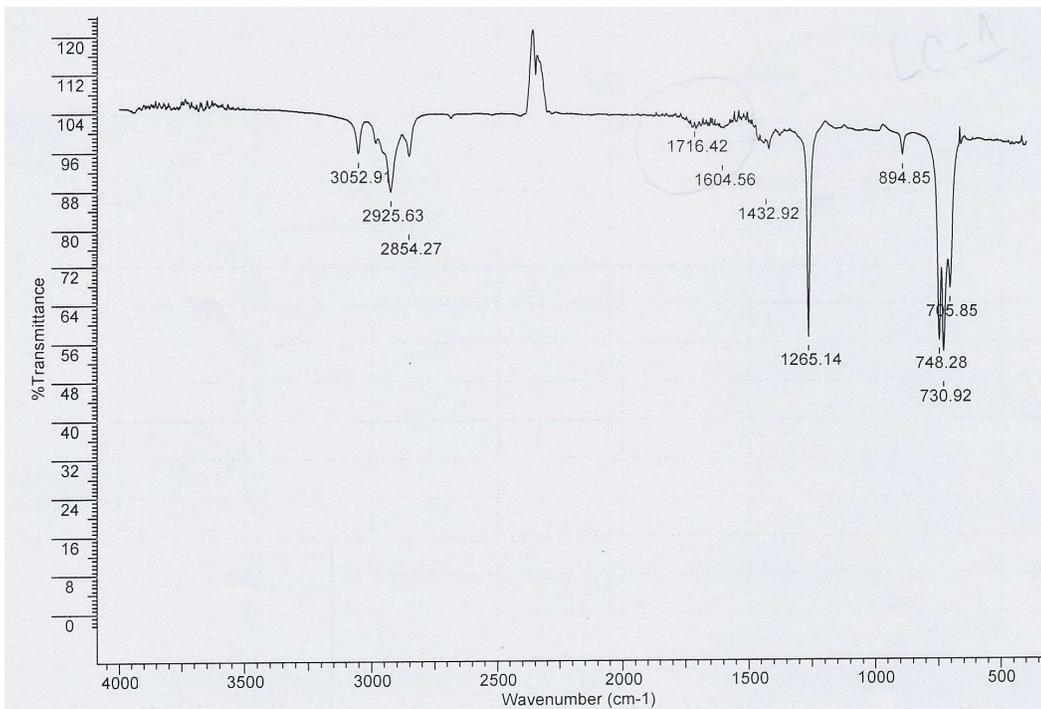


Figura 137-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo LC-1.

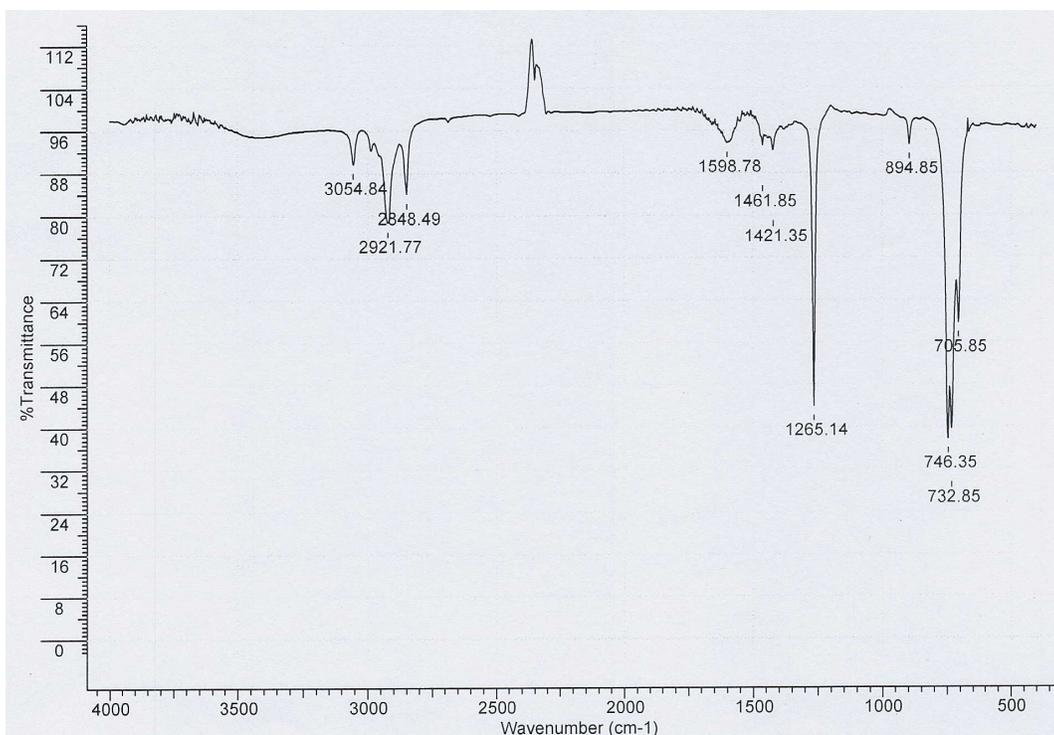


Figura 138-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo LC-1.

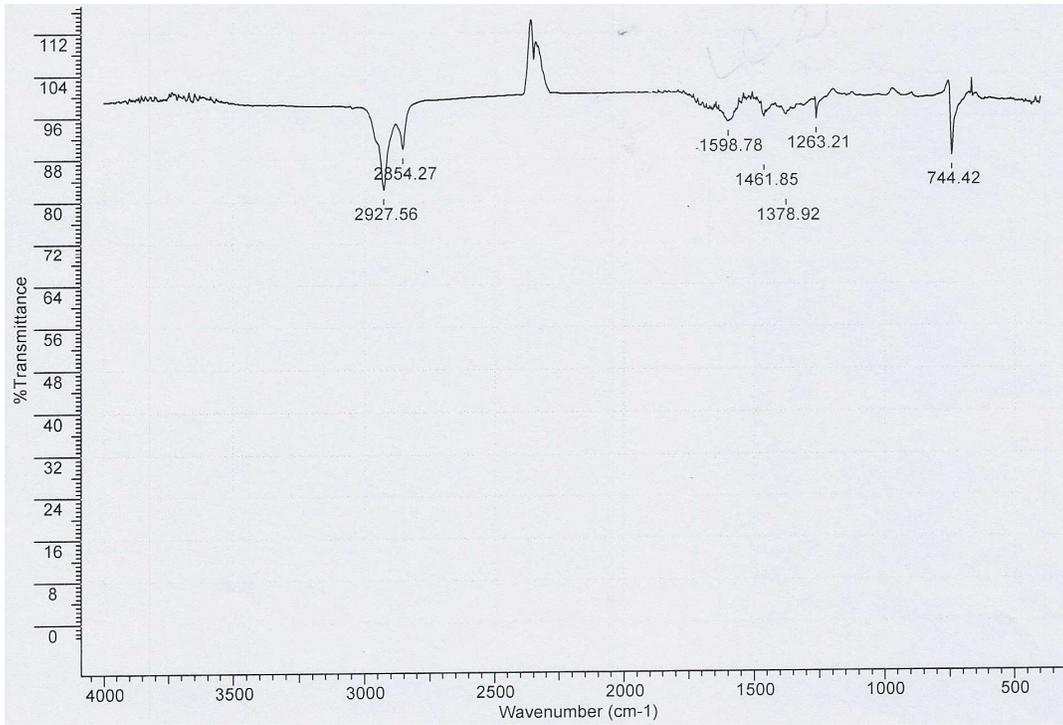


Figura 139-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo LC-2.

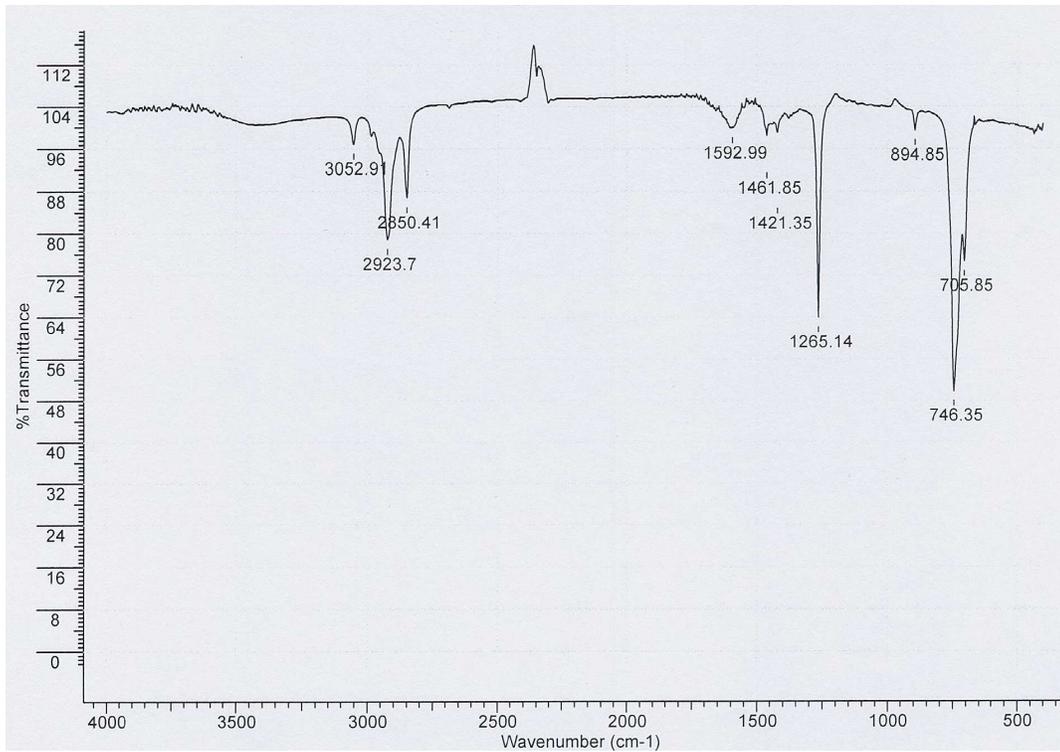


Figura 140-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo LC-2.

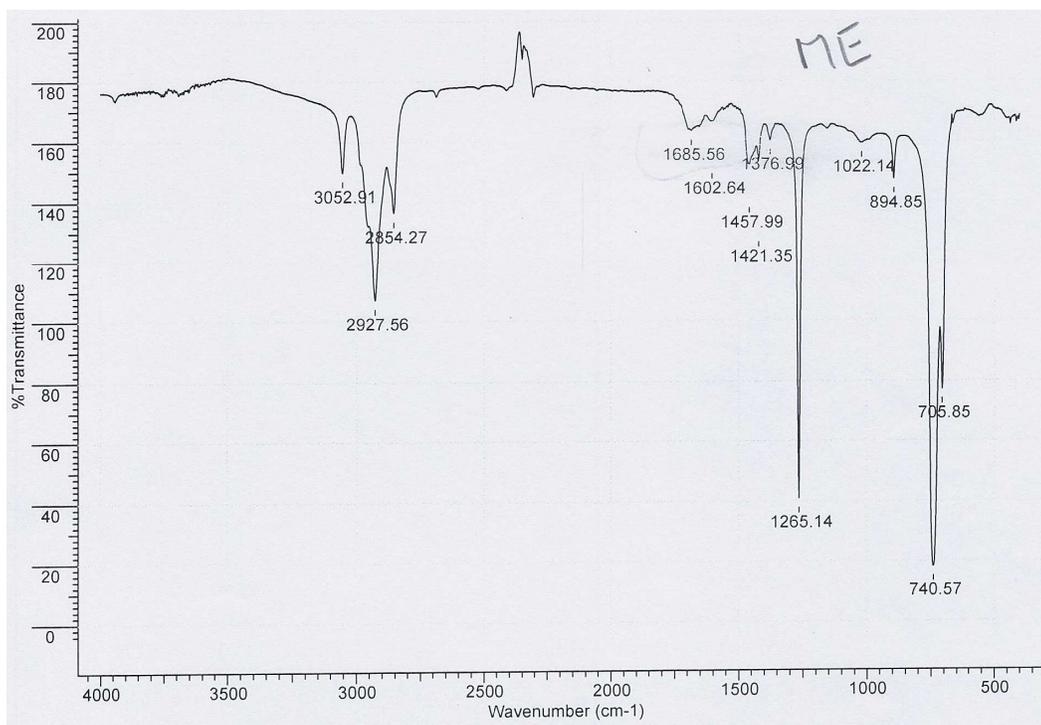


Figura 141-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo ME.

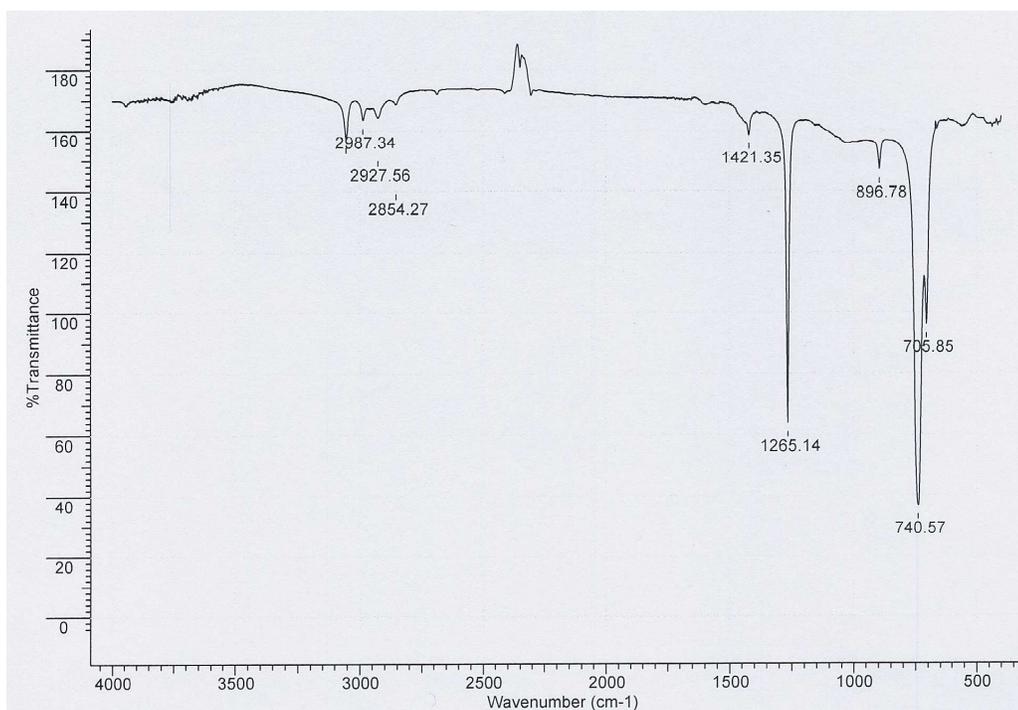


Figura 142-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo ME.

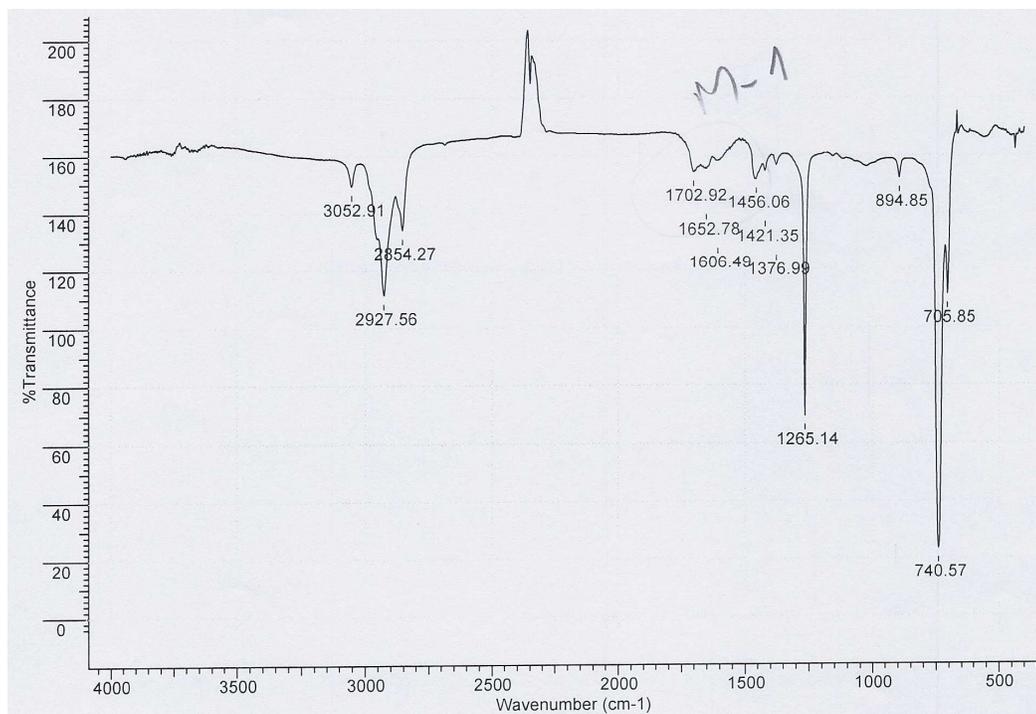


Figura 143-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo M-1.

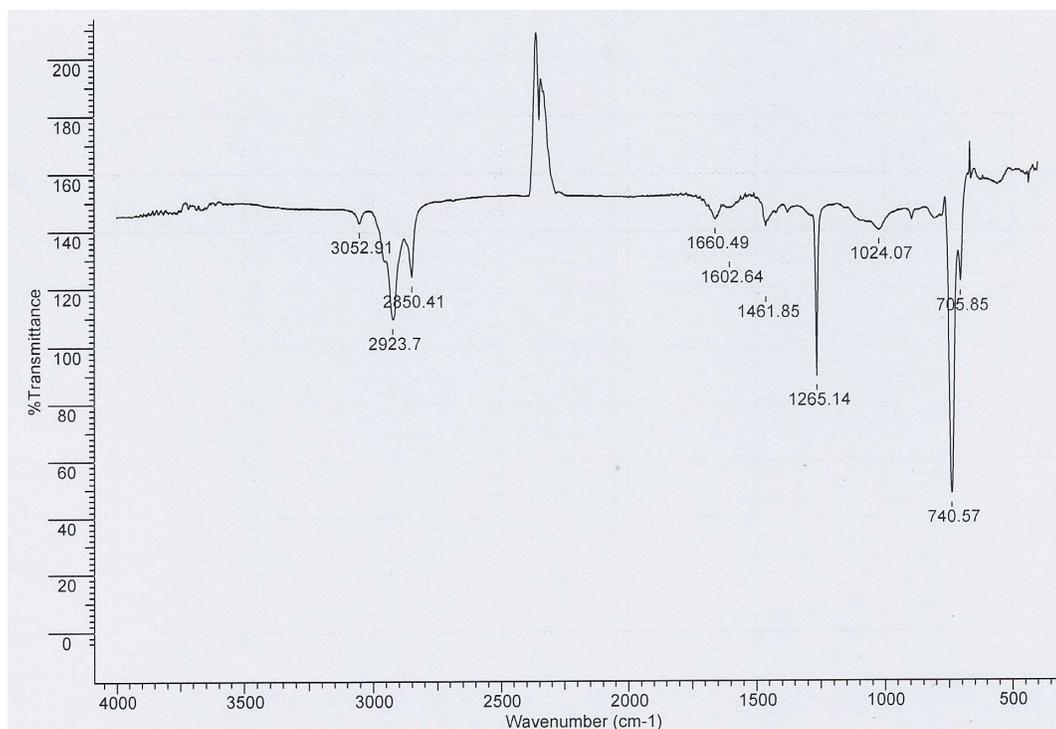


Figura 144-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo M-1.

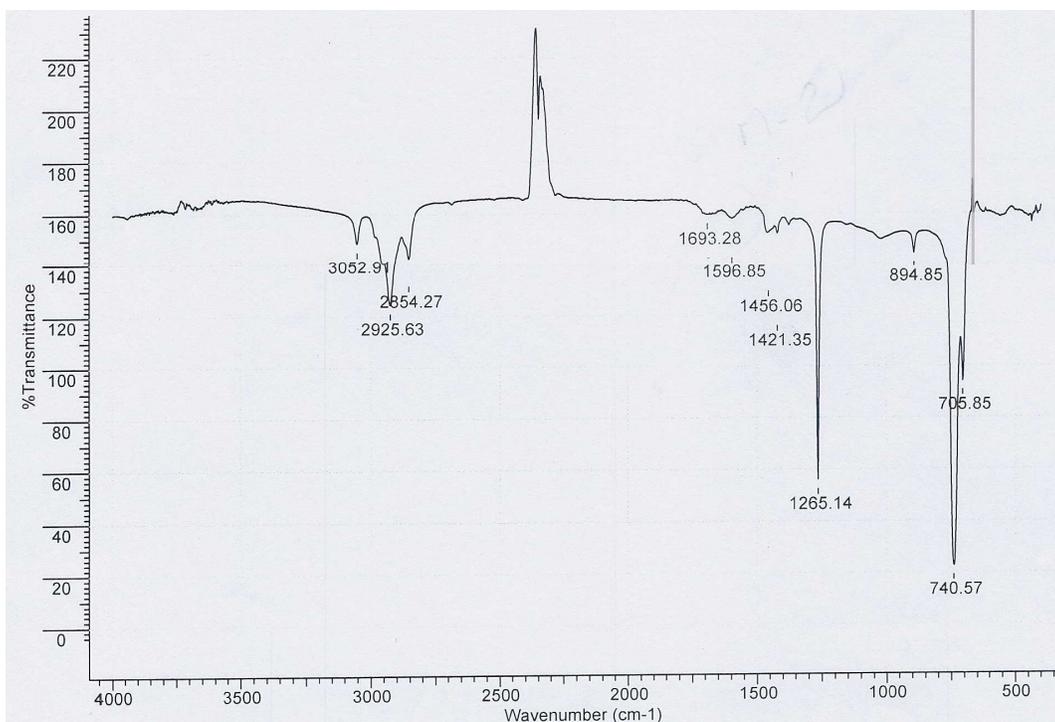


Figura 145-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração ácida do óleo M-2.

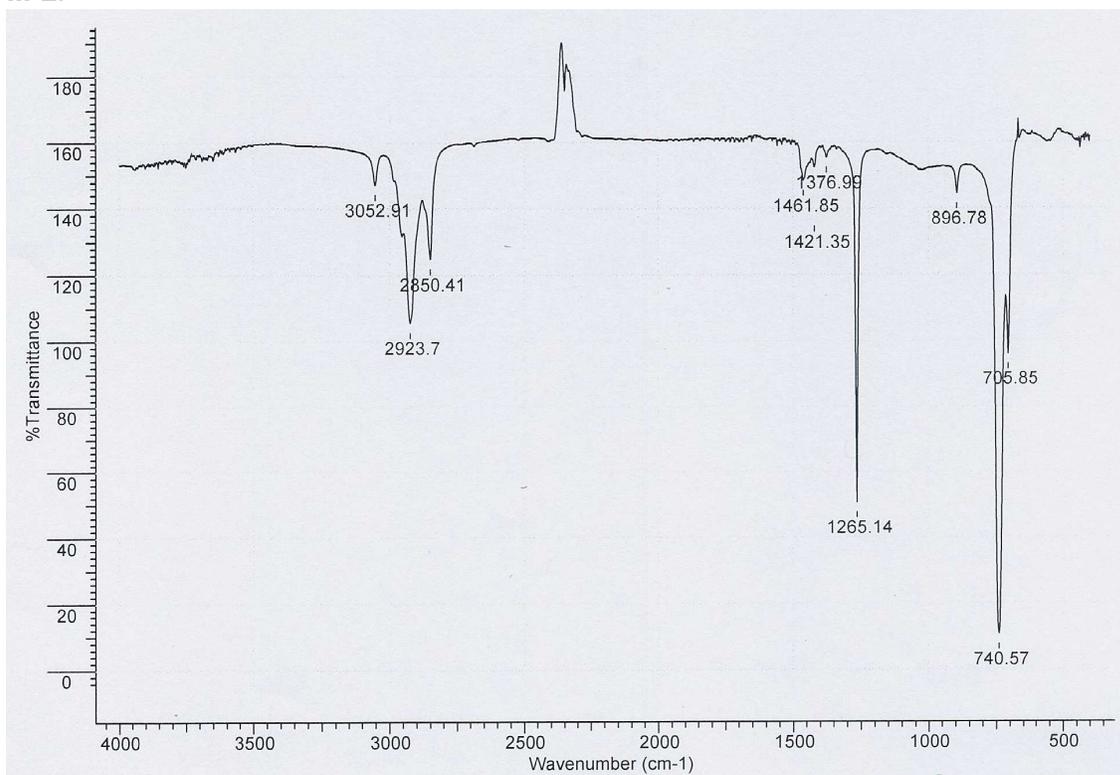


Figura 146-VI: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração neutra do óleo M-2.

ANEXO VII

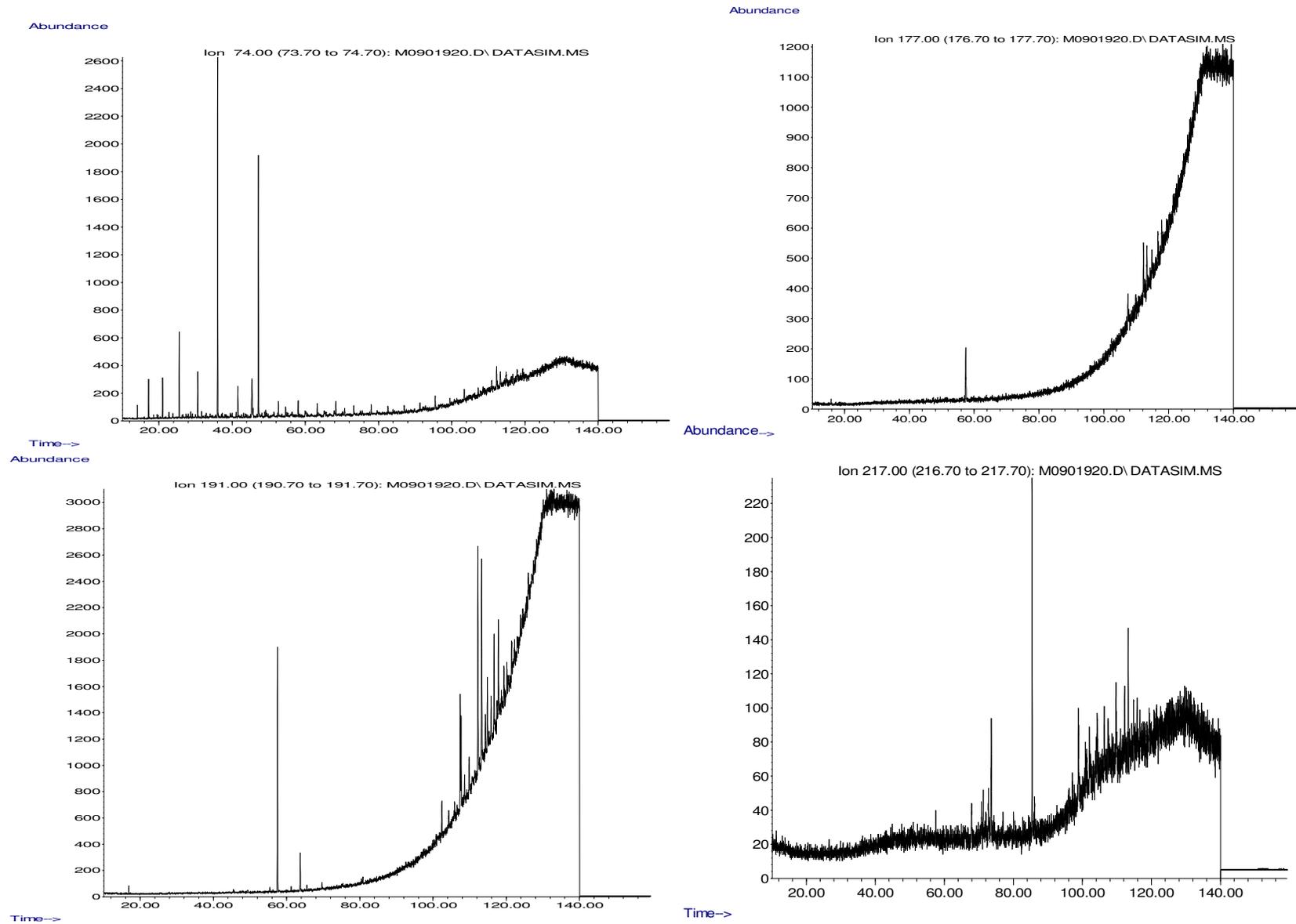


Figura 147-VII: Alguns Cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo **ME-a** (CG-EM, $m/z= 74, 177, 191$ e 217).

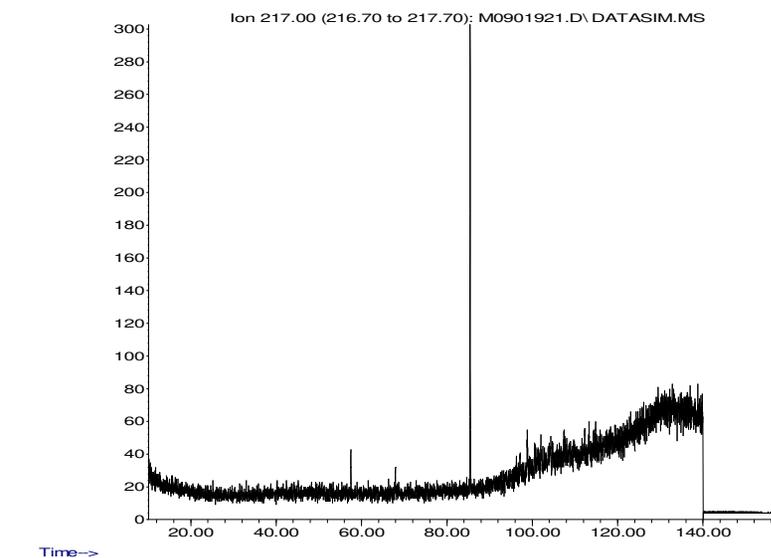
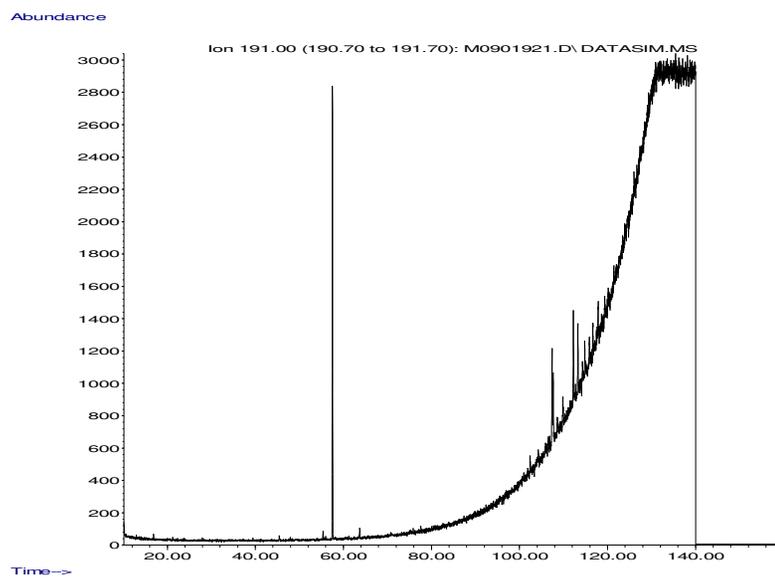
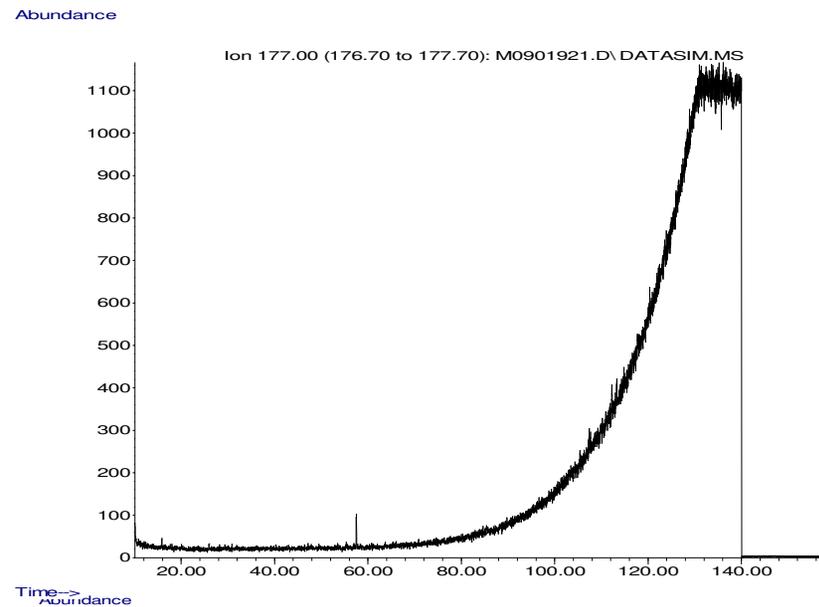
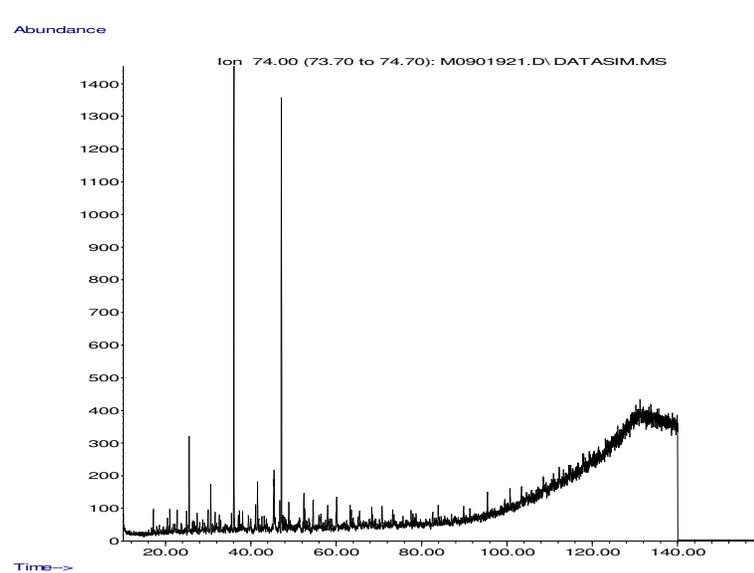
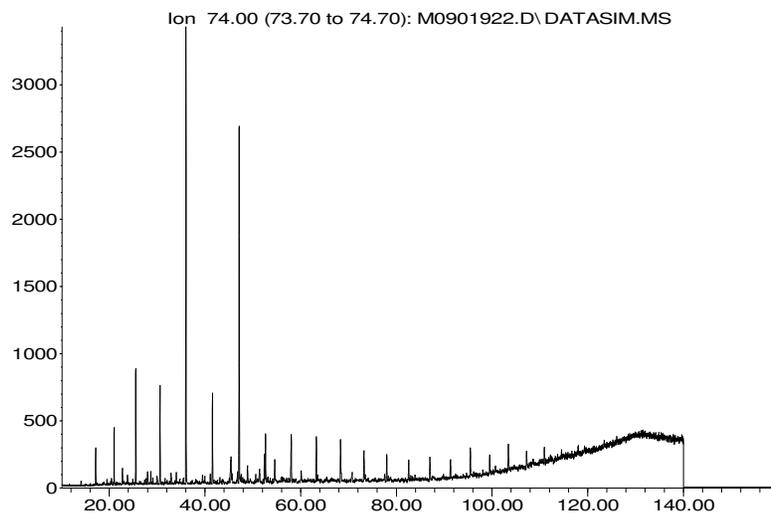


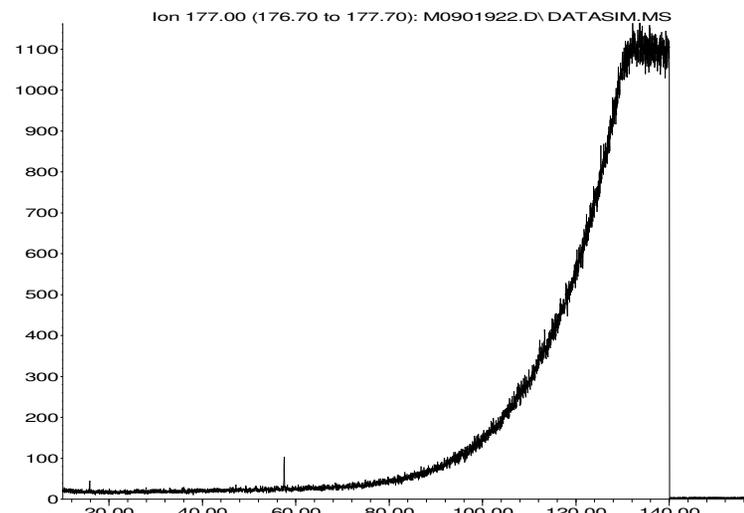
Figura 148-VII: Alguns cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo ME-b (CG-EM, $m/z= 74, 177, 191$ e 217).

Abundance



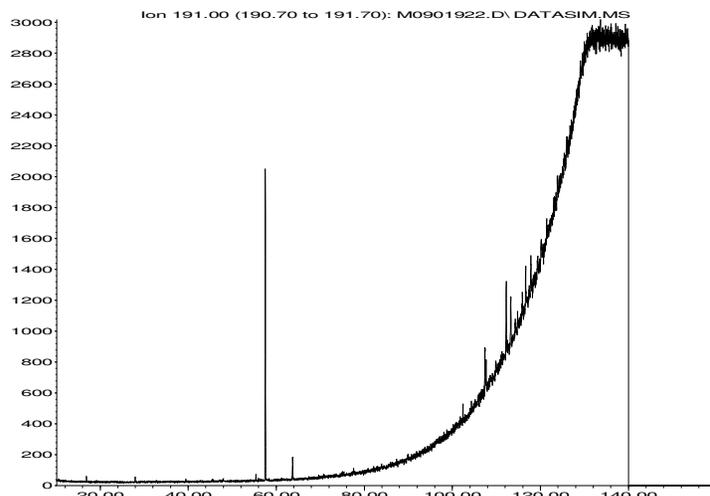
Time-->

Abundance



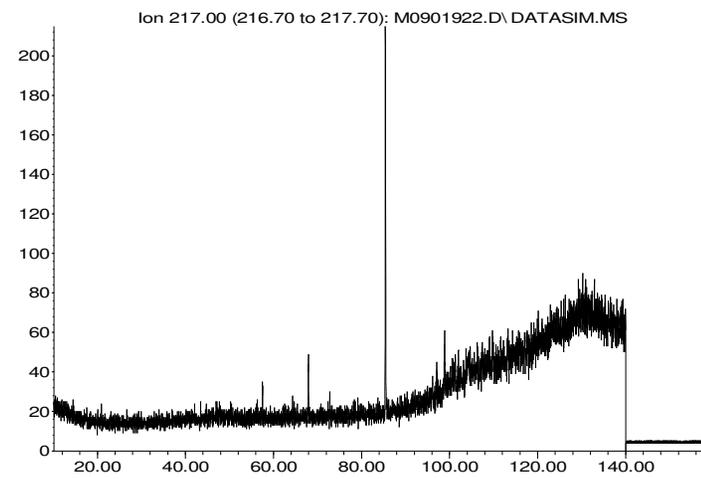
Time-->

Abundance



Time-->

Abundance



Time-->

Figura 149-VII: Alguns cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo ME-c (CG-EM, $m/z= 74, 177, 191$ e 217).

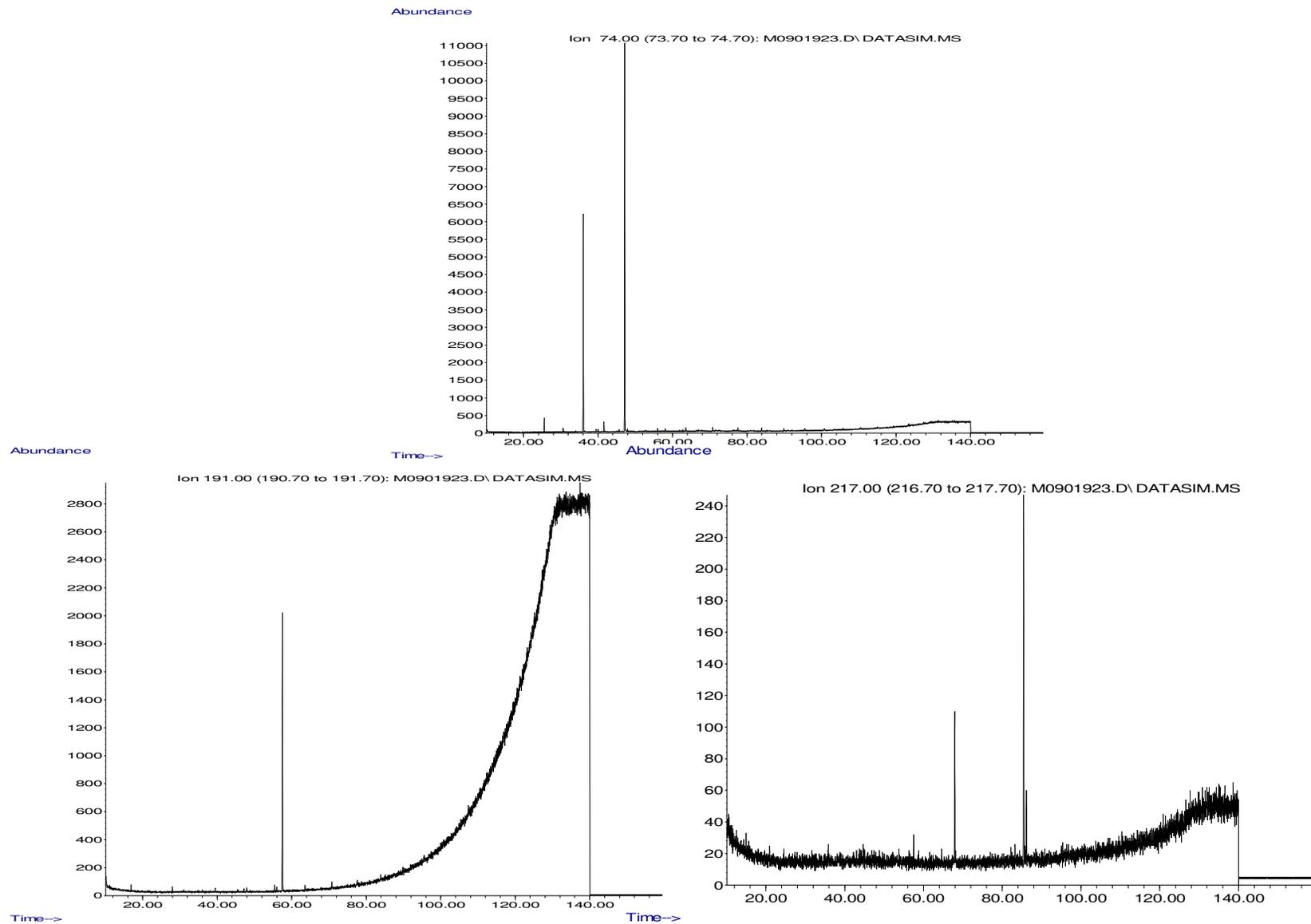


Figura 150-VII: Alguns cromatogramas de íons dos ésteres metílicos do óleo **ME-d** (CG-EM, $m/z= 74, 191$ e 217).