



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**BRENO JORGE POLLO**

**NOVAS ABORDAGENS ANALÍTICAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS  
E SEMI-VOLÁTEIS EM CIÊNCIAS ÔMICAS**

**CAMPINAS**

**2025**

**BRENO JORGE POLLO**

**NOVAS ABORDAGENS ANALÍTICAS NA ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS  
E SEMI-VOLÁTEIS EM CIÊNCIAS ÔMICAS**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto**

**Coorientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO BRENO JORGE POLLO E ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO  
AUGUSTO.**

**CAMPINAS**

**2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

P765n Pollo, Breno Jorge, 1993-  
Novas abordagens analíticas na análise de compostos voláteis e semi-voláteis em ciências ômicas / Breno Jorge Pollo. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Fabio Augusto.  
Coorientador: Paulo de Tarso Vieira e Rosa.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química.

1. Microextração em fase sólida. 2. Planejamento experimental. 3. Extração por solventes. 4. Petróleo - Análise. I. Augusto, Fabio, 1964-. II. Rosa, Paulo de Tarso Vieira e, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Química. IV. Título.

### Informações complementares

**Título em outro idioma:** Novel analytical approaches in the analysis of volatile and semivolatile compounds in omics sciences

**Palavras-chave em inglês:**

Solid phase microextraction

Experimental design

Solvent extraction

Petroleum - Analysis

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Fabio Augusto [Orientador]

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Dosil Pereira de Jesus

Janaina Heberle Bortoluzzi

Andréa Rodrigues Chaves

**Data de defesa:** 06-02-2025

**Programa de Pós-Graduação:** Química

**Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)**

Não se aplica

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7966-1095>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7051982750922067>

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Fabio Augusto (Orientador)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Carla Beatriz Grespan Bottoli (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Janaina Heberle Bortoluzzi (IQB-UFAL)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Andréa Rodrigues Chaves (LaCEM-UFG)

A Ata de defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

*“Hoje, tudo é tornado enumerável,  
a fim de ser convertido em linguagem do desempenho e da eficiência.*

*Assim, hoje, tudo aquilo que não é enumerável cessa de ser.”*

*Byung-Chul Han*

*Aos que em mim acreditaram,  
porque eu mesmo duvidei.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Dr. Fabio Augusto, primeiramente. Sua orientação durante meus 10 anos no laboratório foram fundamentais para as conquistas alcançadas ao longo desta jornada científica. Ao Dr. Paulo Rosa pela coorientação ao longo de 4 anos, que abriu portas do seu laboratório para aplicações “meio brutas” na química analítica. Ao Dr. Leandro Wang pelo apoio dentro do laboratório e estrutura. Ao IQ e Unicamp pela estrutura concedida. À Capes pelas bolsas concedidas (Print: 88887.695105/2022-00). À Prof. Dr<sup>a</sup>. Elia Psillakis, TUC – Chania, Grécia, pelo acolhimento, orientação e desenvolvimento do trabalho apresentado no capítulo 5.

À minha família pelo apoio durante todos estes anos. A crença inabalável de vocês no poder da educação move e continua movendo montanhas. Se todos tivessem uma família como vocês, o mundo seria bem diferente. Obrigado. À minha namorada, Caren, pela paciência durante o ano mais caótico da minha vida. Seu apoio e compreensão e foram fundamentais nesse período de incertezas sem fim e mudanças intensas. Meu obrigado de coração. Te amo.

À Bia, pelos anos de amizade, suporte e cervejas em dias, horas e lugares improváveis. À Mari, porque é muito difícil ser seu amigo, mas seguimos firmes e fortes. Ao Ari, por manter a “lojinha” sempre aberta (agora ampliada) e fornecimento de frituras. Aos meus amigos fora do laboratório, Zé, Ca, Vitinho, Vitor, Camila, Bruna, Humanas, entre muitos outros. Vocês sempre foram um dos pilares da minha (in)sanidade. Aos amigos de ciência e perrengues, Motoboy, Fresta, Ju, João, Isabelita, Gabi, Isa, Mateus, João V., Samuca, Bia, Paty, Bezerra, Victor H., Hery, Marcelo, Vivi, Cid. Os momentos com vocês me deram forças para caminhar, porque sempre que eu olhava para o lado eu via que tinha alguém mais #\$\$#@# que eu! Obrigado por tanto!

Καλημερα Βραζιλία, καλησπερα Ελλάδα! Αν μπορεί να διαβάσει αυτό, ήσουν πολύ σημαντική για τη δουλειά και τη ζωή μου. Τώρα η ζωή μου είναι λίγο πιο ενδιαφέρουσα εξαιτίας σου (σίγουρα έχουμε γραμματικά λάθη εδώ, αλλά δεν με νοιάζει!). Και «Κυρία Ψυλλάκη, δεν μπορώ να δουλέψω αύριο γιατί θέλω να πάω παραλία!» Σας ευχαριστώ παρα παρα πολύ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo: 88887.339445/2019-00.

## RESUMO

Os protocolos padrão para a análise de rochas geradoras de óleo, material este de altíssima complexidade, exigem diversas operações unitárias entre as diferentes etapas necessárias para isolamento da fração de interesse geoquímico. As diferentes etapas envolvidas no processo de preparo de amostra chegam a demandar entre 30 e 80 h/amostra a depender do protocolo adotado e cerca de 1,2 L/amostra de solventes de alta toxicidade, incluindo diclorometano e hexano.

Neste trabalho, exploramos técnicas atuais consolidadas e emergentes (microextração em fase sólida assistida por vácuo – Vac-HSSPME e extração com fluidos pressurizados – água e etanol), para a análise de compostos semi-voláteis (biomarcadores) em amostras de rocha geradora e também hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) em amostras de água. As técnicas utilizadas tiveram seu impacto ambiental avaliados através da métrica AGREEPrep e alinhamento com os princípios da química analítica verde (GAC) também foi avaliado.

Com a aplicação de planejamento experimental às amostras de rocha geradora de óleo, o consumo de solventes e tempo foi reduzido, passando para cerca de 150 mL e 3 h por amostra. Conseqüentemente, o impacto ambiental pela métrica AGREEPrep passou de 0,04 no método clássico para cerca de 0,30 com Vac-HSSPME e etanol. Com Vac-HSSPME, foi possível o estudo de aspectos fundamentais da técnica, onde verificou-se que a extração de analitos em condições não convencionais, isto é, amostras sólidas, estáticas, não solubilizadas, pode estar diretamente correlacionada ao coeficiente de difusão dos analitos na fase vapor ( $D_G$ ). Com etanol, verificou-se que esta pode ser uma substituta direta para os protocolos convencionais devido à alta similaridade no perfil de biomarcadores e equivalência nos parâmetros diagnóstico nas amostras estudadas. O estudo com PAHs foi desenvolvido em parceria com a Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elia Psillakis em Creta – Grécia, onde foi explorada geometria de maior volume associada a pressão reduzida para análise de componentes traço em amostras de água.

A abordagem geral aqui proposta pode ser expandida para amostras de diferentes naturezas, tomando o planejamento experimental como veículo para miniaturização e redução de impacto ambiental.

## ABSTRACT

The standard protocols for the analysis of oil-source rocks, a highly complex material, require several unit operations between the different steps necessary for the isolation of the fraction of geochemical interest. The different steps involved in the sample preparation process require between 30 and 80 h/sample, depending on the protocol adopted, and about 1.2 L/sample of highly toxic solvents, including dichloromethane and hexane.

In this work, we explore consolidated and emerging techniques (vacuum-assisted solid-phase microextraction – Vac-HSSPME and pressurized fluid extraction – water and ethanol), for the analysis of semi-volatile compounds (biomarkers) in oil-source rock samples and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water samples. The techniques used had their environmental impact evaluated through the AGREEP metric and alignment with the principles of green analytical chemistry (GAC) was also evaluated.

With the application of experimental design to the oil-source rock samples, the consumption of solvents and time was reduced, going to about 150 mL and 3 h per sample. Consequently, the environmental impact by the AGREEP metric went from 0.04 in the classical method to about 0.30 with Vac-HSSPME and ethanol. With Vac-HSSPME, it was possible to study fundamental aspects of the technique, where it was found that the extraction of analytes under unconventional conditions, i.e., solid, static, non-solubilized samples, can be directly correlated to the diffusion coefficient of the analytes in the vapor phase ( $D_G$ ). With ethanol, it was found that this can be a direct substitute for conventional protocols due to the high similarity in the biomarker profile and equivalence in the diagnostic parameters in the samples studied. The study with PAHs was developed in partnership with Prof. Dr. Elia Psillakis in Crete – Greece, where higher volume geometry associated with reduced pressure was explored for trace component analysis in water samples.

The general approach proposed here can be expanded to samples of different natures, taking experimental design as a vehicle for miniaturization and reduction of environmental impact.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução generalizada da MO durante e após sedimentação. Adaptado de Prata [3]. Modificado de Peters et al. [1].....	22
Figura 2: Cromatogramas para óleos em diferentes estágios de biodegradação. Mais biodegradado (acima); menos biodegradado (centro) e não biodegradado (abaixo). Modificado de Prata [3].....	26
Figura 3: Óleos brasileiros em diferente estágio de maturidade térmica. Amostra CP11 apresenta um perfil bimodal característico de óleos de baixa maturação. Abaixo o perfil VAL(B) de um óleo de maior maturidade. Modificado de Prata [3]. ....	27
Figura 4: Processo de formação dos isoprenóides Pristano e Fitano em ambientes óxicos e anóxicos. Adaptado de Pollo [19].....	28
Figura 5: Conversão do precursor bacteriohopanotetrol para hopano C30 (H30). Adaptado de Pollo [19].....	29
Figura 6: Fragmentos característicos da classe dos terpanos ou hopanos pentacíclicos. Modificado de Junior [33]. ....	29
Figura 7: Estruturas e equilíbrio entre Tm (17 $\alpha$ (H)-22,29,30-Trinorhopano) e Ts (17 $\beta$ (H)-22,29,30-Trinorneohopano).....	30
Figura 8: Estrutura de esteranos regulares de 27, 28 e 29 carbonos, também chamados de colestanos, ergostanos e estigmastanos, respectivamente. ....	32
Figura 9: Numeração da estrutura da classe dos esteranos (esquerda) e seus fragmentos característicos (direita). Modificado de Junior [33]. ....	33
Figura 10: Nível de biodegradação indicada pela ausência de diferentes classes de compostos do petróleo. Adaptado de Prata e Peters [2,17].....	34
Figura 11: Holder para extração manual em SPME sobre amostra acondicionada em vial para extração através do Headspace (esquerda). (A): fibra extratora exposta do interior da agulha protetora. (B): aproximação na fibra contendo o polímero extrator. Adaptado de Pollo [19]..	36
Figura 12: Tempo de equilíbrio e quantidade de analito extraído em função da espessura do filme (esquerda). Tipo de fibra em função da polaridade e volatilidade dos analitos (direita). Adaptadas de Pawliszyn [47]. ....	38

Figura 13: Vac-HSSPME e modelo dos dois filmes na interface água-ar onde: (w), (g) e (f) são as fases de água, gás e fibra de SPME, respectivamente; C <sub>g</sub> e C <sub>w</sub> são as concentrações nas fases gasosa e aquosa. Adaptado de Psillakis [49].	39
Figura 14: Propriedades da água quente pressurizada. Adaptado de Kronholm [55].	41
Figura 15: Pictograma da métrica AGREE composto de 12 entradas (esquerda). Pictograma para a métrica complexGAPI composto de 26 entradas (direita). Adaptado de Hussien et al. [59].	43
Figura 16: Fluxograma para o método clássico (Soxhlet+SARA) para análise de rocha-geradora. Adaptado de Pollo [19].	48
Figura 17: Aparato para redução de pressão no interior do vial antes da extração com HSSPME. A) Bomba de vácuo, B) Mangueira de silicone, C) Seringa GC, D) vial de 22 ml, E) Tampa Mininert® modificada, F) Septo GC instalado na tampa modificada. Adaptado de Pollo [10].	50
Figura 18: Superfícies de resposta 217 Da do DD. (A) Temperatura de extração fixada em 250 °C. (B) Tempo de extração fixado em 15 minutos. (C) Tempo de evacuação fixado em 15 minutos. Modificado de Pollo et. al. [10].	54
Figura 19: Curvas analíticas considerando a faixa de 10 a 130 mg M0900 para n-alcano C <sub>29</sub> (A), faixa de 10 a 100 mg para terpano H30 (B) e faixa de 10 a 130 mg para esterano C <sub>27</sub> ba20R identificação 'b' (C). Modificado de Pollo et. al. [10].	54
Figura 20: Fingerprints Vac-HSSPME e Soxhlet para a mesma rocha-geradora comparadas. Acima, perfil Vac-HSSPME (preto). Abaixo, o perfil de Soxhlet (azul).	55
Figura 21: Vac-HSSPME vs. Soxhlet+SARA para esteranos 217 Da de 46 a 69 minutos. a: C <sub>27</sub> 13β(H),17α(H) (20S) diasterane, b: C <sub>27</sub> 13β(H),17α(H) (20R) diasterane, c: C <sub>27</sub> 5α(H), 14α(H), 17α(H) (20R) sterane, d: C <sub>28</sub> 5α(H), 14α(H), 17α(H) (20R) sterane, e: C <sub>29</sub> 5α(H), 14β(H), 17β(H) (20S) sterane, f: C <sub>29</sub> 5α(H), 14β(H), 17β(H) (20R) sterane, g: C <sub>29</sub> 5α(H), 14α(H), 17α(H) (20R) sterane.	56
Figura 22: Espectro de massas para o pico 'd' da amostra S1830. Acima: Vac-HSSPME, Abaixo: Extração Soxhlet.	56
Figura 23: Cromatograma de íons selecionados (SIM) 191 Da de 51 a 65 minutos para a amostra S1830. Invertido: Extração Soxhlet. Acima: Vac-HSSPME. A: 18α(H)-22,29,30-trisnorhopano (Ts), B: 17α(H)-22,29,30-trisnorhopano (Tm), C: C <sub>30</sub> 17α, 21β(H) terpane	

(H30), D: C <sub>31</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22S terpane (H <sub>31</sub> S), E: C <sub>31</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22R terpane (H <sub>31</sub> R), F: Gammacerane, G: C <sub>32</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22S terpane (H <sub>32</sub> S), H: C <sub>32</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22R terpane (H <sub>32</sub> R), I: C <sub>33</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22S terpane (H <sub>33</sub> S), J: C <sub>33</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22R terpane (H <sub>33</sub> R), K: C <sub>34</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22S terpane (H <sub>34</sub> S), L: C <sub>34</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22R terpane (H <sub>34</sub> R), M: C <sub>35</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22S terpane (H <sub>35</sub> S), N: C <sub>35</sub> 17 $\alpha$ , 21 $\beta$ (H), 22R terpane (H <sub>35</sub> R).....	57
Figura 24: Espectro de massas para o pico 'C' da amostra S1830. Acima: Vac-HSSPME, Abaixo: Extração Soxhlet.....	57
Figura 25: Correlação LTPRI vs. (S/N) em Vac-HSSPME. ....	61
Figura 26: Coeficientes de difusão em fase gasosa (DG) calculados usando o modelo FSG em P = 200 mbar e T = 250 °C para n-alcanos de (C1, m = 1) a (C50, m = 50). A inserção (direita) mostra DG para o intervalo entre C22 e C31. Adaptado de Pollo et. al. [10] .....	64
Figura 27: Gráfico AGREEPrep. O centro mostra o score final entre 0 e 1. Ao redor estão os fatores, e seu tamanho reflete o peso considerado no cálculo. Vac-HSSPME (esquerda), Soxhlet+SARA (direita). ....	67
Figura 28: (A): 2 picos coeluentes sendo separados em um espaço de 6 modulações. (B): desdobramento dos dados do detector (vetor) para forma de matriz. (C): visualização dos dados na forma de espaço cromatográfico contendo os 2 tempos de retenção e separação dos picos que antes coeluíam. Adaptado e modificado de Pollo et. al. e Pollo et. al. [19,86] .....	71
Figura 29: Sistema de extração com água pressurizada não comercial. (a), válvula micrométrica para controle preciso da pressão na saída do sistema; (b), bomba-seringa; (c), estufa para aquecimento do sistema; (d), serpentina de troca de calor para pré-aquecimento da água; (e), coluna extratora. (f), frasco coletor.....	72
Figura 30: Cromatograma SCAN de extrato PHWE à 200 °C em estufa. ....	73
Figura 31: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS para amostra de óleo extraído de rocha geradora. ....	74
Figura 32: Cromatogramas obtidos para as 3 fibras testadas. ....	78
Figura 33: Cromatograma bidimensional abrangente da amostra 14. ....	79
Figura 34: Resíduos padronizados para cada amostra. Linha tracejada indica os limites a 95% de confiança.....	82
Figura 35: Superfície de resposta à pressão fixa de 150 %. ....	83

Figura 36: Superfície de resposta à temperatura fixa de 275 °C. ....	84
Figura 37: Superfície de resposta à vazão fixa de 2,5 mL/min. ....	84
Figura 38: Coloração das amostras 14 (#3) e 07 (#15).....	85
Figura 39: Perfil visual obtido na avaliação cinética utilizando as condições ótimas do planejamento Doehlert.....	86
Figura 40: Fluxograma das diferentes etapas, modificações e principais conclusões de cada etapa.....	87
Figura 41: Fluxograma simplificado do processo clássico (acima) e das etapas contornadas para o método proposto com etanol (abaixo). Etapas de secagem, ressuspensão e diluição foram omitidas para melhor visualização. ....	90
Figura 42: Aparato para extrações com etanol pressurizado. Syringe pump: bomba seringa; GC oven: forno de GC; Extraction column: coluna de extração; Micrometric valve: válvula micrométrica. ....	92
Figura 43: SCAN obtidos de extrações a 35 °C e 235 °C durante o processo de otimização com a amostra M0365. ....	94
Figura 44: A) Exemplificação dos compostos de interesse sendo extraídos com 35 mL de etanol. B) Limpeza da sessão pós-coluna após o processo de extração. ....	95
Figura 45: Cromatogramas dos extratos obtidos com 35 mL de etanol e 5 mL etanol na sessão pós coluna, ambos à 10 mg/mL.....	97
Figura 46: Massa acumulada (m/m) vs volume de etanol para extração de biomarcadores em rocha-geradora para a amostra S0579. ....	98
Figura 47: Fingerprint da extração com etanol (acima) vs. Soxhlet (abaixo). ....	99
Figura 48: Comparativo dos espectros de massas obtidos para o pico 'i' através do método com etanol (acima) e pelo método convencional Soxhlet+SARA (abaixo). ....	100
Figura 49: SIM para esteranos 217 Da para etanol (acima) vs. Soxhlet+SARA (abaixo). ....	100
Figura 50: Cromatograma de íons selecionados (SIM) 191 Da de 51 a 65 minutos para a amostra S0241. Invertido: Extração Soxhlet. Acima: Etanol. ....	101
Figura 51: Espectro de massas para o pico 'B' da amostra S0241. Acima: Etanol, Abaixo: Extração Soxhlet.....	101

Figura 52: Gráfico AGREEPrep. O centro mostra o score final entre 0 e 1. Ao redor estão os fatores, e seu tamanho reflete o peso considerado no cálculo. Etanol (esquerda), Soxhlet+SARA (direita). .....	106
Figura 53: (I) Esquema do aparato utilizado na extração de PAHs em amostras de água. a) Tampa personalizada para extrações a vácuo, b) O-rings posicionados ao redor da tampa, c) septo, d) vial do tipo crimp de 20 ml, e) amostra de água contendo PAH. (II) SPME-Arrow exposta para extração. (f) Estrutura do Holder da fibra (g) suporte interno de fibra, (h) fase extratora de PDMS, (i) núcleo interno de aço inoxidável, (j) Flecha na ponta da fibra.....	111
Figura 54: Comparativo entre a velocidade de 350 rpm (esquerda – VAC 350) e 250 rpm (direita – VAC 250) para os 4 PAHs avaliados. Média das triplicatas de cada medida representadas pelas barras 350 avrg e 250 avrg.....	113
Figura 55: Efeito da temperatura de amostragem na extração de PAHs de amostras aquosas usando Vac-SPME-Arrow (esquerda) e SPME-Arrow regular (direita). Condições experimentais: 10 mL de amostras aquosas dopadas a 5,0 mg L <sup>-1</sup> ; 30 min de tempo de amostragem; Velocidade de agitação de 350 rpm. Algumas barras de erro são muito pequenas para serem visíveis em comparação com o tamanho da barra da área de picos.....	114
Figura 56: Perfis de tempo de extração para os PAHs obtidos a 30, 50 e 70 °C sob (i) condições de vácuo (símbolos preenchidos - esquerda) e (ii) condições de pressão regular (símbolos abertos - direita). Condições experimentais: 10 mL de amostras aquosas dopadas a 5,0 mg L <sup>-1</sup> ; Velocidade de agitação de 350 rpm. Algumas barras de erro são muito pequenas para serem visíveis em comparação com o tamanho físico do símbolo.....	116

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: p-valor de significância para cada variável da regressão do planejamento Doehlert. Foram consideradas para a superfície de resposta apenas variáveis com p-valor > 0,05.....	51
Tabela 2: Doehlert design e resposta a 217 Da para regressão do modelo. Respostas 2, 7, 13 e 24 foram removidas e consideradas NaN (not a number) para regressão final do modelo. ....	52
Tabela 3: Áreas de pico e razões calculadas dos compostos presentes em cada amostra. ....	59
Tabela 4: Fatores e pesos de referência utilizados no cálculo da métrica AGREEPrep [42]. ..	65
Tabela 5: Valores utilizados para o cálculo da métrica AGREEPrep para os métodos baseados em Vac-HSSPME vs. Soxhlet+SARA.....	66
Tabela 6: Condições experimentais avaliados no planejamento Doehlert de 3 variáveis. (A) corresponde ao fluxo testado, (B) = temperatura e (C) = porcentagem da pressão de vapor na temperatura do modelo. Pc indica os pontos centrais do sistema. “Ordem” indica a sequência de execução das extrações. ....	76
Tabela 7: Condições de pressão para a água a 110, 150 e 190% da pressão de vapor (Pv) em diferentes temperaturas.....	76
Tabela 8: Compostos detectados e identificados via MS, seus respectivos matches e tempos de retenção em ambas as dimensões de separação.....	80
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental Doehlert seguida dos valores de áreas dos picos para 91 Da. NaN é a abreviação de “Not a Number”.....	81
Tabela 10: Tabela ANOVA. ....	82
Tabela 11: P-valor do teste T para cada termo da equação da regressão para o planejamento Doehlert puramente quadrático. ....	82
Tabela 12: Áreas totais de pico obtidas a partir de SIMs para DD com M0365. "Exec" indica a ordem de execução dos experimentos. ....	94
Tabela 13: Porcentagem da massa extraída (m/m) para cada amostra (600 mg) com 35 mL de etanol % (m/m) obtida com 5 mL de etanol na sessão pós-coluna.....	96
Tabela 14: Parâmetros calculados para Soxhlet+SARA vs. etanol. ND, não detectado ou não possível calcular.....	102
Tabela 15: Valores para o cálculo da métrica AGREEPrep para os métodos baseados em etanol vs. Soxhlet+SARA.....	105

Tabela 16: Principais propriedades físico-químicas dos PAHs alvo. Nap: naftaleno, Ace: acenafteno, Phe: fenantreno, Flu: fluoranteno..... 108

Tabela 17: Figuras de mérito analíticas para PAHs alvo usando os métodos Vac-SPME-Arrow e SPME-Arrow regular a 30 °C (n = 3) e a 50 °C (n = 3). Os ensaios de recuperação foram realizados apenas a 50 °C. A 'Faixa Lin.' Corresponde a faixa linear que foi avaliada para cada PAH em cada método..... 119

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo do índice de preferência de carbono (CPI) segundo Peters et al. [1]. Adaptado de Pollo [19].	25
Equação 2: Cálculo do índice de preferência de carbono (CPI) segundo Wood et al. [20]. Adaptado de Pollo [19].	26
Equação 3: Quantidade de analito extraído em função das concentrações e volumes das fases do sistema trifásico.	37
Equação 4: Distribuição do analito nas diferentes fases de um sistema trifásico.	37
Equação 5: Equação de regressão para o sistema Vac-HSSPME.	52
Equação 6: Quantidade de analito extraído pela fibra em função do tempo de extração em condições pré-equilíbrio [47,48].	62
Equação 7: Aproximação do termo $\ln$ para a espessura da fibra 'b'.	62
Equação 8: Quantidade de analito extraído em função da concentração deste na amostra ( $C_s$ ) .....	63
Equação 9: Condensação dos termos constantes na equação no escalar Q.	63
Equação 10: Equação do modelo semi-empírico Fuller-Schettler-Giddings (FSG).	63
Equação 11: Regressão do modelo Doehlert 3 variáveis.	83
Equação 12: Constante de absorção do analito pela fibra (uptake) pela Lei de Fick.	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASTM – Associação americana para testagem e materiais (*American Society for testing and materials*),

CPI – Índice de preferência de carbono (*Carbon Preference Index*)

DD – Planejamento Doehlert (*Doehlert Design*),

DI – Imersão direta (*Direct Immersion*),

DoE – Planejamento de experimentos (*Design of experiments*),

SIM – Monitoramento de íons selecionados (*Selected Ion monitoring*),

FID – Detector de ionização por chama (*Flame ionization detector*),

GAC – Química analítica verde (*Green Analytical Chemistry*),

GC – Cromatógrafo a gás (*Gas Chromatographer*),

GC×GC – Cromatografia gasosa bidimensional abrangente,

LOD/LOQ – Limite de detecção/quantificação (*Limit of detection/quantification*).

m/z – Razão massa-carga,

MO – Matéria Orgânica,

MS – Espectrômetro de massas (*Mass spectrometer*)

MS/MS – Espectrômetro de massas sequencial (*Sequential Mass spectrometer*)

OEP – Preferência de ímpares sobre pares (*Odd-to-even preference*),

PHWE – Extração com água quente pressurizada (*pressurized hot water extraction*),

PLE – Extração líquida pressurizada (*pressurized liquid extraction*),

RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*),

S/N – Razão sinal-ruído (*Signal-to-noise ratio*),

SARA – Saturados Aromáticos Resinas e Asfaltenos,

SCAN – Cromatograma de íons totais ou de varredura,

SVOCs – Compostos orgânicos semivoláteis (*Semivolatile organic compounds*),

TOC – Carbono orgânico total (*Total organic carbon*),

UCM – Mistura complexa não resolvida (*Unresolved Complex Mixture*),

$\epsilon$  – permissividade estática,

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Rochas-geradoras de óleo.....	22
1.2 Parâmetros Geoquímicos.....	23
1.2.1 n-alcenos e índice de preferência de carbono (CPI).....	25
1.2.2 Razão Pristano (Pr) / Fitano (Ph).....	28
1.2.3 Razão Pristano / n-alceno C17 .....	28
1.2.4 Razão Fitano / n-alceno C18 .....	29
1.2.5 Terpanos .....	29
1.2.6 Razão Ts / (Ts + Tm).....	30
1.2.7 Razão Gamacerano / Hopano C30 (H30).....	31
1.2.8 Razão Hopano C35 / Hopano C34 .....	31
1.2.9 Esteranos e correlação C27-C28-C29.....	32
1.2.10 Razão esteranos 20S / (20S + 20R).....	33
1.2.11 Razão de isomerização de esteranos C29 $\alpha\beta\beta$ / ( $\alpha\beta\beta$ + $\alpha\alpha\alpha$ ) .....	33
1.2.12 Razão esteranos regulares / hopanos .....	33
1.2.13 Biodegradação .....	34
1.3 Método de análise da rocha geradora .....	34
1.4 Microextração em fase sólida (SPME).....	35
1.4.1 Fundamentos.....	37
1.4.2 Microextração em fase sólida via Headspace assistida por vácuo (Vac-HSSPME) .....	39
1.5 Extração com fluido pressurizado .....	40
1.5.1 Etanol pressurizado como fluido extrator.....	42
1.6 Métricas verdes.....	42
CAPÍTULO 2: VAC-HSSPME e GC-MS aplicados à análise de rochas geradoras.....	44
2.1 Introdução.....	44
2.2 Materiais e Método .....	47
2.2.1 Procedimento Clássico (SARA) .....	47
2.2.2 Amostras.....	49
2.2.3 Microextração em fase sólida a vácuo via headspace (Vac-HSSPME) .....	49
2.2.4 Otimização multivariada através do planejamento experimental de Doehlert.....	50
2.2.5 Cromatografia a gás com detecção espectrométrica de massas (GC-MS).....	50
2.2.6 Desempenho analítico do método otimizado.....	51
2.3 Resultados e discussões .....	51
2.3.1 Planejamento experimental do tipo Doehlert .....	51
2.4 Perfil qualitativo e quantitativo da fração volátil extraível de rochas geradoras.....	55

2.5	Conclusões.....	64
2.6	Métrica AGREEPrep .....	65
CAPÍTULO 3: EXTRAÇÃO COM ÁGUA QUENTE PRESSURIZADA (PHWE) NA ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM ROCHAS GERADORAS DE ÓLEO .....		68
3.1	Introdução.....	68
3.2	Materiais e métodos.....	71
3.2.1	Procedimento Clássico (SARA).....	71
3.2.2	Amostras.....	71
3.2.3	Sistema PHWE .....	71
3.2.4	Cromatografia a gás com detecção espectrométrica de massas (GC-MS).....	72
3.3	Testes exploratórios 1: Modo dinâmico em extrator <i>lab-made</i> .....	72
3.3.1	Resultados testes exploratórios 1.....	73
3.4	Testes exploratórios 2: esferas de vidro .....	74
3.4.1	Resultados testes exploratórios 2.....	75
3.5	Planejamento Doehlert .....	75
3.5.1	Resultados planejamento Doehlert .....	76
3.6	Planejamento Doehlert: segunda avaliação e seus resultados .....	77
3.6.1	Seleção da fibra de microextração em fase sólida.....	77
3.6.2	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas: GC×GC-MS .....	78
3.6.3	Regressão.....	81
3.6.4	Avaliação qualitativa dos extratos .....	85
3.6.1	Fluxograma: etapas, modificações e resultados .....	86
3.6.2	Conclusões.....	87
CAPÍTULO 4: ETANOL E GC-MS APLICADOS À ANÁLISE DE ROCHAS GERADORAS DE ÓLEO.....		89
4.1	Introdução.....	89
4.2	Materiais e Métodos .....	91
4.2.1	Procedimento Clássico (Soxhlet + SARA).....	91
4.2.2	Amostras.....	91
4.2.3	Extração e aparato experimental <i>lab-made</i> .....	91
4.2.4	Otimização multivariada por planejamento experimental do tipo Doehlert.....	92
4.2.5	Análise por GC-MS .....	93
4.2.6	Transferência de massa do processo de extração por etanol subcrítico .....	93
4.2.7	Métrica AGREEPrep .....	93
4.3	Resultados.....	93
4.3.1	Planejamento experimental do tipo Doehlert .....	93
4.3.2	Limpeza do sistema .....	95

4.3.3	Transferência de massa do processo de extração .....	98
4.3.4	Etanol para avaliação geoquímica de rochas-geradora de petróleo.....	99
4.4	Métricas AGREEPrep.....	104
4.5	Conclusões.....	106
CAPÍTULO 5: SPME-ARROW ASSISTIDA A VÁCUO ASSOCIADA À GC-MS NA ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA.		107
5.1	Introdução.....	107
5.2	Considerações Teóricas .....	108
5.3	Materiais e métodos.....	110
5.3.1	Produtos químicos, materiais e amostras.....	110
5.3.2	Aparatos para Vac-SPME-Arrow .....	111
5.3.3	Análise por GC-MS .....	112
5.4	Resultados e discussões .....	113
5.4.1	Otimização da velocidade de agitação do vial.....	113
5.4.2	Perfil da temperatura de extração .....	113
5.4.3	Perfil de tempo de extração .....	115
5.4.4	Desempenho analítico do método otimizado para Vac-SPME-Arrow e SPME-Arrow convencional.....	117
5.5	Conclusões.....	120
REFERÊNCIAS .....		122

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

### 1.1 Rochas-geradoras de óleo

Rochas-geradoras de óleo são comumente de caráter sedimentar que contém a matéria orgânica (MO) que é depositada ao longo de milhares, até milhões de anos. Essa rocha, portanto, é responsável por conter a MO que pode vir a ser transformada em óleo durante a aplicação de processos físico-químicos. As rochas geradoras de óleo são um importante componente de um sistema de reservatório de petróleo. A definição dada por Peters e demais autores a classifica como “rochas de fina granulação e ricas em matéria orgânica que podem gerar ou já tenham gerado quantidades significativas de petróleo” [1].

A análise de rochas-geradoras de óleo é uma das muitas etapas envolvidas na exploração de campos de petróleo [2]. A exploração geoquímica de um potencial poço de petróleo envolve diversas análises de caráter abrangente para diversos de seus componentes [1]. Esse mapeamento é necessário para verificação do real potencial econômico de um poço. A avaliação geoquímica detalhada pode ser classificada como um passo mais avançado, onde diversas outras características da região explorada já indicam um potencial econômico do poço. Desta forma, a avaliação minuciosa e bastante trabalhosa é realizada. Uma estrutura generalizada de um poço estratigráfico é descrita na Figura 1.

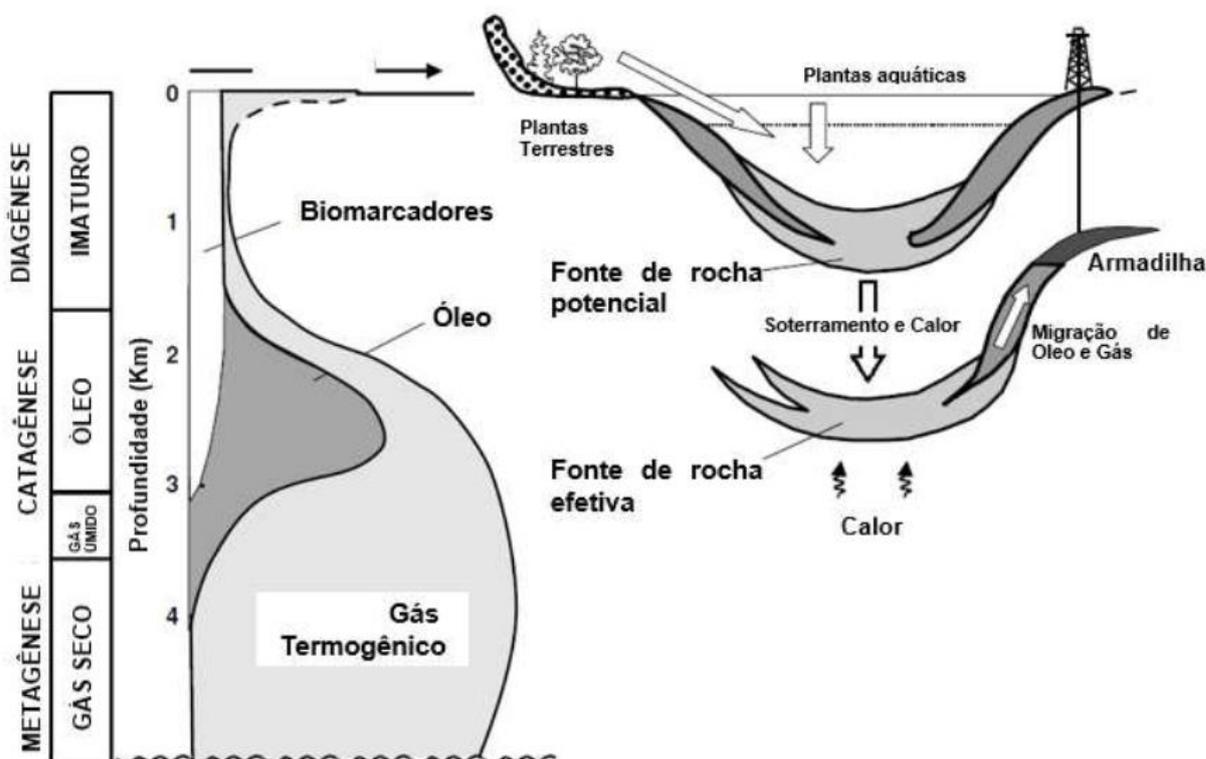


Figura 1: Evolução generalizada da MO durante e após sedimentação. Adaptado de Prata [3]. Modificado de Peters et al. [1]

Ao observar a Figura 1, algumas informações podem ser obtidas sobre o processo de deposição da MO ao longo do tempo (lado direito). A deposição da matéria orgânica, seja ela de plantas terrestres ou aquáticas, ocorre em todo momento e continuamente, sendo um processo natural. Esta matéria orgânica passa a ser soterrada sob presença ou não de oxigênio, ambientes estes determinados como óxicos ou anóxicos. O processo de deposição, soterramento e início do aquecimento pode ser chamado de diagênese. Nesta etapa, o óleo formado é bastante imaturo, ou de baixa evolução térmica, justamente por ser de baixa profundidade e o aquecimento da matéria orgânica ter sido breve e brando. Nesta etapa, a rocha-geradora é de caráter potencial e o contínuo aquecimento, associado a quantidade de matéria orgânica suficiente, a tornará uma rocha geradora efetiva.

A rocha geradora efetiva é encontrada em maiores profundidades sob aquecimento intenso. Nesta etapa, chamada de catagênese, ocorre a janela de formação do óleo na rocha geradora, entre 1800 e 3000 m de profundidade, aproximadamente. Como pode ser verificado ao lado esquerdo da Figura 1, a quantidade de produtos encontrados é a mais abundante para o óleo. Este óleo, ao se desprender da rocha geradora, pode passar por um processo de migração e ser alocado em alguma falha geológica chamada “*trap*” (armadilha). Este aprisionamento do então petróleo, é de grande interesse comercial.

Sob profundidades acima de 3000 metros, a abundância do óleo disponível como produto do processo de deposição e aquecimento da matéria orgânica fica cada vez menor. É importante notar que o produto majoritário encontrado é o gás e a principal razão para isso é a biodegradação do óleo, devido às intensas condições físico-químicas e biológicas as quais a MO é submetida. Nesta etapa, chamada de metagênese, também não são encontrados biomarcadores e a exploração do petróleo como óleo-combustível não é interessante.

## 1.2 Parâmetros Geoquímicos

O petróleo ou óleo presente na rocha geradora é uma mistura química complexa formada por hidrocarbonetos saturados e compostos polares incluindo heteroátomos (N, O, S) de alto peso molecular ou não [2,4]. Esta complexidade, deve-se a grande variedade da matéria orgânica depositada, além do longo período de deposição. A caracterização geoquímica do óleo é tradicionalmente realizada através da determinação de parâmetros diagnóstico onde a classe dos saturados é a fração de compostos mais estudada [2,5–8]. Após a análise por GC-MS e/ou GC-MS/MS, compostos denominados biomarcadores são identificados nos cromatogramas e suas áreas de pico calculadas na etapa de processamento de dados.

A correlação entre as áreas dos picos cromatográficos é utilizada para calcular diferentes razões diagnósticas. Essas proporções, ou uma combinação delas, fornecem informações como evolução térmica, origem da MO, condições durante a deposição da MO e formação de óleo [2,8–11]. Os parâmetros de diagnóstico são uma ferramenta poderosa para extrair informações sobre a correlação óleo-óleo e rocha fonte de petróleo. A comparação de diferentes amostras é geralmente promovida através da comparação direta de razão para razão ou mesmo gráficos 2D ou 3D envolvendo diferentes razões para distribuir as amostras em um espaço gráfico [5,6]. Além disso, análises forenses podem ser realizadas usando tais correlações para sugerir um possível candidato ou origem do óleo derramado que está sendo estudado [7,12,13]. Tais correlações entre componentes de uma mesma amostra têm a função de minimizar os efeitos da concentração quando diferentes amostras são comparadas. Assim, óleos de diferentes locais e condições de análise semelhantes podem ser comparados e avaliados. Não apenas, uma abordagem multicriteriosa é necessária na avaliação geoquímica, uma vez que as características da rocha geradora são sugeridas não apenas por uma, mas por várias razões de biomarcadores, bem como presença ou ausência destes [12].

Em geral, biomarcadores são compostos que preservaram sua estrutura original durante o processo de sedimentação e formação do óleo [1,2]. Classes como esteranos 217 Da e terpanos 191 Da são as mais analisadas, sendo utilizadas como base para avaliação de informações geoquímicas [2,5,6]. Esses compostos podem estar diretamente relacionados aos organismos encontrados na matéria orgânica (MO) durante a formação do óleo, podendo também fornecer informações sobre o ambiente deposicional e o processo de biodegradação que ocorre no óleo [2,4,14]. Seus processos de formação podem ser bastante complexos e a caracterização de um composto como biomarcador depende de um entendimento à fundo, não apenas da rocha/óleo estudado, mas dos processos físico-químicos e biológicos envolvendo a molécula de origem e as modificações sofridas [4]. Devido aos diferentes tipos de matéria orgânica, processos sofridos ao longo do processo de deposição, degradação, entre outros, é de se esperar que a complexidade do material na rocha geradora seja de alta complexidade em uma ampla faixa de massa molar. Desta forma, nem todo componente presente na amostra contém uma informação relevante, sendo necessário observar com cautela alguns compostos chave, mapeados anteriormente. Alguns destes compostos, os biomarcadores, e parâmetros diagnóstico mais comuns são descritos nos tópicos a seguir.

### 1.2.1 *n*-alcanos e índice de preferência de carbono (CPI)

Os *n*-alcanos de cadeia longa, também conhecidos como parafinas, são encontrados como um perfil de série homóloga se submetidos a uma rampa de aquecimento constante. Por esse perfil característico obtido em um cromatograma, é utilizado como a primeira classe para caracterizar óleos e sedimentos em geoquímica orgânica [15]. Estes compostos são encontrados frequentemente em diversos organismos, entre eles plantas, e têm sua origem na descarboxilação de seus ácidos graxos [1,16]. O tamanho da cadeia carbônica da parafina é reflexo da MO de origem que foi depositada. Os *n*-alcanos leves de C<sub>15</sub> a C<sub>17</sub>, são normalmente de MO de origem marinha, predominantemente de algas. No outro espectro, quando a matéria orgânica é de origem terrestre, é comum a predominância de hidrocarbonetos de maiores cadeias, de C<sub>25</sub> a C<sub>35</sub>, por serem originários das chamadas plantas superiores [1,4,14].

O CPI (índice de preferência de carbono) pode ser utilizado para determinar o tipo de matéria orgânica do meio através da verificação da preferência de *n*-alcanos de cadeia ímpar sobre os de número par. Quando se obtém um CPI > 1, este indica uma baixa evolução térmica. E, com CPI > 2, pode-se sugerir a deposição da matéria orgânica proveniente de ambiente terrestre [17,18]. Por outro lado, CPI ≈ 1 sugerem uma maturidade térmica para o extrato da rocha. Para ambiente hipersalinos ou carbonáticos, valores abaixo de 1 são encontrados, apesar de serem incomuns [2].

O parâmetro pode ser calculado pela Equação 1. São utilizados os valores das áreas dos picos de cada *n*-alcano do cromatograma de íons selecionados (SIM) a 85 Da:

$$CPI = \frac{\left[ \frac{C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33}}{C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32}} + \frac{C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33}}{C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32} + C_{34}} \right]}{2}$$

*Equação 1: Cálculo do índice de preferência de carbono (CPI) segundo Peters et al. [1]. Adaptado de Pollo [19].*

É comum uma menor abundância de hidrocarbonetos acima de 30 carbonos e é esperado que essas parafinas de maior cadeia apresentem uma menor contribuição para o valor do CPI. Nesta abordagem, Wood et. al. utiliza picos de C<sub>23</sub> a C<sub>29</sub> para calcular o CPI como demonstrado na equação 2 [20].

$$CPI = \frac{\left[ \frac{C_{23} + C_{25} + C_{27}}{C_{24} + C_{26} + C_{28}} + \frac{C_{25} + C_{27} + C_{29}}{C_{24} + C_{26} + C_{28}} \right]}{2}$$

Equação 2: Cálculo do índice de preferência de carbono (CPI) segundo Wood et al. [20]. Adaptado de Pollo [19].

Este parâmetro, entretanto, é significativamente afetado pela biodegradação através de microrganismos e craqueamento decorrente da evolução térmica, fenômenos estes que consomem os alcanos de cadeia mais longa [1,2,4,18]. Desta forma, é extremamente importante uma abordagem cautelosa na utilização deste parâmetro e associá-los a outros para uma abordagem assertiva. A Figura 2 apresenta o perfil cromatográfico de óleos em diferentes estágios de biodegradação.

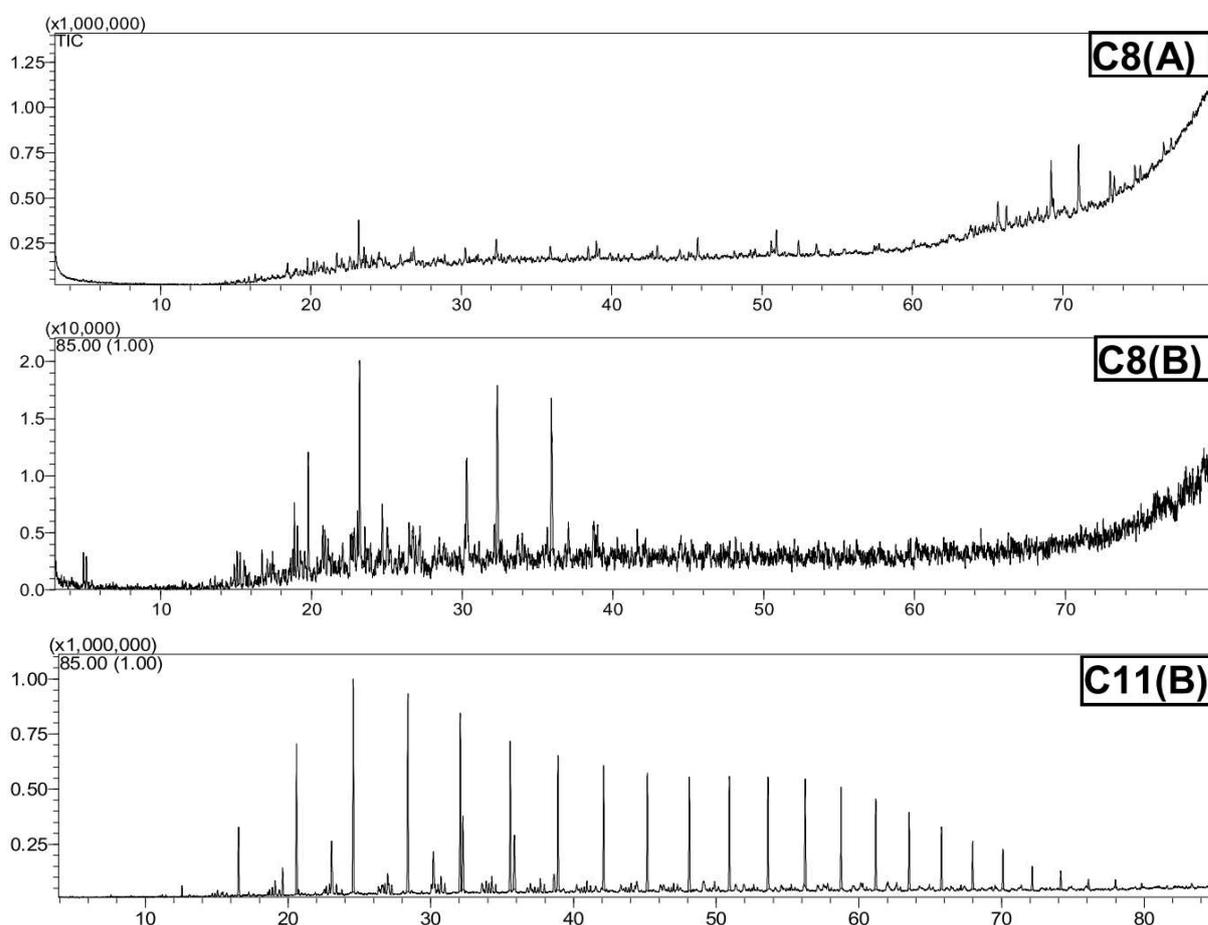


Figura 2: Cromatogramas para óleos em diferentes estágios de biodegradação. Mais biodegradado (acima); menos biodegradado (centro) e não biodegradado (abaixo). Modificado de Prata [3].

Pode-se observar que o perfil da série homóloga dos  $n$ -alcanos fica cada vez menos perceptível conforme a extensão da biodegradação passa a ser mais intensa. De fato, já em óleos

com uma biodegradação leve, o perfil da série homóloga é praticamente não presente no cromatograma de íons totais (SCAN), sendo necessário a verificação do cromatograma de íons selecionados (SIM) para verificação deste perfil. Como resultante do processo de biodegradação, é natural o aparecimento de uma mistura complexa não-resolvida (UCM) no perfil cromatográfico. Indicando uma abundância de compostos, inúmeros isômeros e outros compostos presentes deste processo que não se distinguem cromatograficamente e não são passíveis de identificação devido à grande sobreposição de picos nesta região.

Um outro parâmetro comum de avaliação da extensão da maturidade do óleo é o perfil. Como citado, hidrocarbonetos de cadeia mais longa tendem a serem consumidos com o avanço da maturidade térmica ou biodegradação. A Figura 3 apresenta os perfis cromatográficos representativos para a avaliação desta propriedade.

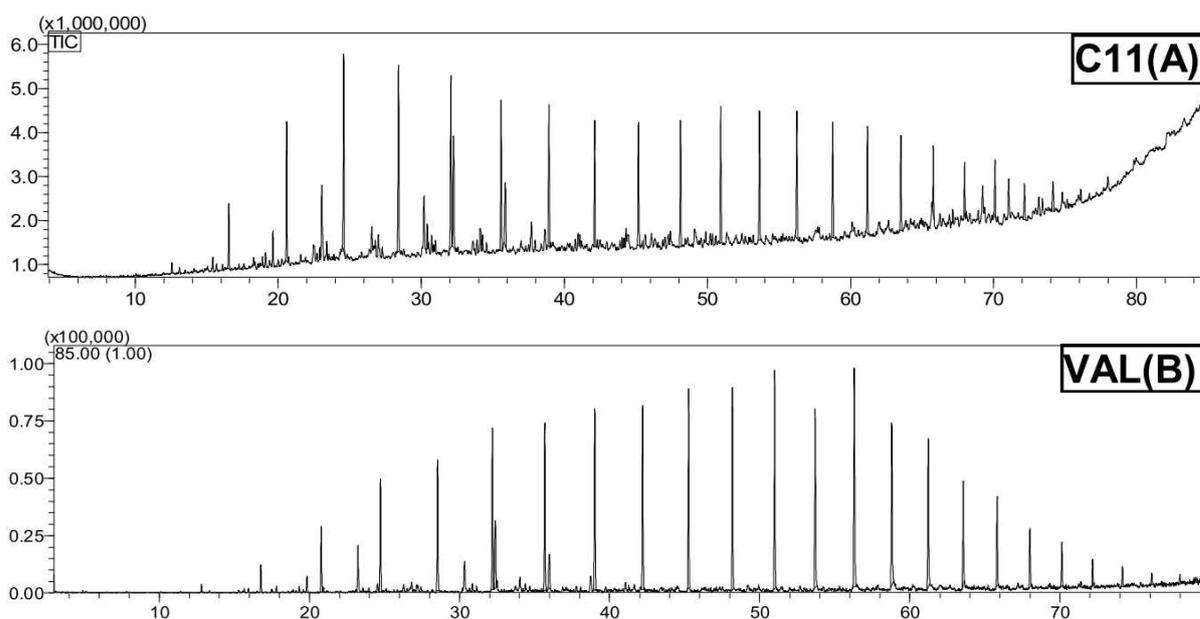


Figura 3: Óleos brasileiros em diferente estágio de maturidade térmica. Amostra CP11 apresenta um perfil bimodal característico de óleos de baixa maturação. Abaixo o perfil VAL(B) de um óleo de maior maturidade. Modificado de Prata [3].

O cromatograma superior apresenta um perfil bimodal de n-alcenos com 2 máximos de área de pico em C20 e em C30. No cromatograma inferior, do contrário, ocorre um máximo apenas em C17, sendo um perfil unimodal. Sugerindo, portanto, que as parafinas de maior massa foram consumidas, resultando em uma menor abundância desses compostos pesados e enriquecendo os compostos mais leves como resultado do craqueamento.

### 1.2.2 Razão Pristano (Pr) / Fitano (Ph)

Pristano e fitano são isoprenoides acíclicos de 19 e 20 carbonos, respectivamente. Isoprenoides podem ser mais facilmente compreendidos como *n*-alcanos ramificados, estruturados pela repetição de unidades de isopreno [2,12]. Para monitoramento do Pr e Ph é utilizado a razão *m/z* 183 Da, mas, pela sua estrutura de hidrocarboneto saturado, o monitoramento pelo íon extraído 85 Da, fragmento característico para alcanos lineares, é também realizada. Seu precursor biológico é a clorofila A, ou fitol. A depender do ambiente deposicional, este apresentando-se como oxidante ou redutor. Desta forma, quando o ambiente apresenta característica oxidante (óxico), é comum uma relação Pr / Ph > 1; o inverso se aplica quando o ambiente deposicional é de característica redutora (anóxico) [1,11]. A Figura 4 apresenta a estrutura dos compostos e seu precursor biológico.

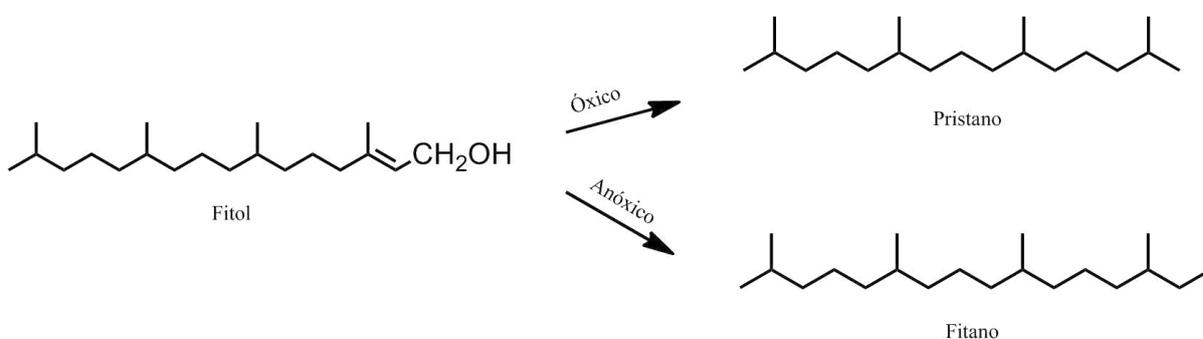


Figura 4: Processo de formação dos isoprenóides Pristano e Fitano em ambientes óxicos e anóxicos. Adaptado de Pollo [19].

Algumas informações adicionais podem ser obtidas a partir da relação Pr / Ph. Quando Pr / Ph > 3), pode-se sugerir que houve deposição em condições óxicas, respeitando a razão Pr / Ph > 1, de matéria orgânica terrestre [2]. Por outro lado, valores de Pr / Ph < 0,8 podem sugerir que a deposição em de MO em ambiente marinho em condições de alta salinidade.

### 1.2.3 Razão Pristano / n-alcano C17

A razão Pr / C17 é um parâmetro complementar à razão Pr / Ph na determinação das características do ambiente deposicional das amostras. Espera-se que amostras provenientes de ambientes marinhos apresentem valores de Pr / C17 < 0,5. Por outro lado, para amostras de ambientes terrestres valores superiores a 0,6 são comuns. Contudo, é importante ressaltar que a razão Pr / C17 não é eficaz na distinção entre ambientes marinhos e lacustres [2].

### 1.2.4 Razão Fitano / n-alcano C18

A razão Pr / Ph é um indicador da maturidade do óleo. Quanto maior a razão Pr / Ph e menor a razão Ph / C18, maior a maturidade do óleo. De forma complementar, a construção de um gráfico relacionando Pr / C17 e Ph / C18 pode trazer informações sobre as condições do ambiente de deposição como óxico ou anóxico [21].

### 1.2.5 Terpanos

Terpanos são biomarcadores encontrados em óleos e possuem origem em membranas lipídicas de bactérias. Estes compostos podem ser classificados em três grupos: tricíclicos (C19-C54), tetracíclicos (derivados de hopanos) e pentacíclicos (hopanos). A alta concentração de terpenos tricíclicos pode indicar a presença de algas primitivas [22]. Hopanos com mais de 30 carbonos são associados a bactérias específicas produtoras de bacteriohopanotetrol, enquanto os menores (C30 ou menos) têm precursores como diplopteno ou diplopterol [23]. Os terpanos pentacíclicos apresentam uma estrutura cíclica de um anel de cinco carbonos e outros quatro anéis de 6 carbonos. Conseqüentemente, a fragmentação de suas moléculas no espectrômetro de massas leva ao aparecimento da razão  $m/z$  191 Da [2]. A Figura 5 apresenta a estrutura do precursor bacteriohopanotetrol e do hopano C30 (H30).

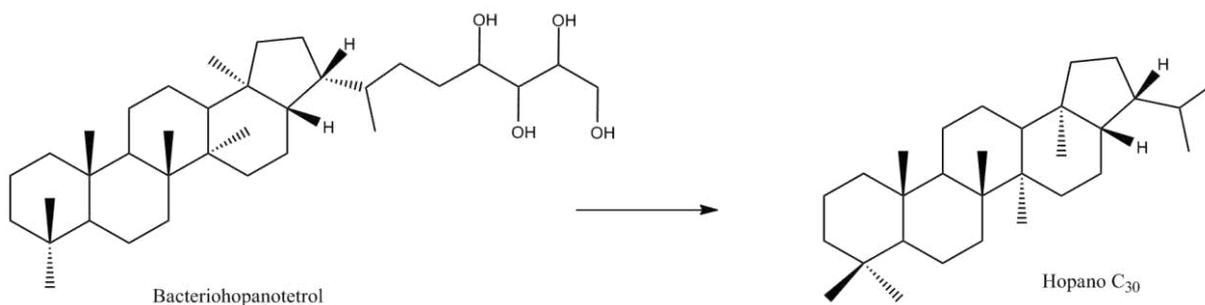


Figura 5: Conversão do precursor bacteriohopanotetrol para hopano C30 (H30). Adaptado de Pollo [19].

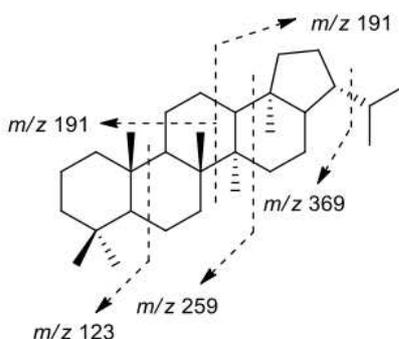


Figura 6: Fragmentos característicos da classe dos terpanos ou hopanos pentacíclicos. Modificado de Junior [33].

Para hopanos de maior cadeia, isto é, de C31 a C35, ocorre o aparecimento de um carbono assimétrico. Assim, passa a ocorrer a presença de 2 picos cromatográficos que representam a forma R e S dos isômeros.

### 1.2.6 Razão Ts / (Ts + Tm)

Os hopanoides Ts ( $17\beta(H)$ -22,29,30-Trinorneohopano) e Tm ( $17\alpha(H)$ -22,29,30-Trinorhopano) são biomarcadores resultantes de modificações estruturais durante o processo de formação do petróleo. Essas alterações, que envolvem a perda de três átomos de carbono e um rearranjo de grupo metila, são resultados das altas temperaturas e pressões presentes no ambiente deposicional. A razão entre as concentrações de Ts e a soma de Ts e Tm ( $Ts/(Ts+Tm)$ ) é utilizada como um parâmetro para avaliar o grau de evolução térmica do óleo. Isso ocorre porque o composto Tm é menos estável termicamente em comparação ao Ts. Conseqüentemente, à medida que o petróleo é submetido a temperaturas mais elevadas, a quantidade de Tm diminui enquanto a de Ts aumenta, indicando uma maior maturidade [2]. A Figura 7 apresenta a conversão entre as duas estruturas para os hopanos Ts e Tm.

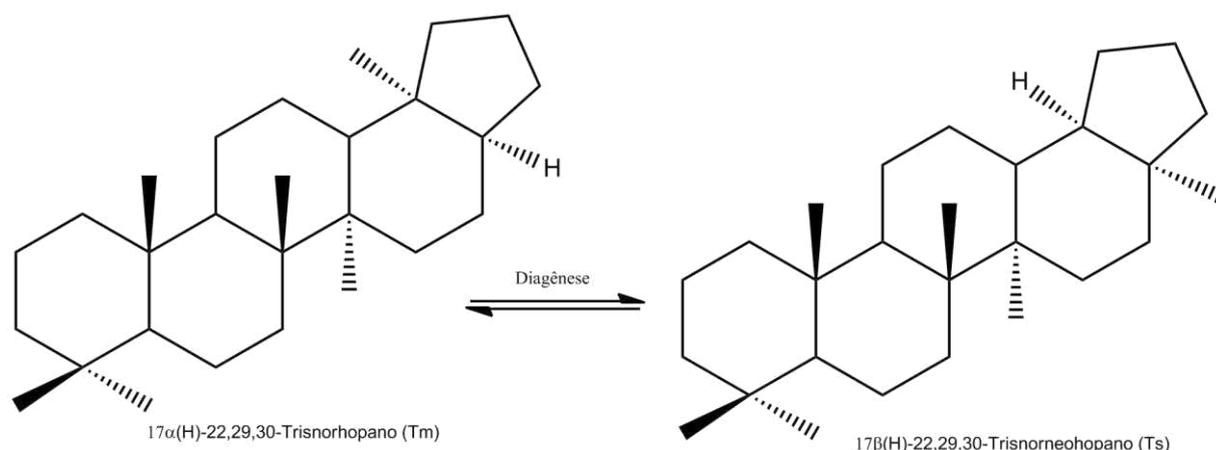


Figura 7: Estruturas e equilíbrio entre Tm ( $17\alpha(H)$ -22,29,30-Trinorhopano) e Ts ( $17\beta(H)$ -22,29,30-Trinorneohopano).

Os compostos Ts e Tm podem ser identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS) através da transição  $m/z$   $370 > 191$ , ou utilizando SIM a 191 Da. Valores baixos para a razão sugerem óleos pouco evoluídos e podem indicar que a rocha geradora ainda não atingiu seu potencial máximo de geração. Ambientes carbonáticos tendem a apresentar valores baixos, enquanto ambientes hipersalinos tendem a apresentar valores altos. A razão Ts / Tm também pode ser utilizada, entretanto ela é mais sensível a variações. Por exemplo, para um estudo realizado em bacias brasileiras valores para  $Ts / Tm >$

1, indicam óleos de ambientes lacustres; para  $T_s / T_m < 1$ , óleos de ambientes evaporíticos e carbonáticos [24]. No entanto, como a maioria dos biomarcadores, estes compostos também estão sujeitos aos efeitos da biodegradação.

### 1.2.7 Razão Gamacerano / Hopano C30 (H30)

O gamacerano é um composto orgânico pentacíclico que desempenha um papel crucial na caracterização de ambientes deposicionais. Sua estrutura molecular se diferencia dos hopanos com cinco anéis de seis carbonos. A presença de gamacerano em sedimentos e óleos é fortemente associada a condições de alta salinidade e estratificação da coluna de água.

Sua origem está ligada a organismos marinhos e protozoários, que produzem um o precursor biológico chamado tetrahimanol. Sob condições de alta salinidade, o tetrahimanol da origem ao gamacerano após uma desidratação seguido de uma hidrogenação da ligação dupla formada neste processo [2,25,26]. A razão entre a concentração de gamacerano e do hopano C30 (H30) é utilizada como um indicador da salinidade do ambiente deposicional, esta razão é também conhecida como *Gammacerane Index*. Valores elevados dessa razão são característicos de ambientes hipersalinos, enquanto valores baixos indicam ambientes menos salinos ou predominantemente terrestres. O gamacerano pode ser monitorado por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) pela transição  $412 > 191$  Da ou pelo SIM  $191$  Da [1].

A análise do gamacerano em amostras geológicas permite reconstruir as condições paleoambientais e identificar ambientes deposicionais favoráveis à geração de hidrocarbonetos. No entanto, é importante considerar que a biodegradação e outros processos pós-deposicionais podem afetar a preservação do gamacerano, limitando a interpretação dos dados.

### 1.2.8 Razão Hopano C35 / Hopano C34

Os hopanos acima de 30 carbonos, como apontado brevemente no tópico 1.2.5, apresentam um carbono assimétrico e subdividem-se em moléculas R e S a partir de 31 carbonos. Por pertencerem a classe dos terpanos pentacíclicos, pode-se realizar o monitoramento do íon  $191$  Da. Para os hopanos C35 e C34 é possível verificar a transição específica no MS/MS para  $m/z$   $468 > 191$  Da e  $454 > 191$  Da, respectivamente.

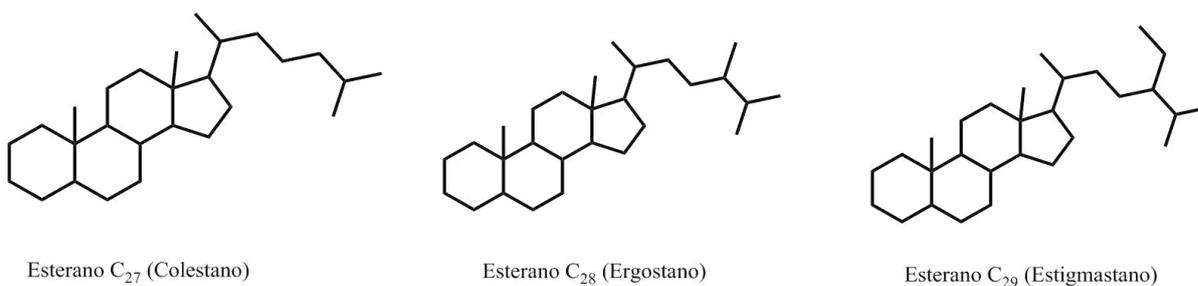
A razão  $H_{35} / H_{34}$  é um sugestivo para a condição redutora do ambiente de deposição da MO. Uma alta razão  $H_{35} / H_{34}$  indica condições altamente redutoras. Ambientes carbonáticos marinhos e evaporíticos também podem apresentar alta concentração de homohopanos C<sub>35</sub> [2].

### 1.2.9 Esteranos e correlação C27-C28-C29

Os esteranos são biomarcadores derivados de esteróis presentes em membranas celulares de organismos eucarióticos como algas e plantas [2,27]. Esteranos regulares variam de C18 a C31, sendo mais comuns os de C27 a C29. Estes biomarcadores são utilizados para investigar o ambiente de deposição do óleo, maturidade e biodegradação [28].

Os esteranos biomarcadores derivados de esteróis presentes em organismos eucarióticos, são amplamente utilizados para avaliação do paleoambiente de deposição. A distribuição relativa dos esteranos C27, C28 e C29, que são os mais abundantes, reflete a contribuição de diferentes fontes de matéria orgânica [12]. Por exemplo, a predominância de esteranos C27 sugere uma maior contribuição de plâncton marinho, enquanto a predominância de C29 indica uma maior contribuição de plantas terrestres. A abundância de esteranos C28 está frequentemente associada a uma mistura de fontes marinhas e terrestres [14,29–32]. Um perfil de esteranos com uma forma de "V" é frequentemente associado a altos graus de maturidade térmica [12]. A representação gráfica da distribuição dos esteranos em diagramas ternários permite visualizar as relações entre os diferentes tipos de esteranos e os respectivos paleoambientes de deposição.

A identificação de esteranos por espectrometria de massas se baseia na detecção de íons característicos, como  $m/z$  217 Da no SIM. No MS/MS, íons precursores com  $m/z$  372, 386, 400 e 414 Da  $>$  217 Da podem ser monitorados para maior especificidade.



*Figura 8: Estrutura de esteranos regulares de 27, 28 e 29 carbonos, também chamados de colestanos, ergostanos e estigmastanos, respectivamente.*

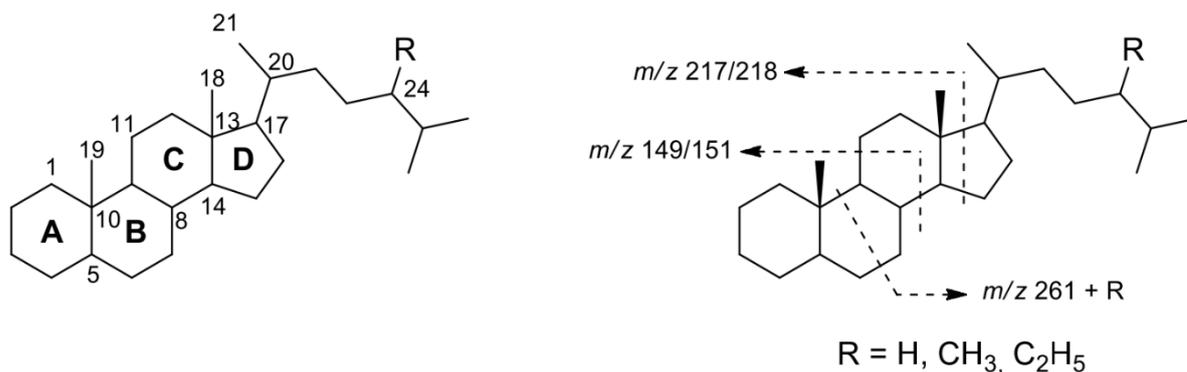


Figura 9: Numeração da estrutura da classe dos esteranos (esquerda) e seus fragmentos característicos (direita). Modificado de Junior [33].

### 1.2.10 Razão esteranos 20S / (20S + 20R)

A maturidade térmica do óleo pode ser avaliada através da análise da conversão da conformação 'R' para 'S' nos esteranos C29. Essa conversão, que ocorre com o aumento da temperatura, é refletida no aumento da razão S/(R+S). Valores próximos a 0,52-0,55 indicam que o óleo atingiu um estágio de máxima maturidade térmica [1,2].

### 1.2.11 Razão de isomerização de esteranos C29 $\alpha\beta\beta$ / ( $\alpha\beta\beta + \alpha\alpha\alpha$ )

A isomerização nos carbonos C5, C14 e C17, expressa pela razão  $\alpha\beta\beta$  / ( $\alpha\beta\beta + \alpha\alpha\alpha$ ) no esterano C29, também é utilizada para avaliar a maturidade [34]. Valores dessa razão entre 0,52 e 0,55 são indicativos de que o óleo é termicamente evoluído e a rocha geradora atingiu o pico de geração de óleo [1,35]. Quando os valores são menores que 0,52, sugere-se que a matéria orgânica seja pouco evoluída termicamente [2,3].

### 1.2.12 Razão esteranos regulares / hopanos

Hopanos são compostos biomarcadores amplamente distribuídos em óleos, sendo mais abundantes em óleos de origem lacustre. A razão entre esteranos regulares (C27, C28 e C29) na conformação  $\alpha\alpha\alpha + \alpha\beta\beta$  (20R + 20S) e hopanos 17 $\alpha$  (C29-C33) (22R + 22S) é um indicador da origem da matéria orgânica. Valores elevados dessa razão, geralmente acima de 1, são característicos de ambientes marinhos com alta contribuição de plâncton e algas, sugerindo predominância de matéria orgânica proveniente de organismos eucarióticos. Por outro lado, baixos valores dessa razão, isto é, altas concentrações de hopanos, indicam maior contribuição de matéria orgânica terrígena e/ou microbiana, proveniente de organismos procarióticos [36,37].

### 1.2.13 Biodegradação

A biodegradação é o processo pelo qual organismos vivos decompõem o petróleo formado, alterando suas características. Nem todos os componentes do petróleo são degradados com a mesma facilidade. Desta forma, diferentes estágios de degradação podem ser verificados de acordo com a presença ou não de algumas classes de hidrocarbonetos saturados, como sugerido pela Figura 10. Os alcanos de cadeia curta são os primeiros a serem consumidos. Compostos mais complexos, como alcanos ramificados e aromáticos, são degradados apenas em estágios avançados.

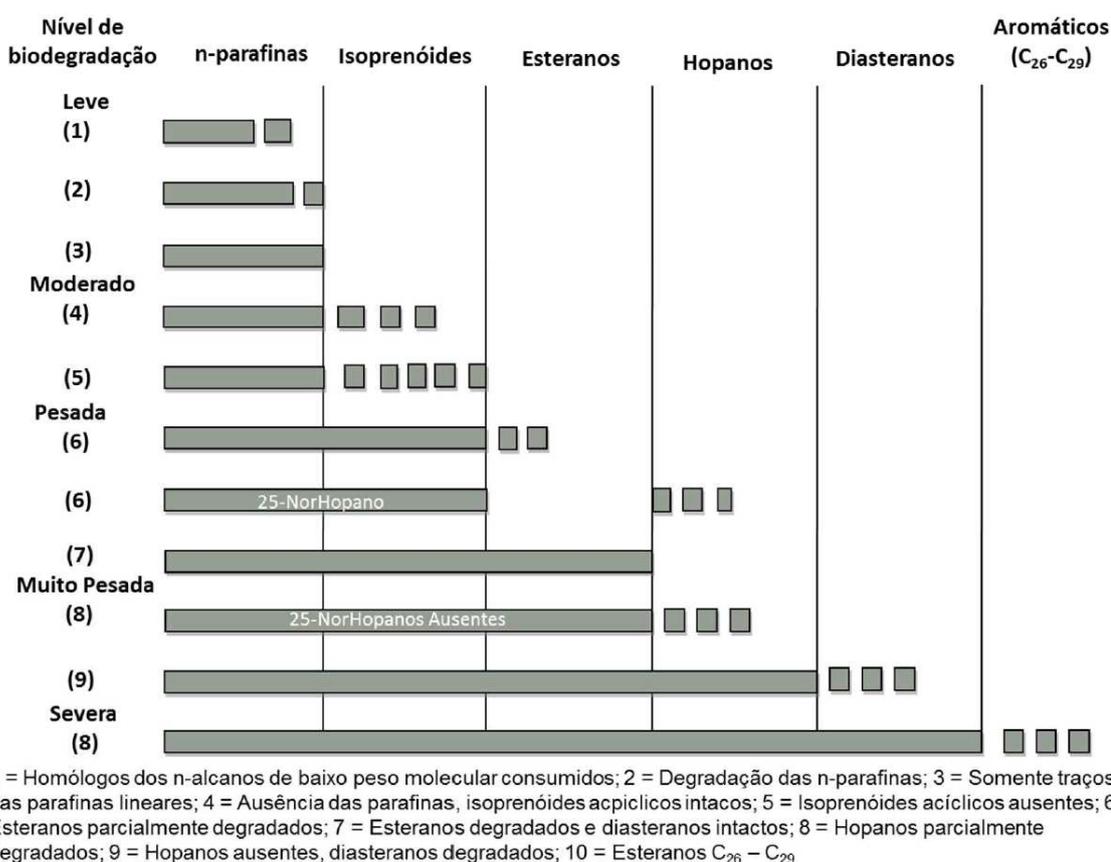


Figura 10: Nível de biodegradação indicada pela ausência de diferentes classes de compostos do petróleo. Adaptado de Prata e Peters [2,17].

### 1.3 Método de análise da rocha geradora

A caracterização e avaliação de uma rocha geradora como possível produtora de petróleo é um desafio para o analista devido à alta complexidade da amostra e número de constituintes, normalmente encontrados em baixas concentrações [2,38]. Tradicionalmente, o método de análise de biomarcadores em sedimentos requer a remoção da MO presente na rocha com extração de Soxhlet, concentração do material extraído seguida de fracionamento em

coluna aberta e análise de GC-FID/MS. O processo de fracionamento visa separar o extrato em saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos leves (SARA) [8,10,39]. O procedimento de referência é a ASTM D4124, sendo este modificado pela comunidade ao longo dos anos [39]. Tal procedimento é demorado, exigindo pré-tratamento da amostra e cuidadoso manuseio durante todo o processo, pois suas etapas não são automatizáveis, o que expõe o método a inúmeros erros e possíveis contaminações associadas à grande quantidade de operações unitárias [40].

Apesar de estarem associados a uma atividade econômica de alto risco, o processamento e os protocolos não se atualizaram no mesmo ritmo que a indústria de petróleo e gás em geral; e a maioria dos métodos aplicados ainda depende de grande quantidade de solventes tóxicos [41]. Desta forma, métodos mais rápidos e de menor impacto ambiental são necessários para alinhar os procedimentos com os padrões de preparo de amostras do século 21 [42].

#### **1.4 Microextração em fase sólida (SPME)**

Desenvolvida em meados dos anos 90, a microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de microextração altamente consolidada na comunidade científica [43,44]. A SPME, na sua forma mais simples, envolve a adsorção dos analitos de interesse em uma fibra revestida com um filme fino de dimetilpolissiloxano (PDMS), seguida da dessorção térmica direta no sistema cromatográfico [45]. Outros tipos de recobrimento de fibra estão disponíveis comercialmente. Esta é outra característica bastante atrativa da técnica. Sua compatibilidade direta com o sistema cromatográfico e total integração à sistemas de injeção automática proporcionam a rápida dessorção dos analitos com alta praticidade. Não apenas, a reutilização da fibra fica na casa das centenas de vezes. Características estas, portanto, que podem ser citadas como as responsáveis pela ampla difusão de técnica em análises químicas [43,44].

A técnica é baseada em coeficientes de partição de analitos nas diferentes fases do sistema, e devido ao pequeno volume de fase extratora, a técnica é de caráter não exaustivo [43,46–48]. Assim, a quantidade de analito que um revestimento pode extrair depende das constantes de distribuição e da quantidade de analito livre na amostra. Não apenas, a imersão direta (DI) ou a extração através do *headspace*, além das condições experimentais, afetam a velocidade com que a quantidade máxima de compostos pode ser extraída. Para compostos altamente voláteis em amostras aquosas, extrações em condições de equilíbrio são realizadas corriqueiramente devido à cinética rápida. No entanto, para compostos orgânicos semivoláteis (SVOCs) o equilíbrio pode não ser prático por ser exigir tempos de extração muito longos [47].

Este método simples, mas eficaz, tem sido usado extensivamente na química analítica em áreas como ambiental e biológicas, por exemplo. No entanto, na área petroquímica seu uso é restrito devido à natureza da amostra e a inadequação da técnica para extração de compostos mais pesados, que tem sua aplicação voltada a compostos voláteis e/ou presentes em amostras aquosas. Sua aplicação raramente requer o uso de solventes orgânicos nas amostras ou algum tipo de procedimento ambientalmente não amigável, caracterizando a técnica como verde [47].

Apesar da compatibilidade com injetores automáticos, a SPME também pode ser operada manualmente utilizando aparelho chamado *holder*, que é um dispositivo que permite a exposição da fibra microextratora a partir do seu compartimento. A Figura 11 apresenta o aparato para extrações manuais.

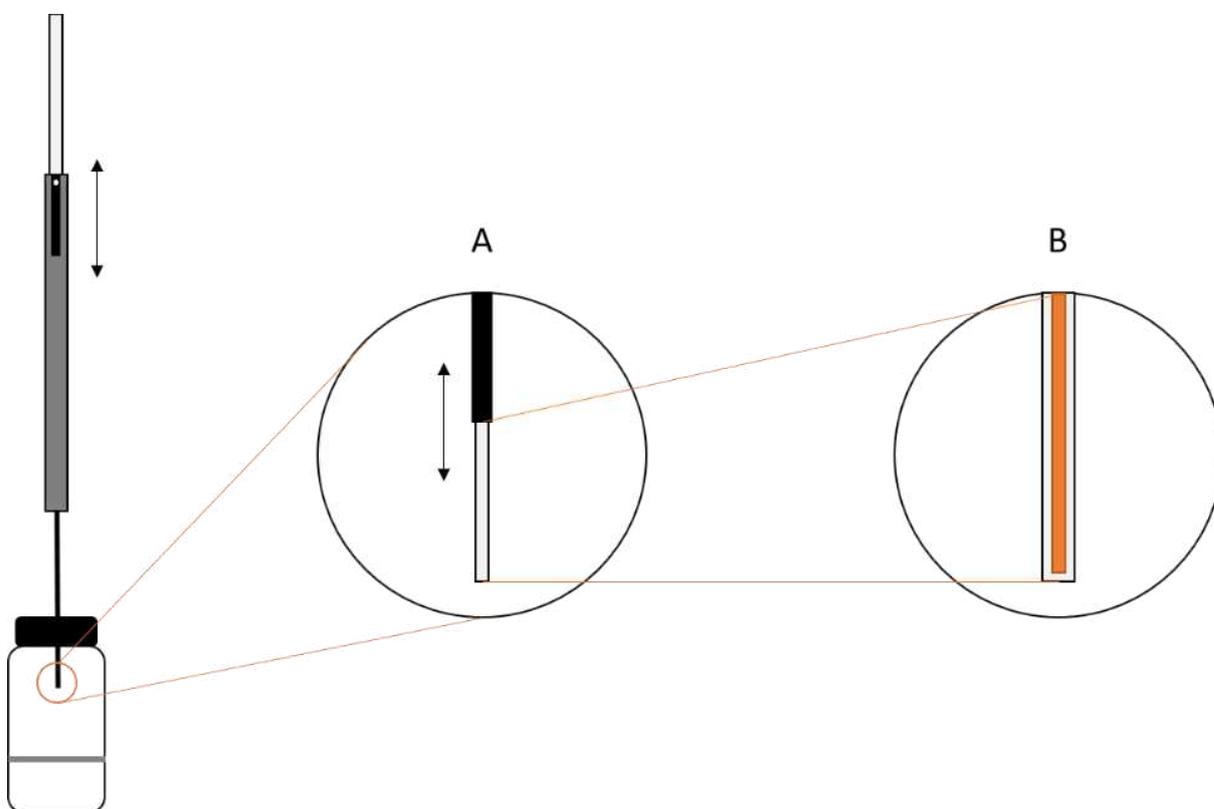


Figura 11: Holder para extração manual em SPME sobre amostra acondicionada em vial para extração através do Headspace (esquerda). (A): fibra extratora exposta do interior da agulha protetora. (B): aproximação na fibra contendo o polímero extrator. Adaptado de Pollo [19].

Os aspectos operacionais da fibra de microextração em fase sólida são relativamente simples. Num primeiro momento a fibra deve ser exposta do seu compartimento para que passe a absorver/adsorver analitos, a depender da natureza da fibra utilizada [47]. É importante atenção com a operação, pois a fibra é bastante frágil à impactos [45]. Na imersão direta, ela primeiro é acondicionada dentro da amostra agitada e exposta posteriormente. Na extração via

*headspace* ela é posicionada acima da amostra, agitada ou não, para depois ser exposta. Em ambos os casos o vial de extração possui tampa e o êmbolo da fibra é inserido no vial através de um septo.

### 1.4.1 Fundamentos

Os fundamentos teóricos da técnica que explicam os mecanismos e a interação dos analitos com o meio podem ser abordados termodinamicamente ou cineticamente. Esta segunda abordagem se fará extremamente relevante posteriormente.

Termodinamicamente, o aspecto de maior interesse ao se realizar uma microextração é conhecer a quantidade de analito capaz de ser extraída pelo sistema ( $n$ ). Neste caso, ao se considerar um sistema trifásico, sendo estas 1) polímero extrator, 2) *headspace* e 3) matriz, a quantidade do composto de interesse extraída pela fibra no sistema é obtida pela equação a seguir:

$$n = C_f V_f = \frac{C_0 K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s}$$

*Equação 3: Quantidade de analito extraído em função das concentrações e volumes das fases do sistema trifásico.*

A distribuição de um analito entre as fases durante uma extração através do *headspace* pode ser expressa segundo a equação 4:

$$C_0 V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s$$

*Equação 4: Distribuição do analito nas diferentes fases de um sistema trifásico.*

Ao observar as duas equações, verifica-se que os termos presentes são, em sua grande maioria, os mesmos.  $V_f$  representa o volume da fibra extratora e  $V_s$  é o volume da amostra.  $C_0$ , a concentração inicial de analito no sistema,  $C_f$  é a concentração de analito na fibra. Os termos de concentração representados com o símbolo  $\infty$  são para um tempo de extração infinito, isto é, com o sistema em equilíbrio.  $K_{fs}$  representa a constante de equilíbrio do analito entre o a fibra extratora e a amostra [47]. Esta constante pode ser desmembrada como  $K_{fh}$  multiplicado por  $K_{hs}$ , o termo 'h' é para o *headspace*.

Este termo,  $K_{hs}$ , relaciona-se com a constante de Henry. Neste caso, analitos com constante de Henry de baixo valor, isto é, com baixa pressão de vapor, possuem a resistência à transferência do analito para o *headspace* no termo  $K_{hs}$ . Assume-se também que a transferência do analito da fase gasosa para a fibra seja rápida, resultando em um  $K_{fh}$  significativamente maior que  $K_{hs}$  [47].

No aspecto cinético da técnica, diversos fatores podem influenciar a velocidade com que uma extração ocorre. Considerando ainda o caso para um sistema de extração através do *headspace*, o analito deve deixar o *bulk* da amostra, passar para a fase vapor e para ser absorvido pela fase extratora. Ao considerar os equilíbrios amostra-*headspace* e *headspace*-fibra, algumas considerações podem ser levantadas.

Intuitivamente, para analitos que possuem uma baixa pressão de vapor, o aquecimento leva a uma aceleração da extração considerável. O mesmo benefício é visualizado para a agitação da amostra. O aumento no tempo de extração pode ser ajustado para extração máxima do analito de interesse. Há diferentes tipos de fibras extratoras com polaridades e espessuras de filme disponíveis comercialmente como mostra a Figura 12.

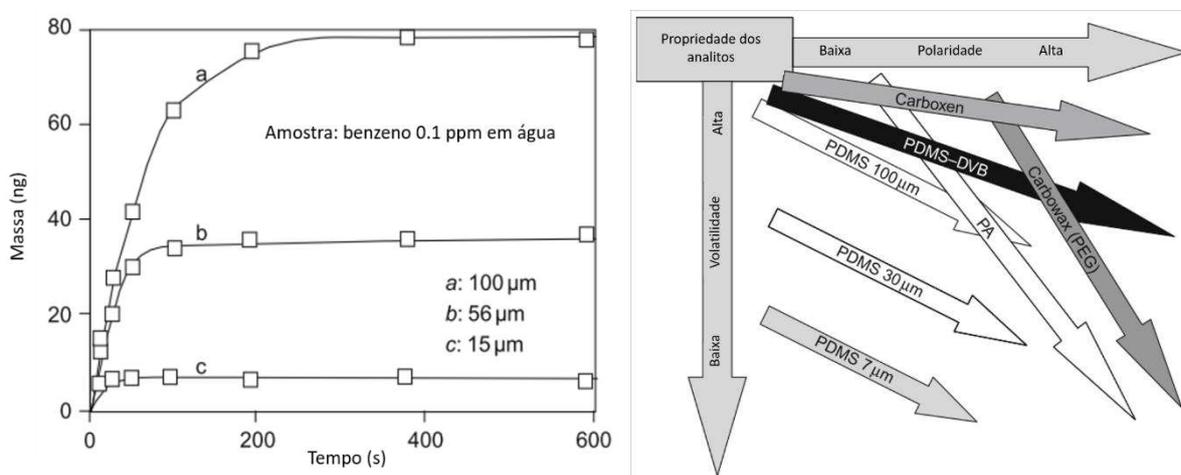


Figura 12: Tempo de equilíbrio e quantidade de analito extraído em função da espessura do filme (esquerda). Tipo de fibra em função da polaridade e volatilidade dos analitos (direita). Adaptadas de Pawliszyn [47].

Verifica-se que com a utilização de um filme de espessura mais fina, o equilíbrio é atingido rapidamente durante a extração. Com a utilização de fibras de menor capacidade, ocorre o favorecimento da extração de compostos de menor volatilidade. Por outro lado, a quantidade de analito extraído é significativamente menor [45,47]. Portanto, além da temperatura, tempo de extração, modo de extração e quantidade de amostra, é de suma importância a escolha da fibra para maior eficiência no processo.

Apesar de todos os aspectos que podem ser avaliados, quando se trata de compostos de baixíssima volatilidade, estes podem não ser o suficiente para obtenção de quantidade apreciável de analito extraído. Um tempo de extração muito longo, acima de 1 h, e temperaturas além da temperatura de evaporação da água no aquecimento podem não ser práticos, pensando no fluxo de análises dentro de um laboratório.

### 1.4.2 Microextração em fase sólida via Headspace assistida por vácuo (Vac-HSSPME)

Como forma de contornar essas limitações, Psillakis e colaboradores demonstraram que a aplicação de vácuo pode melhorar a cinética de extração de SVOCs via *headspace* [49,50]. Considerando que as pressões parciais dos analitos em fase vapor são independentes da pressão total, a quantidade de compostos extraídos em Vac-HSSPME é essencialmente a mesma que em HS-SPME convencional. No entanto, a pressão reduzida encurta o tempo necessário para o equilíbrio do sistema, promovendo uma extração rápida e ganho significativo para compostos de maior massa.

Considerando amostras aquosas ou em solução, a teoria cita que a resistência à transferência de massa da amostra para a fase vapor está relacionada a dois filmes adjacentes à interface água-ar, estes, por sua vez, relacionados à constante de Henry ( $K_H$ ), propriedade do analito. Este parâmetro não é afetado pela pressão reduzida e compostos com menor  $K_H$  podem ter sua transferência para o *headspace* acelerada, já que sua resistência à transferência de massa depende da espessura de filme na fase gasosa [49–51]. A Figura 13 demonstra a presença dos filmes na interface entre as duas fases do sistema.

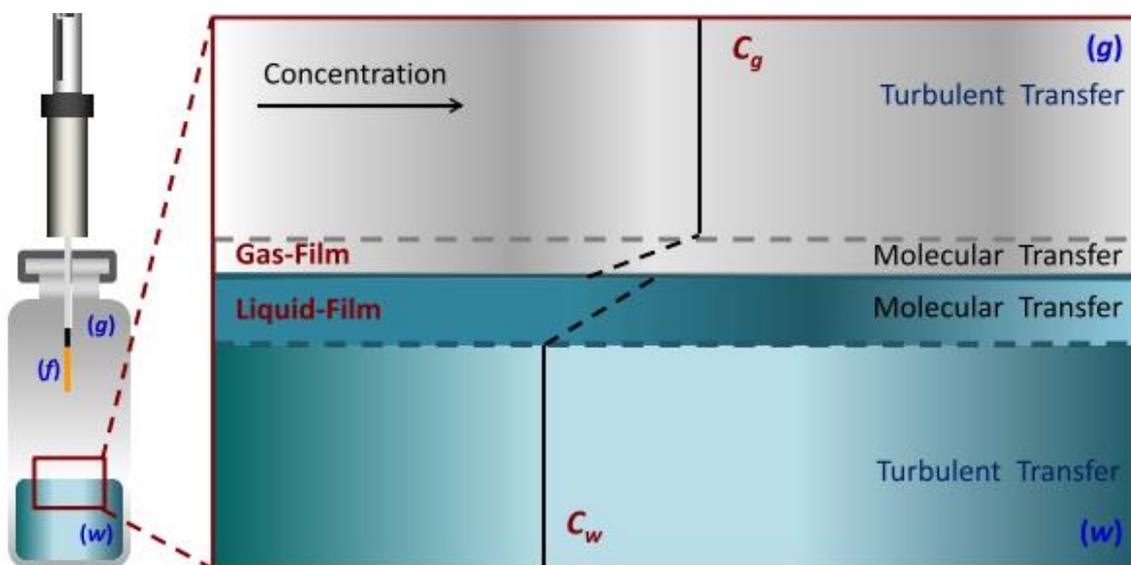


Figura 13: Vac-HSSPME e modelo dos dois filmes na interface água-ar onde: (w), (g) e (f) são as fases de água, gás e fibra de SPME, respectivamente;  $C_g$  e  $C_w$  são as concentrações nas fases gasosa e aquosa. Adaptado de Psillakis [49].

Do ponto de vista teórico, a aplicação de vácuo no sistema apresenta uma melhora cinética. Neste caso, os analitos afetados pela pressão reduzida no sistema são extraídos mais rapidamente. A quantidade de analito extraído sob um tempo de equilíbrio infinito (um aspecto

termodinâmico) não é afetada pela evacuação, mas sim a velocidade com que esses analitos são levados ao *headspace*.

### **1.5 Extração com fluido pressurizado**

Existem métodos alternativos para a análise de rocha-geradora e não é preciso restringir-se a técnicas de equilíbrio de partição. A extração líquida pressurizada (PLE) tem sido utilizada como alternativa à extração líquida convencional, como extração líquido-líquido e Soxhlet em diversas áreas, devido às suas propriedades e vantagens [52,53]. Uma extração líquida depende da transferência dos analitos da matriz para o solvente e, a depender do solvente ou das propriedades do analitos de interesse, um grande volume de solvente pode ser necessário. Normalmente, esses processos de extração clássicos vêm associados a um alto consumo de solvente pouco amigáveis no aspecto ambiental, além de demandarem muito tempo e operações unitárias na extração.

A transferência de analitos da matriz para o solvente pode ser acelerada se alguns parâmetros de extração forem ajustados, como temperatura e pressão do solvente. A PLE tem como princípio o aquecimento para alteração de propriedade do solvente para ajuste de sua seletividade [54]. Parâmetros como permissividade estática, ou constante dielétrica ( $\epsilon$ ), apresentam uma relação negativa com o aumento da temperatura ( $T$ ). Para a água, seu valor em temperatura ambiente é de 79, enquanto à 200 °C este é reduzido para 35 [54]. Não menos importante, com maior  $T$  é obtida uma menor tensão superficial e menor viscosidade para o fluido. Desta forma, sua molhabilidade e difusão são melhoradas, garantindo uma melhor transferência de massa do analito da matriz para o solvente.

De maneira análoga à SPME, diversos parâmetros de extração podem ser ajustados em um sistema PLE. Dentre estes pode-se citar a quantidade de amostra, temperatura e tempo de extração. Sendo de interesse que o solvente permaneça em estado líquido com seu aquecimento, é necessário que seja utilizada uma alta pressão no sistema, parâmetro este que também pode ser otimizado. Associado ao tempo de extração, está o modo de extração, podendo este ser dinâmico, estático ou ambos. As propriedades termodinâmicas dos solventes, como permissividade estática e ponto crítico, devem ser consideradas quando um método PLE está sendo desenvolvido [52,55]. Esses parâmetros podem ser usados como base para comparar solventes, inclusive com os solventes associados aos métodos clássicos e podem prever algum comportamento durante o processo de extração. Alguns compostos apresentam propriedades interessantes que os tornaram os principais candidatos para PLE: água, CO<sub>2</sub> e etanol. Após

realização da otimização das condições, idealmente, se esta for ótima, menos solvente pode ser usado para extração de analitos em um menor tempo.

A Água é altamente abundante, barata e fornece uma ampla faixa  $\epsilon$  em relação à temperatura [52,55]. No entanto, o ponto crítico da água ocorre em alta temperatura e pressão ( $T_c = 374,1\text{ }^\circ\text{C}$  e  $P_c = 221\text{ bar}$ ), e sua  $\epsilon$  começa a se alterar significativamente apenas próximo a ele. A Figura 14 apresenta diferentes parâmetros variando em função da temperatura.

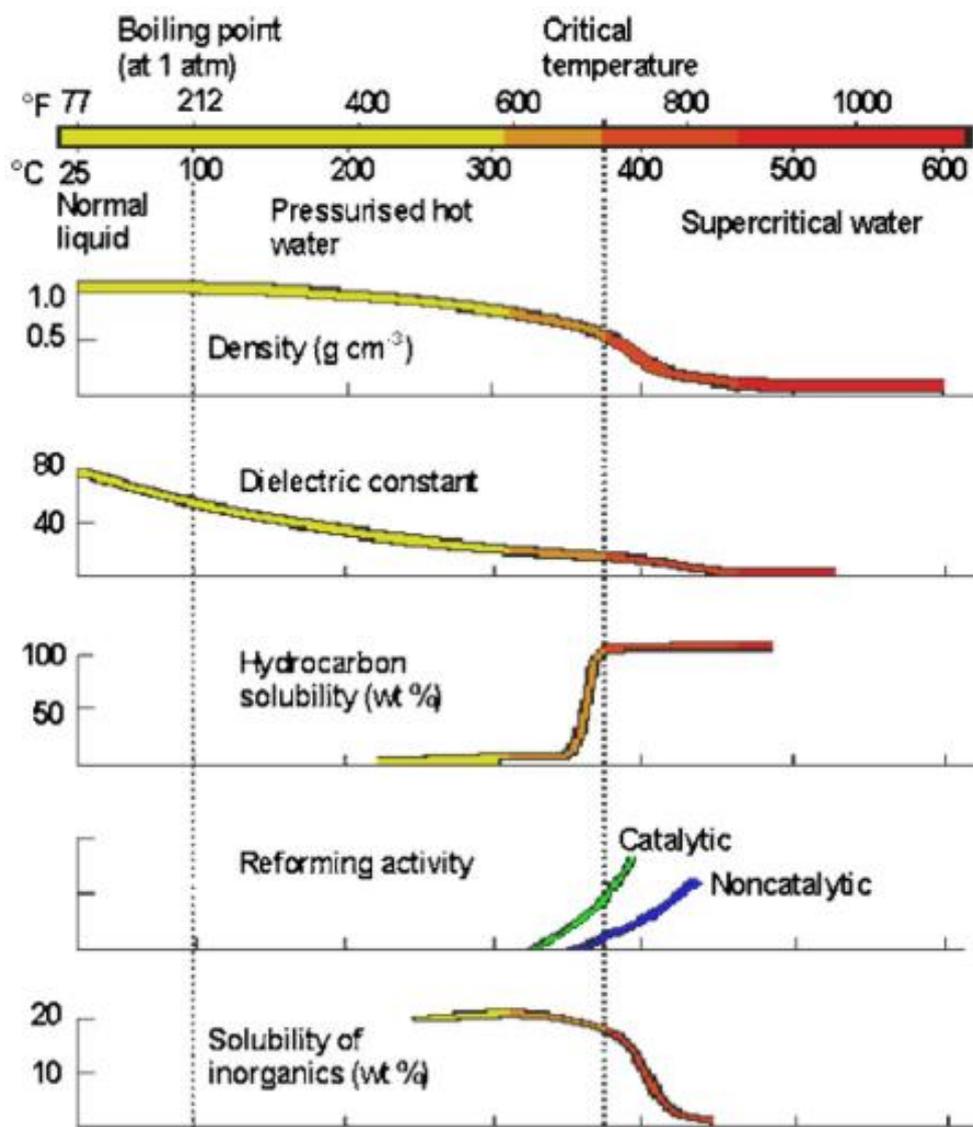


Figura 14: Propriedades da água quente pressurizada. Adaptado de Kronholm [55].

É possível observar que próximo a temperatura crítica, a água passa a adquirir propriedades distintas de seu estado convencional. Como citado anteriormente, a constante dielétrica tem seu valor significativamente reduzido, juntamente com a densidade. O mais interessante, provavelmente a propriedade de maior interesse, é o alto ganho na solubilidade de

compostos da classe dos hidrocarbonetos, fazendo com que a água passe a atuar como um solvente orgânico. Entretanto, essas propriedades do solvente demandam uma alta temperatura, pressão e, associado à essas demandas, vem a dificuldade operacional. As extrações com água quente pressurizada (PHWE) são propensas a vazamentos, pois selos expansíveis em conexões não são compatíveis, podendo ser utilizadas apenas conexões de tubulação de aço inoxidável para garantir que o sistema seja completamente selado [55]. Por essas dificuldades, sua utilização não é realizada apenas no modo supercrítico, sendo comum seu uso em condições próximas, chamadas de subcríticas [56].

### 1.5.1 Etanol pressurizado como fluido extrator

O bioetanol pode ser definido como o etanol obtido de fontes renováveis, sendo o caso do Brasil com sua grande produção de cana-de-açúcar [57]. Seu ponto crítico ( $T_c = 240,8 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $P_c = 61,5 \text{ bar}$ ) não é tão alto quanto o da água, mas tem um  $\epsilon$  significativamente menor à temperatura ambiente [52]. Seu valor à T ambiente é de 12,13, enquanto a  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  é de 5,37, apresentando uma vantagem considerável neste aspecto sobre a água [58]. Além disso, sua cadeia alquílica curta deve proporcionar melhor interação do solvente com hidrocarbonetos quando comparado à água. Levando em conta as propriedades do etanol, pode-se considerá-lo como um solvente alternativo alinhado com as bases da química analítica verde.

## 1.6 Métricas verdes

Todo processo químico, seja este em escala laboratorial ou de produção, possui um custo operacional e riscos a ele associado. Esse custo, seja de pessoal, consumíveis ou reagentes, pode ser mapeado, quantificado e os riscos minimizados. Alguns riscos apresentam um impacto negativo de caráter ambiental e, obviamente, é de interesse que estes sejam identificados e minimizados [59]. A fim de enfatizar a importância desse posicionamento no desenvolvimento de métodos e processos, em 1999 foram idealizados os princípios de química analítica verde (GAC) [60].

Diferentes métricas de impacto têm sido estudadas e desenvolvidas desde 2007 para avaliar o grau verde de métodos analíticos enquanto os artigos relacionados a GAC possuem crescente publicação desde 2003 [60,61]. O uso dessas métricas baseadas em softwares tem sido difundido e algumas dessas são a AGREEPrep, AGREE, complexGAPI, RGB12, todas gratuitas [42,59,62,63]. Algumas métricas são focadas em métodos específicos, por exemplo a HPLC-EAT é voltada a métodos com cromatografia líquida de alta eficiência [64].

Ao se observar as diferentes métricas, é possível notar que estas apresentam uma grande abrangência de variáveis, indo de cerca de 10, como na AGREEPrep, até 26 na complexGAPI. Conseqüentemente, a entrada de dados em seus respectivos softwares acaba por gerar um pictograma. Estes, por sua vez, podem ser simples, ou bastante complexos a depender da métrica utilizada. Para exemplificar, a Figura 15 apresenta o pictograma da métrica AGREE junto ao da métrica complexGAPI.

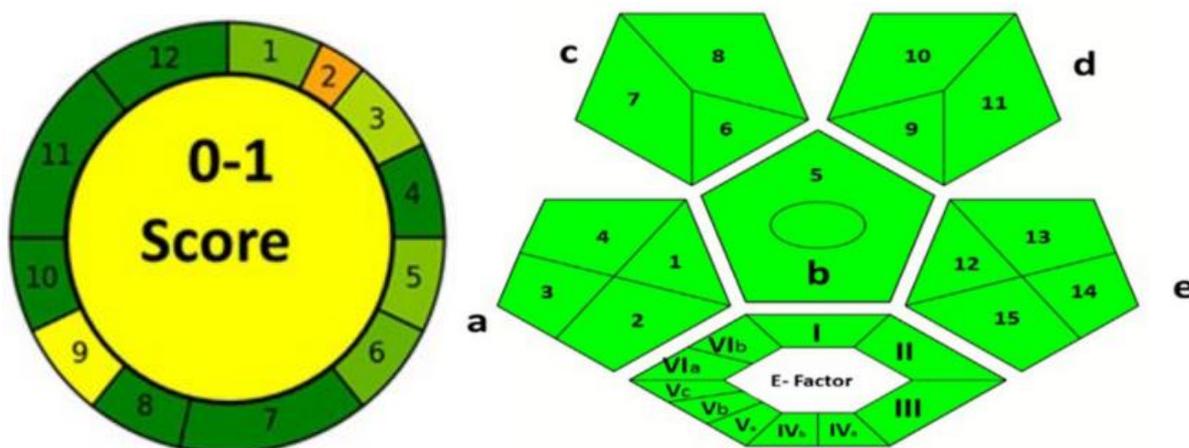


Figura 15: Pictograma da métrica AGREE composto de 12 entradas (esquerda). Pictograma para a métrica complexGAPI composto de 26 entradas (direita). Adaptado de Hussien et al. [59].

Em 2022, a métrica chamada AGREEPrep foi desenvolvida com o objetivo de padronizar e avaliar os métodos de preparo de amostras de forma ampla. Seu valor varia entre zero e 1, sendo 1 o índice de menor impacto ambiental. Diferentes aspectos são avaliados na métrica, como consumo de energia, operações unitárias envolvidas, quantidade de amostra e uso de solventes, totalizando 10 entradas para avaliação [42].

Considerando a desvantagem dos métodos convencionais aplicados à análise de rochas geradoras de óleo, Vac-HSSPME+GC-MS otimizado por DD pode ser uma abordagem interessante e rápida para avaliação de biomarcadores. Da mesma forma, a aplicação de DD em PLE, especialmente para o etanol, pode fornecer vantagens significativas sobre o método Soxhlet+SARA. O objetivo deste trabalho é fornecer novas abordagens para a avaliação geoquímica de rochas-geradoras de óleo, visando avaliar diretamente os biomarcadores, simplificando e encurtando o procedimento de preparo amostral, consumindo menos recursos humanos e sem utilizar solventes de alto impacto ambiental no processo de extração. A avaliação do impacto de cada método será mensurada através da métrica AGREEPrep e os valores obtidos comparados com o método convencional.

## **CAPÍTULO 2: VAC-HSSPME e GC-MS aplicados à análise de rochas geradoras.**

### **2.1 Introdução**

O petróleo é uma mistura química complexa formada por hidrocarbonetos saturados e compostos polares, incluindo heteroátomos (N, O, S) de alto peso molecular ou não [2,4]. A caracterização físico-química do óleo é tradicionalmente realizada através da determinação de parâmetros geoquímicos. Estes dependem da quantidade, ausência ou presença de biomarcadores, permitindo extrair informações sobre as condições durante a deposição da matéria orgânica na rocha geradora. Tais compostos podem estar diretamente relacionados a organismos encontrados na matéria orgânica durante a formação do óleo e também podem fornecer informações sobre o ambiente deposicional e o processo de biodegradação que ocorre no óleo [2,4,14] Classes como isoprenoides, esteranos e terpanos são comuns em rochas geradoras de petróleo e ainda podem fornecer informações sobre sua origem e potencial de produção de óleo de alta qualidade para o material estudado.

Os biomarcadores são formados durante a sedimentação da matéria orgânica e os processos da diagênese, conservando sua estrutura [4] Assim, sua estrutura pode estar relacionada ao seu precursor biológico carregando informações sobre a matéria orgânica depositada. Características específicas diferenciam os biomarcadores de outros compostos encontrados em rochas geradoras [11]:

- Os precursores pertencem a uma classe de organismos vivos;
- Eles são parcialmente ou completamente estáveis durante a sedimentação e subsequente processo físico, biológico e químico associado a ela;
- A estrutura do biomarcador deve ser capaz de indicar sua origem biológica.

Os dados adquiridos são interpretados verificando a correlação entre diferentes biomarcadores por meio de proporções e abundância relativa desses compostos de maneira qualitativa [9,11,12] Os parâmetros de diagnóstico são uma ferramenta poderosa para extrair informações sobre a correlação óleo-óleo e rocha-fonte de petróleo. A comparação de diferentes amostras é geralmente promovida por meio de comparação direta de proporção para proporção ou mesmo gráficos 2D ou 3D de proporção versus proporção para distribuir as amostras em um espaço gráfico [5,6] Não apenas, análises forenses podem ser realizadas usando tais correlações para sugerir um possível candidato a óleo ou origem de um óleo derramado estudado [7,12,13,65] Tais correlações entre componentes de uma mesma amostra têm a função de minimizar os efeitos de concentração quando diferentes amostras são comparadas. Assim, óleos

de diferentes locais e condições de análise semelhantes podem ser comparados e avaliados. Além disso, uma abordagem multicritério é necessária na avaliação geoquímica, pois as características da rocha-fonte são sugeridas por várias proporções de biomarcadores, presença ou ausência delas [12]

A caracterização e avaliação de uma rocha geradora como possível produtora de petróleo é um desafio para o analista devido à alta complexidade da amostra e número de constituintes, geralmente encontrados em baixas concentrações [2,38] Tradicionalmente, a metodologia de análise de biomarcadores em sedimentos requer a remoção da matéria orgânica presente na fonte com extração de Soxhlet, concentração do material extraído seguida de fracionamento em coluna aberta e análise GC-FID/MS. O processo de fracionamento visa separar o extrato em saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos leves (SARA). O procedimento de referência é o ASTM D4124 09. No entanto, foi fortemente modificado pela comunidade petroquímica ao longo dos anos [39] Esse procedimento é demorado e caro, exigindo pré-tratamento da amostra e manuseio cuidadoso durante todo o processo. Além disso, essas etapas não podem ser automatizadas, o que expõe o método de preparo de amostras a inúmeros erros e contaminantes associados à quantidade de operações unitárias necessárias para a análise de biomarcadores [40] Assim, abordagens alternativas no desenvolvimento de novos métodos compatíveis com as demandas de sensibilidade, simplicidade e robustez são necessárias.

Nesse cenário, o desenvolvimento da microextração em fase sólida (SPME) há mais de duas décadas permitiu a quantificação de analitos sem necessidade de extração exaustiva [43,46] Este método simples, mas eficaz, tem sido amplamente utilizado em química analítica, em áreas como ambiental, fragrâncias, biológica e muitas outras. No entanto, no campo petroquímico seu uso é restrito devido à natureza da amostra e inadequação para extração de compostos mais pesados. As capacidades da técnica para extrair compostos voláteis e mais leves são bem conhecidas.

A teoria para SPME está bem estabelecida e discutida na literatura tanto em termos termodinâmicos quanto cinéticos [47,48] A técnica é baseada em coeficientes de partição de analitos nas diferentes fases do sistema. Assim, a quantidade de analito que um revestimento pode extrair depende das constantes de distribuição dos analitos e da quantidade de analito livre na amostra. Além disso, a imersão direta, extração através do *headspace* e as condições experimentais afetam a rapidez com que o máximo termodinâmico pode ser alcançado. Para compostos altamente voláteis em amostras aquosas, as extrações em condições de equilíbrio

são facilmente alcançáveis devido à cinética rápida. No entanto, para compostos orgânicos semivoláteis (SVOCs), o equilíbrio pode não ser prático por ser muito longo. Assim, a extração fora do equilíbrio é realizada para esses analitos. Para contornar essas limitações, Psillakis e colaboradores demonstraram que a aplicação de vácuo pode melhorar a cinética de extração de SVOCs por meio da extração através do *headspace* [49,50] Considerando que as pressões parciais dos analitos na fase de vapor são independentes da pressão total, a quantidade de compostos extraídos por Vac-HSSPME é essencialmente a mesma que na HSSPME convencional. No entanto, a pressão mais baixa reduz o tempo necessário para o equilíbrio do sistema, levando à rápida extração e aprimoramento do sinal para compostos de massa mais alta. Para amostras aquosas, a teoria afirmou que a resistência à transferência de massa da amostra para a fase de vapor está relacionada a dois filmes adjacentes à interface água-gás que se relacionam à constante de Henry ( $K_H$ ). Este é um parâmetro não afetado pela baixa pressão e compostos com menor  $K_H$  podem ter sua transferência para o *headspace* acelerada, pois sua resistência à transferência de massa depende do filme de fase gasosa [49–51]

Considerando que, na SPME, fatores como tempo de exposição da fibra, temperatura de extração, natureza da fibra, agitação e muitos outros, podem influenciar na eficiência da extração. Esses parâmetros devem ser avaliados e um gráfico de superfície gerado para avaliar as melhores condições de extração por meio de planejamento experimental [43] O uso de vácuo durante a extração requer apenas uma variável adicional no processo de otimização [49]

Técnicas de planejamento experimental (DoE) são aplicadas como ferramenta de otimização para avaliar variáveis relevantes dentro do sistema estudado. Uma abordagem comum é através do modelo de planejamento fatorial que permite uma otimização rápida em sistemas simples onde as variáveis são poucas. No entanto, quando há mais variáveis a serem testadas em diferentes níveis, o planejamento do tipo Doehlert (DD) pode ser considerado uma opção interessante. Implementado por David Doehlert em 1970, o DD permite que mais níveis sejam testados dentro da mesma variável, aplicando um modelo de distribuição pontual dos valores experimentais de maneira uniforme [66,67] Comparando o número de experimentos à outros DoEs, o DD requer significativamente menos. Quando 7 variáveis foram consideradas, Box-Behnken exigiria 85 experimentos e composto central, 143. DD exigiria 57 experimentos enquanto testava as variáveis em mais níveis [67]. Além disso, pontos testados anteriormente podem ser reutilizados em novos modelos para uma abordagem de superfície de resposta [66,68] Apesar de suas vantagens, o DD não é comumente aplicado para análises por

cromatografia gasosa, onde apenas alguns poucos exemplos podem ser citados, como a determinação de cloretos em soro humano ou água [69,70]. Em nossa experiência, isso pode estar relacionado à sua baixa disponibilidade em softwares de DoE, exigindo uma abordagem menos automatizada e algum conhecimento de programação no tratamento de dados.

Considerando a desvantagem dos métodos convencionais aplicados às análises de rochas geradoras de petróleo, Vac-HSSPME+GC-MS otimizada via DD pode ser uma abordagem interessante para avaliação de biomarcadores. O objetivo deste trabalho é fornecer uma nova abordagem para a triagem de rochas fonte de petróleo, consumindo menos tempo, menos recursos humanos, sem usar solventes no processo de extração.

## 2.2 Materiais e Método

### 2.2.1 Procedimento Clássico (SARA)

O procedimento adotado é baseado no método padrão ASTM D4124 com algumas modificações. 60 g de rocha geradora foram trituradas e depois pulverizadas em um pó fino nos equipamentos Pulverizette e Mill, respectivamente (Fritsch, Idar-Oberstein, Alemanha) para melhor eficiência de extração. O equipamento foi limpo com acetona pura (Synth, Diadema, SP, Brasil) antes de cada uso, a fim de evitar qualquer contaminação cruzada entre as amostras que estavam sendo preparadas.

10 g do pó da rocha geradora de óleo foram peneirados a 150  $\mu\text{m}$  (Mesh 100) e inseridos em um cartucho de papel de filtro dentro do sistema Soxhlet. 300 mL de diclorometano/metanol (DCM/MeOH) (9:1) foram utilizados sob refluxo por 72 h para extração de óleo. Após extração exaustiva, o solvente foi removido sob fluxo suave de  $\text{N}_{2(\text{g})}$ .

O extrato (1 mL) foi colocado dentro de um tubo de ensaio com *n*-pentano (10 mL). O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 300 rpm. O sobrenadante foi recuperado com uma pipeta de Pasteur, depositado em um frasco de 40 mL e seco com  $\text{N}_{2(\text{g})}$ . O procedimento de recuperação do sobrenadante (maltenos) foi repetido por 5 a 8 vezes até que o solvente parecesse translúcido. Os maltenos, fração solúvel em *n*-pentano, foram secos e pesados após a remoção do *n*-pentano.

A cromatografia líquida em coluna aberta foi realizada para fracionamento de óleo com coluna de 20 g de sílica gel. 1 g dos maltenos recuperados foi colocado no topo da coluna. 80 mL de hexano de grau HPLC foram utilizados para eluir a fração de hidrocarbonetos saturados, 80 mL de hexano/DCM (9:1) eluiu a fração aromática, 80 mL de DCM:MeOH para as resinas e asfaltenos leves remanescentes. Os biomarcadores são distribuídos principalmente na primeira fração. Essa fração, F1, foi seca, pesada e diluída a 20 mg/mL para análise de GC-MS.

As análises cromatográficas foram realizadas nas mesmas condições descritas a seguir na seção 2.2.5. Não foi utilizado *split* durante a injeção e um tempo de corte de solvente maior foi aplicado, iniciando-se a aquisição no espectrômetro de massa após 7 minutos. O fluxograma é descrito na Figura 16 a seguir.

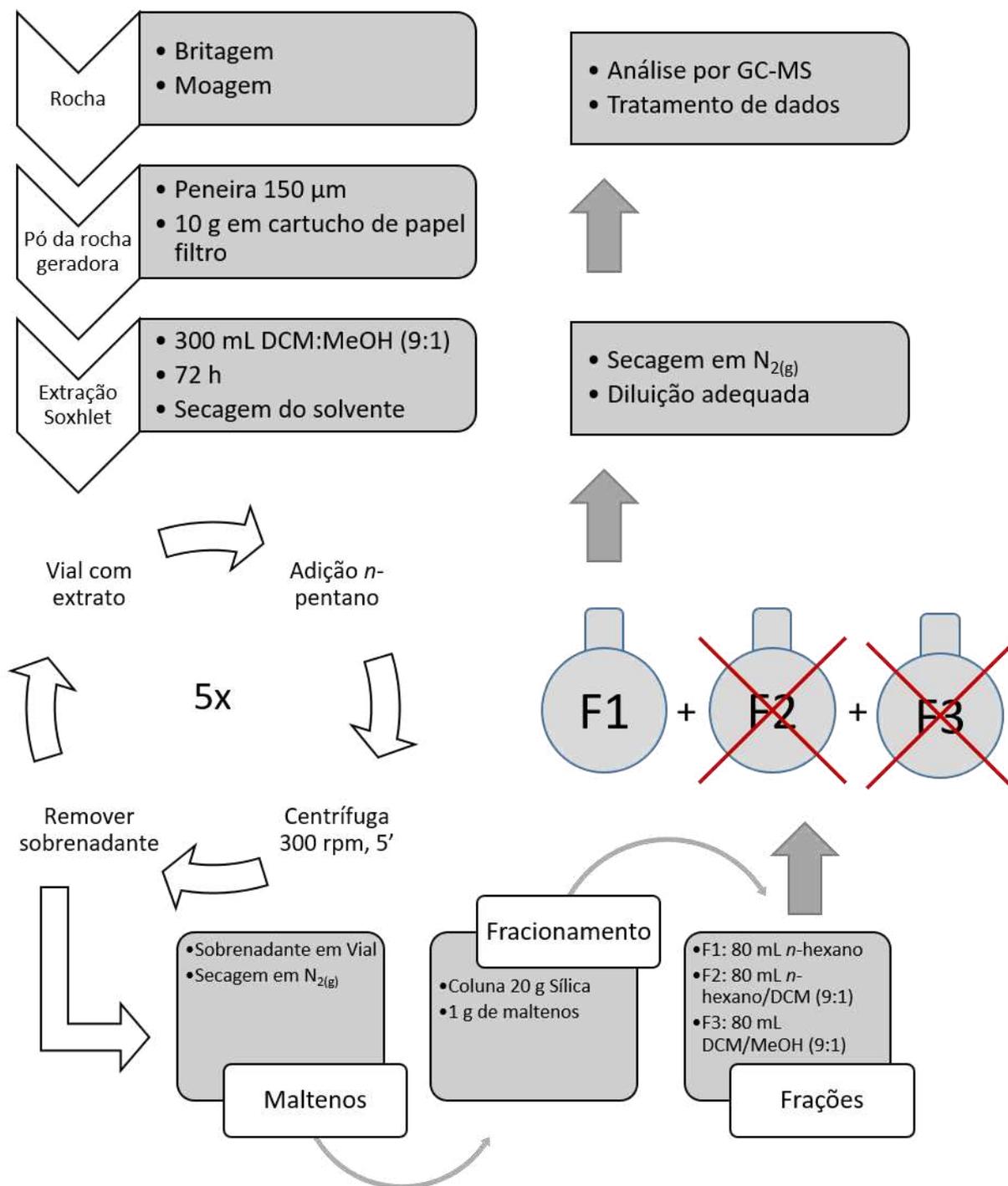


Figura 16: Fluxograma para o método clássico (Soxhlet+SARA) para análise de rocha-geradora. Adaptado de Pollo [19].

### 2.2.2 Amostras

Todas as amostras utilizadas eram do mesmo poço de petróleo e seu teor de carbono orgânico total (TOC) foi previamente determinado pelo fornecedor usando procedimentos padrão (por análise elementar convencional). As rochas foram moídas em um moinho planetário e peneiradas a diâmetro de partícula  $dP < 0,75$  mm (mesh 200) antes do uso e identificadas como S0361, S0364, S0579, S0937 e S1830, com TOC de 3,61 %; 3,64 %; 5,79 %; 9,37 % e 18,30 %, respectivamente. Para fins de otimização, uma mistura com TOC médio estimado de 9,0 % foi preparada e identificada como M0900.

### 2.2.3 Microextração em fase sólida a vácuo via headspace (Vac-HSSPME)

Alíquotas de rocha geradora moída foram pesadas diretamente em *vials* de 22 mL (Supelco, Bellefonte – PA, EUA). O *vial* com amostra foi selado com um septo de silicone pré-perfurado de alta temperatura do tipo *plug* Thermolite Shimadzu Plus (Restek, Bellefonte – PA, EUA), encaixado a uma válvula *Mininert* modificada (Sigma-Aldrich, St. Louis- MI, EUA) [71]. O *headspace* do *vial* foi evacuado usando uma bomba de vácuo GM-0.50 (Jinteng Experiment Equipment Co., Tianjin, China), acoplada à válvula *Mininert* por uma mangueira de silicone e microseringa de GC. Após um tempo para o equilíbrio amostra-*headspace*, o *vial* foi inserido num bloco de aquecimento de alumínio e a bomba de vácuo desacoplada da válvula *Mininert*. Uma fibra PDMS 7  $\mu$ m foi introduzida no *vial* através do septo pré-perfurado e exposta ao *headspace* para extração. Esta fibra, em particular, foi escolhida devido à sua alta estabilidade térmica e melhor desempenho para compostos de maior massa molecular [47]. Após a extração, a fibra foi exposta ao injetor aquecido do GC-MS para dessorção (5 minutos), separação, detecção e identificação dos analitos. O aparato experimental para Vac-HSSPME é mostrado na Figura 17 [49].

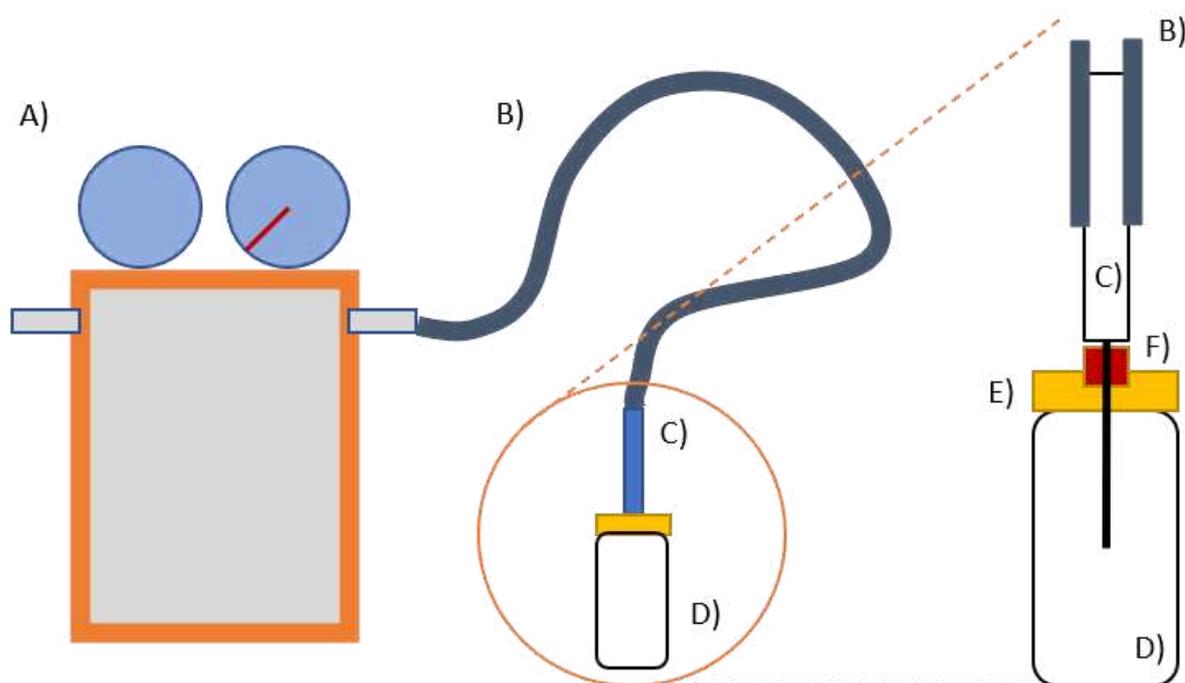


Figura 17: Aparato para redução de pressão no interior do vial antes da extração com HSSPME. A) Bomba de vácuo, B) Mangueira de silicone, C) Seringa GC, D) vial de 22 ml, E) Tampa Mininert® modificada, F) Septo GC instalado na tampa modificada. Adaptado de Pollo [10].

#### 2.2.4 Otimização multivariada através do planejamento experimental de Doehlert

O método Vac-HSSPME foi otimizado por DD [66,72]. Alíquotas da mistura M0900 foram utilizadas em todos os experimentos. As variáveis estudadas e seus respectivos níveis foram: massa de amostra  $M_s$  (100, 300, 500, 700 e 900 mg); tempo de evacuação do *headspace*  $t_{PRE}$  (5, 10 ou 15 min); temperatura de extração  $Temp$  (100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250 °C) e tempo de extração  $t_{ext}$  (15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 min) – para um total de 25 experimentos, sendo 5 repetições no ponto central. A resposta otimizada foi a soma de todos os picos para esteranos SIM 217 Da [2,11]. O processamento dos dados foi realizado na plataforma MATLAB v. 2011b (Natick, MA, EUA).

#### 2.2.5 Cromatografia a gás com detecção espectrométrica de massas (GC-MS)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC2010 acoplado ao espectrômetro de massas TQ8030 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A temperatura do injetor foi ajustada para 280°C, modo *split* 1:1. Todas as amostras estavam na concentração de 10 mg/mL. A coluna utilizada foi a SLB-5MS (30 m × 0,25 mm-I.D. × 0,25 μm).  $H_{2(g)}$  foi utilizado como gás de arraste com vazão constante a 1,3 mL/min. O forno do GC foi programado de 70 °C (por 2 minutos) até 300 °C a 4 °C/min (por 30 minutos no final). A aquisição foi realizada a 10 Hz

no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM) a 85, 191, 217 Da para otimização do DD. A mesma taxa de aquisição foi aplicada para as amostras usando o modo SCAN de 50 a 600 Da. A interface entre o GC e o MS foi ajustada para 200 °C, enquanto a fonte de íons estava a 250 °C. Análises de espectro de massa e integração de picos foram realizadas no software Shimadzu Postrun analysis v. 4.52.

### 2.2.6 Desempenho analítico do método otimizado

Foram preparadas misturas da amostra M0900 com rocha moída isenta de matéria orgânica para emular amostras não-sintéticas com diferentes teores de matéria orgânica, mas de teores conhecidos para gerar dados de linearidade. As quantidades de M0900 foram de 10 a 160 mg com incrementos de 30 mg, sempre completando a massa no *vial* até 160 mg com rocha isenta de MO. As extrações foram realizadas nas condições ótimas do DD.

## 2.3 Resultados e discussões

### 2.3.1 Planejamento experimental do tipo Doehlert

As amostras petroquímicas são altamente complexas e os estudos geoquímicos são uma abordagem multicritério. A avaliação da informação, acerca de seu ambiente deposicional e da matéria orgânica depositada, é frequentemente feita por meio de gráficos de biomarcadores, razão para razão e perfil cromatográfico geral da amostra. Três classes de compostos são especialmente relevantes: alcanos lineares (85 Da), terpanos pentacíclicos (191 Da) e esteranos (217 Da). Para a otimização, optou-se por monitorar a área total de picos para esteranos 217 Da.

Uma correlação quadrática entre essa resposta e as variáveis otimizadas mostrou-se adequada, considerando o valor do teste F de significância e de falta de ajuste. A Tabela 1 mostra o p-valor de significância para cada variável e suas interações. Variáveis com  $p > 0,05$  não foram consideradas estatisticamente relevantes a 95% de confiança. A Equação 5 representa a regressão do modelo.

*Tabela 1: p-valor de significância para cada variável da regressão do planejamento Doehlert. Foram consideradas para a superfície de resposta apenas variáveis com p-valor > 0,05.*

Valor	Variável	P-valor
-59216	Constante	0,002
-6,35	X1: massa	0,629
+344,82	X2: temperatura	0,005
+999,62	X3: Tempo de Extração	$5,4 \times 10^{-4}$
+31,80	X4: Vácuo	0,974
+0,05	X1X2	0,430

-0,25	X1X3	0,068
+0,60	X1X4	0,465
-2,97	X2X3	0,001
-3,92	X2X4	0,326
-36,94	X3X4	4,3x10 <sup>-4</sup>
+0,01	X1 <sup>2</sup>	0,162
-0,45	X2 <sup>2</sup>	0,065
+0,57	X3 <sup>2</sup>	0,307
+122,51	X4 <sup>2</sup>	0,004

$$S = -59216 + 345 X_2 + 1000 X_3 - 3 X_2 X_3 - 37 X_3 X_4 + 122 X_4^2$$

Equação 5: Equação de regressão para o sistema Vac-HSSPME.

A Tabela 2 mostra os experimentos que foram realizados durante o processo de otimização. Alguns resultados foram verificados como sendo *outliers* por apresentarem resíduos maiores do que 2 desvios-padrão padronizados. Estes valores não são considerados no cálculo. Na tabela, estes valores são representados como NaN (*not a number*) e não impactaram a regressão, sendo eles os experimentos de número 2, 7, 13 e 24, de acordo com o modelo de regressão gerado.

Tabela 2: Doehlert design e resposta a 217 Da para regressão do modelo. Respostas 2, 7, 13 e 24 foram removidas e consideradas NaN (*not a number*) para regressão final do modelo.

Modelo	Massa/mg	Temperatura/°C	T Ext./min	t <sub>PRE</sub> (vácuo)/min	217 Da
1	900	175	60	10	7307
2	700	250	60	10	NaN
3	700	200	105	10	1208
4	700	200	75	15	1320
5	100	175	60	10	0
6	300	100	60	10	0
7	300	150	15	10	NaN
8	300	150	45	5	468
9	700	100	60	10	212
10	700	150	15	10	0
11	700	150	45	5	955
12	700	250	60	10	1080
13	500	225	15	10	NaN
14	500	225	45	5	4466
15	300	200	105	10	3566
16	500	125	105	10	10931
17	500	175	30	15	12383
18	300	200	75	15	362
19	500	125	75	15	4100
20	500	175	30	15	9389
21	500	175	60	10	564

<b>22</b>	500	175	60	10	2170
<b>23</b>	500	175	60	10	1641
<b>24</b>	500	175	60	10	NaN
<b>25</b>	500	175	60	10	2694

Uma melhor avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a eficiência de extração pode ser feita após a inspeção da Figura 18, que representa superfícies correlacionando a resposta com tempo de evacuação do *headspace*, tempo de extração e temperatura de extração.

A Figura 18 indica que as condições ótimas de extração são a 250 °C com 15 min de vácuo e 15 min de extração. Como a massa da amostra não afetou significativamente a eficiência de extração, ela foi fixada em 100 mg para os demais experimentos após avaliação do desempenho analítico descrito no item 2.2.6. A Figura 19 demonstra a área de pico obtida para cada composto representativo das principais classes de compostos para o experimento descrito no item 2.2.6. Para *n*-alcanos, a maioria dos coeficientes de determinação é superior a 0,99, com poucas exceções. Para a classe dos terpanos e esteranos, 100 mg de amostra encontra-se dentro do limite superior da linearidade.

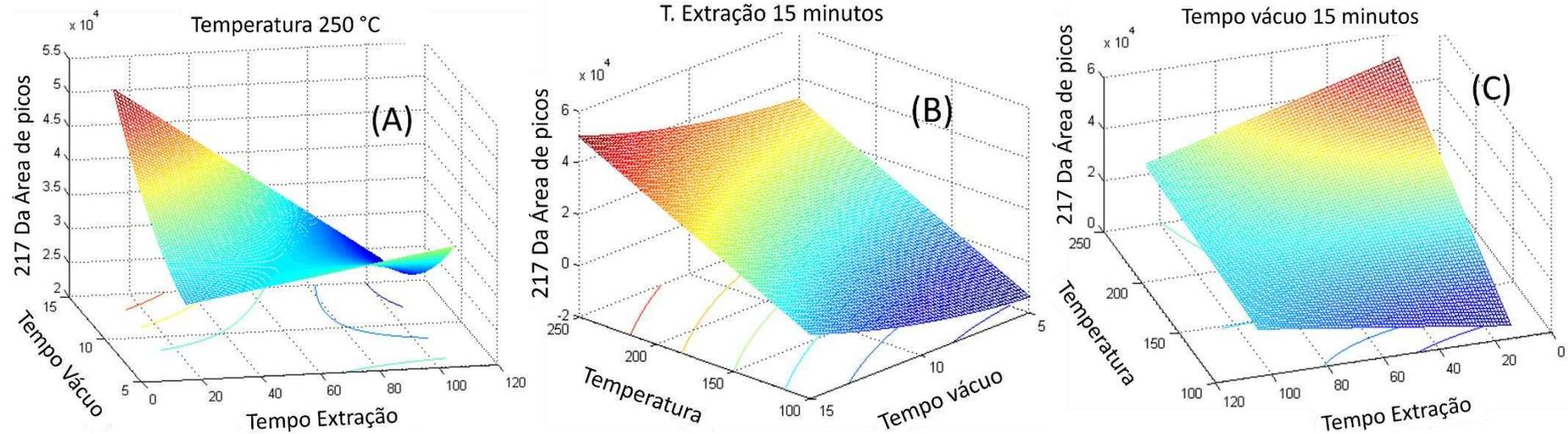


Figura 18: Superfícies de resposta 217 Da do DD. (A) Temperatura de extração fixada em 250 °C. (B) Tempo de extração fixado em 15 minutos. (C) Tempo de evacuação fixado em 15 minutos. Modificado de Pollo et. al. [10]

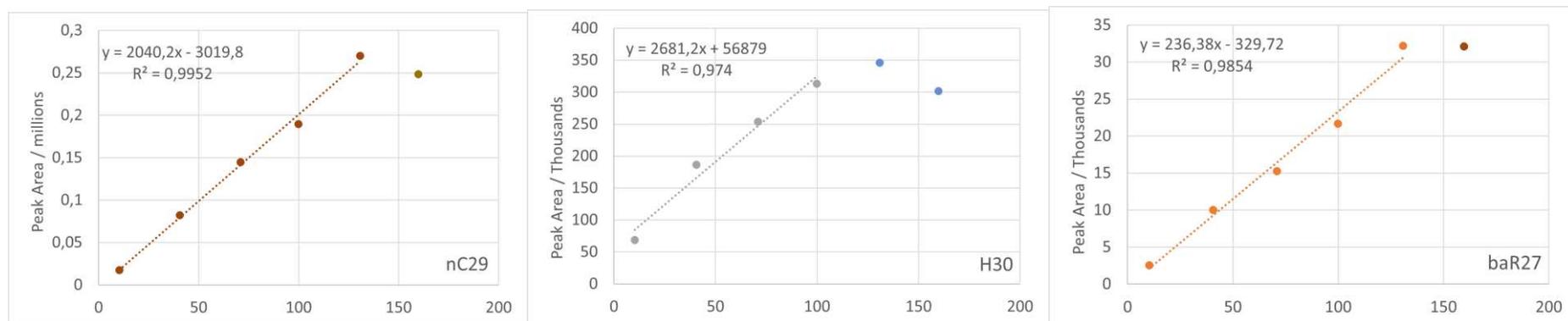


Figura 19: Curvas analíticas considerando a faixa de 10 a 130 mg M0900 para n-alcano C<sub>29</sub> (A), faixa de 10 a 100 mg para terpano H30 (B) e faixa de 10 a 130 mg para esterano C27ba20R identificação 'b' (C). Modificado de Pollo et. al. [10]

Além do objetivo prático, a determinação das condições ótimas de extração, as superfícies mostradas na Figura 18 podem fornecer algumas informações sobre aspectos teóricos de Vac-HSSPME. A eficiência de extração é sempre aumentada para temperaturas operacionais mais altas: isso é consistente com um processo de extração cineticamente controlado, onde um aumento na temperatura sempre leva ao aumento da eficiência devido à aceleração de todas as etapas de transferência de massa envolvidas. O mesmo vale para o aumento do tempo de evacuação antes da extração: períodos mais longos de pré-equilíbrio amostra-*headspace* sob vácuo devem levar ao enriquecimento da fase vapor com analitos até o equilíbrio ou completa extração do analito na amostra (o que não parece ser o caso).

O comportamento da superfície de resposta em termos do tempo de evacuação do *headspace* e tempo de extração (Figura 18A) merece uma análise mais aprofundada. Dois máximos locais são observados: para menor tempo de vácuo com maior tempo de extração, e para maior tempo de vácuo com menor tempo de extração, sendo este último a condição ótima. Uma possível causa pode estar relacionada à perda de analitos através de septos, vedação do *vial*, conexões de tubos ou outras interfaces após períodos mais longos de operação.

#### 2.4 Perfil qualitativo e quantitativo da fração volátil extraível de rochas geradoras

A Vac-HSSPME otimizada foi aplicada em amostras de rochas-geradoras de óleo, e os resultados foram comparados ao método convencional Soxhlet + SARA. A Figura 20 e a Figura 21 comparam cromatogramas SCAN e 217 Da para uma amostra representativa e permitem uma comparação qualitativa entre os dois métodos.

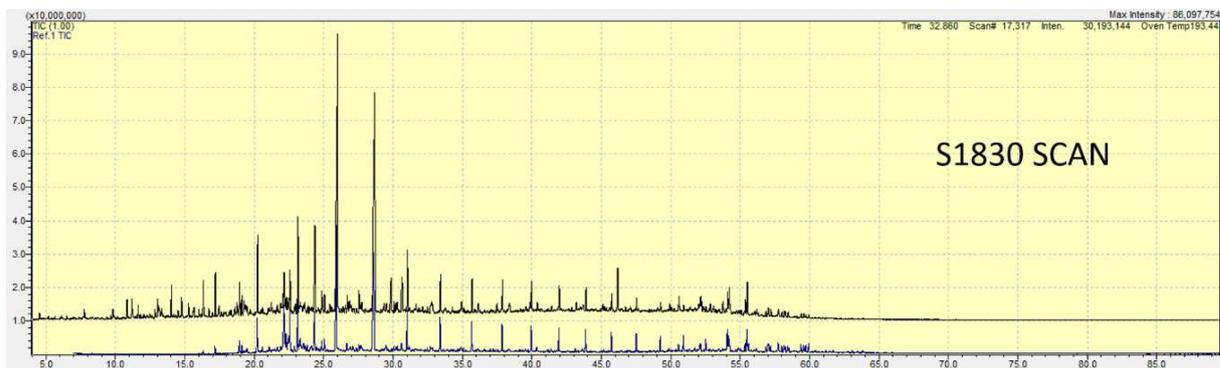


Figura 20: Fingerprints Vac-HSSPME e Soxhlet para a mesma rocha-geradora comparadas. Acima, perfil Vac-HSSPME (preto). Abaixo, o perfil de Soxhlet (azul).

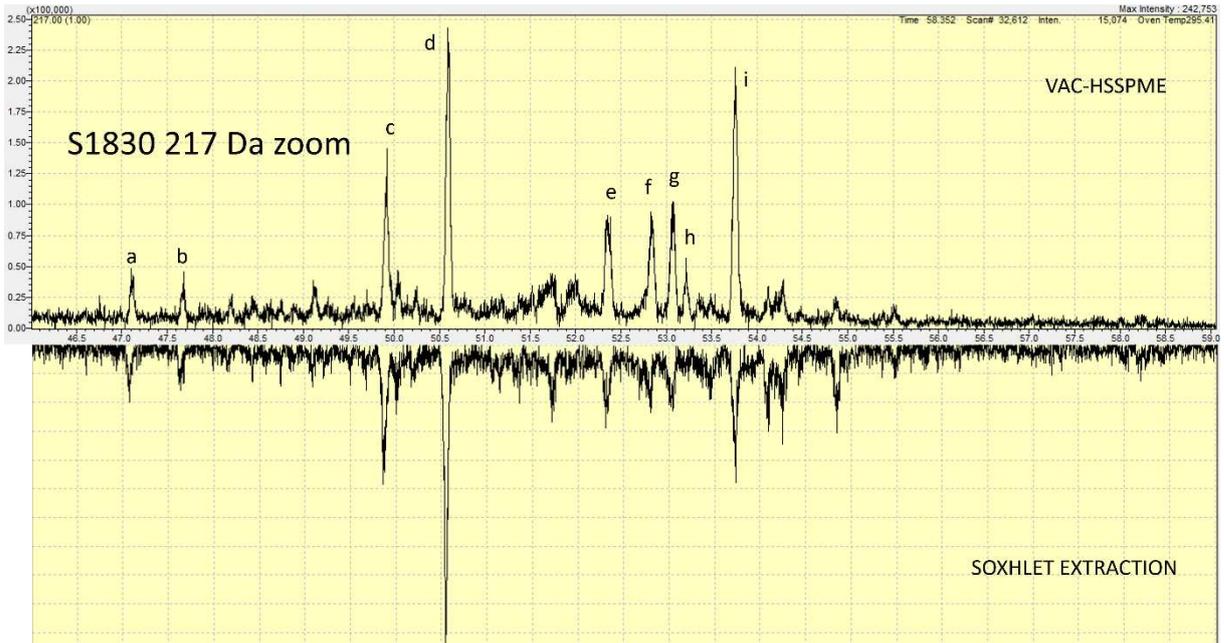


Figura 21: Vac-HSSPME vs. Soxhlet+SARA para esteranos 217 Da de 46 a 69 minutos. a:  $C_{27}$   $13\beta(H), 17\alpha(H)$  (20S) diasterane, b:  $C_{27}$   $13\beta(H), 17\alpha(H)$  (20R) diasterane, c:  $C_{27}$   $5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$  (20R) sterane, d:  $C_{28}$   $5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$  (20R) sterane, e:  $C_{29}$   $5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$  (20S) sterane, f:  $C_{29}$   $5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$  (20R) sterane, g:  $C_{29}$   $5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$  (20R) sterane.

A Figura 22 apresenta o espectro de massas para o pico 'd' da classe dos esteranos e pode-se verificar confirmar a similaridade entre eles.

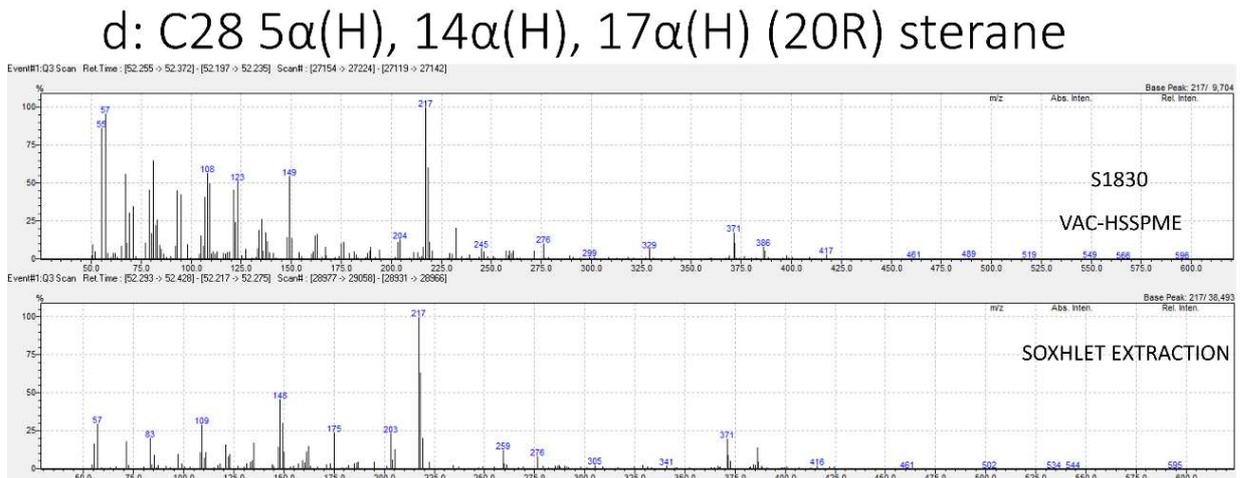


Figura 22: Espectro de massas para o pico 'd' da amostra S1830. Acima: Vac-HSSPME, Abaixo: Extração Soxhlet.

A Figura 23 apresenta o SIM para 191 Da da classe dos terpanos, enquanto a Figura 24 apresenta o espectro de massas do pico 'C' (H30) obtido por Vac-HSSPME e também pelo método clássico.

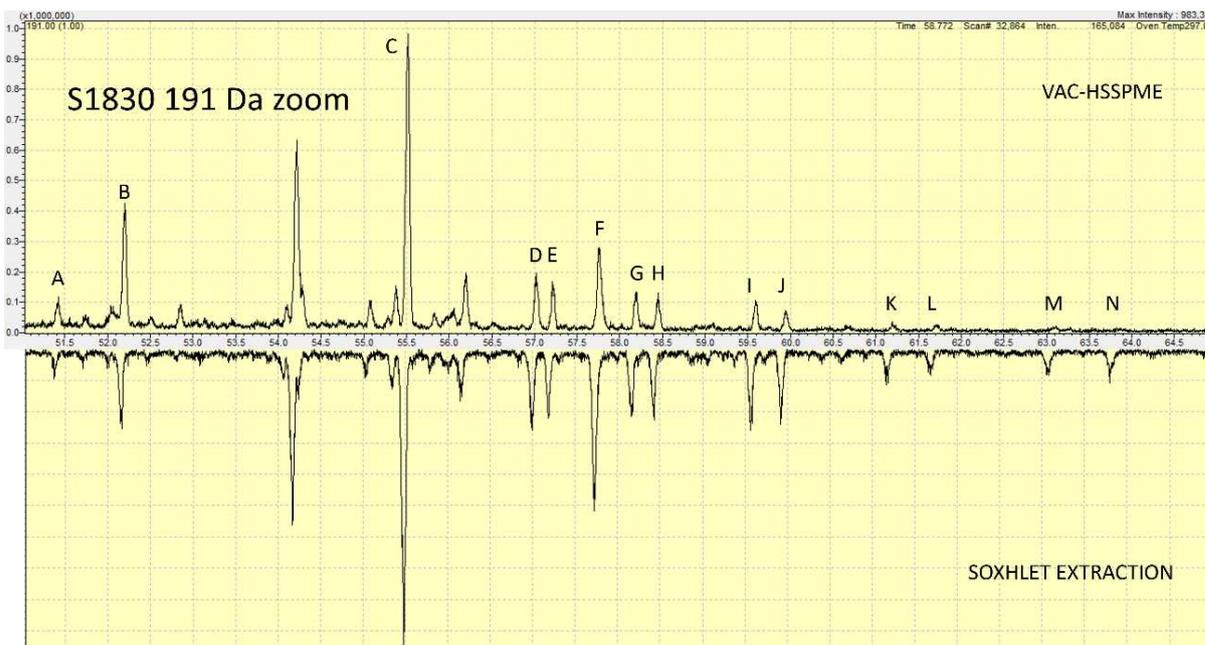


Figura 23: Cromatograma de íons selecionados (SIM) 191 Da de 51 a 65 minutos para a amostra S1830. Invertido: Extração Soxhlet. Acima: Vac-HSSPME. A:  $18\alpha(H)$ -22,29,30-trisnorhopano (Ts), B:  $17\alpha(H)$ -22,29,30-trisnorhopano (Tm), C:  $C_{30}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$  terpane (H30), D:  $C_{31}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22S$  terpane ( $H_{31}S$ ), E:  $C_{31}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22R$  terpane ( $H_{31}R$ ), F: Gammacerane, G:  $C_{32}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22S$  terpane ( $H_{32}S$ ), H:  $C_{32}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22R$  terpane ( $H_{32}R$ ), I:  $C_{33}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22S$  terpane ( $H_{33}S$ ), J:  $C_{33}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22R$  terpane ( $H_{33}R$ ), K:  $C_{34}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22S$  terpane ( $H_{34}S$ ), L:  $C_{34}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22R$  terpane ( $H_{34}R$ ), M:  $C_{35}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22S$  terpane ( $H_{35}S$ ), N:  $C_{35}$   $17\alpha$ ,  $21\beta(H)$ ,  $22R$  terpane ( $H_{35}R$ ).

### C: $C_{30}$ $17\alpha$ , $21\beta(H)$ terpane (H30)

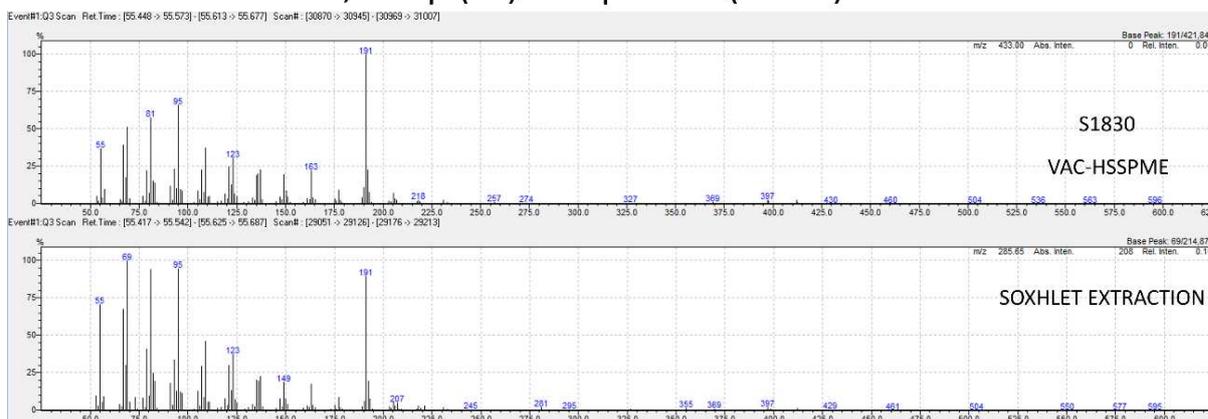


Figura 24: Espectro de massas para o pico 'C' da amostra S1830. Acima: Vac-HSSPME, Abaixo: Extração Soxhlet.

Uma inspeção visual mostra que os perfis obtidos usando Vac-HSSPME e o método Soxhlet são bastante comparáveis. No entanto, um exame mais minucioso mostra que existem algumas diferenças. Analitos menos retidos e, portanto, possivelmente mais voláteis ( $t_R < 25$  min na Figura 20), parecem ser melhor detectados usando Vac-HSSPME – o que é esperado,

visto que compostos com altas pressões de vapor são propensos a serem perdidos durante a extração Soxhlet, bem como durante as diversas operações unitárias do método clássico, como evaporações, redissoluções e transferências entre *vials*. Além disso, tanto em cromatogramas SCAN quanto nos SIM, a distribuição e as intensidades relativas dos picos detectados em ambas as técnicas parecem ser comparáveis, de forma geral.

Embora a comparação visual de cromatogramas possa revelar algumas informações interessantes, uma melhor avaliação em termos quantitativos se faz necessária a fim de assegurar a aplicabilidade desse método. A comparação entre os resultados da Vac-HSSPME e Soxhlet+SARA não é simples. Ambos são, a princípio, quantitativos, mas o último é tipicamente exaustivo e SPME, independente do formato de fibra ou método abordagem utilizada, é uma técnica de extração de equilíbrio controlada cineticamente. Não apenas, para o método clássico (Soxhlet + SARA), os extratos são soluções orgânicas que normalmente são introduzidas no GC utilizando modo *split* – apesar de modo *splitless* ser possível, mas não frequentemente utilizado pela natureza bastante suja da amostra. Do contrário, em SPME os extratos são injetados diretamente na coluna cromatográfica com injetores operando normalmente em modo *splitless*, sem a necessidade de evaporação do solvente ou reconcentração da banda cromatográfica *on-column* (quando utilizando injeções líquidas em modo *splitless*, por exemplo). Uma maneira simples de comparar ambas as abordagens para fins quantitativos poderiam ser realizadas através da avaliação dos limites de detecção de compostos relevantes para ambas as técnicas. Devido à natureza das amostras aqui estudadas (rochas naturais provenientes de petróleo) e uma vez que os materiais certificados são na maioria das vezes indisponíveis, o cálculo dos LOD não seria realista. Tradicionalmente, a avaliação de rochas-geradoras é realizada por razões de biomarcadores, mas a mesma abordagem não seria válida quando aplicada diretamente a Vac-HSSPME. Distorções significativas nos valores de área de pico são esperadas decorrente da natureza da extração. A razão entre Vac e Soxhlet reforça a distorção nos valores de pico para compostos mais pesados na maioria das classes. A Tabela 3 demonstra a abundância de cada pico para cada um dos métodos a razão Vac/Soxhlet.

Tabela 3: Áreas de pico e razões calculadas dos compostos presentes em cada amostra.

	Rt/min	Compound	ID Reference	S1830 Area %			S0364 Area %			S0937 Area %			S0361 Area %			S0579 Area %		
				Soxhlet	Vac	Ratio												
C <sub>22</sub>	37,87	Docosane	[5,6,73]	16,06	21,44	<b>1,34</b>	13,40	26,27	<b>1,96</b>	8,11	13,88	<b>1,71</b>	12,28	33,86	<b>2,76</b>	11,01	17,68	<b>1,61</b>
C <sub>23</sub>	39,96	Tricosane	[5,6,73]	14,05	18,66	<b>1,33</b>	13,42	29,68	<b>2,21</b>	10,33	23,90	<b>2,31</b>	11,62	23,11	<b>1,99</b>	11,40	20,35	<b>1,79</b>
C <sub>24</sub>	41,97	Tetracosane	[5,6,73]	12,61	16,57	<b>1,31</b>	11,61	16,19	<b>1,39</b>	12,33	14,39	<b>1,17</b>	12,17	15,25	<b>1,25</b>	11,96	17,50	<b>1,46</b>
C <sub>25</sub>	43,84	Pentacosane	[5,6,73]	12,88	14,60	<b>1,13</b>	12,59	11,99	<b>0,95</b>	14,54	14,85	<b>1,02</b>	12,38	11,04	<b>0,89</b>	13,08	17,43	<b>1,33</b>
C <sub>26</sub>	45,75	Hexacosane	[5,6,73]	11,17	11,13	<b>1,00</b>	11,12	6,89	<b>0,62</b>	13,48	10,63	<b>0,79</b>	11,85	5,34	<b>0,45</b>	11,16	11,18	<b>1,00</b>
C <sub>27</sub>	47,53	Heptacosane	[5,6,73]	10,31	8,04	<b>0,78</b>	10,14	4,36	<b>0,43</b>	12,42	8,69	<b>0,70</b>	12,66	3,81	<b>0,30</b>	11,93	8,19	<b>0,69</b>
C <sub>28</sub>	49,27	Octacosane	[5,6,73]	8,05	4,64	<b>0,58</b>	9,44	2,32	<b>0,25</b>	10,47	6,26	<b>0,60</b>	9,81	3,31	<b>0,34</b>	9,67	3,98	<b>0,41</b>
C <sub>29</sub>	50,93	Nonacosane	[5,6,73]	8,60	3,29	<b>0,38</b>	9,75	1,57	<b>0,16</b>	10,79	4,82	<b>0,45</b>	9,97	2,31	<b>0,23</b>	11,37	2,50	<b>0,22</b>
C <sub>30</sub>	52,59	Triacontane	[5,6,73]	6,27	1,62	<b>0,26</b>	8,52	0,73	<b>0,09</b>	7,52	2,59	<b>0,34</b>	7,25	1,98	<b>0,27</b>	8,43	1,19	<b>0,14</b>
a	47,12	C <sub>27</sub> 13β(H),17α(H) (20S) diasterane	[5,6,73,74]	8,17	4,51	<b>0,55</b>	0,00	4,25		0,63	0,77	<b>1,22</b>	1,83	6,07	<b>3,31</b>	2,60	3,40	<b>1,31</b>
b	47,69	C <sub>27</sub> 13β(H),17α(H) (20R) diasterane	[5,6,73,74]	4,51	3,69	<b>0,82</b>	0,00	2,14		0,44	0,62	<b>1,43</b>	1,90	4,52	<b>2,38</b>	2,71	3,47	<b>1,28</b>
c	50,60	C <sub>27</sub> 5α(H), 14α(H), 17α(H) (20R) sterane	[5,6,73,74]	44,44	27,43	<b>0,62</b>	20,84	26,59	<b>1,28</b>	17,65	20,94	<b>1,19</b>	16,46	21,36	<b>1,30</b>	21,72	24,55	<b>1,13</b>
d	52,36	C <sub>28</sub> 5α(H), 14α(H), 17α(H) (20R) sterane	[5,6,73,74]	12,25	13,96	<b>1,14</b>	18,03	15,54	<b>0,86</b>	15,35	15,24	<b>0,99</b>	17,20	14,53	<b>0,84</b>	16,18	16,13	<b>1,00</b>
e	52,84	C <sub>29</sub> 5α(H), 14β(H), 17β(H) (20S) sterane	[5,6,73,74]	6,44	10,19	<b>1,58</b>	13,17	11,53	<b>0,88</b>	13,26	13,91	<b>1,05</b>	12,77	12,99	<b>1,02</b>	13,63	15,60	<b>1,14</b>
f	53,08	C <sub>29</sub> 5α(H), 14β(H), 17β(H) (20R) sterane	[5,6,73,74]	9,12	12,55	<b>1,38</b>	10,45	12,31	<b>1,18</b>	12,82	12,83	<b>1,00</b>	12,46	14,75	<b>1,18</b>	10,57	11,44	<b>1,08</b>
g	53,76	C <sub>29</sub> 5α(H), 14α(H), 17α(H) (20R) sterane	[5,6,73,74]	15,06	27,67	<b>1,84</b>	37,51	27,63	<b>0,74</b>	39,84	35,68	<b>0,90</b>	37,38	25,77	<b>0,69</b>	32,59	25,42	<b>0,78</b>
A	51,42	18α(H)-22,29,30- trisorhopano (Ts)	[5,6,73,74]	1,54	2,83	<b>1,84</b>	2,56	6,20	<b>2,42</b>	1,88	2,41	<b>1,29</b>	3,72	8,37	<b>2,25</b>	3,63	5,62	<b>1,55</b>
B	52,20	17α(H)-22,29,30- trisorhopano (Tm)	[5,6,73,74]	6,41	15,84	<b>2,47</b>	5,78	13,81	<b>2,39</b>	5,30	8,19	<b>1,54</b>	8,14	10,74	<b>1,32</b>	9,69	15,88	<b>1,64</b>
C	55,52	C <sub>30</sub> 17α, 21β(H) terpane (H <sub>30</sub> )	[5,6,73,74]	28,23	40,48	<b>1,43</b>	43,61	49,12	<b>1,13</b>	47,19	52,40	<b>1,11</b>	43,37	49,15	<b>1,13</b>	47,97	51,32	<b>1,07</b>
D	57,03	C <sub>31</sub> 17α, 21β(H), 22S terpane (H <sub>31S</sub> )	[5,6,73,74]	7,05	7,38	<b>1,05</b>	9,55	6,94	<b>0,73</b>	9,86	8,87	<b>0,90</b>	9,82	7,00	<b>0,71</b>	12,59	7,77	<b>0,62</b>
E	57,22	C <sub>31</sub> 17α, 21β(H), 22R terpane (H <sub>31R</sub> )	[5,6,73,74]	5,54	5,58	<b>1,01</b>	10,14	3,51	<b>0,35</b>	6,75	6,66	<b>0,99</b>	5,87	9,24	<b>1,57</b>	5,53	4,02	<b>0,73</b>
F	57,75	Gammacerane	[5,6,74]	16,30	12,57	<b>0,77</b>	15,15	11,22	<b>0,74</b>	15,70	11,93	<b>0,76</b>	18,54	15,50	<b>0,84</b>	20,59	10,96	<b>0,53</b>

<b>G</b>	58,20	<i>C</i> <sub>32</sub> 17α, 21β(H), 22S terpane ( <i>H</i> <sub>32S</sub> )	[5,6,73,74]	6,13	4,09	<b>0,67</b>	3,37	2,93	<b>0,87</b>	3,24	2,47	<b>0,76</b>	4,97	0,00	<b>0,00</b>	0,00	1,47	
<b>H</b>	58,45	<i>C</i> <sub>32</sub> 17α, 21β(H), 22R terpane ( <i>H</i> <sub>32R</sub> )	[5,6,73,74]	5,71	3,85	<b>0,68</b>	2,92	1,93	<b>0,66</b>	2,55	2,10	<b>0,82</b>	5,57	0,00	<b>0,00</b>	0,00	2,95	
<b>I</b>	59,61	<i>C</i> <sub>33</sub> 17α, 21β(H), 22S terpane ( <i>H</i> <sub>33S</sub> )	[5,6,73,74]	6,58	3,51	<b>0,53</b>	3,38	2,23	<b>0,66</b>	2,51	1,70	<b>0,68</b>	0,00	0,00		0,00	0,00	
<b>J</b>	59,96	<i>C</i> <sub>33</sub> 17α, 21β(H), 22R terpane ( <i>H</i> <sub>33R</sub> )	[5,6,73,74]	6,40	2,59	<b>0,40</b>	3,54	2,11	<b>0,60</b>	1,85	1,20	<b>0,65</b>	0,00	0,00		0,00	0,00	
<b>K</b>	61,21	<i>C</i> <sub>34</sub> 17α, 21β(H), 22S terpane ( <i>H</i> <sub>34S</sub> )	[5,6,73,74]	2,58	0,73	<b>0,28</b>	0,00	0,00		3,15	0,92	<b>0,29</b>	0,00	0,00		0,00	0,00	
<b>L</b>	61,71	<i>C</i> <sub>34</sub> 17α, 21β(H), 22R terpane ( <i>H</i> <sub>34R</sub> )	[5,6,73,74]	2,28	0,56	<b>0,25</b>	0,00	0,00		0,00	0,52		0,00	0,00		0,00	0,00	
<b>M</b>	63,10	<i>C</i> <sub>35</sub> 17α, 21β(H), 22S terpane ( <i>H</i> <sub>35S</sub> )	[5,6,73,74]	2,71	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,00		0,00	0,21		0,00	0,00		0,00	0,00	
<b>N</b>	63,87	<i>C</i> <sub>35</sub> 17α, 21β(H), 22R terpane ( <i>H</i> <sub>35R</sub> )	[5,6,73,74]	2,55	0,00	<b>0,00</b>	0,00	0,00		0,00	0,42		0,00	0,00		0,00	0,00	

Alternativamente, as relações sinal-ruído (S/N) medidas para picos poderiam ser um parâmetro confiável para comparar cromatogramas obtidos em condições tão diferentes. Para cada cromatograma, razões (S/N) para *n*-alcanos de C<sub>22</sub> a C<sub>32</sub> SCAN, esteranos 217 Da e terpanos 191 Da foram calculadas. A Figura 25 mostra gráficos das razões dos valores de (S/N)<sub>Vac</sub> para *n*-alcanos em função dos respectivos índices de retenção programados por temperatura linear de van den Dool – Kratz (LTPRI) para cada analito.

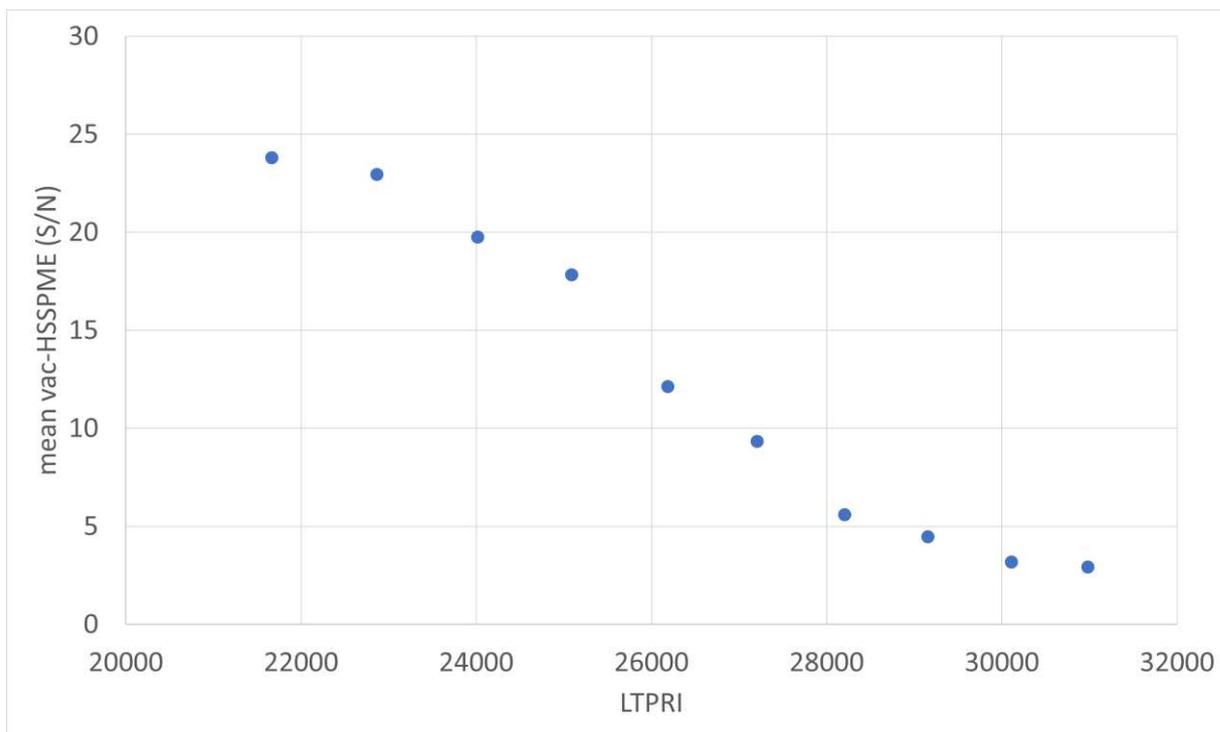


Figura 25: Correlação LTPRI vs. (S/N) em Vac-HSSPME.

A Figura 25 mostra que existe uma correlação aproximadamente linear entre as relações S/N para Vac-HSSPME e LTPRI do analito, exceto para os dois alcanos mais pesados (onde as quantidades detectadas são próximas aos limites de detecção e, portanto, a incerteza sobre as áreas de pico medidas é grande). Supondo que o método de extração convencional seja exaustivo, essa tendência deve ser atribuída às características da Vac-HSSPME.

Aspectos teóricos da Vac-HSSPME têm sido discutidos na literatura e os modelos que correlacionam a taxa de absorção do analito, sua natureza e os parâmetros operacionais geralmente dependem da  $K_H$  para solução aquosa / equilíbrio de vapor [49–51], o que não seria aplicável aqui já que não há fase aquosa envolvida no processo. Para *n*-alcanos, o LTPRI representa o tamanho da cadeia alquílica, e vários parâmetros moleculares termodinâmicos e cinéticos relativos ao processo de extração podem ser diretamente correlacionados a ele. Por exemplo, Pawliszyn e colaboradores mostraram que, para SPME em equilíbrio, as constantes

de distribuição *headspace*-fibra e *headspace*-amostra podem ser diretamente correlacionadas com o LTPRI do analito, se o material do revestimento de fibra e da fase estacionária da coluna no GC forem as mesmas [47,48]. Como Vac-HSSPME é conduzida em condições de não-equilíbrio, outros parâmetros que afetam a taxa de transferência de massa devem ser considerados.

Para o caso aqui estudado, uma discussão simplificada poderia ser feita considerando que a dessorção dos analitos a partir da superfície da amostra é rápida e que não há difusão significativa do interior da matriz sólida. Portanto, após o período de equilíbrio amostra-*headspace* a concentração do analito no *headspace*  $C_{HS}$  é diretamente proporcional à concentração da substância na amostra  $C_s$ . Pode-se supor também que a quantidade de analitos extraídos é pequena em comparação com sua concentração no *headspace* do *vial* no início do processo. Assim, a quantidade de analito extraída  $n(t)$  poderia ser correlacionada com o tempo de extração  $t_{ext}$  e à  $C_{HS}$ :

$$n(t) = \frac{2\pi D_G L}{\ln\left(\frac{b + \delta}{b}\right)} \cdot C_{HS} \cdot t_{ext}$$

*Equação 6: Quantidade de analito extraído pela fibra em função do tempo de extração em condições pré-equilíbrio [47,48].*

onde  $D_G$  é o coeficiente de difusão do analito em fase gasosa,  $L$  e  $b$  são o comprimento e o diâmetro da fibra, respectivamente, e  $\delta$  é a espessura da camada limite difusiva estática ao redor da fibra. Como o *headspace* não é agitado, ele fica estagnado e, portanto,  $\delta$  corresponde à distância  $r$  entre a fibra e a parede do *vial* da amostra. Se a fibra estiver centrada no sistema,  $\delta \approx r$ . Sendo  $r \gg b$ :

$$\ln\left(\frac{b + \delta}{b}\right) = \ln\left(\frac{b + r}{b}\right) \approx \ln\left(\frac{r}{b}\right)$$

*Equação 7: Aproximação do termo  $\ln$  para a espessura da fibra 'b'.*

Além disso, a  $C_{HS}$  deve ser diretamente proporcional à concentração do analito na superfície da amostra, que por sua vez também é proporcional à concentração total na amostra  $C_s$ , se esta for homogênea ( $C_{HS} = q \cdot C_s$ , onde  $q$  é uma constante de proporcionalidade escalar). Portanto, a Equação 6 se reduz a:

$$n(t) = \frac{2\pi D_G L}{\ln\left(\frac{r}{b}\right)} \cdot q \cdot C_S \cdot t_{ext} = Q \cdot C_S \cdot t_{ext}$$

*Equação 8: Quantidade de analito extraído em função da concentração deste na amostra ( $C_S$ )*

onde  $Q$  é um escalar que combina todos os termos constantes na Equação 8:

$$Q = \frac{2\pi D_G L q}{\ln\left(\frac{r}{b}\right)}$$

*Equação 9: Condensação dos termos constantes na equação no escalar  $Q$ .*

Todos os termos da Equação 9, exceto  $D_G$ , estão relacionados às dimensões da fibra e do *vial* da amostra. Quanto a  $D_G$ , segundo o modelo semi-empírico de Fuller-Schettler-Giddings (FSG), este pode ser estimado a partir de parâmetros relacionados ao analito e às condições operacionais [50,75]:

$$D_G = \frac{10^{-3} T^{1.75} \sqrt{\left(\frac{1}{M_A} + \frac{1}{M_{air}}\right)}}{P(V_A^{1/3} + V_{air}^{1/3})^2}$$

*Equação 10: Equação do modelo semi-empírico Fuller-Schettler-Giddings (FSG).*

onde  $T$  é a temperatura (K),  $P$  é a pressão (atm),  $M_A$  e  $V_A$  são a massa molar e o volume de difusão molar do analito e  $M_{air}$  e  $V_{air}$  são a massa molar aparente e o volume de difusão molar aparente do ar atmosférico. Os  $V_A$  para o analito podem ser calculados a partir da soma dos volumes de difusão atômica tabelados para cada átomo ou característica estrutural (por exemplo, anéis aromáticos) na fórmula molecular do analito. Portanto, para compostos em uma série homóloga como  $n$ -alcanos,  $D_G$  (assim como  $M_A$ ) é uma função direta do comprimento da cadeia alquílica.

Para  $n$ -alcanos  $C_m H_{2m+2}$ , uma expressão de dependência entre  $D_G$  e  $m$  pôde ser obtido expressando  $M_A$  e  $V_A$  em termos de  $m$  e reescrever a equação do modelo FSG inserindo as fórmulas correspondentes. A equação polinomial complexa resultante obtida será claramente não-linear em termos de  $m$  como pode ser visto na Figura 26 – que mostra um gráfico de  $D_G$  estimados a partir do modelo FSG para  $n$ -alcanos de  $C_1$  a  $C_{50}$  nas condições de extração otimizadas por DD ( $P = 200$  mbar e  $T = 250$  °C). No entanto, na prática, a dependência entre  $D_G$  e  $m$  para hidrocarbonetos mais pesados pode ser considerado aproximadamente linear: a

inserção da Figura 26 mostra  $D_G$  para a faixa de cadeia alquila de  $C_{22}$  a  $C_{31}$  (a mesma da Figura 25) e a reta de regressão mostrada tem um coeficiente de determinação igual a 0,995. Assim, de maneira simplificada, os  $D_G$  podem ser um bom parâmetro para avaliar e prever eficiências relativas de extração em Vac-HSSPME, pelo menos quando se consideram amostras sólidas não aquosas.

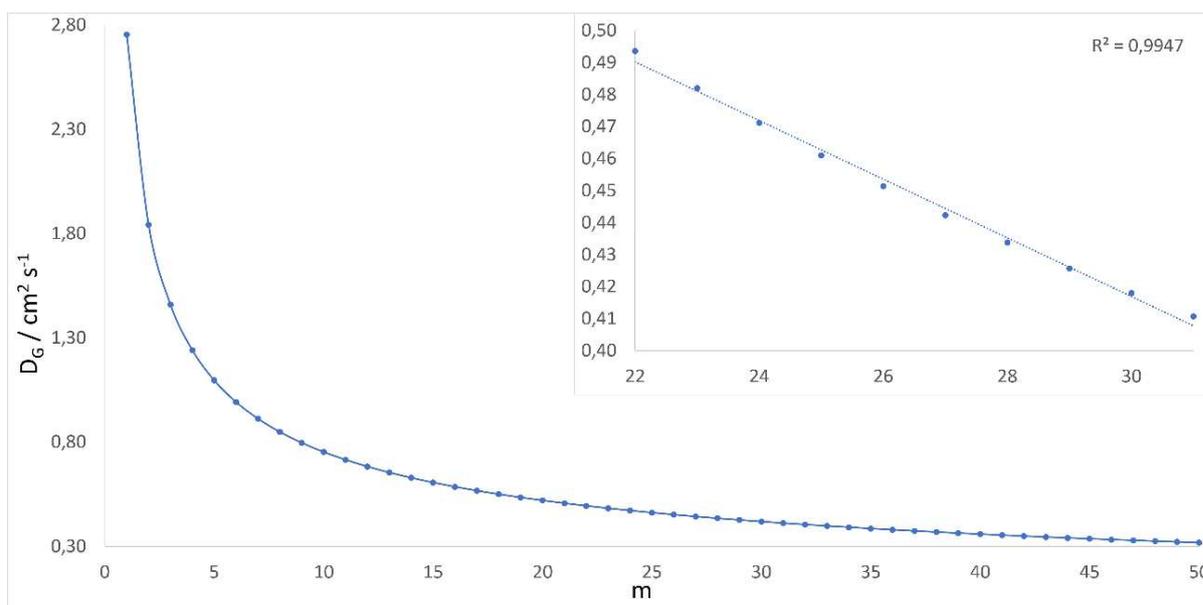


Figura 26: Coeficientes de difusão em fase gasosa ( $D_G$ ) calculados usando o modelo FSG em  $P = 200$  mbar e  $T = 250$  °C para  $n$ -alcanos de ( $C1$ ,  $m = 1$ ) a ( $C50$ ,  $m = 50$ ). A inserção (direita) mostra  $D_G$  para o intervalo entre  $C22$  e  $C31$ . Adaptado de Pollo et. al. [10]

## 2.5 Conclusões

Vac-HSSPME é apresentado como uma alternativa ao procedimento clássico de preparo de amostras baseado na extração de Soxhlet+SARA, que é demorado e requer muitos solventes orgânicos. Esta abordagem mais simples evita muitos erros aleatórios durante operações unitárias, como pesagem, transferência, evaporação de solvente e cromatografia em coluna aberta e muitas outras etapas realizadas no ASTM D4124 ou métodos similares.

O comparativo entre Soxhlet+SARA e Vac-HSSPME forneceu informações sobre aspectos teóricos. Considerando as condições de contorno do modelo, a extração de analitos pode ser descrita principalmente em termos de  $D_G$  com base no modelo FSG para amostras sólidas, não agitadas e não aquosas, como rochas-geradoras de petróleo.

Novos estudos com um maior número de amostras são necessários para melhor avaliação dos parâmetros geoquímicos, visto que o comparativo entre o método de preparo de amostra clássico e Vac-HSSPME demonstraram perfis similares, mas não equivalentes. Assim, pode-se

esperar valores diferentes para as razões geoquímicas calculadas para vac-HSSPME+GC-MS quando comparados ao método Soxhlet+SARA. Espera-se que os métodos quimiométricos de reconhecimento de padrão associados a Vac-HSSPME possam contornar as etapas trabalhosas de cálculo manual de parâmetros e gráficos razão por razão nas etapas finais das análises geoquímicas.

Apesar de estar em seus estágios iniciais, esta nova técnica apresenta grande potencial em análises geoquímicas ou mesmo em análises de outras matrizes complexas com compostos de baixa volatilidade. A linearidade e a sensibilidade demonstraram que a Vac-HSSPME é uma técnica quantitativamente capaz para análises de rochas fonte de petróleo, proporcionando um maior rendimento quando comparado à abordagem Soxhlet + SARA. No entanto, nenhum solvente nocivo foi usado no método Vac-HSSPME, o que deve reduzir custos e danos ambientais em análises petroquímicas ou de sedimentos relacionados.

## 2.6 Métrica AGREEPrep

A métrica é composta por 10 fatores que impactam no *score* do método avaliado com valores na faixa de zero a 1. Para facilitar o uso e comparação, os pesos padrões para os fatores não foram alterados no software [42]. Os fatores e seus respectivos pesos foram compilados na Tabela 4.

Tabela 4: Fatores e pesos de referência utilizados no cálculo da métrica AGREEPrep [42].

<b>Fator</b>	<b>Descrição</b>	<b>Peso</b>
<b>1</b>	Favorecimento de preparo amostral <i>in situ</i>	1
<b>2</b>	Uso de solventes e reagentes mais seguros	5
<b>3</b>	Uso de materiais sustentáveis, renováveis e reutilizáveis	2
<b>4</b>	Minimizar descartes	4
<b>5</b>	Minimizar uso de amostras e quantidade de materiais	2
<b>6</b>	Maximizar o fluxo de amostras ( <i>sample throughput</i> )	3
<b>7</b>	Automação e integração de operações unitárias	2
<b>8</b>	Minimizar consumo energético	4
<b>9</b>	Método de análise verde pós-preparo amostral	2
<b>10</b>	Garantir procedimentos seguros para o operador	3

A Vac-HSSPME apresenta significativa vantagens no preparo amostral sobre o método convencional Soxhlet+SARA. A Tabela 5 apresenta de forma resumida todos os valores considerados na métrica.

Tabela 5: Valores utilizados para o cálculo da métrica AGREEPrep para os métodos baseados em Vac-HSSPME vs. Soxhlet+SARA.

Vac-HSSPME		Soxhlet+SARA
Fator	Valor ou Modo	Valor ou Modo
1	Ex Situ	Ex Situ
2	5 mL solvente/am (DCM limpeza)	600 mL solvente/amostra
3	Todos materiais reutilizáveis	<25 % Materiais reutilizáveis
4	5 mL de descarte	600 mL de descarte
5	0.1 g de amostra	10 g de amostra
6	1 amostra/h	0.1 amostra/h
7	4 passos de prep amostral (Manual)	6/+ passos de prep amostral (Manual)
8	200 Wh	20000 Wh
9	GC-MS	GC-MS
10	1 risco (DCM – limpeza)	4/+ riscos (DCM, Hexano, Pentano, MeOH por longos períodos).

O primeiro fator refere-se ao preparo da amostra no próprio local de amostragem, o que não é o caso para os métodos, sendo ambos *Ex situ*. O segundo fator refere-se à quantidade de solventes nocivos utilizados, no caso de Vac-HSSPME, apenas 5 mL foi utilizado por amostra na limpeza do *vial*. Por outro lado, o método convencional utiliza de mais 600 mL de solvente por amostra, levando em conta todas as etapas de extração e fracionamento. No terceiro fator, a fração de materiais reutilizáveis pode ser considerada total em Vac-HSSPME. O quarto fator é referente ao descarte e considerou-se que todo solvente utilizado teve o descarte com destino.

A quantidade de amostra com Vac-HSSPME foi reduzida significativamente, passando de 10 g no método clássico para 0,1 g. Com a simplificação do preparo amostral, o tempo necessário para o preparo de cada amostra foi melhorado em pelo menos 10 vezes, passando do estimado de uma amostra a cada 10 h para 1 amostra/h. No fator 7, a quantidade de passos necessários para o preparo amostral foi reduzida utilizando Vac-HSSPME. Entretanto, etapas como a moagem não podem ser removidas do procedimento, além de não serem automatizáveis.

Utilizando Vac-HSPPME, o consumo energético estimado corresponde ao uso da chapa de aquecimento na extração. O consumo para o método Soxhlet, por outro lado, é extremamente alto. O valor de 20 kWh parece fora de contexto, no entanto, para este valor estimou-se que uma placa de aquecimento de 1000W foi usada por 72 h a 30 % de sua energia. Também não foi considerado o consumo de energia do exaustor (capela) para evitar vapores de solventes tóxicos ou qualquer outro equipamento. Mesmo que fosse realizada uma análise mais detalhada

do consumo energético do método Soxhlet, isso não teria impacto no *score* final, pois a literatura considera valores  $> 500$  Wh como 0 [42]. No nono fator, ambos os métodos requerem GC-MS para informações moleculares detalhadas que a análise geoquímica exige. Por fim, com Vac-HSSPME, o operador é exposto a risco apenas na etapa de lavagem do *vial* utilizado, que demanda uso de DCM para remoção da MO. Com o método clássico o analista encontra-se o tempo todo exposto à solventes tóxicos, seja durante a extração Soxhlet, precipitação de asfaltenos, ou fracionamento SARA.

Os valores dos diferentes fatores foram adicionados a um software que retorna o gráfico com o *score* e o peso considerado para cada fator. A Figura 27 mostra a comparação entre a extração Vac-HSSPME (esquerda) e o método baseado em Soxhlet (direita). Considerando as cores do diagrama, mostra-se que apenas os fatores 1 e 6 não apresentaram melhora, passando de vermelho para laranja ou verde. Sendo estes relativos à amostragem *Ex situ* e amostras por hora. Ao avaliar fator 2, consumo de solventes, a métrica não é capaz de demonstrar adequadamente a redução de 595 mL de solventes tóxicos. O mesmo vale para a quantidade de amostras que são analisadas em um mesmo período, com uma melhoria de 10 vezes para a extração com Vac-HSSPME no fator 6. Embora o *score* não represente adequadamente algumas melhoras significativas, a técnica Vac-HSSPME aplicada a análise de rochas geradoras pontuou 0,37, enquanto o método clássico pontuou 0,04, representando uma melhoria de 825%.

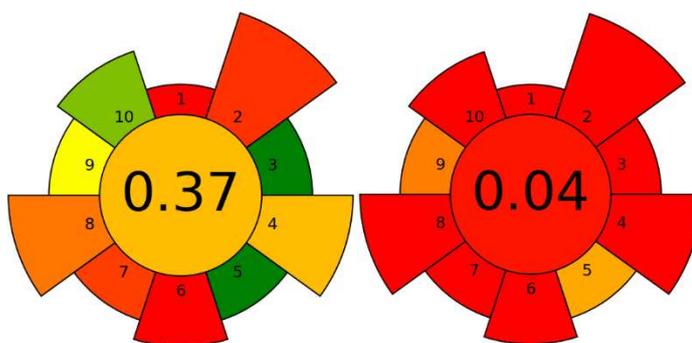


Figura 27: Gráfico AGREEPrep. O centro mostra o *score* final entre 0 e 1. Ao redor estão os fatores, e seu tamanho reflete o peso considerado no cálculo. Vac-HSSPME (esquerda), Soxhlet+SARA (direita).

## **CAPÍTULO 3: EXTRAÇÃO COM ÁGUA QUENTE PRESSURIZADA (PHWE) NA ANÁLISE DE BIOMARCADORES EM ROCHAS GERADORAS DE ÓLEO**

### **3.1 Introdução**

A avaliação dos biomarcadores em amostras de rocha geradora pode trazer informações sobre o ambiente de deposição, migração e correlações rocha-óleo e rocha-rocha [1]. Este processo é realizado pela determinação de parâmetros diagnóstico através da identificação da semi-quantificação dos biomarcadores nos cromatogramas [5,6]. Após identificação, razões entre 2 ou mais picos são utilizadas, ou mesmo gráficos destas razões, para determinação das propriedades da matéria orgânica originária do óleo presente na rocha geradora [2,4,14].

Entretanto, o caminho de preparo amostral que permite que esta análise geoquímica seja feita é bastante trabalhoso e conta com diversas operações unitárias [40]. As etapas necessárias para tornar uma amostra de rocha sedimentar com teor de carbono orgânico abaixo de 1 %, na maioria dos casos, compatível com GC-MS demandam grandes recursos humanos além de utilizar muitos solventes clorados [2,38,39].

A primeira etapa é a de britagem e moagem da rocha geradora, para uniformidade e ganho de área superficial para posterior extração. Nesta etapa, o equipamento utilizado deve ser limpo com acetona após cada amostra para evitar contaminação cruzada, adicionando um tempo significativo ao processo. A etapa seguinte é a de peneiramento, para remoção das inconsistências da moagem. A terceira etapa é a extração em refluxo do tipo Soxhlet. Esta etapa, em particular, apresenta um grande consumo de diclorometano (DCM). Nela a amostra é refluxada por pelo menos 24 h, chegando a 72 h, e, por mais que o sistema de refluxo esteja eficiente, é comum ocorrer a evaporação do solvente, sendo necessária sua reposição. Outro problema comum é a secagem do solvente, causando um sobreaquecimento e possível modificação do extrato. É estimado que o consumo de DCM seja entre 300 e 500 mL por 10 g de amostra de rocha geradora. Após a secagem deste extrato, se obtém um líquido bastante viscoso que passa uma etapa de separação da fração não solúvel em hidrocarbonetos, os chamados asfaltenos. Para tal, são adicionados à 1 g deste extrato 5 mL de n-pentano e centrifugados. O sobrenadante, ou maltenos, é separado e seco sobre leve fluxo de  $N_2(g)$ . O processo é repetido até que o n-pentano saia translúcido. Este malteno, por fim, é fracionado em coluna de sílica em 3 frações com mistura de solventes de diferentes polaridades, onde apenas a fração 1, de hidrocarbonetos saturados, é analisada por GC-MS após diluição adequada [8,10,39].

A extração Soxhlet e outras demais etapas são realizadas com solventes orgânicos, clorados ou não, devido a sua maior afinidade com os compostos de interesse, neste caso, os hidrocarbonetos saturados. Para as demais frações, solventes mais polares são utilizados para seletividade, como o metanol no fracionamento em coluna para obtenção da fração de compostos polares [41]. A aplicação desses solventes apresenta, por outro lado, pontos significativamente negativos, como seu baixíssimo índice verde, risco para o analista devido a sua exposição aos componentes clorados e alto custo operacional, visto que o uso desses compostos ultrapassa o valor de 1 L por amostra [42]. De fato, alternativas que simplifiquem e barateiem a análise de compostos provenientes de rocha geradora são de alto interesse, não apenas financeiro, mas para redução de impacto ambiental das análises em uma indústria que é, na sua essência, poluente [42].

Um solvente extremamente abundante e muito comum é a água. Num primeiro momento, esta não apresenta características interessantes para extração ou atuação como solvente para compostos apolares [55]. Diversas propriedades físico-químicas determinam a característica do solvente e seu comportamento, dentre eles a presença ou não de ligações hidrogênio, tamanho da cadeia carbônica, polarizabilidade entre outros. Para a água, a presença de ligações hidrogênio e permissividade estática ( $\epsilon$ ) acima de 70 são grandes indicativos da baixa afinidade deste solvente para compostos de longa cadeia carbônica à temperatura e pressão ambiente (25 °C ou 298 K e 1 atm) [52,55].

Entretanto, estas propriedades estão ligadas diretamente a temperatura da água e podem ser alteradas de acordo com o interesse do analista, desde que esta esteja sob pressão adequada para manter-se líquida e dentro dos limites seguros de operação do aparato. Por exemplo, a permissividade estática da água em sua temperatura crítica é de 8,63, além de ter sua densidade significativamente reduzida [58]. Ao se observar a Figura 14, verifica-se também que ocorre uma diminuição significativa da capacidade de solubilizar compostos inorgânicos [55]. Desta forma, extração com água quente pressurizada (PHWE) pode ser uma alternativa mais barata e de menor impacto para extração de compostos apolares e pouco polares.

Durante a extração, diversos parâmetros podem ser otimizados, como temperatura de extração, pressão da água, tipo da extração (dinâmica ou estática) e a razão fluído/amostra (mL/g) [76]. Com muitos parâmetros, o número de experimentos necessários para avaliação das variáveis em um planejamento experimental clássico, como o fatorial, pode ultrapassar a casa das centenas. Portanto, um planejamento otimizado, que avalie as variáveis em diferentes

níveis, pode ser interessante. Neste caso, o planejamento Doehlert apresenta essas características e permite a avaliação de maneira dinâmica, com diferentes níveis para cada variável [66,67].

A extração com fluido pressurizado visa contornar as etapas associadas a remoção dos compostos de interesse da matriz. Entretanto, a depender da quantidade de solvente utilizada ou massa de amostra, a concentração destes compostos pode se encontrar muito baixa. Desta forma, o uso das microextração em fase sólida (SPME) como meio concentrador destes compostos contornaria uma possível etapa de troca de solvente para compatibilidade com o GC-MS. A técnica apresenta propriedades que fizeram com se ela fosse amplamente difundida na comunidade científica desde sua comercialização nos anos 90 [47].

Sendo o extrato obtido por PHWE livre de particulados, a SPME pode ser realizada por imersão direta e, sendo a fase extratora voltada a extração de compostos apolares, como a PDMS, espera-se um enriquecimento significativo destes compostos na fase [43,44]. Apesar disso, caso a presença dos biomarcadores seja ainda baixa, principalmente limitada pelas condições de extração, técnicas de separação avançadas e de alta sensibilidade podem ser utilizadas para detecção destes compostos em nível traço.

Neste contexto, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) apresenta-se como a alternativa de maior desempenho a cromatografia convencional [77–79]. Em termos simples, o processo de separação ocorre em 2 etapas [78,80,81]. A primeira etapa é convencionalmente realizada em coluna de caráter apolar e ela se obteria um perfil cromatográfico convencional. Entretanto, na saída desta coluna há uma interface chamada modulador, esta possui a função de reconcentrar os picos eluidos da primeira coluna e reinjetá-los de maneira rápida e padronizada na segunda coluna [79].

A segunda coluna de separação é significativamente mais curta que a primeira, de caráter polar, promovendo separações em poucos segundos [79]. Desta forma, o eluente da primeira coluna é reinjetado na segunda coluna a cada 6 s ou menos e, após um processamento computadorizado, pode-se obter um perfil cromatográfico em um espaço tridimensional, composto de tempo de retenção na primeira dimensão ( $tr_1$ ),  $tr_2$  e intensidade [81,82]. Pela característica complementar das colunas cromatográficas, a GCxGC é capaz de resolver as chamadas misturas complexas não-resolvidas (UCM), estas que são bastante comuns em análises petroquímicas [83–85]. Essas UCMs são compostas de picos coeluidos, isômeros ou não, causando um grande desnível de linha base no cromatograma e dificultando a identificação

por espectrometria de massas pela mistura dos espectros. A Figura 28 apresenta o processo de modulação para separação no espaço cromatográfico de 2 picos que coeluem.

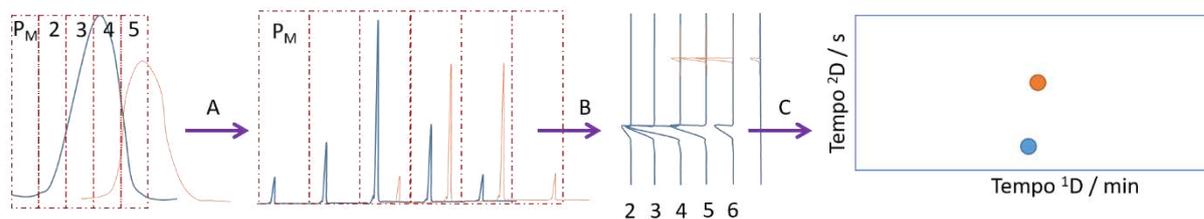


Figura 28: (A): 2 picos coeluentes sendo separados em um espaço de 6 modulações. (B): desdobramento dos dados do detector (vetor) para forma de matriz. (C): visualização dos dados na forma de espaço cromatográfico contendo os 2 tempos de retenção e separação dos picos que antes coeluíam. Adaptado e modificado de Pollo et. al. e Pollo et. al. [19,86]

Os experimentos que se seguem visam avaliar a aplicabilidade de PHWE e SPME como alternativa ao método convencional (Soxhlet + SARA) para a detecção de biomarcadores provenientes de rochas geradoras de óleo. Para separação cromatográfica, o uso de GC×GC-MS vem como alternativa de maior sensibilidade a GC convencional, a fim de contornar possíveis perdas de sensibilidade e baixa concentração destes compostos nos extratos finais. Por fim, o procedimento avaliado apresenta maior alinhamento com os princípios de Química Analítica Verde (GAC), diferentemente do método convencional.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Procedimento Clássico (SARA)

Como adotado no item 2.2.1.

### 3.2.2 Amostras

Como adotado no item 2.2.2, mas com TOC estimado de 5,0 %.

### 3.2.3 Sistema PHWE

O aparato consiste em coluna de 15 cm x 1/4 de polegada de diâmetro em aço-inox acoplada dentro de estufa para aquecimento. O interior da coluna foi recheado com 1,3 g de amostra de rocha contendo cerca de 5% em carbono orgânico total (TOC) de granulometria < 75 µm. Nas pontas da coluna foram adicionadas lã de vidro compactada para evitar que o conteúdo da coluna fosse arrastado pela vazão aplicada ou o mesmo retornasse e contaminasse a bomba seringa. A coluna foi montada em estufa cuja capacidade máxima de aquecimento era 200 °C. A pressurização do sistema foi feita gradualmente por bomba do tipo seringa em modo pressão constante.

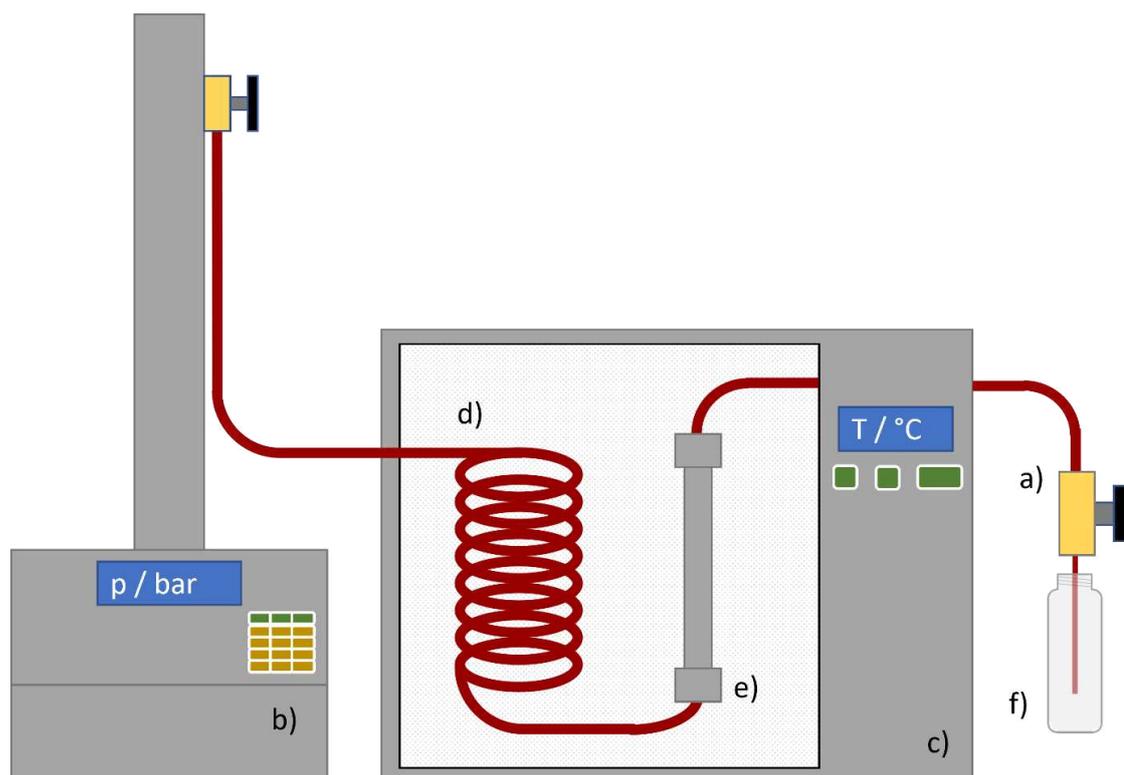


Figura 29: Sistema de extração com água pressurizada não comercial. (a), válvula micrométrica para controle preciso da pressão na saída do sistema; (b), bomba-seringa; (c), estufa para aquecimento do sistema; (d), serpentina de troca de calor para pré-aquecimento da água; (e), coluna extratora. (f), frasco coletor.

### 3.2.4 Cromatografia a gás com detecção espectrométrica de massas (GC-MS)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC2010 acoplado ao espectrômetro de massas TQ8030 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A temperatura do injetor foi ajustada para 280°C, modo *split* 1:1. A coluna utilizada foi a SLB-5MS (30 m × 0,25 mm-I.D. × 0,25 μm). H<sub>2(g)</sub> foi utilizado como gás de arraste com vazão constante a 1,3 mL/min. O forno do GC foi programado de 70 °C (por 2 minutos) até 300 °C a 4 °C/min (por 30 minutos no final). A taxa de aquisição foi aplicada para as amostras usando o modo SCAN de 50 a 600 Da a 10 Hz. A interface entre o GC e o MS foi ajustada para 200 °C, enquanto a fonte de íons estava a 250 °C. Análises de espectro de massa e integração de picos foram realizadas no software Shimadzu Postrun analysis v. 4.52.

### 3.3 Testes exploratórios 1: Modo dinâmico em extrator *lab-made*

Como etapa preliminar de avaliação das condições de extração e comportamento do sistema, foram realizados testes em temperatura e pressões reportadas na literatura [87,88]. A

extração ocorreu em modo dinâmico com 0,5 mL/min de fluxo utilizando água destilada, 80 bar e 200 °C.

### 3.3.1 Resultados testes exploratórios 1

Durante o procedimento houve compactação do leito, gerando alta restrição ao fluxo. Com isso, a pressão do sistema foi aumentada para forçar o fluxo e essa foi estabilizada a 110 bar com fluxo de apenas 0,2 mL/min provavelmente devido ao diâmetro de partícula inferior à 75 µm. O volume de água (mL) por massa (g) de amostra foi de cerca de 50:1. Dessa forma, a extração foi realizada a uma vazão inferior ao planejado inicialmente, o que pode apresentar um efeito positivo na transferência dos analitos da amostra para o solvente extrator. Isto considerado, procedeu-se com a análise do extrato por cromatografia.

O extrato aquoso é incompatível com a cromatografia a gás. Para análise do extrato optou-se pela concentração dos possíveis compostos orgânicos presentes através da microextração em fase sólida (SPME). Para tal, utilizou-se 20 mL do extrato obtido, sendo este acondicionado em vial de 22 mL, agitado a 500 rpm e aquecido a 60 °C. A fibra de SPME do tipo PDMS 100 µm foi exposta por imersão direta para extração por 30 minutos, sendo recolhida e exposta ao injetor do GC-MS para análise.

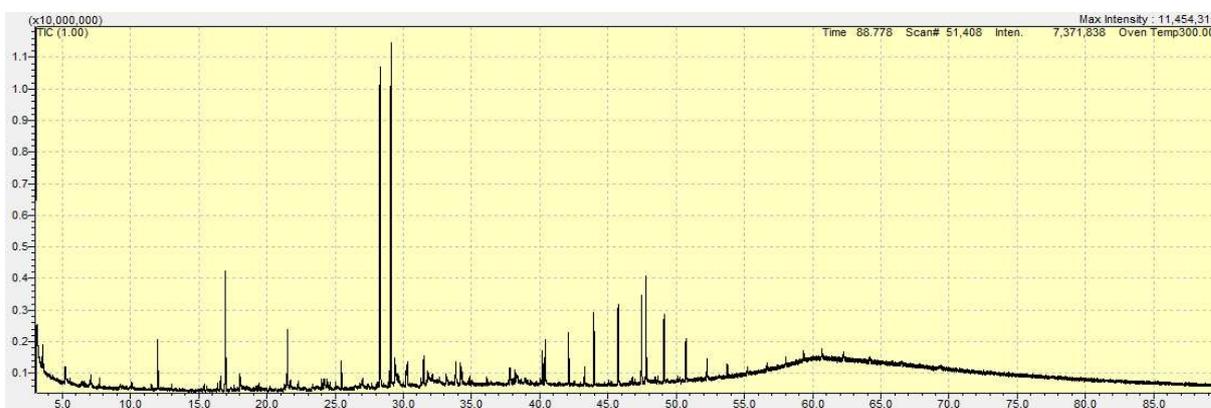


Figura 30: Cromatograma SCAN de extrato PHWE à 200 °C em estufa.

Na Figura 30 observa-se que há presença de compostos de baixa massa molar e até maiores massas, estes eluindo em temperaturas próximas à 300 °C (em tempos de retenção acima de 50 min). Quando comparado ao cromatograma de extrato obtido pelo método convencional Figura 31, pode-se verificar presença de compostos em menor abundância e em diferentes concentrações.

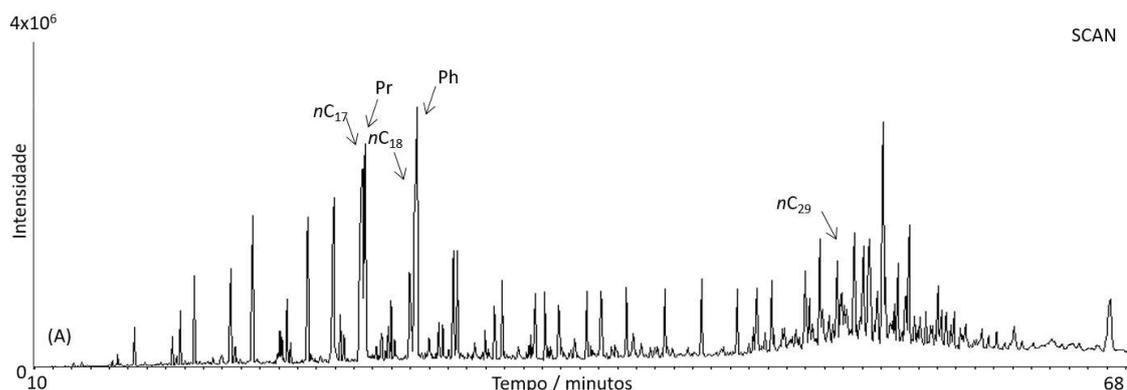


Figura 31: Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS para amostra de óleo extraído de rocha geradora.

De fato, os cromatogramas não são comparáveis. A Figura 31 é um representativo típico de um perfil cromatográfico para amostras de rocha geradora de óleo e nem é possível constatar a presença de pares críticos: alcano linear de 17 carbonos (nC17) justo ao isoprenoide pristano (Pr) e nC18 com o isoprenoide fitano (Ph) com cerca de 27 e 30 minutos de separação cromatográfica, respectivamente. O mesmo perfil de pares críticos não é encontrado Figura 30. De fato, há 2 picos intensos na mesma região, mas estes não representam os mesmos compostos visto que os tempos de retenção relativos são distintos.

Outra região de interesse em cromatogramas de amostras de rochas geradoras é compreendida entre 45 e 60 minutos, aproximadamente. Na Figura 31, esta região é caracterizada por um desnível de linha base, e o alcano linear de 29 carbonos (nC<sub>29</sub>) é apontado. Este desnível é devido a grande concentração e coeluição de compostos de diferentes classes, entre eles os biomarcadores da classe dos esteranos 217 Da e terpanos pentacíclicos 191 Da. Novamente, o mesmo perfil não é observado na amostra extraída com água pressurizada na Figura 30, onde são verificados picos esparsos, característicos de uma série homóloga, mas sem informação geoquímica.

### 3.4 Testes exploratórios 2: esferas de vidro

Diante da compactação do leito pela utilização da amostra de fina granulometria, testes utilizando esferas de vidro misturadas à amostra foram realizados. As esferas possuíam diâmetro inferior a 0,25 mm, sendo previamente lavadas com etanol e secas em estufa a 60 °C por 8 h. Inicialmente foi utilizado proporção 3:1 esferas/amostra buscando melhor fluxo e estabilidade do sistema no momento da extração. A massa final utilizada foi de aproximadamente 2 g. Desta forma, foi utilizado cerca de 500 mg de amostra e cerca de 1,5 g

esferas de vidro no interior da coluna. As demais condições de extração foram as mesmas, exceto a temperatura. Para este experimento, foi utilizada uma estufa de maior temperatura e a extração foi realizada a 300 °C para aproveitamento de um ( $\epsilon$ ) mais reduzido.

### 3.4.1 Resultados testes exploratórios 2

O conteúdo da coluna apresentou-se bastante rígido e de difícil remoção após a extração. O fluxo não foi interrompido como no uso apenas de amostra. Entretanto, a dificuldade de limpeza da coluna impossibilitaria o uso do processo como rotina na análise de amostras petroquímicas. Para tal, foi necessário o uso de bastante força, para raspagem do conteúdo com uma haste rígida de aço inox. Não apenas, a haste foi adaptada em uma furadeira para acelerar o processo de limpeza que foi muito laborioso.

Na tentativa de contornar o problema de compactação e limpeza do leito pós extração, outras proporções esferas de vidro/amostra foram testadas e a água destilada foi substituída por água deionizada. A proporção de esferas/amostra 5:1 (massa total de 1,3 g) apresentou melhor condição de limpeza da coluna de extração e fluxos constantes durante o processo de extração.

### 3.5 Planejamento Doehlert

Para realização desta etapa, a segunda estufa foi substituída por um forno de cromatógrafo que se mostrou disponível. Com a mudança, alguns ganhos consideráveis de performance podem ser citados, entre eles o equilíbrio mais rápido da temperatura: com o forno do cromatógrafo a convecção é intensa e a precisão da temperatura na casa dos decimais; resfriamento rápido: o mesmo ventilador que realiza a convecção no momento do aquecimento é o que resfria o sistema. Dessa forma, a troca de coluna pode ser realizada de maneira muito mais rápida.

Realizou-se o planejamento Doehlert utilizando a proporção esferas/amostras avaliadas anteriormente (5:1). No planejamento foram testadas 3 variáveis: pressão do sistema, temperatura de extração e fluxo de extração. A temperatura de extração foi testada em 7 níveis, fluxo da extração em 5 e a pressão utilizada em 3 níveis. Entretanto, a pressão de vapor é dependente da temperatura e pontos fixos não poderiam ser escolhidos para o planejamento. Assim, as condições de pressão testadas foram 110, 150 e 190% da pressão de vapor da água na temperatura do experimento realizado. Com isso, pontos virtualmente fixos foram criados para realização e cumprimento das condições do planejamento Doehlert. A Tabela 6 mostra as condições realizadas no planejamento e a Tabela 7 mostra a pressão de vapor da água em cada temperatura, bem como seus valores a 110, 150 e 190% da pressão de vapor.

Tabela 6: Condições experimentais avaliados no planejamento Doehlert de 3 variáveis. (A) corresponde ao fluxo testado, (B) = temperatura e (C) = porcentagem da pressão de vapor na temperatura do modelo. Pc indica os pontos centrais do sistema. "Ordem" indica a sequência de execução das extrações.

Doehlert		(mL/min)	(°C)		(bar)
Modelo	Ordem	A	B	C	P real
1 Pc	7	1.5	275	150	90
2 Pc	6	1.5	275	150	90
3 Pc	14	1.5	275	150	90
4 Pc	8	1.5	275	150	90
5 Pc	13	1.5	275	150	90
6	5	2.5	275	150	90
7	15	2.0	350	150	255
8	17	2.0	300	190	171
9	9	0.5	275	150	90
10	12	1.0	200	150	24
11	16	1.0	250	110	45.1
12	1	2.0	200	150	24
13	10	2.0	250	110	45.1
14	3	1.0	350	150	255
15	2	1.5	325	110	134.2
16	4	1.0	300	190	171
17	11	1.5	225	190	49.4

Tabela 7: Condições de pressão para a água a 110, 150 e 190% da pressão de vapor (Pv) em diferentes temperaturas.

Temperatura	P <sub>v</sub>	110%	150%	190%
200	16	17.6	24	30.4
225	26	28.6	39	49.4
250	41	45.1	61.5	77.9
275	60	66	90	114
300	90	99	135	171
325	122	134.2	183	231.8
350	170	187	255	323

Todos os experimentos foram realizados eluindo 70 mL de água para cerca de 1,3 g da mistura esfera/amostra 5:1. Sendo cerca de 220 mg de amostra para cada extração, a proporção água/amostra foi cerca de 320:1. Os extratos foram armazenados em geladeira em frascos âmbar vedados de 100 mL.

### 3.5.1 Resultados planejamento Doehlert

Neste momento, a pandemia da covid fechou as portas da universidade por um longo período. Como os extratos obtidos eram aquosos, estes acabaram fungando, mesmo em geladeira, e os experimentos realizados no planejamento foram perdidos sem a possibilidade de avaliação cromatográfica dos resultados para obtenção da condição ótima de extração.

Entretanto, nos testes realizados, exploratórios e com esferas de vidro, foi possível avaliar limitações do sistema em torno da granulometria das amostras pela alta compactação do leite e tendência das partículas em se agregarem pela natureza apolar de seus compostos. A otimização dos experimentos com DoE Doehlert não mostrou limitações dentro das faixas de fluxo, temperatura e pressões utilizadas. Foi verificado também que a proporção 320:1 de fluido extrator/amostra era muito diluída.

### **3.6 Planejamento Doehlert: segunda avaliação e seus resultados**

Foram refeitas todas as extrações do planejamento durante a fase 3 do plano de retomada de atividades, quando a universidade reabriu as portas com rígidas medidas de segurança. As condições de extração foram citadas na Tabela 6 e Tabela 7. A única diferença entre as extrações anteriores e a esta foi o volume de água utilizado. Anteriormente eram utilizados 70 mL de água, nesse novo procedimento foram utilizados apenas 35 mL, pois foi constatado que as amostras estavam bastante diluídas. A razão esferas de vidro/amostra foi a mesma de 5:1.

#### **3.6.1 Seleção da fibra de microextração em fase sólida**

Considerando a incompatibilidade do extrato aquoso com GC, a seleção da fibra de SPME foi o primeiro passo tomado após a conclusão do planejamento fatorial para avaliação de fato desses extratos. A quantidade de analitos extraídos e diferentes classes de compostos podem ser favorecidas ou não dependendo da natureza da fibra extratora. Dessa forma, 3 fibras comercialmente disponíveis foram testadas: Polidimetilsiloxano de 7  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$  (PDMS 7 e PDMS 100) e a fibra DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  StableFlex 2cm (TRIPLA). As análises foram feitas em GC-MS para avaliação do total de picos presentes nas condições citadas no tópico 3.2.4, utilizando, porém, uma taxa de aquecimento mais elevada para separações mais rápidas. A amostra utilizada para realização dos testes foi a amostra #15, de coloração mais intensa. Os cromatogramas resultantes da imersão direta das diferentes fibras são apresentados na Figura 32.

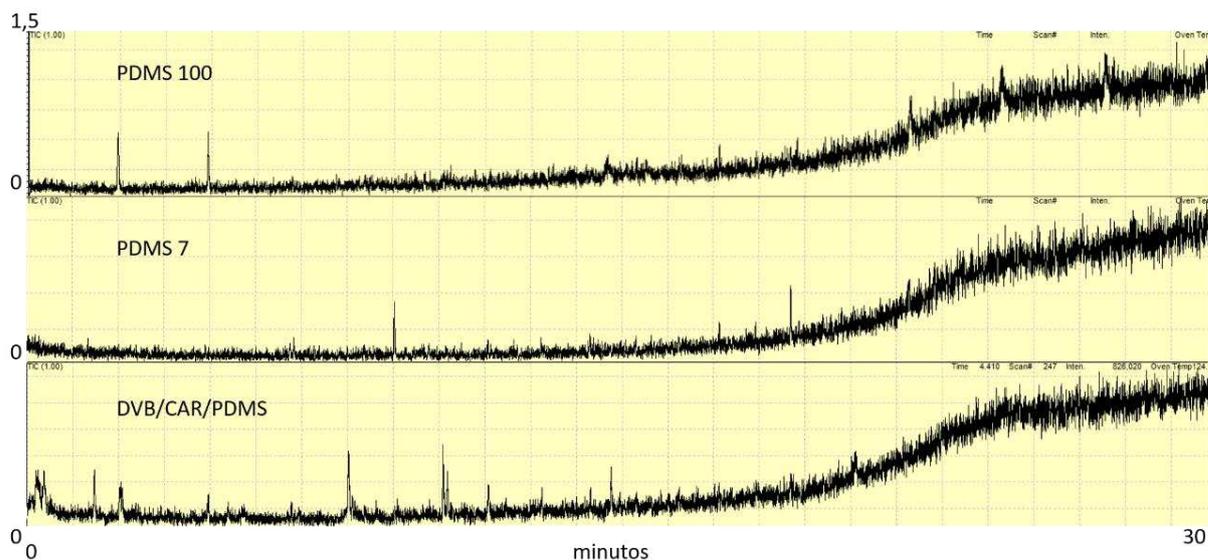


Figura 32: Cromatogramas obtidos para as 3 fibras testadas.

Apesar da baixa abundância de picos, a fibra tripla apresentou a maior quantidade de área total. Considerando esta baixa abundância de picos presentes, pode-se sugerir que os compostos em solução se encontravam em baixíssima concentração. Desta forma, a fim de contornar esta limitação, foi utilizada a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) na busca de maior sensibilidade.

### 3.6.2 Cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas: GC×GC-MS

O cromatógrafo utilizado era do modelo Thermo TRACE 1600 com modulador GC×GC *in house* e detector MS modelo ISQ. O modulador era um modelo de fluxo e o período de modulação  $P_M$  utilizado foi de 6 s. A varredura do detector foi de 50 a 450 m/z com taxa de aquisição de 15 Hz. As condições para SPME foram as mesmas da etapa de avaliação da fibra, mas foi realizada de modo automático no injetor TriPlus®.

A modulação do fluxo foi realizada usando dois divisores GC de três portas SilFlow (Trajan Scientific and Medical – Melbourne, Austrália) para o modo de operação FFF (*forward fill/flush*). Um divisor GC de três portas e um divisor de quatro portas foram usados para o modo de operação RFF (*reverse fill/flush*). Uma alça de amostragem de 50  $\mu$ l compreendendo uma coluna de proteção desativada MXT de 23 cm  $\times$  0,53 mm-id (Restek Corporation – Bellefonte, PA, EUA) foi usada para modulação do fluxo. Uma válvula de isolamento de diafragma miniatura de três vias (Parker Hannifin – Cleveland, Ohio, EUA) foi usada para acionar o gás auxiliar durante a modulação do fluxo. Uma placa microcontroladora Arduino

(Arduino – Ivrea, Itália), fonte de alimentação de 12 V e uma válvula solenóide de estado sólido foram usadas para controlar a interface GC × GC e sincronizar a execução do GC.

Um set de coluna polar média × não polar foi usada em todos os experimentos. Foram utilizadas como colunas primária e secundária uma coluna primária e secundária de 5 m × 0,25 mm-id (0,25 µm de espessura de filme) DB-17 MS (poli(difenildimetilsiloxano) com incorporação de monômero de difenilsiloxano a 5 m × 0,25 mm-id (espessura de filme de 0,25 µm) DB-1 MS (100% poli(dimetilsiloxano)] (Agilent Technologies – Wilmington, DE, EUA). No modo RFF, foram avaliados três capilares restritores, 5 m × 0,10 mm-id, 2 m × 0,10 mm-id e 1 m × 0,10 mm-id. A vazão do gás auxiliar foi ajustada para evitar a divisão da banda entre 2D e capilar de sangria. As taxas de fluxo otimizadas de gás auxiliar foram 5,5 mL min<sup>-1</sup> (FFF), 39,5 mL min<sup>-1</sup> (RFF com restritor de 5 m × 0,10 mm-id), 17,0 mL min<sup>-1</sup> (RFF com restritor de 2 m × 0,10 mm-id) e 10,5 mL min<sup>-1</sup> (RFF com restritor de 1 m × 0,10 mm-id).

Os dados obtidos no cromatógrafo foram exportados do software Xcalibur® no formato .CDF para posterior avaliação pelo software GC-Image (GC Image, LLC; Lincoln, Nebraska, EUA). Todos os cromatogramas foram submetidos à mesma escala de cor. A Figura 33 apresenta do cromatograma com a maior presença de compostos.

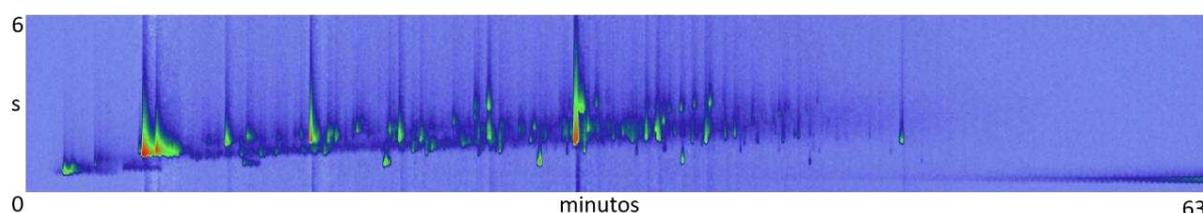


Figura 33: Cromatograma bidimensional abrangente da amostra 14.

Observando a Figura 33 é evidente o ganho de sensibilidade da GC×GC comparando-a à GC na Figura 32. Com a cromatografia bidimensional se verifica a presença de inúmeros compostos presentes pela melhoria significativa na relação S/N, inerente à técnica. Dentre os 17 experimentos realizados, os pontos do modelo 5, 7 e 9 apresentaram problemas durante a execução. Assim, esses pontos não foram considerados na avaliação do modelo. Os experimentos podem ser verificados na Tabela 9. O ponto 5 apresentou vazamento na rosca entre a coluna e a alimentação; o ponto 7 apresentou vazamento após o recolhimento de 12 mL e, por fim, o ponto 9 apresentou entupimento não sendo possível o recolhimento do extrato. Acredita-se que isto tenha ocorrido devido a baixíssima granulometria das partículas utilizadas,

onde a baixa vazão de 0,5 mL/min não tenha sido suficiente para vencer a queda de pressão e promover o fluxo da água pela mistura amostra/vidro para a amostra 9.

Para o extrato mais abundante, no caso, a amostra 14 representada na Figura 33, foram avaliados os espectros de massas para os picos presentes. A Tabela 8 apresenta alguns compostos detectados, *match* (similaridade) e seus respectivos tempos de retenção na primeira e segunda dimensões de separação.

Tabela 8: Compostos detectados e identificados via MS, seus respectivos matches e tempos de retenção em ambas as dimensões de separação.

<b>Composto</b>	<b>Match</b>	<b>Tr1 / min</b>	<b>Tr2 / s</b>
<i>2-etil-oxietano</i>	797	4,23	0,80
<i>1,3-dimetil-benzeno</i>	907	8,33	1,40
<i>1,2,4-trimetil-benzeno</i>	805	12,60	1,77
<i>1,2,3-trimetil-benzeno</i>	729	13,64	1,94
<i>Trans-2-undecen-1-ol</i>	763	16,87	1,90
<i>p-cimeno</i>	710	17,91	2,06
<i>1,2,3,4-tetrametil-5-metileno-1,3-ciclopentadieno</i>	782	19,34	2,19
<i>1-metil-naftaleno</i>	813	26,05	2,98
<i>2-hexil-1-octanol</i>	738	26,67	1,55
<i>6,10-dimetil-2-undecanona</i>	818	30,52	1,88
<i>1,7-dimetil-naftaleno</i>	862	30,87	2,95
<i>3-(2-metil-propenil)-1H-indeno</i>	773	35,41	2,87

Os compostos apresentados são, em sua grande maioria, da classe dos aromáticos ou cíclicos, devido ao deslocamento na segunda dimensão de separação (coluna Tr2) característico de compostos polarizáveis. No sistema de separação utilizado, a segunda dimensão de separação era de caráter mais polar, enquanto a primeira dimensão, mais apolar. A estrutura do cromatograma sugere, portanto, que os compostos presentes nos extratos sejam em sua maioria dessas classes. Dessa forma, 91 Da, fragmento característico da classe dos aromáticos, foi escolhido como o íon resposta para o modelo para avaliação com o menor número possível de interferentes. A Tabela 9 apresenta a construção da matriz do modelo e seus respectivos volumes de picos.

Tabela 9: Matriz do planejamento experimental Doehlert seguida dos valores de áreas dos picos para 91 Da. NaN é a abreviação de “Not a Number”.

Modelo	Ordem	Vazão/ mL/min	Temperatura/ °C	Pressão Virtual	Pressão/ bar	91 Da / volume
1	7	1,5	275	150	90	1,7x10 <sup>8</sup>
2	6	1,5	275	150	90	6,8x10 <sup>7</sup>
3	14	1,5	275	150	90	1,9x10 <sup>8</sup>
4	8	1,5	275	150	90	1,4x10 <sup>8</sup>
5	13	1,5	275	150	90	NaN
6	5	2,5	275	150	90	5,9x10 <sup>7</sup>
7	15	2,0	350	150	255	NaN
8	17	2,0	300	190	171	5,5x10 <sup>7</sup>
9	9	0,5	275	150	90	NaN
10	12	1,0	200	150	24	1,0x10 <sup>8</sup>
11	16	1,0	250	110	45	1,3x10 <sup>8</sup>
12	1	2,0	200	150	24	1,1x10 <sup>8</sup>
13	10	2,0	250	110	45	4,0x10 <sup>7</sup>
14	3	1,0	350	150	255	7,8x10 <sup>7</sup>
15	2	1,5	325	110	134	6,9x10 <sup>7</sup>
16	4	1,0	300	190	171	7,2x10 <sup>7</sup>
17	11	1,5	225	190	49	6,3x10 <sup>6</sup>

### 3.6.3 Regressão

A partir da Tabela 9 foi feita a regressão para avaliação do ponto ótimo de extração utilizando o MATLAB 2014-A (Natick, MA, EUA). A função utilizada foi a “regstats”, que permite regressão de modo linear, quadrático ou puramente quadrático, onde os coeficientes de interação são desconsiderados.

A abordagem primeiramente testada foi a quadrática, para investigação de todos os efeitos envolvidos. A regressão nesse modo não apresentou um p-valor para o F de significância do modelo menor do que 0,05 com 95% de confiança. Dessa forma, o modelo não pode ser considerado significativo, mesmo sem amostras anômalas nos resíduos padronizados e coeficiente de determinação  $r^2 = 0,85$ . Entretanto, ao aplicar a regressão puramente quadrática, o modelo passou a ser significativo com um p-valor para o teste F = 0,04. A hipótese nula ( $H_0$ ) para o teste F de falta de ajuste postula que o modelo seja adequado. Como o valor calculado para F é menor que F tabelado,  $H_0$  não pode ser rejeitada e, portanto, não há evidência de falta de ajuste para o modelo aplicado. A Tabela 10 apresenta todos os termos calculados do teste F. A Figura 34 apresenta o gráfico para os resíduos padronizados das amostras.

Tabela 10: Tabela ANOVA.

Fonte	Graus Liberdade	Soma dos quadrados (SQ)	Média SQ	Teste F	P valor
<b>Regressão</b>	6	$5,6 \times 10^{16}$	$9,3 \times 10^{15}$	4,25	0,04
<b>Erro</b>	7	$1,5 \times 10^{16}$	$2,1 \times 10^{15}$		
<b>Total</b>	13	$7,1 \times 10^{16}$		<b>Teste F</b>	<b>F<sub>4,3 tab</sub></b>
<b>Falta de ajuste</b>	4	$2,6 \times 10^9$	$6,5 \times 10^8$	$5,0 \times 10^{-7}$	9,12
<b>Erro puro</b>	3	$1,5 \times 10^{16}$	$5,0 \times 10^{15}$		

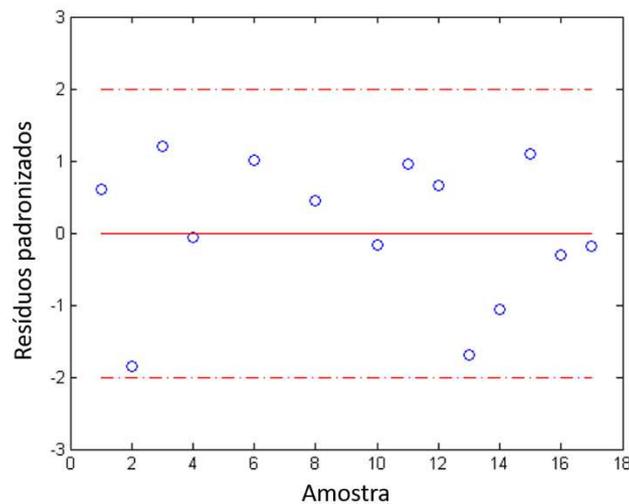


Figura 34: Resíduos padronizados para cada amostra. Linha tracejada indica os limites a 95% de confiança.

Por fim, o teste T foi aplicado para avaliação da significância de cada termo para a regressão. A Tabela 11 apresenta o p-valor de cada termo da equação de regressão, sendo x1 a vazão, x2 a temperatura e x3 a pressão.

Tabela 11: P-valor do teste T para cada termo da equação da regressão para o planejamento Doehlert puramente quadrático.

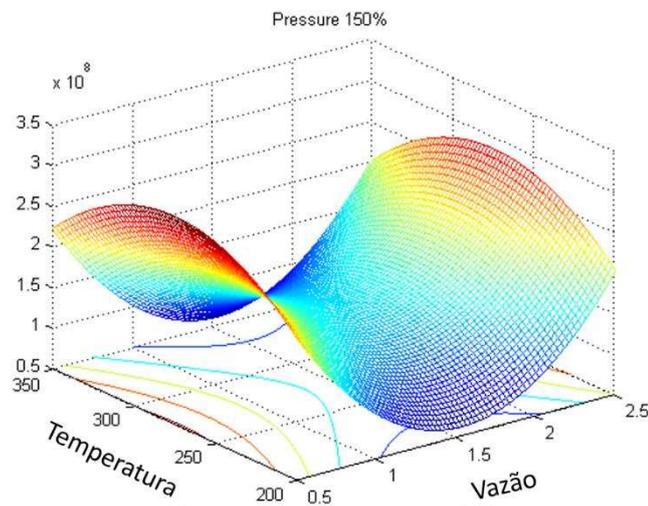
Valor	Termo	P valor
$-1,7 \times 10^9$	Constante	0,032
$-4,7 \times 10^8$	X1 (vazão)	0,046
$+8,1 \times 10^6$	X2 (temperatura)	0,053
$+1,5 \times 10^7$	X3 (pressão)	0,020
$+1,5 \times 10^8$	X1 <sup>2</sup>	0,033
$-1,5 \times 10^4$	X2 <sup>2</sup>	0,057
$-5,1 \times 10^4$	X3 <sup>2</sup>	0,018

Nenhum dos termos foi excluído da equação de regressão, visto que não diferem significativamente do p-valor = 0,05. A Equação 11 descreve a regressão para o modelo Doehlert 3 variáveis aplicado à extração com água quente pressurizada.

$$\text{Volume} = -1,7 \times 10^9 - 4,7 \times 10^8 X_1 + 8,1 \times 10^6 X_2 + 1,5 \times 10^7 X_3 + 1,5 \times 10^8 X_1^2 - 1,5 \times 10^4 X_2^2 + 5,1 \times 10^4 X_3^2$$

*Equação 11: Regressão do modelo Doehlert 3 variáveis.*

Sendo 3 variáveis totais, uma delas deve ser fixa para então avaliação das demais numa superfície de resposta. A Figura 35 apresenta a superfície de resposta à pressão fixa de 150 % da Pv da água. Para os 3 níveis de pressão a superfície é semelhante, mas à 150 % obtém-se os maiores valores para o volume de picos.



*Figura 35: Superfície de resposta à pressão fixa de 150 %.*

A superfície sugere que as melhores condições de extração se encontram nos extremos da vazão, mais especificamente à 0,5 e 2,5 mL/min. Quanto à temperatura, é sugerido que a extração seja realizada à 275 °C. A regressão sugere que a vazão de 1,5 mL/min e os extremos de temperatura, 200 e 350 °C, não são adequados à extração de compostos que contenham a 91 Da. A análise da relação vazão e pressão na Figura 36 sustenta as sugestões apontadas a partir da Figura 35. Apenas a temperatura fixa de 275 °C será apresentada, pois possui o maior valor para o volume de picos.

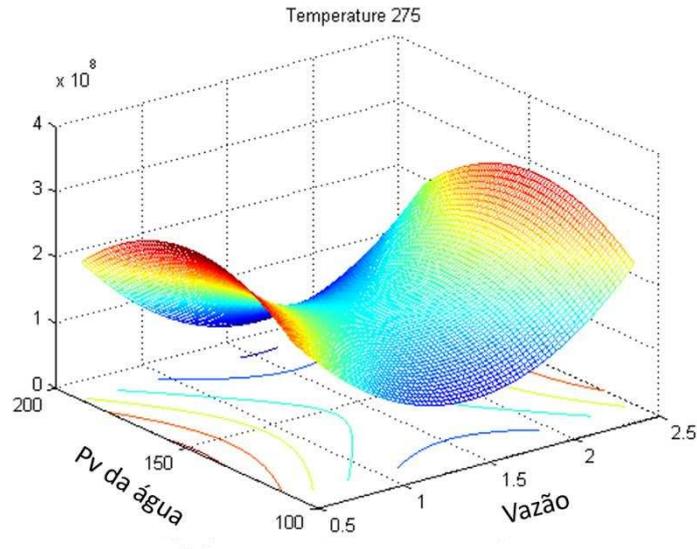


Figura 36: Superfície de resposta à temperatura fixa de 275 °C.

A superfície da Figura 36 apresenta como sugestão o máximo volume de picos à 150 % Pv e vazões de 0,5 mL/min ou 2,5 mL/min. Por fim, resta a avaliação da vazão. Como as sugestões das demais variáveis apontam para ótimos em 0,5 ou 2,5 mL/min e é de interesse do analista extrações mais rápidas, 2,5 mL/min foi escolhida como o ideal para os compostos aromáticos. Não apenas, a vazão de 0,5 mL/min apresentou problemas durante a execução dos experimentos, mais especificamente no ponto 09, e a avaliação de todas as superfícies com vazão fixa mostrou que o máximo ocorre em 275 °C, apresentado na Figura 37.

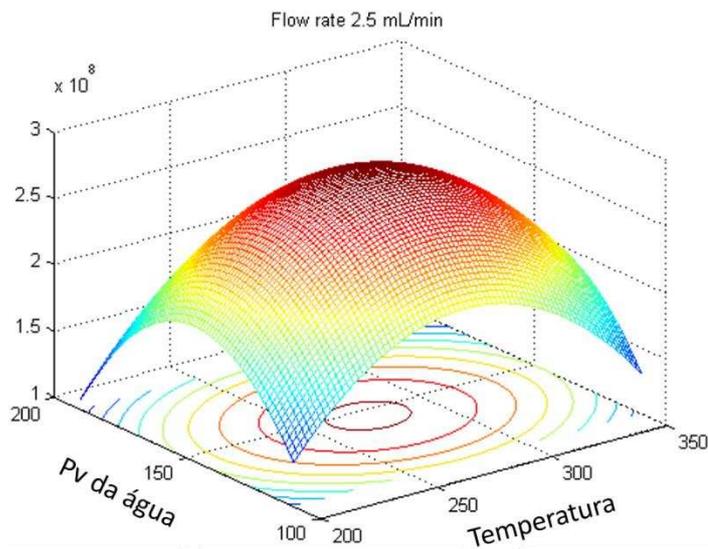


Figura 37: Superfície de resposta à vazão fixa de 2,5 mL/min.

A Figura 37 demonstra um ponto de máximo, que é considerado um ótimo resultante de um processo de otimização para maximização de uma resposta. A não presença desse ponto no

sistema sugeriria que os fatores avaliados podem estar numa faixa inadequada aos compostos de interesse e replanejamento ou expansão do planejamento é necessária. No Doehlert de 3 variáveis aplicado à extração com água quente pressurizada, pode se sugerir que as variáveis estavam adequadas para a extração de hidrocarbonetos aromáticos. Mesmo que o máximo apresentado na Figura 37 seja questionado como um máximo local, as condições experimentais operadas no planejamento foram até o limite superior do aparato experimental. Outro fator crítico, é que a Figura 37 não mostra uma derivada positiva nos seus extremos que indique um possível crescimento na resposta avaliada. Portanto, o máximo em 275 °C pode ser considerado o ótimo de temperatura para a extração de compostos aromáticos, juntamente à vazão de 2,5 mL/min para extrações mais rápidas e pressão de 150 % de Pv da água.

#### 3.6.4 Avaliação qualitativa dos extratos

Durante o planejamento Doehlert, foi realizada a avaliação qualitativa por comparação de cor de duas amostras em particular. A amostra 7, representada pelo vial identificado como #15, na Figura 38 por ter sido o décimo quinto experimento de extração a ser realizado, eluiu apenas 12 mL do total de 35 mL esperado. As condições a ela aplicadas foram de 2,0 mL/min para a vazão, 275 °C e 150 % de Pv. Ao comparar a amostra com outra de mesma temperatura e pressão, no caso a amostra #3 (vial 14), constatou-se que a amostra 07 #15 apresentou uma coloração mais intensa. A Figura 38 apresenta o comparativo das duas amostras.



Figura 38: Coloração das amostras 14 (#3) e 07 (#15).

Ao observar tal diferença, há um indicativo de que o volume utilizado durante o planejamento experimental seja talvez excessivo e ultrapasse o ponto ótimo da maior quantidade de analito extraído por volume de água. Portanto, a avaliação da cinética de extração, que já seria uma próxima etapa natural do processo de otimização da extração, tem sua necessidade reforçada pela diferença no perfil mostrado na Figura 38.

Realizou-se, portanto, a extração da amostra nas condições ótimas obtidas no planejamento. 1,5 mL de extrato foi recolhido em vial de 2 mL num total de 15 *vials* ou 22,5 mL. O volume era apontado no mostrador da bomba seringa. Como o *vial* utilizado apresenta um bocal estreito, não foi possível coletar diretamente nele. Utilizou-se um béquer e seringa para transferência ao *vial* posteriormente. O experimento foi realizado em triplicata. A primeira extração é representada pelos *vials* de 1 a 15, a segunda de 16 a 30 e a final de 31 a 45, a tonalidade dos *vials* é apresentada na Figura 39.



Figura 39: Perfil visual obtido na avaliação cinética utilizando as condições ótimas do planejamento Doehlert.

A diferença de tonalidade do extrato da primeira amostra em relação às demais replicatas é notável. Essa discrepância é explicada pelo tempo de contato entre a água e a amostras no interior da coluna. Foi nessa primeira extração que se notou que os *vials* possuíam bocais muito pequenos para recolhimento do extrato. Assim, a extração ficou por um período em modo estático enquanto a solução com béquer e seringa para transferência era articulada. Essa replicata, que deveria ser desconsiderada por não seguir o padrão de extração das demais, demonstrou que condições estáticas no início podem ser interessantes e podem modificar consideravelmente a extração.

### 3.6.1 Fluxograma: etapas, modificações e resultados

A Figura 40 apresenta um resumo em forma de fluxograma do desenvolvimento da extração PHWE para amostras de rocha geradora.

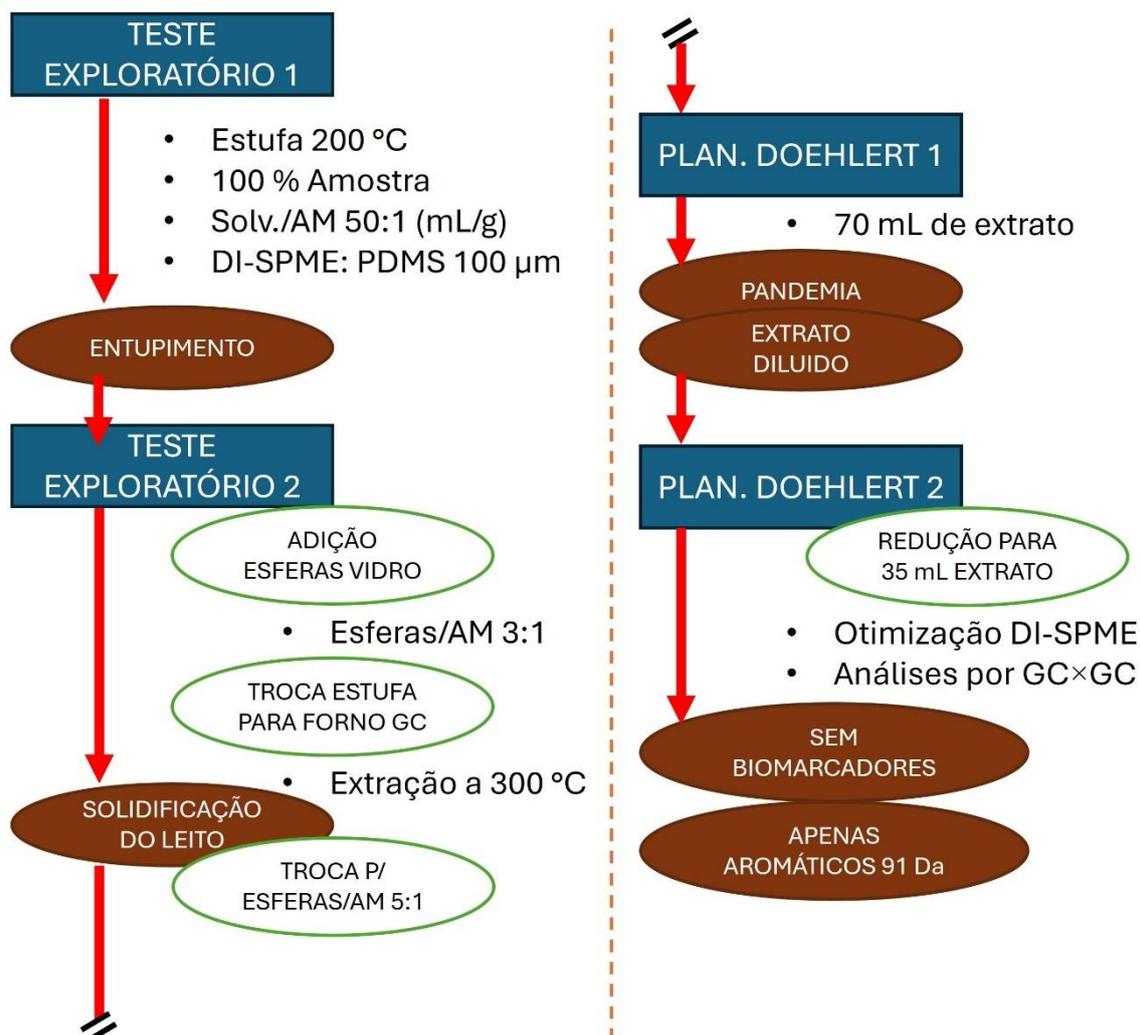


Figura 40: Fluxograma das diferentes etapas, modificações e principais conclusões de cada etapa.

### 3.6.2 Conclusões

Apesar dos esforços para obtenção de compostos biomarcadores nas amostras de rocha geradora, isto não foi possível utilizando PHWE com reconcentração dos analitos via SPME. Diferentes modificações foram realizadas no sistema, como adição de esferas de vidro e vazão reduzida, por exemplo. Não apenas, mesmo utilizando uma técnica de separação de alta sensibilidade como GC×GC, não foi possível verificar a presença de compostos das classes como terpanos 191 Da, esteranos 217 Da e alcanos a 85 Da, sendo possível verificar a presença majoritariamente de compostos aromáticos a 91 Da.

A alta temperatura de operação e a incompatibilidade com selos expansíveis se mostraram um desafio operacional, resultando em vazamentos constantes e baixo throughput. Ao se considerar essas dificuldades juntamente a necessidade de redução do  $\epsilon$  para melhor

extração de alcanos saturados, constatou-se que a água pode não ser a melhor alternativa para extração em amostras de rocha geradora de óleo.

Entretanto, o equipamento desenvolvido, juntamente a experiência adquirida com a execução dos experimentos, foram aplicados a solventes mais eficientes como discutido no capítulo a seguir.

## CAPÍTULO 4: ETANOL E GC-MS APLICADOS À ANÁLISE DE ROCHAS GERADORAS DE ÓLEO

### 4.1 Introdução

Durante a avaliação de um potencial poço produtor de petróleo, diversas análises exploratórias devem ser realizadas a fim de garantir a produtividade e viabilidade financeira deste [1,2]. Dentre estas inúmeras análises, estão presentes as análises das rochas geradoras, componente este que compõe o quebra-cabeças complexo de um sistema reservatório [1].

A avaliação da rocha geradora pode trazer diversas informações acerca da MO que formadora o óleo daquele poço, indicar o potencial de formação, correlação o óleo encontrado com a rocha geradora entre outros parâmetros. A complexidade do sistema entorno da exploração de petróleo, é classicamente semelhante à complexidade do método analítico para avaliação geoquímica das rochas geradoras [2,4].

O método convencional é baseado em uma estrutura que requer, primeiramente, a extração exaustiva da MO da rocha. Para tal, são necessárias diversas etapas que incluem operações unitárias complexas e demoradas, levando a potenciais erros durante o processo. Entre elas, pode-se citar a moagem das amostras em moinho planetário, que requer uma limpeza cuidadosa do equipamento para evitar contaminação cruzada [8,10,39]. Extração em refluxo do tipo Soxhlet, com alto consumo de solventes, incluindo clorados como DCM, durante mais 24 a 72 h. Nesta etapa, a secagem do solvente durante a noite é um problema comum [39,40].

Após a etapa de extração exaustiva, vem a etapa de fracionamento, podendo esta ser dividida em duas etapas principais: precipitação de asfaltenos e fracionamento em coluna de sílica (sem citar as etapas de secagem e ressuspensão). O asfalteno é um composto que tem como característica a sua não dissolução em hidrocarbonetos. Desta forma, sua precipitação é realizada utilizando *n*-pentano de 5 a 6 vezes na amostra. Os compostos solúveis são reconcentrados, obtendo-se os chamados maltenos [2,38].

Os maltenos, por sua vez, são submetidos ao fracionamento em coluna de sílica, onde 3 frações são obtidas: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos e resinas (compostos polares leves), conhecido como fracionamento SARA. A avaliação de biomarcadores, entretanto, ocorre apenas na fração de saturados, sendo as demais armazenadas [2,5–8]. Após uma etapa de reconcentração e diluição adequada para compatibilidade com o GC-MS, a amostra é analisada e o conjunto de dados obtidos processado manualmente, buscando-se os picos de interesse nos cromatogramas SCAN, SIM e, se disponível, MS/MS [1,2]. Obviamente, o procedimento clássico é bastante laborioso, custoso, e impõe uma baixa

vazão de amostra. O que torna o processo pouco seguro ao analista lidando com uma grande quantidade de amostras e, conseqüentemente, solventes orgânicos clorados e alcanos. A fim de contornar estas etapas, sugere-se unificar os procedimentos de extração e fracionamento em uma única etapa baseada na extração com solvente pressurizado [52,53].

É natural considerar a água como primeira alternativa de solvente, devido a sua abundância quase que irrestrita. Entretanto, suas propriedades como solvente extrator passam a ser interessantes apenas muito próximas ou acima do ponto crítico, que ocorre a 374 °C [54]. Desta forma, sua utilização requer um sistema em aço inox, sem utilização de selos expansivos e alta energia para aquecimento [52,55].

No contexto brasileiro, grande produtor de cana-de-açúcar, sugere-se o uso do etanol proveniente de fontes renováveis a fim minimizar os impactos ambientais provenientes do uso de solventes [57]. Este apresenta uma cadeia de 2 carbonos, que deve favorecer a interação com hidrocarbonetos. Não apenas, a permissividade estática ( $\epsilon$ ) do etanol a 150 °C é significativamente menor que a da água, apresentando um valor de 9,88 versus 43,94 da água. O etanol apresenta também uma polarizabilidade ( $\pi^*$ ) menor na temperatura citada, sendo seu valor 0,27 contra 0,98 da água [58]. Esses fatores, entre outras propriedades físico-químicas, são grandes indicativos de uma maior característica apolar do solvente e possível compatibilidade com os analitos de interesse nas amostras de rocha geradora. A Figura 41 apresenta o fluxograma esperado para o método com etanol comparado ao método clássico.

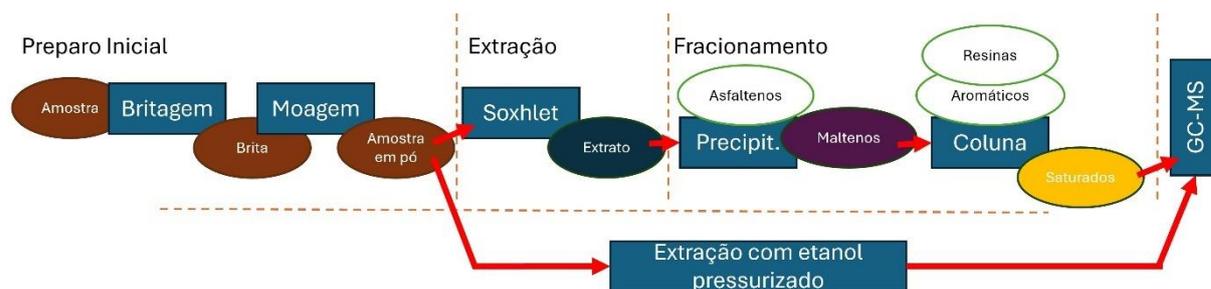


Figura 41: Fluxograma simplificado do processo clássico (acima) e das etapas contornadas para o método proposto com etanol (abaixo). Etapas de secagem, ressuspensão e diluição foram omitidas para melhor visualização.

A fim de obter as melhores condições de extração para a amostra geradora será utilizado o planejamento experimental Doehlert [66,67]. Com ele é possível testar variáveis em diferentes níveis, reduzindo o número de experimentos necessários quando comparados ao planejamento fatorial, por exemplo. A aplicação de diferentes níveis de testes para as várias é bastante

interessante também quando já se conhece o sistema estudado e quais são as variáveis mais relevantes para a modelagem, aprofundando a abordagem e detalhando as variáveis de maior significância [66,67].

Naturalmente, os resultados obtidos com o procedimento otimizado serão comparados ao método clássico para verificação de uma possível correlação direta entre os biomarcadores e informação geoquímica. Isto será feito através das razões entre picos de interesse amplamente documentadas e utilizadas frequentemente neste tipo de análises.

Por fim, o método utilizado foi avaliado através da métrica verde AGREEPrep para verificação de seu impacto ambiental. A métrica consiste em 10 fatores de diferentes pesos, como quantidade de descarte gerado, quantidade de amostra, solventes utilizados etc [42]. Estes impactam no valor final que varia entre 0 e 1, sendo zero um método pouco verde e não alinhado com os princípios da química analítica verde (GAC) [42,60]. Enquanto 1, é um método que apresenta total alinhamento com a GAC e um alto índice verde para a métrica AGREEPrep.

## **4.2 Materiais e Métodos**

### **4.2.1 Procedimento Clássico (Soxhlet + SARA)**

Como descrito no item 2.2.1.

### **4.2.2 Amostras**

O TOC das amostras foi determinado da mesma forma descrita no item 2.2.2. As amostras foram identificadas como S0131, S0361, S0364, S0579, S0241, S0152, S0546, S0280, S0282 e S0917 e seu TOC é representado por seu próprio nome. S0131 tem 1,31 % TOC; S0361, 3,61 %, por exemplo. Foi preparada uma mistura de esferas de vidro 0,25 mm previamente limpas com etanol quente e diferentes amostras de rochas-geradoras na proporção de 5:1 (m/m) com TOC final estimado de 3,65 % para fins de otimização. Esta amostra é identificada como M0365.

### **4.2.3 Extração e aparato experimental *lab-made***

O aparato consistiu em um GC Agilent 6890 adaptado para conter a serpentina de troca de calor, coluna de extração, além de válvulas para controle de pressão e vazão. A temperatura de extração foi determinada no processo de otimização. A coluna de extração foi construída com tubo de aço inox de 11,3 cm e volume interno de aproximadamente 3,2 cm<sup>3</sup>. Uma bomba seringa 500D (Teledyne Isco, Lincoln, NE, EUA) foi usada no modo vazão constante a 2,5 mL/min durante a extração. A vazão inicial foi de 0,5 mL/min com incrementos de 0,5 mL/min a cada 10 segundos para evitar compressão excessiva da amostra dentro da coluna. Um total de

35 mL de etanol foi recuperado. Lã de vidro foi aplicada na parte superior e inferior da coluna para evitar que as partículas da amostra fluíssem para o *vial* coletor ou para a bomba seringa. A válvula de saída era uma válvula micrométrica para controlar a pressão da extração. A Figura 42 mostra o esquema do aparato experimental utilizado para todas as extrações.

Após a extração, o etanol remanescente na linha de extração foi recuperado em um frasco de 25 mL pesado, passando-se mais 5 mL de etanol através da linha. A linha de extração foi então limpa com 10 mL de uma mistura de tolueno:hexano (1:1) v/v. Todos os extratos foram secos sob fluxo suave de  $N_{2(g)}$ , diluídos de 10 a 100 mg/mL em diclorometano (DCM) e analisados por GC-MS.

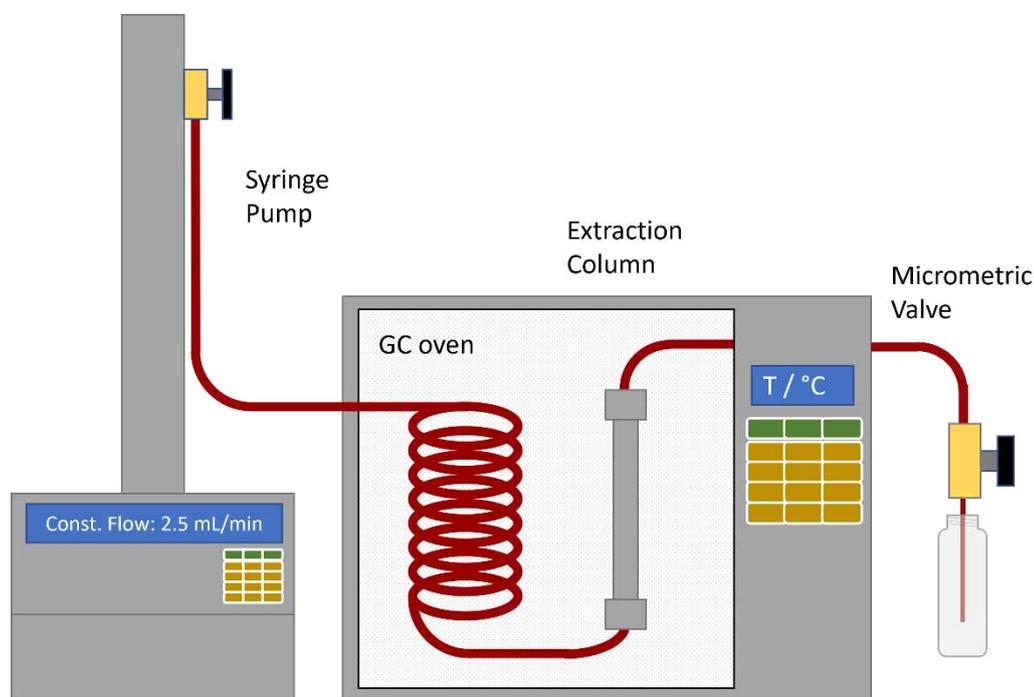


Figura 42: Aparato para extrações com etanol pressurizado. Syringe pump: bomba seringa; GC oven: forno de GC; Extraction column: coluna de extração; Micrometric valve: válvula micrométrica.

#### 4.2.4 Otimização multivariada por planejamento experimental do tipo Doehlert

O método foi otimizado por DD de 2 níveis com a mistura M0365. As variáveis testadas foram pressão (P) e temperatura de extração (T). A temperatura foi avaliada de 35 °C até 235 °C em 5 níveis. A pressão foi avaliada de 110 a 190 % da pressão de vapor ( $P_v$ ) em 3 níveis. Os pontos de pressão não foram fixos, pois o  $P_v$  varia com a temperatura. Assim, definir pontos experimentais como uma porcentagem da  $P_v$ , 110, 150 e 190 %, forneceu um ponto fixo virtual para a otimização. A vazão foi fixada em 2,5 mL/min. A massa total no interior da coluna foi

de aproximadamente 1,2 g (sendo cerca de 200 mg de M0365 misturado com esferas de vidro inerte). Foram 11 experimentos no total, sendo 5 pontos centrais + 6 pontos distintos. O conjunto completo de experimentos é encontrado na Tabela 12. Foram selecionadas áreas de picos totais para alcanos lineares (monitorados por GC-MS considerando o fragmento de massa 85 Da), terpanos pentacíclicos (191 Da) e esteranos (217 Da), bem como cromatogramas SCAN completos para avaliação do DD. Após otimização, as amostras individuais foram analisadas usando 600 mg de rocha-geradora no interior da coluna sem adição das esferas de vidro.

#### **4.2.5 Análise por GC-MS**

Como descrito no item 2.2.5.

#### **4.2.6 Transferência de massa do processo de extração por etanol subcrítico**

Uma curva cinética (m/v) foi construída com 20 pontos a cada 1,6 mL, medido na bomba de seringa. O extrato foi coletado em frascos pesados de 2 mL e estes foram secos sob fluxo suave de N<sub>2(g)</sub>.

#### **4.2.7 Métrica AGREEPrep**

A métrica é composta por 10 fatores que impactam no *score* do método avaliado com valores na faixa de zero a 1. Para facilitar o uso e comparação, os pesos padrões para os fatores não foram alterados no software [42].

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Planejamento experimental do tipo Doehlert**

Na avaliação dos resultados foram aplicadas diversas abordagens. O primeiro modelo considerado foi o quadrático, em que se considera as contribuições de todos os termos envolvidos na equação de segundo grau. Para as três principais classes envolvidas na avaliação geoquímica, isto é, esteranos a 217 Da, terpanos 191 Da e alcanos 85 Da, nenhuma destas ou mesmo o cromatograma SCAN apresentaram significância na regressão do modelo. Para todas estas classes, mesmo considerando modelos de regressão mais simples como linear ou puramente quadrático, o p-valor do teste F foi muito superior ao limite de 0,05 a nível de confiança de 95 %. A Tabela 12 apresenta os resultados do planejamento experimental com áreas de pico calculadas para alcanos 85 Da, terpanos 191 Da e esteranos 217 Da.

Tabela 12: Áreas totais de pico obtidas a partir de SIMs para DD com M0365. "Exec" indica a ordem de execução dos experimentos.

Exec	EXP	T/ °C	P	P%	A 85 Da	A 191 Da	A 217 Da	m/m %
4	#1 PC	135	11,3	150	349604	--	44087	2,00 %
5	#2 PC	135	11,3	150	4367302	403560	553519	2,40 %
9	#3 PC	135	11,3	150	2418384	136621	213056	2,68 %
1	#4 PC	135	11,3	150	4050072	300034	399267	3,46 %
10	#5 PC	135	11,3	150	419115	73984	134817	2,09 %
3	#6	235	90	150	2468318	179609	274619	3,19 %
7	#7	185	38	190	974772	49840	97699	2,73 %
11	#8	35	SP+50% (2 bar)	150	1840044	220173	354891	1,44 %
8	#9	85	SP+10% (6 bar)	110	1120482	102980	144698	2,73 %
2	#10	185	22	110	4258560	307618	402435	2,57 %
6	#11	85	SP+90% (9 bar)	190	1049796	97145	150828	3,44 %

A Figura 43 compara os cromatogramas SCAN obtidos a 35 °C e 235 °C para M0365. A otimização sugere que a temperatura e a pressão não impõem qualquer efeito sobre a extração de biomarcadores com etanol. Conseqüentemente, esta poderia ser realizada em condições brandas, sem penalidades para os resultados de forma geral. A quantidade de analitos (m/m<sub>total</sub> da amostra) extraídos durante a etapa de otimização variou entre 1,44 % e 3,46 % (Tabela 12). A extração a 35 °C apresentou a menor porcentagem de massa extraída, 1,44 %. Por outro lado, as condições de extração brandas são bastante atrativas devido a velocidade de estabilização do sistema com operação em temperatura próxima do ambiente, além da não necessidade de resfriamento para limpeza e início da próxima análise. Diante disso, optou-se por T = 35 °C a 2,5 mL/min de vazão e 600 mg de amostra (capacidade máxima da coluna) para as extrações subsequentes pelo ganho significativo no tempo de extração com temperaturas menores.

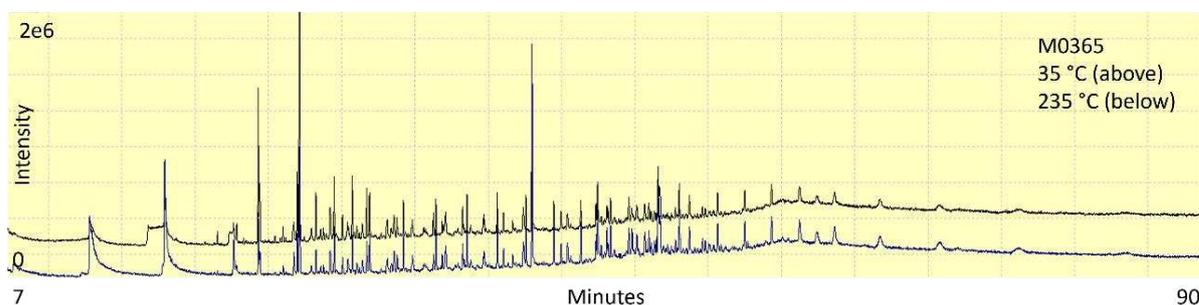


Figura 43: SCAN obtidos de extrações a 35 °C e 235 °C durante o processo de otimização com a amostra M0365.

### 4.3.2 Limpeza do sistema

Durante a extração, a quantidade de massa extraída foi calculada para diferentes etapas: extração, limpeza da linha com 5 mL de etanol extra e 10 mL de mistura tolueno:hexano (1:1) v/v no final. A Figura 44 apresenta a forma como estes volumes foram utilizados.

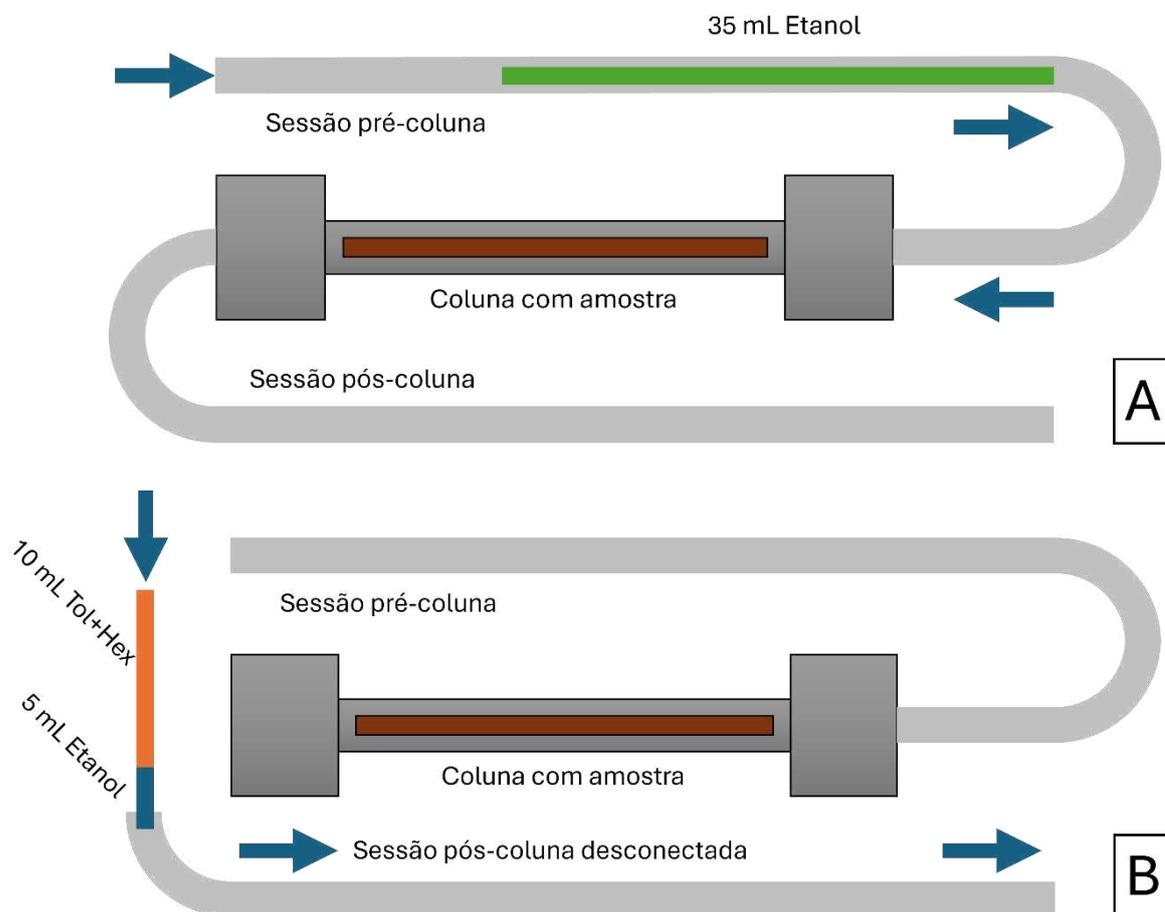


Figura 44: A) Exemplificação dos compostos de interesse sendo extraídos com 35 mL de etanol. B) Limpeza da sessão pós-coluna após o processo de extração.

Na etapa A, 35 mL de etanol são recolhidos após este passar pela coluna de aço-inox que contém a amostra. Após o extrato ser recolhido em frasco âmbar de 50 mL, a coluna é desconectada da sessão final, etapa B. Seu conteúdo (< 1 mL) é recolhido em outro frasco âmbar, mais 5 mL de etanol são eluidos através desta sessão pós-coluna e recolhidos. Por fim, 10 mL da mistura 1:1 Tolueno:Hexano são eluidos através desta sessão para limpeza. Esses mesmos 10 mL são utilizados para limpeza da coluna após retirada da amostra. Os cromatogramas dos extratos com 35 mL de etanol e os 5 mL extras da sessão pós-coluna foram comparados para verificar quais compostos estavam presentes em cada etapa.

A porcentagem recuperada da massa total de amostra adicionada à coluna de extração (m/m), esta extraída com 35 mL de etanol, variou entre 0,18 % e 0,49 %, com a maioria das amostras acima de 0,25 %. É importante destacar que esse valor é em relação a massa de amostra pesada. Com relação ao TOC de cada amostra, a MO orgânica extraída variou de cerca de 3 a 29 %. A Tabela 13 mostra a massa relativa extraída para todas as amostras e inclui também a porcentagem com relação a MO presente na rocha geradora. Os valores para a porcentagem mássica extraída para o volume extra de etanol foram de 0,13 % para S0131, com três outras amostras testadas próximas a 0,15 % da massa bruta de amostra. Esses valores representam cerca de um terço da massa total extraída com 35 mL. Considerando que a quantidade extraída é de poucos mg, o erro associado à medida é grande. Sendo a incerteza absoluta da balança analítica cerca de  $\pm 0,1$  mg, a incerteza na medida fica próxima a 17 % para o primeiro ponto recolhido da amostra S0579 (Figura 46). Não foram detectados biomarcadores ou quaisquer outros compostos na avaliação dos SIM e SCAN para o volume extra de etanol, conforme demonstrado na Figura 45, onde o cromatograma apresenta apenas ruído. Assim, sugere-se que essa massa extra possa estar relacionada a pequenas partículas que possam ter escapado da coluna para a linha de extração; mas pode-se sugerir que esse valor ocorra devido a erros associados à medida de valores de massa muito baixos na balança analítica.

*Tabela 13: Porcentagem da massa extraída (m/m) para cada amostra (600 mg) com 35 mL de etanol % (m/m) obtida com 5 mL de etanol na sessão pós-coluna.*

<b>Amostra</b>	<b>TOC</b>	<b>% da amostra extraída c/ 35 mL de etanol</b>	<b>% da MO extraída c/ 35 mL de etanol</b>	<b>% da amostra obtida da sessão pós-coluna com 5 mL etanol</b>
<b>S0131</b>	1.31 %	0.29 %	22.14 %	0.13 %
<b>S0364</b>	3.64 %	0.46 %	12.64 %	0.16 %
<b>S0361</b>	3.61 %	0.44 %	12.19 %	0.14 %
<b>S0579</b>	5.79 %	0.49 %	8.46 %	0.14 %
<b>S0241</b>	2.41 %	0.23 %	9.54 %	--
<b>S0152</b>	1.52 %	0.45 %	29.61 %	--
<b>S0546</b>	5.46 %	0.28 %	5.13 %	--
<b>S0280</b>	2.80 %	0.18 %	6.43 %	--
<b>S0282</b>	2.82 %	0.25 %	8.87 %	--
<b>S0917</b>	9.17 %	0.30 %	3.27 %	--

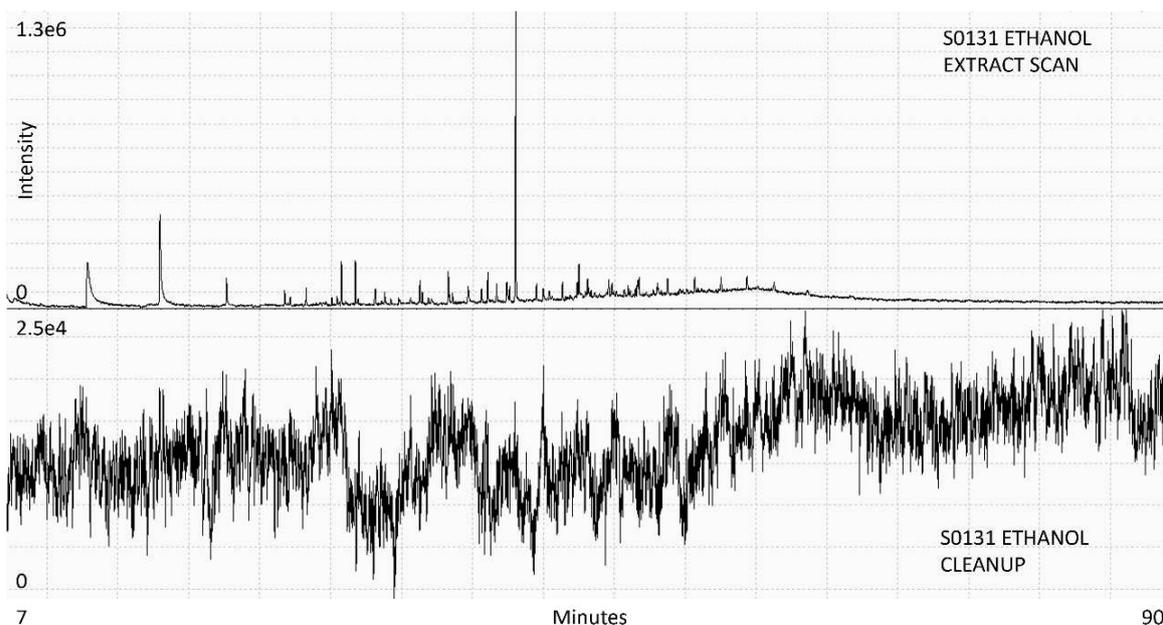


Figura 45: Cromatogramas dos extratos obtidos com 35 mL de etanol e 5 mL etanol na sessão pós coluna, ambos à 10 mg/mL.

O cromatograma inferior na Figura 45 é semelhante para todas as amostras testadas, mostrando apenas ruído. Há evidências, portanto, de que nenhum composto relevante, isto é, compatível com o GC-MS seja retido no sistema de extração após a eluição dos 35 mL de etanol.

Vale a pena notar, a massa extraída com amostras puras (sem esferas de vidro, totalizando 600 mg) é cerca de 10 vezes menor quando comparada ao DD. Durante a etapa de otimização, apenas 200 mg de rocha geradora foram utilizados por extração, efetivamente (M0365). No caso das amostras com esferas de vidro, o maior volume de solvente/g de amostra forçaria uma maior extração dos compostos ao se considerar a baixa solubilidade desses compostos em etanol. Não apenas, essas esferas aplicadas durante o processo de otimização permitiram maior contato entre a amostra e o etanol. Seu uso também promove uma melhor distribuição da amostra dentro da coluna com um maior espaçamento entre as partículas de rocha geradora, levando a uma maior área superficial efetiva, além de evitar caminhos preferenciais durante a extração. Enquanto para as amostras individuais, de 600 mg sem esferas de vidro, os caminhos preferenciais podem ter sido um problema durante a extração, levando a uma menor eficiência, mesmo que a massa de amostra tenha sido 3 vezes maior.

### 4.3.3 Transferência de massa do processo de extração

Uma curva de massa extraída vs. volume de etanol foi gerada para avaliar o volume adequado para 600 mg da amostra S0579. O extrato foi recuperado a cada 1,6 mL indicado na bomba seringa, limitado pelo volume de 2 mL do *vial*. A cada troca de *vial*, a extração era pausada por alguns segundos. A Figura 46 mostra a curva de massa acumulada. Sugere-se que 35 mL de etanol sejam adequados para extração de biomarcadores em 600 mg de amostra e que qualquer volume adicional pode não proporcionar uma melhoria significativa na quantidade de massa extraída, mas aumentaria o tempo necessário para secar o extrato final, bem como o tempo da própria extração. Também, é possível observar o ganho mais rápido em massa extraída no início da extração, desacelerando com um maior volume de solvente utilizado. A massa final extraída foi de 0,75 % (m/m) para a amostra S0579 nesta etapa, que é um pouco superior ao valor de 0,49 % encontrado durante a extração. No entanto, a grande quantidade de erro induzido pela baixa massa pesada em cada *vial* deve ser levada em consideração. Após 15 mL de extração, a maior parte da massa medida foi próxima de zero. De fato, até mesmo algumas massas negativas foram obtidas, o que pode estar relacionado as flutuações e erros associados à medida na balança. Esses valores não foram considerados na curva.

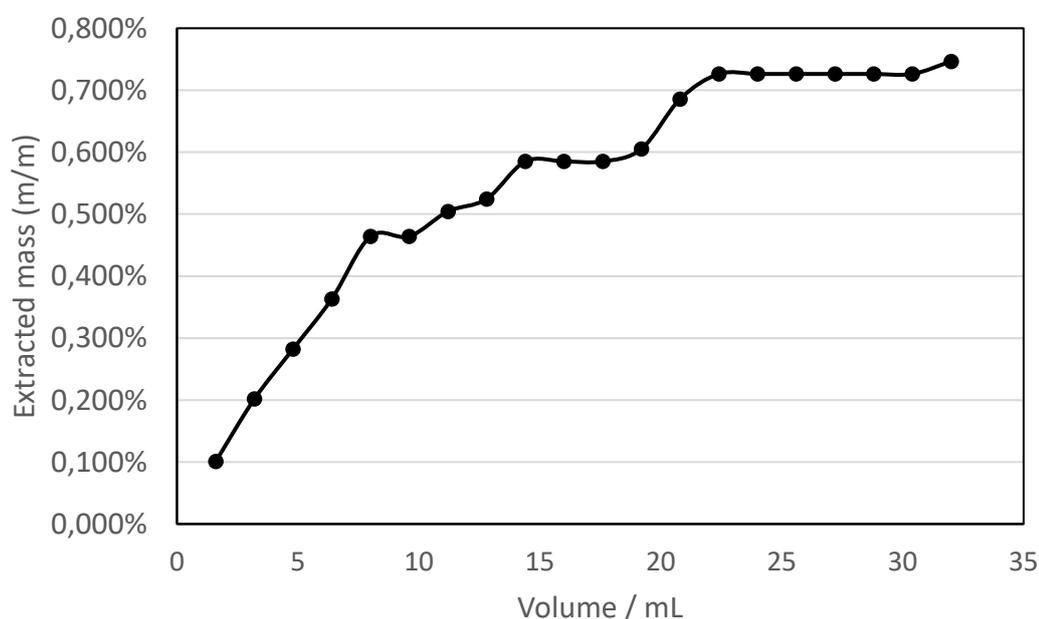


Figura 46: Massa acumulada (m/m) vs volume de etanol para extração de biomarcadores em rocha-geradora para a amostra S0579.

#### 4.3.4 Etanol para avaliação geoquímica de rochas-geradora de petróleo

Uma discussão mais aprofundada será baseada em um único resultado para evitar repetições. A Figura 47 compara cromatogramas obtidos após a extração com etanol subcrítico a 35°C e o método clássico Soxhlet+SARA.

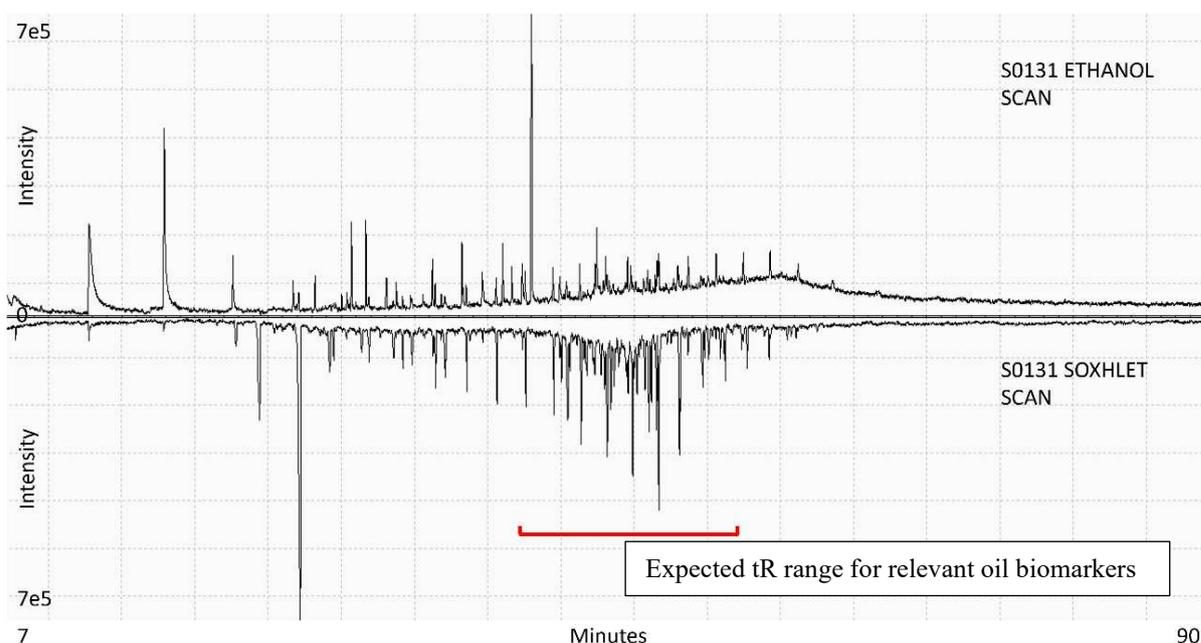


Figura 47: *Fingerprint da extração com etanol (acima) vs. Soxhlet (abaixo).*

Os cromatogramas da Figura 47 mostram dois perfis distintos entre os extratos etanol e Soxhlet. O perfil Soxhlet mostra uma mistura complexa não resolvida (UCM) pronunciada entre 42 e 57 min, sendo a área onde a maioria dos terpanos e esteranos são encontrados. Isso não é encontrado no perfil com etanol, onde a UCM é encontrada após 60 minutos. No entanto, o procedimento clássico analisa apenas a fração de saturados, já que o extrato Soxhlet é submetido ao fracionamento SARA antes da análise por GC; com o etanol não há nenhuma separação de classes. Dessa forma, o etanol pode apresentar um menor sinal de pico a 10 mg/mL, uma vez que os compostos extraídos não estão relacionados exclusivamente à fração de hidrocarbonetos saturados, diferentemente da análise pós fracionamento SARA no método convencional.

Na extração com etanol, o tempo de contato do solvente com a amostra é reduzido enquanto o método Soxhlet promove uma extração exaustiva pelo refluxo contínuo de solvente. O etanol também apresenta um valor consideravelmente maior de  $\epsilon = 24,6$  quando comparado ao DCM  $\epsilon = 9,08$ , provavelmente levando a uma menor solubilização dos compostos saturados

e saturação precoce do solvente. Apesar disso, os SIMs para terpanos (191 Da) e esteranos (217 Da) mostraram um perfil comparável entre as técnicas, apesar da menor relação S/N. Levando em consideração que as razões geoquímicas são calculadas intra-amostra, a concentração do extrato não deve influenciar nas razões calculadas, desde que o detector não esteja fora de sua faixa de linearidade. A identificação por espectrometria de massas dos esteranos citados demonstra um perfil equivalente para os picos entre as técnicas. A Figura 48 apresenta o comparativo dos espectros para os dois métodos, exemplificados pelo pico 'i'. Na Figura 49 são comparados os perfis de esteranos 217 Da no SIM.

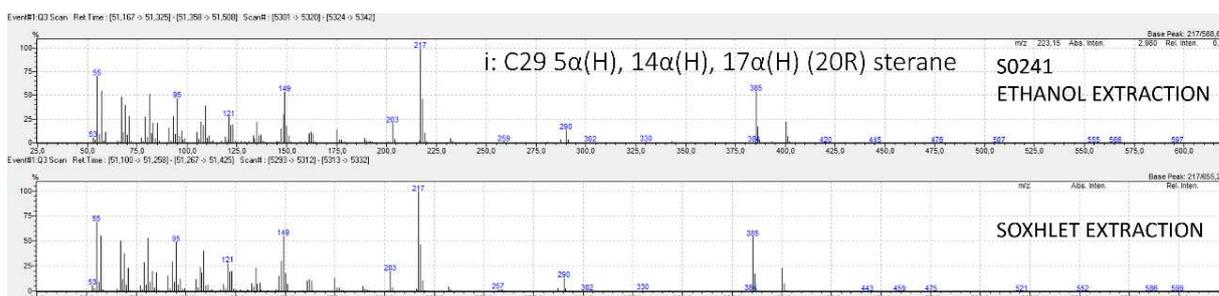


Figura 48: Comparativo dos espectros de massas obtidos para o pico 'i' através do método com etanol (acima) e pelo método convencional Soxhlet+SARA (abaixo).

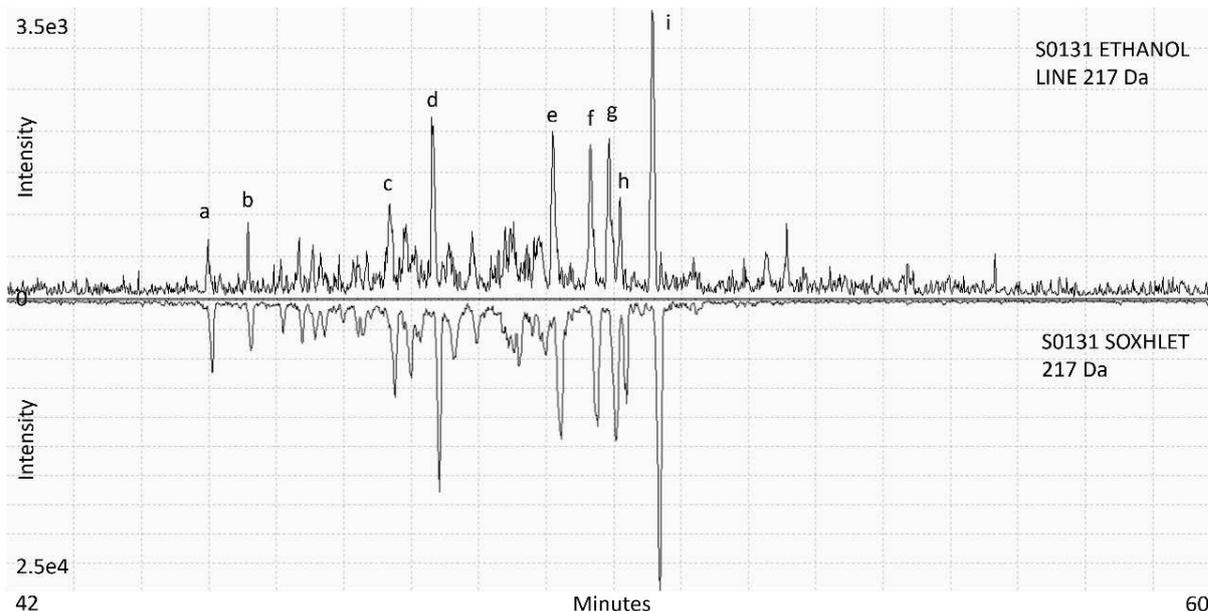


Figura 49: SIM para esteranos 217 Da para etanol (acima) vs. Soxhlet+SARA (abaixo).

Na Figura 49, a escala não é a mesma e o resultado Soxhlet apresenta picos com maior intensidade. Isso não foi considerado para evidenciar a alta similaridade entre os perfis. De fato, os picos 'd', 'e' e 'i' têm sua intensidade relativa comparável entre as técnicas. Os picos

identificados no SIM 85 Da para alcanos, hopanos 191 Da e esteranos 217 Da foram aplicados a parâmetros diagnósticos comuns utilizados em análises geoquímicas. Para a classe dos terpanos pentacíclicos obteve-se uma alta similaridade entre os perfis cromatográficos como demonstrado na Figura 50. Na Figura 51 são comparados os espectros de massas obtidos para o pico 'B' (Tm) tanto para o método com etanol, como para o método convencional Soxhlet+SARA.

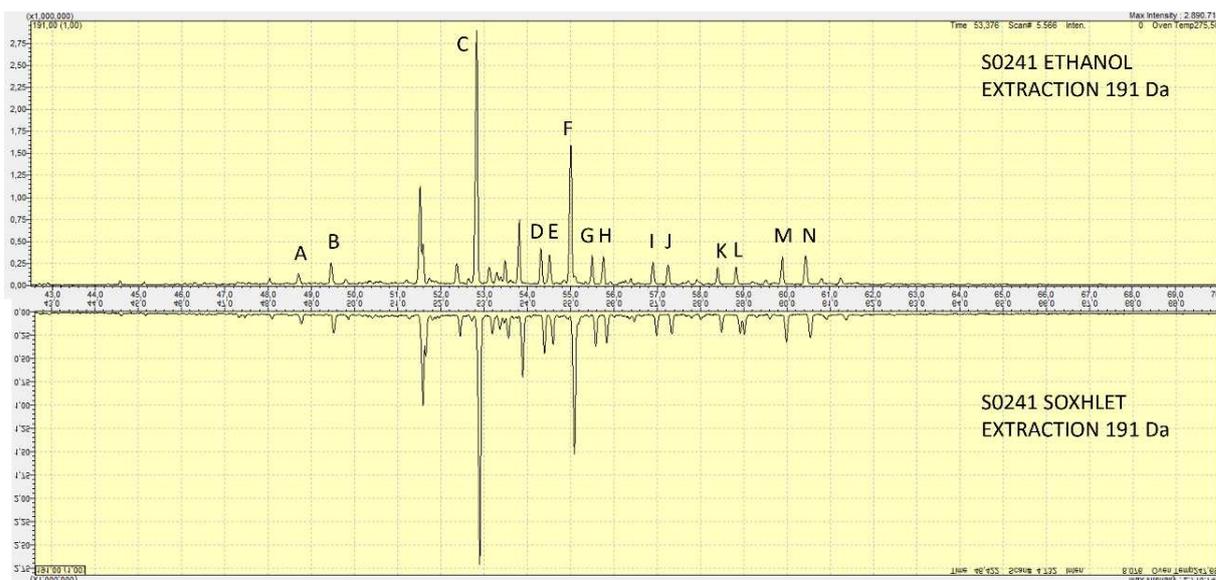


Figura 50: Cromatograma de íons selecionados (SIM) 191 Da de 51 a 65 minutos para a amostra S0241. Invertido: Extração Soxhlet. Acima: Etanol.

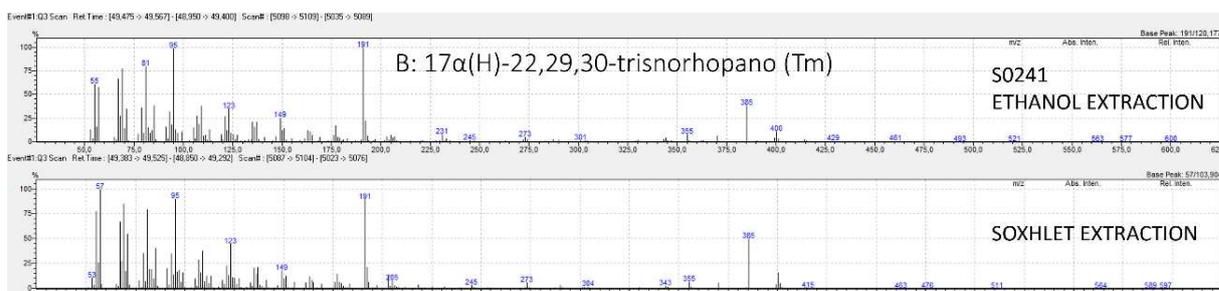


Figura 51: Espectro de massas para o pico 'B' da amostra S0241. Acima: Etanol, Abaixo: Extração Soxhlet.

A Tabela 14 resume os valores calculados de parâmetros diagnóstico tanto para Soxhlet+SARA quanto para extração com etanol.

Tabela 14: Parâmetros calculados para Soxhlet+SARA vs. etanol. ND, não detectado ou não possível calcular.

	S031 <sup>1</sup>		S1364 <sup>1</sup>		S1361 <sup>1</sup>		S1579 <sup>1</sup>		S1241 <sup>2</sup>		S152 <sup>3</sup>		S1546 <sup>3</sup>		S1280 <sup>3</sup>		S1282 <sup>3</sup>		S1917 <sup>3</sup>	
	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH	Soxh	ECH
<b>CH<sup>a</sup></b>	1,09	1,03	1,35	1,13	1,29	2,92	1,27	1,16	0,97	0,97	1,50	1,31	1,22	1,02	1,40	1,03	1,29	1,08	2,51	1,26
<b>OEP[23]<sup>b</sup></b>	0,92	0,82	0,92	0,96	1,10	1,04	1,02	1,12	0,93	0,89	1,19	1,13	1,03	0,98	0,94	0,89	0,97	0,90	1,11	0,99
<b>20S(20S+20R)C29<sup>c</sup></b>	0,34	0,35	0,21	0,28	0,26	0,33	0,29	0,34	0,26	0,26	0,21	0,19	0,26	0,25	0,31	0,27	0,30	0,29	0,23	0,14
<b>abb(abb+aaa)C29<sup>d</sup></b>	0,37	0,34	0,23	0,25	0,18	0,23	0,22	0,30	0,22	0,21	0,20	0,19	0,24	0,22	0,26	0,26	0,28	0,28	0,33	0,42
<b>esteranosHopane<sup>e</sup></b>	0,71	0,89	1,39	1,61	0,79	1,04	1,55	1,66	1,01	0,78	0,30	0,26	1,40	1,47	4,43	3,08	3,18	3,78	2,00	2,35
<b>1s(1s+1im)<sup>f</sup></b>	0,40	0,30	0,30	ND	0,33	ND	0,30	ND	0,38	0,39	0,46	0,45	0,25	0,31	ND	0,27	0,29	0,21	ND	ND
<b>1sH30<sup>g</sup></b>	0,07	0,00	0,03	0,00	0,02	ND	0,06	ND	0,04	0,04	0,08	0,06	0,04	0,03	ND	0,06	0,04	0,00	ND	ND
<b>G30H30<sup>h</sup></b>	0,50	0,34	0,18	ND	0,25	ND	0,34	ND	0,57	0,63	0,61	0,58	0,24	0,20	0,33	0,38	0,32	0,30	0,30	ND
<b>22S(22S+22R)H31<sup>i</sup></b>	0,57	0,63	0,60	0,52	0,56	ND	0,64	ND	0,56	0,54	0,58	0,56	0,56	0,56	0,58	0,58	0,56	0,60	0,43	ND
<b>22S(22S+22R)H32<sup>j</sup></b>	0,58	ND	0,47	ND	0,51	ND	0,53	ND	0,52	0,51	0,54	0,55	0,52	0,44	0,58	0,49	0,49	0,50	0,52	ND
<b>22S(22S+22R)H33<sup>k</sup></b>	0,53	ND	0,48	ND	0,56	ND	0,51	ND	0,53	0,50	0,56	0,56	0,59	0,60	0,60	0,40	0,60	0,50	ND	ND
<b>22S(22S+22R)H34<sup>l</sup></b>	0,44	ND	ND	ND	0,59	ND	0,55	ND	0,51	0,55	0,62	0,53	0,55	0,67	0,54	0,65	0,59	0,65	ND	ND
<b>22S(22S+22R)H35<sup>m</sup></b>	0,57	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,48	0,49	ND	ND	0,57	0,60	0,58	ND	0,42	0,46	ND	ND
<b>H31R/H30<sup>n</sup></b>	0,24	0,22	0,15	ND	0,14	ND	0,15	ND	0,10	1,44	0,19	0,21	0,15	0,15	0,14	0,15	0,12	0,14	0,14	0,26
<b>IG<sup>o</sup></b>	38,24	36,14	16,50	ND	22,20	ND	19,97	ND	56,75	785,62	58,20	56,93	25,53	21,84	30,31	32,51	32,15	33,72	19,02	19,64

1: extrato a 10 mg/mL.

2: extrato a 25 mg/mL.

3: extrato a 100 mg/mL.

a: CPI (índice de preferência de carbono):  $0,5 \times (\sum_{\text{odd}} C_{24}-C_{33} / \sum_{\text{even}} C_{24}-C_{33} + \sum_{\text{odd}} C_{25}-C_{34} / \sum_{\text{even}} C_{25}-C_{34})$  em 85 Da SIM [89];

b:  $(C_{21} + 6 \times C_{23} + C_{25}) / (4 \times C_{22} + 4 \times C_{24})$  em 85 Da SIM [90];

c:  $C_{29} 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H) 20S / C_{29} 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H) 20(S + R)$  áreas em SIM 217 Da [2];

d:  $C_{29} 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H) 20(S + R) / (C_{29} 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H) 20(S + R) + C_{29} 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H) 20(S + R))$  áreas em SIM 217 Da [2];

e:  $C_{27} 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H) 20(S + R)$  áreas em SIM 217 Da /  $C_{30} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopano em SIM 191 Da [2];

f:  $18\alpha(H), 21\beta(H)$ -22,29,30-trisnorneohopane /  $(18\alpha(H), 21\beta(H)$ -22,29,30-trisnorneohopane +  $17\alpha(H), 21\beta(H)$ -22,29,30-trisnorhopane) em SIM 191 Da [2];

g:  $18\alpha(H), 21\beta(H)$ -22,29,30-trisnorneohopane /  $C_{30} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopano, em SIM 191 Da [2];

h: Área gamacerano /  $17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopano em SIM 191 Da [2];

i-m:  $C_{31} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -homohopano 22S /  $(C_{31} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -homohopano 22S +  $C_{31} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -homohopano 22R) em SIM 191 Da. A contagem de carbono sobe até  $C_{35}$  [2];

n:  $C_{31} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -homohopano 22R /  $C_{30} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopano, em SIM 191 Da [2];

o:  $100 \times [\text{Gamacerano} / C_{30} 17\alpha(H), 21\beta(H)$ -hopane], em SIM 191 Da (baixa < 50, média 50–60 e alta > 60) [2];

Diferentes informações geoquímicas podem ser obtidas com a avaliação desses parâmetros diagnósticos. O CPI é comumente utilizado para avaliação da evolução térmica e valores  $> 1$  são resultantes de hidrocarbonetos de predominância ímpar [2,5,6]. Todas as amostras, com exceção de S0241, apresentam valor  $> 1$ , que se correlaciona com a matéria orgânica (MO) de baixa evolução térmica. O índice OEP (preferência de ímpares sobre os pares), avalia as mesmas informações. Para a maioria das amostras o valor  $< 1$ , mas muito próximo de um, o que pode sustentar a baixa evolução térmica do CPI [5].

O  $T_s/(T_s + T_m)$  é outro índice que avalia a maturidade da MO. A janela de equilíbrio está entre 0,52 - 0,55, e todas as amostras, em ambas as técnicas, apresentam valor abaixo de 0,52, indicando um processo de baixa maturidade [91]. A razão  $20S/(20S+20R)$   $C_{29}$  esteranos tem a mesma janela de equilíbrio que o  $T_s/(T_s + T_m)$ . Como todos os valores apresentados são  $< 0,52$ , a mesma sugestão de baixa evolução térmica pode ser feita para essas amostras. O  $\alpha\beta\beta/(\alpha\beta\beta+\alpha\alpha\alpha)$   $C_{29}$  varia de 0,67 – 0,71 no equilíbrio. A maioria das amostras está significativamente abaixo da marca de 0,30, com exceção de S0131 e S0917, o que sugere MO de baixa maturação.

O  $(G_{30}/H_{30})$  com valor  $> 0,6$  indica uma alta salinidade do ambiente durante a deposição da MO. Todas as amostras apresentam valores abaixo desse limite, exceto as amostras S0241 e S0152 na extração com Soxhlet e Etanol, respectivamente. O índice de gamacerano (iG), apresentou alta discrepância na amostra S0241, mas para todas as outras amostras as razões levam as mesmas conclusões.

#### 4.4 Métricas AGREEPrep

Para o primeiro fator, ambos os métodos usam abordagem *ex situ*. Para o fator 2, considerou-se que o método com etanol utiliza 10 mL/amostra de solvente não seguro para limpeza do sistema e da vidraria. Enquanto o método Soxhlet consome cerca de 600 mL. Consequentemente, quase nenhum dos materiais pode ser considerado renovável nesse processo e o resíduo em ambos os métodos pode ser o mesmo que suas entradas de solventes tóxicos.

A quantidade de amostra utilizada no método do etanol, fator 5, é consideravelmente menor, 0,6 g. Para as extrações posteriores, a quantidade de amostra deve ser ajustada para 200 mg em esferas de vidro para melhor eficiência de extração. O tempo despendido por amostra

é consideravelmente menor levando aproximadamente 1 amostra/h. A Tabela 15 apresenta todos os valores considerados para a métrica AGREEPrep.

Tabela 15: Valores para o cálculo da métrica AGREEPrep para os métodos baseados em etanol vs. Soxhlet+SARA.

Fator	Peso	Etanol	Soxhlet+SARA
		Valor/Modo	Valor/Modo
1	1	Ex Situ	Ex Situ
2	5	10 mL Solvente/amostra	600 mL Solvente/amostra
3	2	>75 % Materiais renováveis	<25 % Materiais Renováveis
4	4	10 mL de resíduo	600 mL resíduo
5	2	0,6 g de amostra	10 g de amostra
6	3	1 amostra/h	0,1 amostra/h
7	2	4 etapas de preparo (Manual)	6 etapas de preparo ou mais (Manual)
8	4	150 Wh	20000 Wh
9	2	GC-MS	GC-MS
10	3	1 risco (DCM – limpeza de vidraria)	4 ou mais perigos (DCM, Hexano, Pentano, MeOH por períodos prolongados).

O consumo de energia apresenta uma queda significativa. Com o etanol, a maior parte do consumo de energia no preparo da amostra deve-se ao uso de equipamentos de moagem, ao uso da bomba seringa e GC em baixa temperatura durante a extração. O valor de 150 Wh/amostra foi uma estimativa simples. O consumo para o método Soxhlet, por outro lado, é extremamente alto, 20000 Wh ou mais. O valor de 20 kWh parece fora de contexto, no entanto, para este valor estimou-se que uma placa de aquecimento de 1000W foi usada por 72 h a 30 % de sua energia. Também não foi considerado o consumo de energia do exaustor (capela) para evitar vapores de solventes tóxicos ou qualquer outro equipamento. Mesmo que fosse realizada uma análise mais detalhada do consumo energético do método Soxhlet, isso não teria impacto no *score* final, pois a literatura considera valores > 500 Wh como 0 [42]. No nono fator, ambos os métodos requerem GC-MS para informações moleculares detalhadas que a análise geoquímica exige.

O último fator avaliado na métrica é a garantia de procedimentos seguros para o operador. Para o método com etanol, apenas 10 mL de tolueno:hexano (1:1) v/v são usados durante o procedimento de limpeza da coluna após a extração. A Tabela 15 resume os valores aplicados para o cálculo da métrica AGREEPrep. A métrica mostra 7,25 vezes de ganho para o valor

AGREEPrep, indo de 0,04 no método convencional Soxhlet+SARA para 0,29 na extração com etanol (Figura 52).

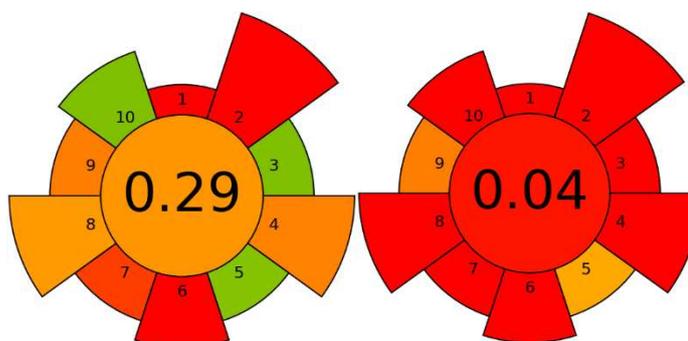


Figura 52: Gráfico AGREEPrep. O centro mostra o score final entre 0 e 1. Ao redor estão os fatores, e seu tamanho reflete o peso considerado no cálculo. Etanol (esquerda), Soxhlet+SARA (direita).

#### 4.5 Conclusões

O procedimento de preparo da amostra foi condensado em uma única etapa de extração, passando de mais de 48 h para cerca de uma hora por amostra. Esse processo simplificado pode levar a menos erros durante o preparo da amostra, pois menos operações unitárias são necessárias. Conseqüentemente, o método com etanol mantém o analista longe dos perigos de solventes tóxicos durante a extração, já que o uso destes é praticamente zerado. Os benefícios da simplificação são mostrados na métrica AGREEPrep, onde o método baseado em etanol pontua 0,29, enquanto o método clássico pontua 0,04.

Como uma visão geral dos resultados geoquímicos, pode-se observar a alta similaridade para as razões calculadas entre Soxhlet+SARA e o método proposto com poucas exceções. Para a maioria das 10 amostras analisadas, as conclusões para as informações geoquímicas podem ser consideradas equivalente.

O método proposto com etanol proporcionou uma abordagem mais rápida e barata na análise de biomarcadores. Esteranos 217 Da apresentaram um perfil muito semelhante quando comparado ao método baseado em Soxhlet. Terpanos 191 Da ficaram abaixo do LOD com extrato a 10 mg/mL. Nas amostras com extratos analisados em concentrações mais elevadas, estes foram detectados e as razões diagnósticas calculadas para extração com etanol e extração Soxhlet mostraram valores comparáveis.

## **CAPÍTULO 5: SPME-ARROW ASSISTIDA A VÁCUO ASSOCIADA À GC-MS NA ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA.**

### **5.1 Introdução**

A microextração em fase sólida (SPME) é, sem dúvida, uma das técnicas de microextração mais bem sucedidas e utilizadas em química analítica. Desde o seu desenvolvimento em 1989, seu uso tem sido constantemente crescente devido à sua facilidade de uso, disponibilidade comercial e automação [44,47]. Assim, associado à sua confiabilidade e repetibilidade, o SPME tem sido aplicado constantemente em alimentos [92–95], ambiental [75,96] e diferentes campos das ciências ômicas [10,97,98].

Nos últimos anos, foi desenvolvido um novo modelo para SPME, denominado SPME-Arrow, que apresenta a mesma geometria da fibra convencional, porém possui maior volume de fase extratora permitindo maior sensibilidade [99]. Enquanto o SPME convencional normalmente mostra medidas de 100  $\mu\text{m}$  x 10 mm, a *arrow* pode ir até 250  $\mu\text{m}$  x 30 mm de fase extratora e apresenta um núcleo de fibra mais espesso, fazendo com que a mesma espessura de recobrimento garanta um maior volume de fase. Além disso, o modelo é totalmente compatível com injetores automáticos já disponíveis. Seu design é muito semelhante à SPME convencional, mas com uma ponta de metal para maior robustez e resistência ao perfurar o septo GC e permite também que a fibra seja completamente fechada enquanto não estiver em uso.

A disponibilidade comercial do SPME-Arrow adicionou uma opção extra para o analista que, ao desenvolver um método, deve fazer escolhas em relação ao tipo de fibra utilizada, fase extratora, imersão direta ou extração via *headspace*, tempo, agitação e temperatura de extração. Esses são apenas alguns parâmetros que precisam ser ajustados para o desenvolvimento do método. A partir de uma ampla gama de aplicações de SPME, a extração via *headspace* é preferível para garantir maior vida útil da fibra, mas também pode ser necessária dependendo das características da amostra como, por exemplo, partículas dissolvidas ou amostras sólidas [47].

A aplicabilidade da SPME em uma amostra depende dos coeficientes multi-equilíbrios de seus analitos. O processo também é altamente dependente da cinética dos analitos, pois compostos com baixa volatilidade apresentam taxas de transferência lentas da amostra para o *headspace*, limitando a praticidade da SPME para analitos semivoláteis [47]. Desde 2012, a introdução de amostras aquosas em recipientes pré-evacuados mostrou melhorar significativamente a extração de compostos [50]. A teoria formulada para amostras aquosas

descreve dois filmes adjacentes entre a fase aquosa (amostra) e gasosa (*headspace*). A redução da pressão aumentaria a transferência de massa de analitos que apresentam uma resistência decorrente da fase gasosa, ou seja, compostos com baixa constante de  $K_H$ , inferior a  $1,2 \times 10^{-5}$  atm m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>. Cita-se que esses compostos têm mais de 95 % de sua taxa de evaporação decorrente da presença da fase gasosa no sistema [49,51]. Assim, a evacuação do *headspace* aceleraria o processo de extração desses compostos. A pressão reduzida no *headspace* também permite o uso de menor temperatura de extração com tempos de extração mais curtos, enquanto menores LOD e LOQ podem ser alcançados pelo melhor desempenho de extração da técnica [100,101].

Neste trabalho descrevemos o uso da SPME-Arrow para extração de PAHs sob condições de pressão reduzida em amostras aquosas, especificamente amostras de água provenientes de estação de tratamento de esgoto. É de interesse a rápida detecção destes analitos devido ao seu potencial nocivo à saúde [102]. Avaliou-se a aplicação do método em amostras de água de esgoto tratada, bem como as figuras de mérito analítico. Aspectos teóricos da técnica sob vácuo também são discutidos com base na extração do naftaleno (Nap – C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>), acenafteno (Ace – C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>), fenantreno (Phe – C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) e fluoranteno (Flu – C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>) em água.

Tabela 16: Principais propriedades físico-químicas dos PAHs alvo. Nap: naftaleno, Ace: acenafteno, Phe: fenantreno, Flu: fluoranteno.

Composto	Massa molar (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Íon (Da)	Pressão de vapor (25 °C, mm Hg)	$K_H$ (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
<b>Nap</b>	128.17	128.00	0.085	$4.4 \times 10^{-4}$
<b>Ace</b>	154.21	153.00	0.00215	$1,84 \times 10^{-4}$
<b>Phe</b>	178.23	178.00	0.000121	$4.23 \times 10^{-5}$
<b>Flu</b>	202.26	202.00	$9.22 \times 10^{-6}$	$8.86 \times 10^{-6}$

## 5.2 Considerações Teóricas

Os aspectos teóricos para a SPME convencional sob pressão atmosférica estão bem estabelecidos e têm sido amplamente discutidos na literatura [49,51,103]. Outras geometrias também foram implementadas em sistemas de pressão reduzida, como microextração em filme fino (TFME, *Thin-film SPME*) e extração agitada em barra sorbente (comercialmente disponível como Twisters™, *stir bar sorbent extraction SBSE*) [100,101]. Cada uma dessas geometrias apresenta vantagens e desvantagens inerentes, mas os princípios teóricos da extração assistida a vácuo permanecem os mesmos.

Considera-se que a extração ocorra em um sistema fechado e que uma transferência de massa dos analitos ocorre em várias etapas. Os analitos sendo principalmente dissolvidos em uma amostra aquosa, dois equilíbrios diferentes ocorrem neste sistema: amostra/fase gasosa e fase gasosa/fibra. A primeira é a etapa de volatilização e a última, a etapa de extração dos analitos do *headspace*. A taxa de transferência de massa depende da matriz, das propriedades dos analitos e da fase de extração, entre outros fatores. A velocidade total da extração é limitada pela etapa mais lenta envolvida na extração, normalmente o equilíbrio amostra/*headspace*. Assim, o equilíbrio entre *headspace*/fibra é considerado rápido.

Como mencionado em trabalhos anteriores, a pressão reduzida no sistema deve afetar apenas a etapa cinética da extração, não desempenhando nenhum papel nos aspectos termodinâmicos do equilíbrio [49,51,103]. Isto considerado, a quantidade total de analito extraído em equilíbrio permanece a mesma, enquanto o vácuo aplicado ao sistema acelera a taxa de transferência dos analitos da amostra para o *headspace*.

A principal propriedade dos analitos utilizados para prever o impacto da pressão reduzida em sua extração é a constante da Lei de Henry ( $K_H$ ). Para descrever o efeito do  $K_H$  na extração, a teoria dos dois filmes foi extensivamente utilizada e discutida. No sistema fechado considerado, formam-se duas interfaces entre os três componentes: amostra líquida, *headspace* e fibra [49]. A etapa de evaporação requer que o analito no volume da amostra passe por dois filmes: filme líquido e filme gasoso. A primeira está associada à amostra líquida e não está sujeita a variações de pressão. O segundo é dependente da pressão e mostra um efeito direto na transferência de massa do analito para o *headspace*. Se um analito apresentar um  $K_H < 1,6 \times 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$  Espera-se que esse analitos apresentem cinética acelerada quando a pressão reduzida é aplicada durante a extração, uma vez que mais de 50 % da taxa de evaporação proveniente da fase gasosa. Se o  $K_H < 1,2 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ , mais de 95 % da resistência à evaporação deve-se a fase gasosa, levando a melhorias mais elevadas quando a pressão do sistema é reduzida. Para analitos com  $K_H > 5 \times 10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ , não são esperadas melhorias significativas durante as extrações a vácuo [49].

A maioria das considerações teóricas passadas foi discutida para o modelo SPME convencional. Recentemente, diferentes geometrias, ou seja, TFME e SBME foram aplicadas em condições de pressão reduzida [100,101]. Essas geometrias proporcionam maiores volumes e distintas relações área/volume de fase do extrator sorvente. A fibra convencional revestida com PDMS  $100 \mu\text{m} \times 10 \text{ mm}$  tem um volume de aproximadamente  $0,6 \mu\text{L}$  [47,99]. Enquanto

isso, as SPME-Arrow apresentam um volume consideravelmente maior devido ao seu comprimento e núcleo maior. A fibra utilizada neste trabalho tinha 100  $\mu\text{m}$  de espessura de filme, 20 mm de comprimento com um núcleo de fibra considerado de 0,4  $\mu\text{m}$ . O volume estimado para a fase extratora é de 5,6  $\mu\text{L}$ , 9 vezes maior que o volume de PDMS contido no SPME convencional.

Uma preocupação com o uso de novas geometrias é a absorção de analitos pela fibra. O equilíbrio constante na fibra é diretamente afetado pela área e volumes do PDMS. Um fator afetado pela relação área de superfície/volume é a constante de absorção do analito pela fibra. A equação é descrita aplicando-se a primeira Lei de Fick:

$$k_u = \frac{D_g A_e}{\delta V_e}$$

*Equação 12: Constante de absorção do analito pela fibra (uptake) pela Lei de Fick.*

$D_g$  é a difusividade molar do analito na fase gasosa;  $A_e$ , área da fase extratora;  $V_e$ , volume da fase extratora e  $\delta$ , a espessura da camada de fronteira entre fibra e *headspace*. A área/volume calculada para o SPME-Arrow (PDMS 100  $\mu\text{m} \times 20$  mm) é 2,4 vezes menor do que a relação para o SPME regular (PDMS 100  $\mu\text{m} \times 10$  mm). Em trabalhos anteriores, SBSE e TFME foram usados para a extração de PAHs e discussões sobre suas geometrias foram feitas. Para o SBSE, os 500  $\mu\text{m}$  de espessura do filme deveriam, e de fato proporcionaram, um tempo maior para atingir o equilíbrio [100,101]. Para a TFME, que apresenta uma relação área-volume comparável à da SPME convencional, os tempos de equilíbrio foram muito mais próximos da SPME. Assim, a TFME proporcionou maiores quantidades de analitos extraídos devido a um volume total de 63,5  $\mu\text{L}$  e área de 5  $\text{cm}^2$  [100]. Assim, considerando a fibra do tipo Arrow, a menor constante de taxa de absorção calculada não deve afetar significativamente a extração. Apenas a quantidade de analitos extraídos deve ser diferente se a quantidade extraída do *headspace* ainda estiver dentro do limite termodinâmico do equilíbrio.

## 5.3 Materiais e métodos

### 5.3.1 Produtos químicos, materiais e amostras

Foram utilizados quatro hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), naftaleno (Nap), acenafteno (Ace), fenantreno (Phe) e fluoranteno (Flu). Todos os PAHs tinham pureza > 99% e foram comprados da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), exceto o Flu, que foi comprado da Agilent (Santa Clara, CA, EUA). Uma solução-estoque de 100  $\text{mg L}^{-1}$  foi preparada com os quatro PAHs diluídos em acetonitrila (grau HPLC). Esta solução foi mantida armazenada no

escuro a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  quando não estava em uso. A solução-estoque foi utilizada para preparar diariamente novas soluções de PAH em água deionizada.

Amostras de água de esgoto da estação de tratamento municipal de Chania, Grécia, foram utilizadas para estudos de recuperação ( $\text{pH} = 7,4$ ; Demanda Química de Oxigênio =  $15\text{ mg L}^{-1}$ ; Sólidos Suspensos Totais =  $4\text{ mg L}^{-1}$ ; Sólidos Dissolvidos Totais =  $468\text{ mg L}^{-1}$ ). A estação atende aproximadamente 70 mil habitantes. Antes do uso, as amostras foram coletadas, filtradas e analisadas para garantir a ausência dos analitos alvo. O efluente filtrado foi armazenado em geladeira quando não estava em uso.

### 5.3.2 Aparatos para Vac-SPME-Arrow

Uma tampa especial de aço inoxidável projetada pela Professora E. Psillakis foi usada para extrações em pressão reduzida. Os detalhes sobre o projeto estão descritos em Yiantzi et. al. [100]. As tampas permanecem justas ao *vial* do tipo *crimp* de 20 mL sem a necessidade de crimpagem. O septo utilizado foi o Thermogreen® LB-1 (Supelco) com orifício de meia altura (6 mm de diâmetro  $\times$  9 mm de comprimento). A Figura 53 descreve o aparelho de extração (I) e algumas das propriedades estruturais da fibra tipo Arrow (II).

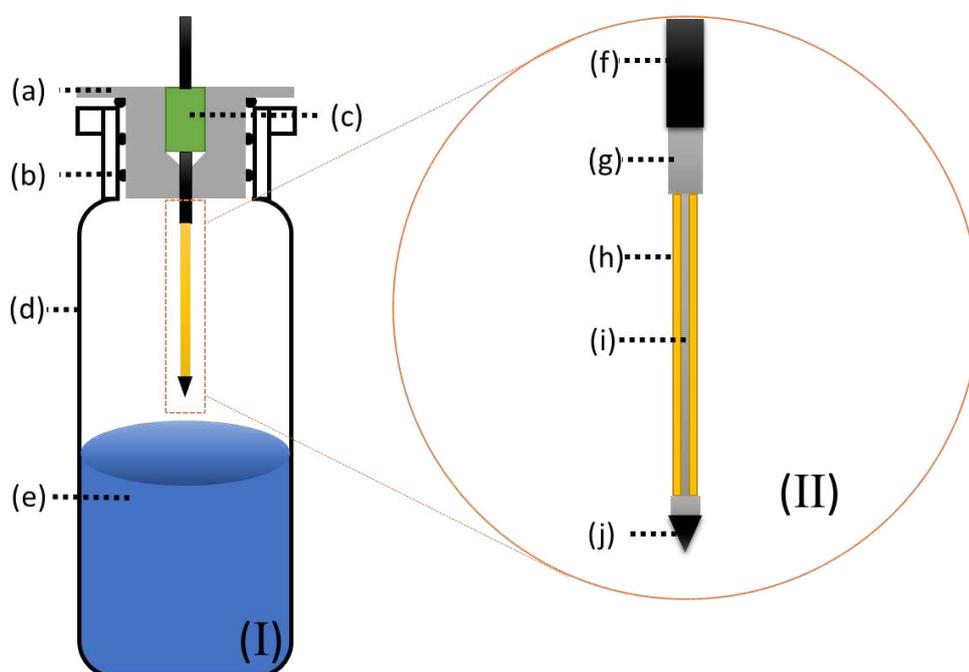


Figura 53: (I) Esquema do aparato utilizado na extração de PAHs em amostras de água. a) Tampa personalizada para extrações a vácuo, b) O-rings posicionados ao redor da tampa, c) septo, d) vial do tipo *crimp* de 20 ml, e) amostra de água contendo PAH. (II) SPME-Arrow exposta para extração. (f) Estrutura do Holder da fibra (g) suporte interno de fibra, (h) fase extratora de PDMS, (i) núcleo interno de aço inoxidável, (j) Flecha na ponta da fibra.

O *headspace* do *vial* foi evacuado por 1 minuto com bomba de vácuo Vacuubrand VP 2 Autovac fabricada pela GmbH & Co KZ (Wertheim, Alemanha) (7 mbar – 0,007 atm). Para essa etapa, uma seringa hipodérmica conectada a ponta da mangueira da bomba de vácuo foi utilizada para perfuração do septo. 10 mL de amostra aquosa dopada foram introduzidos no frasco após a remoção do ar usando uma seringa *gastight* (SGE, Austrália). O tempo de incubação dos *vials* foi ajustado para 10 minutos e a agitação do *vial* no incubador foi testada a 350 e 250 rpm.

Durante os 10 minutos de incubação, o SPME-Arrow foi condicionado a 250 °C para garantir que estivesse completamente limpo antes da extração da amostra. A SPME-Arrow utilizada foi uma Shimadzu PDMS (100 µm × 20 mm × 1,1 mm) e todas as extrações foram realizadas no modo *headspace*. O efeito da temperatura na extração foi testado em condições de vácuo e regular a 30, 40, 50, 60 e 70 °C com 30 minutos de extração. O tempo de extração do perfil foi realizado em 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos a 30, 50 e 70 °C para *Arrow* regular e Vac-SPME-Arrow. Essas 3 temperaturas foram escolhidas para representar condições amenas, regulares e de alta temperatura. Todas as extrações a vácuo e regulares foram conduzidas no amostrador automático Shimadzu AOC 6000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Para a extração regular da SPME-Arrow foram utilizados frascos convencionais de 20 mL (Restek, Bellefonte, EUA).

### 5.3.3 Análise por GC-MS

A análise GC-MS foi realizada utilizando um GC Shimadzu QP2020 acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu QP2050 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Hélio foi utilizado como gás de arraste com vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup> e a coluna utilizada foi a DB5-MS (30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm). A temperatura do forno foi iniciada a 75 °C (por 2 min) até 150 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura foi mantida a 150 °C por 2 minutos seguida de aumento para 240 °C (por 10 min) a 10 °C min<sup>-1</sup>. O injetor estava a 250 °C em modo *splitless*. O espectrômetro de massas foi operado no modo SCAN de 50 a 500 Da a 3,33 Hz com tempo de corte do solvente de 1 minuto. A fonte de íons e a temperatura de interface foram fixadas em 220 e 270 °C, respectivamente. A integração de pico e a linearidade foram avaliadas com o íon mais abundante para cada PAH (Tabela 16). O software utilizado foi o GCMS Postrun Analysis versão 4.52 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O software Microsoft Excel 365 foi utilizado para criação dos gráficos e análises estatísticas.

## 5.4 Resultados e discussões

### 5.4.1 Otimização da velocidade de agitação do vial

350 rpm foi escolhido para experimentos subsequentes devido às áreas de pico mais altas obtidas em testes preliminares como demonstra a Figura 54.

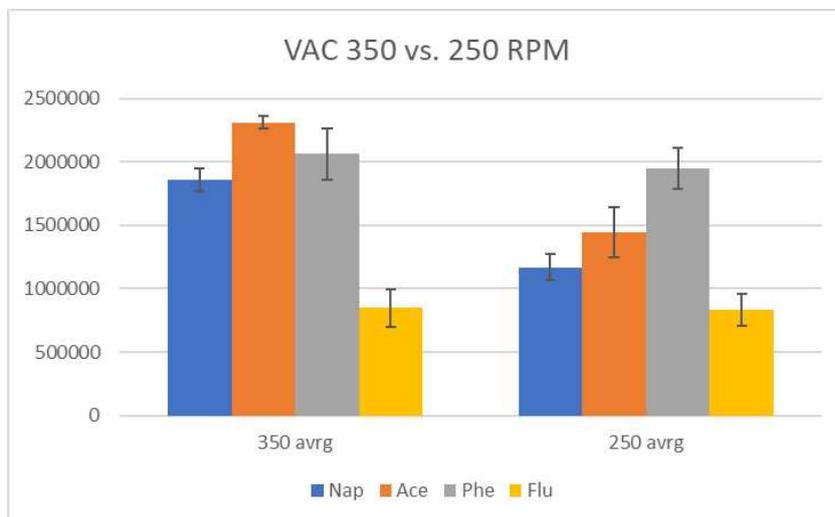


Figura 54: Comparativo entre a velocidade de 350 rpm (esquerda – VAC 350) e 250 rpm (direita – VAC 250) para os 4 PAHs avaliados. Média das triplicatas de cada medida representadas pelas barras 350 avrg e 250 avrg.

### 5.4.2 Perfil da temperatura de extração

Durante o desenvolvimento de um método SPME, a temperatura é um dos fatores mais importantes a serem considerados e estes foram avaliados de 30 °C a 70 °C com 30 minutos de extração. A Figura 2 mostra os resultados obtidos para Vac-SPME-Arrow, bem como SPME-Arrow regular em diferentes condições de temperatura.

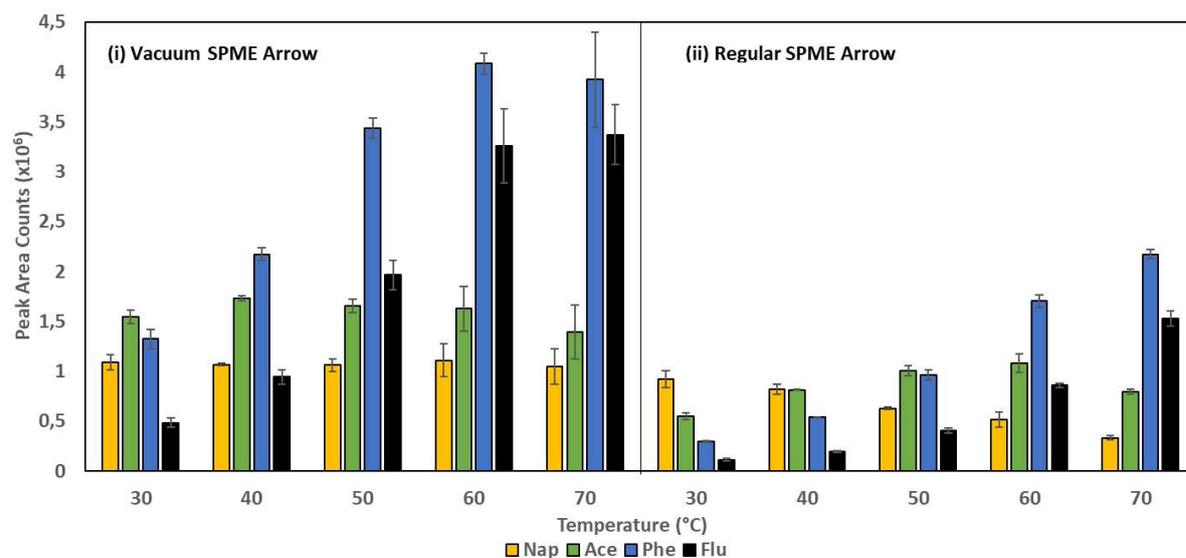


Figura 55: Efeito da temperatura de amostragem na extração de PAHs de amostras aquosas usando Vac-SPME-Arrow (esquerda) e SPME-Arrow regular (direita). Condições experimentais: 10 mL de amostras aquosas dopadas a 5,0 mg L<sup>-1</sup>; 30 min de tempo de amostragem; Velocidade de agitação de 350 rpm. Algumas barras de erro são muito pequenas para serem visíveis em comparação com o tamanho da barra da área de picos.

Como pode ser visto, a Vac-SPME-Arrow fornece áreas totais de pico mais altas para Ace, Phe, e Flu em todas as temperaturas. As áreas de pico para Nap podem ser consideradas as mesmas a 30 °C em condições atmosféricas e de pressão reduzida. Compostos com maiores valores de  $K_H$  não são significativamente afetados por pressões reduzidas, como é o caso de Nap com  $K_H = 4,4 \times 10^{-4}$ , indicando uma resistência a transferência de massa predominantemente na fase líquida. Ace tem um valor de  $K_H$  próximo ao limiar entre a resistência à fase gasosa e à fase líquida. No entanto, sua resistência em fase gasosa próxima a 50 % é suficiente para mostrar melhora significativa na extração sob condições de pressão reduzida. A área de pico de Ace em todas as temperaturas testadas foi maior, com um aumento de 2,8 vezes a 30 °C e 1,6 vezes maior a 50 °C.

Para compostos  $K_H$  mais baixos, o efeito do vácuo é mais pronunciado. Neste caso, Phe e Flu apresentam grande melhora na área total de pico tanto em baixas quanto em altas temperaturas. A evacuação do efeito headspace é mais pronunciada em temperaturas mais baixas. Para a Phe há um aumento de 4,5 vezes na área de pico a 30 °C, e para a Flu a área em 4,3 vezes maior. A 50 °C, Flu atinge uma melhora de 4,8 vezes, praticamente o mesmo que 30 °C, enquanto a Phe cai para 3,6 vezes. A 70 °C, a melhora é próxima de 2,0 para Ace, Phe e Flu. Os valores de melhoria a 70 °C, no entanto, são menores do que a 60 °C, embora apresentem RSDs (desvio padrão relativo) mais altos com áreas de pico ligeiramente menores.

A maior área de pico obtida é a 60 °C para a maioria dos analitos. No entanto, os RSDs a 60 °C e 70 °C são maiores do que a 50 °C e o ganho relativo a 50 °C é maior. Assim, duas abordagens diferentes podem ser seguidas durante o uso da Vac-SPME-Arrow: uma condição branda de extração a 30 °C ou uma área de pico absoluto mais alta a 50 °C visando menores LODs e LOQs. A abordagem em condição branda proporcionou um aumento na área de pico mais de 4 vezes para Phe e Flu, e quase 3 vezes para Ace. A 50 °C o aumento para Flu chega perto de 5 vezes no aumento da área de pico, 3,6 para Phe, e 1,6 para Ace. De forma geral, a temperatura de 50 °C deve proporcionar maior sensibilidade para o método com menor RSD.

Com outra abordagem, comparando as áreas de pico em diferentes temperaturas, a mesma sensibilidade para Flu em SPME-Arrow regular a 70 °C pode ser alcançada entre 40 e 50 °C com Vac-SPME-Arrow. Phe sob pressão reduzida a 40 °C tem a mesma área que a extração regular a 70 °C. Ace mostra uma área de pico mais alta em 30 °C do que em todas as outras temperaturas.

#### 5.4.3 Perfil de tempo de extração

Como demonstrado, as extrações assistidas a vácuo têm o benefício de melhorar a cinética de analitos de baixo  $K_H$ , proporcionando a mesma área de pico em temperaturas mais baixas quando comparadas às condições atmosféricas. Considerando isso, é importante avaliar o tempo de extração necessário para atingir o equilíbrio em um sistema de pressão reduzida. A Figura 3 mostra o perfil do tempo de extração a 30, 50 e 70 °C comparando Vac-SPME-Arrow com SPME-Arrow regular.

Em extrações a 30 °C, o Nap atinge condições de equilíbrio com apenas 5 minutos de extração, que foi o menor tempo de extração testado, tanto para extrações regulares como para Vac-SPME-Arrow. Ace tem uma melhora significativa na cinética de extração em pressão reduzida a 30 °C, atingindo o equilíbrio em 30 minutos, com uma área de pico de aproximadamente  $2,0 \times 10^6$ . Em condições atmosféricas, Ace não atinge o equilíbrio mesmo aos 120 minutos de extração, com uma área de pico próxima a  $1,3 \times 10^6$ . Para Phe e Flu, o equilíbrio não é atingido a 30 °C, mas a melhora na área do pico é significativa com pressão reduzida, com aumento de 7,8 e 8,6 vezes com 30 minutos de extração, respectivamente.

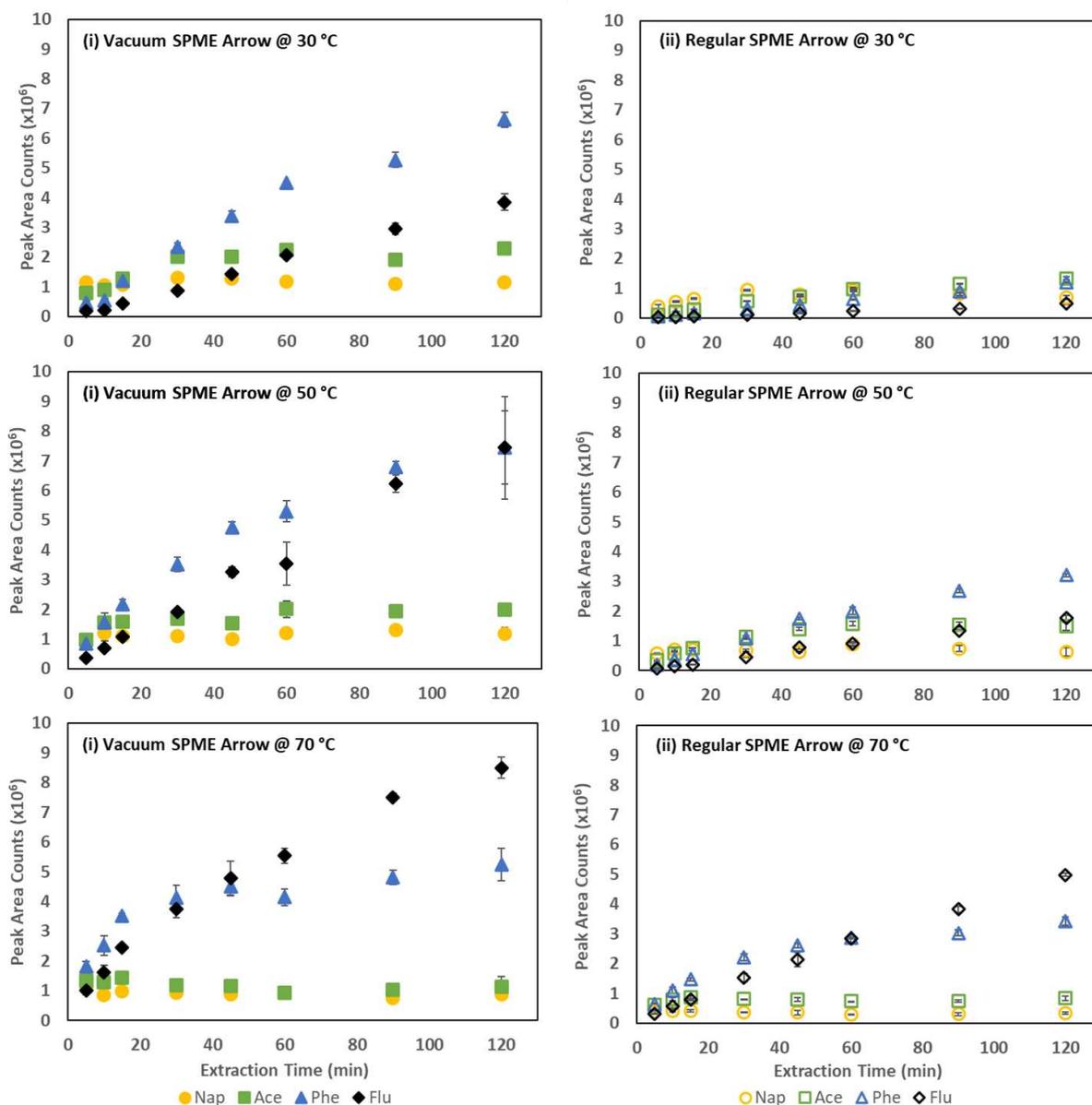


Figura 56: Perfis de tempo de extração para os PAHs obtidos a 30, 50 e 70 °C sob (i) condições de vácuo (símbolos preenchidos - esquerda) e (ii) condições de pressão regular (símbolos abertos - direita). Condições experimentais: 10 mL de amostras aquosas dopadas a 5,0 mg L<sup>-1</sup>; Velocidade de agitação de 350 rpm. Algumas barras de erro são muito pequenas para serem visíveis em comparação com o tamanho físico do símbolo.

A cinética global para todos os compostos é consideravelmente acelerada com o aumento da temperatura de 30 °C para 50 °C. O Nap já está em equilíbrio com apenas 5 minutos de extração em condições regulares e de vácuo. Ace atinge o equilíbrio consideravelmente mais rápido nesta temperatura. Em condições regulares, o equilíbrio é atingido em 60 minutos, enquanto para o vácuo, 10 minutos de extração são suficientes para a área máxima do pico. Para Phe, o equilíbrio não é atingido dentro das 2 horas de extração. Interessante notar, a área total

do pico de Phe a 30 °C e 50 °C é praticamente a mesma. Este aumento de temperatura não melhora significativamente a extração de Phe sob pressão reduzida. Conseqüentemente, a razão de melhoria para Phe é menor a 50 °C, a 3,3 vezes em 30 minutos de extração quando comparada a 30 °C (aumento de 7,8 vezes). As áreas de pico do Flu são consideravelmente mais altas, a 50 °C, mas ainda não atingem o equilíbrio. A melhora do vácuo em relação ao regular é próxima de 4,2 vezes aos 30 minutos de extração, metade da melhora a 30 °C, mas ainda assim um efeito significativo da pressão reduzida aplicada ao sistema.

Considerando o perfil de tempo de extração a 70 °C para Phe, parece que o equilíbrio está sendo atingido em 120 minutos com área de pico de  $3,5 \times 10^6$ . No entanto, o perfil Vac-SPME-Arrow mostra a área do pico para Phe próxima a  $5,0 \times 10^6$  e ligeiramente ascendente aos 120 minutos. Isso indica uma taxa de transferência de massa significativamente mais rápida do analito para a fase gasosa. No entanto, a área total do pico de Phe a 70 °C é menor do que a 50 °C, o que pode indicar uma perda de afinidade pela fase extratora, além de uma taxa de evaporação mais rápida. A área de 120 minutos para Phe em extração regular é próxima de  $3,5 \times 10^6$ , em Vac-SPME-Arrow a mesma área de pico é atingida com apenas 15 minutos de extração, proporcionando uma extração 6 vezes mais rápida para este analito. A mesma melhora é encontrada para Ace a 50 °C; atinge o equilíbrio com Vac-SPME-Arrow aos 10 min de extração, enquanto em condições atmosféricas o equilíbrio ocorre aos 60 minutos.

Para tempo de extração acima de 60 minutos, Ace, Phe e Flu apresentam melhora relativa entre 1,5 e 2,0. As melhorias mais altas são encontradas para tempos de extração mais curtos. Com 15 minutos, melhorias de 1,7, 2,4 e 3,1 são encontradas para Ace, Phe e Flu, respectivamente. A melhora relativa da área do pico a 70 °C, em geral, não é tão expressiva quanto em temperaturas mais baixas de extração, uma vez que a transferência de massa também é melhorada para as condições atmosféricas e os analitos aqui abordados, apesar de características semivoláteis, ainda podem ser considerados de baixa massa molar. Entretanto, vale ressaltar que ainda há melhora e maior sensibilidade pela evacuação do *headspace* antes da introdução da amostra, caso o analito apresente constante de Henry adequada.

#### **5.4.4 Desempenho analítico do método otimizado para Vac-SPME-Arrow e SPME-Arrow convencional**

O desempenho analítico foi avaliado a 30 °C e 50 °C com 30 minutos de tempo de extração. Limites de detecção (LODs), limites de quantificação (LOQs), bem como RSDs, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e repetibilidade foram avaliados para vac-SPME-Arrow e

SPME-Arrow regular. A faixa linear para SPME-Arrow em pressão atmosférica e reduzida foi avaliada de  $10000 \text{ ng L}^{-1}$  até  $40 \text{ ng L}^{-1}$ . A Tabela 2 mostra os valores obtidos para os valores analíticos de mérito a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . A LOD foi calculada considerando a relação sinal-ruído (S/N) de 3 e o LOQ o limiar de S/N de 10 foi considerado se os valores estivessem dentro da faixa de linearidade do método.

Tabela 17: Figuras de mérito analíticas para PAHs alvo usando os métodos Vac-SPME-Arrow e SPME-Arrow regular a 30 °C (n=3) e a 50 °C (n=3). Os ensaios de recuperação foram realizados apenas a 50 °C. A 'Faixa Lin.' Corresponde a faixa linear que foi avaliada para cada PAH em cada método.

Analito	Vac-SPME-Arrow						Reg-SPME-Arrow				
	R <sup>2</sup>	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	RR * %	Faixa Lin.	R <sup>2</sup>	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Faixa Lin.
<b>30 °C</b>											
<b>Nap</b>	0.9996	1119	369	9.6	-----	40-10000	0.9997	329	109	3.7	40-4000
<b>Ace</b>	0.9999	357	118	7.5	-----	40-10000	0.9997	326	108	3.4	40-4000
<b>Phe</b>	0.9991	572	189	7.4	-----	40-4000	0.9988	770	254	12.0	40-4000
<b>Flu</b>	0.9983	225	74	8.8	-----	40-1000	0.9984	2168	716	11.2	400-10000
<b>50 °C</b>											
<b>Nap</b>	0.9998	615	203	9.7	93 (9)	40-10000	0.9999	65	21	1.5	40-4000
<b>Ace</b>	0.9999	373	123	11.7	86 (9)	40-10000	0.9997	341	112	2.9	40-4000
<b>Phe</b>	0.9999	312	103	11.3	99 (12)	40-10000	0.9992	537	177	4.1	40-4000
<b>Flu</b>	0.9988	186	61	9.5	106 (10)	40-1000	0.9986	716	236	8.3	40-10000

\*Concentração do spike: 1000 ng L<sup>-1</sup>.

Vac-SPME-Arrow a 30 °C apresentou coeficientes de determinação variando de 0,9983 a 0,9999, enquanto SPME-Arrow regular apresentou R<sup>2</sup> variando de 0,9987 a 0,9997. Ace em Vac-SPME-Arrow apresentou um R<sup>2</sup> de 0,9999 com RSD de 7,5 %, enquanto SPME-Arrow regular teve um coeficiente de determinação de 0,9997 com 3,4 % RSD. Phe e Flu apresentaram RSD significativamente menores no Vac-SPME-Arrow, passando de 12,0 e 11,2 % para 7,4 e 8,8 %, respectivamente. Essa redução também é acompanhada por uma melhora na faixa de linearidade, LODs e LOQs. A melhora do RSD é explicada por áreas de pico significativamente mais altas mostradas para compostos com valores mais baixos de K<sub>H</sub>, como Phe e Flu. Como esses compostos são extraídos em condições de não-equilíbrio, a aplicação de vácuo no *vial* melhora significativamente as taxas de evaporação.

Os RSDs para extração a pressão reduzida a 50 °C são comparáveis aos encontrados na extração regular, com R<sup>2</sup> variando de 0,9988 a 0,9999 em Vac-SPME-Arrow e 0,9986 a 0,9999 em SPME-Arrow regular. Phe apresentou melhora significativa nos LOD e LOQ, estes ficando cerca de 1,7 vezes menor. A melhoria mais expressiva nos limites de detecção e quantificação foi encontrada para o Flu. A 50 °C o LOD e LOQ é melhorado em cerca de 4 vezes. Entretanto, a 30 °C, a melhora é de praticamente 10 vezes, evidenciando a aplicabilidade da técnica em condições brandas e alto ganho cinético sob pressão reduzida.

As amostras de água de tratamento de esgoto foram fortificadas a 1000 ng L<sup>-1</sup> com todos os 4 PAHs e a recuperação relativa foi calculada com 5 replicatas de extração Vac-SPME-Arrow. Os valores de recuperação variaram de 86 a 106 % com RSD de 9 a 12 % e estão descritos na íntegra na Tabela 17. Sugere-se que o efeito de matriz seja pequeno, uma vez que a maioria dos valores de recuperação para os PAHs se aproxima dos 100 %. Os RSDs são consistentes com os RSDs calculados para a linearidade na mesma temperatura; portanto, dentro da faixa esperada quando a abordagem a vácuo é empregada.

### 5.5 Conclusões

O emprego da Vac-SPME-Arrow apresenta vantagens significativas sobre o SPME-Arrow convencional. Os efeitos de melhorias mais significativos proporcionados pela redução da pressão no *headspace* foram observados em temperaturas mais baixas, com aumento de 8 vezes nas áreas de pico para compostos de baixo K<sub>H</sub> (Phe e Flu) nas extrações a 30 °C e 30 min. Em temperaturas mais altas, 50 e 70 °C, a melhora geral foi menor. No entanto, essa abordagem

deve ser considerada quando os valores de mérito analítico exigem LOD e LOQ mais baixos, por exemplo.

O método Vac-SPME-Arrow desenvolvido foi aplicado a amostras de águas provenientes de uma estação de tratamento de esgoto local. Nap, Ace, Phe e Flu foram analisados quantitativamente e apresentam LODs, LOQs e faixa de linearidade melhores ou comparáveis quando comparados ao SPME-Arrow convencional, exceto para o Nap que apresentou LODs e LOQs significativamente maiores com a utilização de vácuo na extração. As razões para tal ainda são desconhecidas, mas pode-se sugerir pequenas variações na pressão dentro do vial que levam a uma grande flutuação nas áreas de pico para os compostos muito voláteis.

Como demonstrado, o vácuo é uma opção viável e de fácil implementação para extração de compostos semi-voláteis em condições amenas. A melhoria na faixa de linearidade, LODs e LOQs, mostra a clara vantagem de seu emprego na determinação de PAHs em amostras aquosas. No entanto, o ganho significativo de sensibilidade pode ser aplicado não apenas aos PAHs, mas estendido a compostos voláteis em geral e outras matrizes, uma vez que a evacuação do *headspace* proporciona melhores resultados em condições amenas e pode permitir a detectabilidade de compostos não extraídos sob pressão atmosférica.

**REFERÊNCIAS**

- [1] K.E. Peters, C.C. Walters, J.M. Moldowan, K.E. Peters, C.C. Walters, *The biomarker guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History*, 2nd ed., Cambridge, 2005. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [2] K.E. Peters, C.C. Walters, M. Moldowan., *The Biomarker Guide. Biomarkers and isotopes in petroleum exploration and earth history*, Cambridge, New York, 2005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781107326040>.
- [3] P.S. Prata, *Caracterização geoquímica de petróleo por cromatografia gasosa bidimensional abrangente e análise multivariada de dados*, University of Campinas, 2016.
- [4] B.P. Tissot, D.H. Welte, *Petroleum Formation and Occurrence*, 1984. <https://doi.org/10.1029/EO066i037p00643>.
- [5] A.A.C. de Sousa, E.S. Sousa, M.S. Rocha, G.R. Sousa Junior, I.V.A.F. de Souza, A.S. Brito, A.A. Souza, J.A.D. Lopes, A.C.R. Nogueira, S.G. de Lima, Aliphatic and aromatic biomarkers of the Devonian source rocks from the Western Parnaíba Basin Brazil: Pimenteiras Formation, *J. South Am. Earth Sci.* 99 (2020) 102493. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2019.102493>.
- [6] E. da S. Sousa, G.R.S. Júnior, A.F. Silva, F. de A. M. Reis, A.A.C. de Sousa, G.M. Ciocari, R. Capilla, I.V.A.F. de Souza, P.M. Imamura, R. Rodrigues, J.A.D. Lopes, S.G. de Lima, Biomarkers in Cretaceous sedimentary rocks from the Codó Formation - Parnaíba Basin: Paleoenvironmental assessment, *J. South Am. Earth Sci.* 92 (2019) 265–281. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2019.03.025>.
- [7] P.S. Prata, G.L. Alexandrino, N.G.S. Mogollón, F. Augusto, Discriminating Brazilian crude oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and multiway principal component analysis, *J. Chromatogr. A.* 1472 (2016) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.044>.
- [8] G.L. Alexandrino, P.S. Prata, F. Augusto, Discriminating lacustrine and marine organic matter depositional paleoenvironments of Brazilian crude oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography-quadrupole mass spectrometry and supervised

- classification chemometric approaches, *Energy and Fuels*. 31 (2017) 170–178. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b01925>.
- [9] B.J. Pollo, G.L. Alexandrino, F. Augusto, L.W. Hantao, The impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography on oil & gas analysis: Recent advances and applications in petroleum industry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 202–217. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.007>.
- [10] B.J. Pollo, K.L. Romero-Orejón, A.J. Marsaioli, P.T.V. Rosa, F. Augusto, Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry applied to source rock analysis, *Adv. Sample Prep.* 1 (2022) 100001. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2021.100001>.
- [11] J.M. Moldowan, K.E. Peters, C.C. Walters, *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History*, 2005. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [12] Z. Wang, S. a. Stout, M. Fingas, Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification, *Environ. Forensics*. 7 (2006) 105–146. <https://doi.org/10.1080/15275920600667104>.
- [13] G.L. Alexandrino, J. Malmborg, F. Augusto, J.H. Christensen, Investigating weathering in light diesel oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography–High resolution mass spectrometry and pixel-based analysis: Possibilities and limitations, *J. Chromatogr. A*. 1591 (2019) 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.042>.
- [14] S. Killops, V. Killops, *Introduction to Organic Geochemistry*, *Introd. to Org. Geochemistry*. (2005) 30–70. <https://doi.org/10.1002/9781118697214>.
- [15] J.M. Hunt, R.P. Philp, K.A. Kvenvolden, Early developments in petroleum geochemistry, *Org. Geochem.* 33 (2002) 1025–1052. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(02\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(02)00056-6).
- [16] N.G.S. Mogollón, *Caracterização geoquímica orgânica de amostras de óleo bruto por cromatografia gasosa uni e bidimensional*, Universidade Estadual de Campinas, 2015.
- [17] P.S. Prata, *Caracterização geoquímica orgânica de óleos da bacia Sergipe-Alagoas*, Federal University of Sergipe, 2012.

- [18] R. Marzi, B.E. Torkelson, R.K. Olson, A revised carbon preference index, *Org. Geochem.* 20 (1993) 1303–1306. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(93\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0146-6380(93)90016-5).
- [19] B.J. Pollo, *Análise exploratória de biomarcadores em rochas geradoras de óleos e materiais similares por HS-SPME combinada a GCxGC-MS*, University of Campinas, 2019.
- [20] A. Wood, B. Hazra, Characterization of organic-rich shales for petroleum exploration & exploitation: A review-part 2: Geochemistry, thermal maturity, isotopes and biomarkers, 28 (2017) 758–778.
- [21] A. Tewari, S. Dutta, T. Sarkar, Organic geochemical characterization and shale gas potential of the permian barren measures formation, west bokaro sub-basin, eastern India, *J. Pet. Geol.* 39 (2016) 49–60. <https://doi.org/10.1111/jpg.12627>.
- [22] R.S.F. Silva, H.G.M. Aguiar, M.D. Rangel, D.A. Azevedo, F.R. Aquino Neto, Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time of flight mass spectrometry applied to biomarker analysis of oils from Colombia, *Fuel.* 90 (2011) 2694–2699. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.04.026>.
- [23] N.G.S. Mogollón, P.S. Prata, J.Z. dos Reis, E.V. dos S. Neto, F. Augusto, Characterization of crude oil biomarkers using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 3384–3391. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600418>.
- [24] M.R. Mello, P.C. Gaglianone, S.C. Brassell, J.R. Maxwell, Geochemical and biological marker assessment of depositional environments using Brazilian offshore oils, *Mar. Pet. Geol.* (1988). [https://doi.org/10.1016/0264-8172\(88\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0264-8172(88)90002-5).
- [25] H.L.T. Haven, M. Rohmer, J. Rullkötter, P. Bissere, Tetrahymanol, the most likely precursor of gammacerane, occurs ubiquitously in marine sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 53 (1989) 3073–3079. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(89\)90186-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(89)90186-5).
- [26] J.S. Sinninghe Damsté, F. Kenig, M.P. Koopmans, J. Köster, S. Schouten, J.M. Hayes, J.W. de Leeuw, Evidence for gammacerane as an indicator of water column stratification, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 59 (1995) 1895–1900. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(95\)00073-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00073-9).

- [27] K.E. Peters, M.R. Cassa, *Applied Source Rock Geochemistry*, Pet. Syst. Source to Trap AAPG Mem. (1994). <https://doi.org/10.1306/M60585C5>.
- [28] R.P. Philp, *Fossil fuel biomarkers: applications and spectra*, Elsevier Ltd, 1985. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(87\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(87)90138-4).
- [29] A.S. Mackenzie, R.L. Patience, J.R. Maxwell, M. Vandembroucke, B. Durand, Molecular parameters of maturation in the Toarcian shales, Paris Basin, France—I. Changes in the configurations of acyclic isoprenoid alkanes, steranes and triterpanes, *Geochim. Cosmochim. Acta.* (1980). [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(80\)90222-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(80)90222-7).
- [30] J.M. Moldowan, F.J. Fago, R.M.K. Carlson, D.C. Young, G. an Duvne, J. Clardy, M. Schoell, C.T. Pillinger, D.S. Watt, Rearranged hopanes in sediments and petroleum, *Geochim. Cosmochim. Acta.* (1991). [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(91\)90492-N](https://doi.org/10.1016/0016-7037(91)90492-N).
- [31] W.Y. Huang, W.G. Meinschein, Sterols as ecological indicators, *Geochim. Cosmochim. Acta.* (1979). [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(79\)90257-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(79)90257-6).
- [32] P.J. Grantham, The occurrence of unusual C27 and C29 sterane predominances in two types of Oman crude oil, *Org. Geochem.* 9 (1986) 1–10. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(86\)90077-X](https://doi.org/10.1016/0146-6380(86)90077-X).
- [33] G.R. de Souza Junior, *Caracterização geoquímica de betumes das capas carbonáticas do Craton Amazônico, Brasil*, 2017. <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2017.980682>.
- [34] F. Xiao, L. Liu, Z. Zhang, K. Wu, Z. Xu, C. Zhou, Conflicting sterane and aromatic maturity parameters in Neogene light oils, eastern Chepaizi High, Junggar Basin, NW China, *Org. Geochem.* 76 (2014) 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.07.014>.
- [35] A. Steen, Gas chromatographic/mass spectrometric (GC/MS) analysis of C27-30-steranes, *Org. Geochem.* 10 (1986) 1137–1142. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(86\)80055-9](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(86)80055-9).
- [36] H.P. Nytoft, J.A. Bojesen-Koefoed, 17 $\alpha$ ,21 $\alpha$ (H)-hopanes: Natural and synthetic, *Org. Geochem.* 32 (2001) 841–856. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(01\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(01)00028-6).
- [37] P. Farrimond, J.C. Bevan, A.N. Bishop, Hopanoid hydrocarbon maturation by an igneous intrusion, *Org. Geochem.* 25 (1996) 149–164. <https://doi.org/10.1016/S0146->

- 6380(96)00128-3.
- [38] E.J. Milani, J.A.S.L. Brandão, P. V. Zalán, L.A.P. Gamboa, Petróleo na margem continental Brasileira: Geologia, exploração, resultados e perspectivas, *Rev. Bras. Geofis.* 18 (2000) 351–396. <https://doi.org/10.1590/S0102-261X2000000300012>.
- [39] A.M. Kharrat, J. Zacharia, V.J. Cherian, A. Anyatonwu, Issues with comparing SARA methodologies, *Energy and Fuels.* 21 (2007) 3618–3621. <https://doi.org/10.1021/ef700393a>.
- [40] W.F.M. Röling, I.M. Head, S.R. Larter, The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: Perspectives and prospects, *Res. Microbiol.* 154 (2003) 321–328. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00086-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00086-X).
- [41] J. Beens, The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 260–275. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00205-8).
- [42] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 149 (2022) 116553. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.
- [43] R. Morales, L.A. Sarabia, M.S. Sánchez, M.C. Ortiz, Experimental design for the optimization of the derivatization reaction in determining chlorophenols and chloroanisoles by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1296 (2013) 179–195. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.038>.
- [44] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- [45] A.L.P. Valente, F. Augusto, Microextração por fase sólida, *Quim. Nova.* 23 (2000) 523–530. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400016>.
- [46] H. Lord, J. Pawliszyn, Microextraction of drugs, *J. Chromatogr. A.* 902 (2000) 17–63. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00836-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00836-0).
- [47] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 2012.

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00003-6>.
- [48] J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction: theory and practice*, Wiley, 1997.
- [49] E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review, *Anal. Chim. Acta.* 986 (2017) 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.033>.
- [50] E. Psillakis, E. Yiantzi, L. Sanchez-Prado, N. Kalogerakis, Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Improved extraction of semivolatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions, *Anal. Chim. Acta.* 742 (2012) 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.019>.
- [51] E. Psillakis, A. Mousouraki, E. Yiantzi, N. Kalogerakis, Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1244 (2012) 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.006>.
- [52] M. Plaza, C. Turner, Pressurized Hot Water Extraction of Bioactives, *Compr. Anal. Chem.* 76 (2015) 53–82. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.12.005>.
- [53] C.C. Teo, S.N. Tan, J.W.H. Yong, C.S. Hew, E.S. Ong, Pressurized hot water extraction (PHWE), *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2484–2494. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.050>.
- [54] M. Plaza, M.L. Marina, Pressurized hot water extraction of bioactives, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 166 (2023) 117201. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117201>.
- [55] J. Kronholm, K. Hartonen, M.L. Riekkola, Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 396–412. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.03.004>.
- [56] M. Castro-Puyana, M.L. Marina, M. Plaza, Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 5 (2017) 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2017.03.009>.
- [57] L.M. Rossi, J.M.R. Gallo, L.H.C. Mattoso, M.S. Buckeridge, P. Licence, D.T. Allen, Ethanol from Sugarcane and the Brazilian Biomass-Based Energy and Chemicals Sector, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9 (2021) 4293–4295. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01678>.

- [58] Y. Marcus, Extraction by Subcritical and Supercritical Water , Methanol , Ethanol and Their Mixtures, (2018). <https://doi.org/10.3390/separations5010004>.
- [59] F.A. Semysim, B.K. Hussain, M.A. Hussien, E.A. Azooz, D. Snigur, Assessing the Greenness and Environmental Friendliness of Analytical Methods: Modern Approaches and Recent Computational Programs, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 0 (2024) 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408347.2024.2304552>.
- [60] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [61] L.H. Keith, L.U. Gron, J.L. Young, Green analytical methodologies, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2695–2708. <https://doi.org/10.1021/cr068359e>.
- [62] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.
- [63] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski, Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software, *Green Chem.* 23 (2021) 8657–8665. <https://doi.org/10.1039/d1gc02318g>.
- [64] L.P. Kowtharapu, N.K. Katari, S.K. Muchakayala, V.M. Mariseti, Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 166 (2023) 117196. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117196>.
- [65] G.L. Alexandrino, G. Tomasi, P.G.M. Kienhuis, F. Augusto, J.H. Christensen, Forensic Investigations of Diesel Oil Spills in the Environment Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry and Chemometrics: New Perspectives in the Absence of Recalcitrant Biomarkers, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 550–559. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05238>.
- [66] D. Doehlert, Uniform Shell Designs, *J. R. Stat. Soc.* 19 (1970) 231–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2346327>.
- [67] S.L.C. Ferreira, W.N.L. Dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review, *Talanta.* 63

- (2004) 1061–1067. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.01.015>.
- [68] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*. 76 (2008) 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
- [69] Y. Zhou, Q. Jiang, Q. Peng, D. Xuan, W. Qu, Development of a solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of pentachlorophenol in human plasma using experimental design, *Chemosphere*. 70 (2007) 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.029>.
- [70] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection, *J. Chromatogr. A*. 844 (1999) 425–432. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00393-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00393-3).
- [71] M.J. Trujillo-Rodríguez, V. Pino, E. Psillakis, J.L. Anderson, J.H. Ayala, E. Yiantzi, A.M. Afonso, Vacuum-assisted headspace-solid phase microextraction for determining volatile free fatty acids and phenols. Investigations on the effect of pressure on competitive adsorption phenomena in a multicomponent system, *Anal. Chim. Acta*. 962 (2017) 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.056>.
- [72] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta*. 597 (2007) 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
- [73] M. Goryl, L. Marynowski, J.J. Brocks, I. Bobrovskiy, A. Derkowski, Exceptional preservation of hopanoid and steroid biomarkers in Ediacaran sedimentary rocks of the East European Craton, *Precambrian Res.* 316 (2018) 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2018.07.026>.
- [74] A.O. Barakat, A.R. Mostafa, J. Rullkötter, A. Hegazi, Application of a multimolecular marker approach to fingerprint petroleum pollution in the marine environment, *Mar. Pollut. Bull.* 38 (1999) 535–544. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00110-6).
- [75] E. Yiantzi, N. Kalogerakis, E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace solid phase

- microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples, *Anal. Chim. Acta.* 890 (2015) 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.047>.
- [76] M. Plaza, C. Turner, Pressurized hot water extraction of bioactives, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>.
- [77] A. Mostafa, T. Górecki, Development and Design of a Single-Stage Cryogenic Modulator for Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5414–5423. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00767>.
- [78] M. Edwards, A. Mostafa, T. Górecki, Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2335–2349. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5100-6>.
- [79] L. Mondello, *Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011. <https://doi.org/10.1002/9781118003466>.
- [80] J.C. Giddings, Transport, space, entropy, diffusion and flow. Elements underlying separation by electrophoresis, chromatography, field-flow fractionation and related methods, *J. Chromatogr. A.* (1987). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)94097-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94097-X).
- [81] P.J. Marriott, S.-T. Chin, B. Maikhunthod, H.-G. Schmarr, S. Bieri, Multidimensional gas chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.10.013>.
- [82] L.L.P. Van Stee, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, Comprehensive two-dimensional gas chromatography with atomic emission detection and correlation with mass spectrometric detection: Principles and application in petrochemical analysis, *J. Chromatogr. A.* 1019 (2003) 89–99. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01301-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01301-3).
- [83] L. Mondello, A.C. Lewis, K.D. Bartle, *Multidimensional gas chromatography*, 2002. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.022>.
- [84] N.G.S. Mogollon, F.A. de L. Ribeiro, M.M. Lopez, L.W. Hantao, R.J. Poppi, F. Augusto, Quantitative analysis of biodiesel in blends of biodiesel and conventional diesel by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate curve resolution, *Anal. Chim. Acta.* 796 (2013) 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.071>.

- [85] A.K. Huba, P.R. Gardinali, Characterization of a crude oil weathering series by ultrahigh-resolution mass spectrometry using multiple ionization modes, *Sci. Total Environ.* 563–564 (2016) 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.233>.
- [86] B.J. Pollo, C.A. Teixeira, J.R. Belinato, M.F. Furlan, I.C. de M. Cunha, C.R. Vaz, G.V. Volpato, F. Augusto, Chemometrics, Comprehensive Two-Dimensional gas chromatography and “omics” sciences: Basic tools and recent applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 134 (2021) 116111. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116111>.
- [87] M.N. Islam, Y.T. Jo, Y.J. Jeong, J.H. Park, Remediation approach for organic compounds and arsenic co-contaminated soil using the pressurized hot water extraction process, *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 40 (2019) 125–131. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1380713>.
- [88] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Pressurized hot water extraction coupled to solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, *J. Chromatogr. A.* 1196–1197 (2008) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.006>.
- [89] E.. Bray, E.. Evans, Distribution of n-paraffins as a clue to recognition of source beds, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 22 (1961) 2–15. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(61\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(61)90069-2).
- [90] E.. Scalan, J.. Smith, An improved measure of the odd-even predominance in the normal alkanes of sediment extracts and petroleum, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 34 (1970) 611–620. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(70\)90019-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(70)90019-0).
- [91] W.K. Seifert, J.M. Moldowan, The effect of thermal stress on source-rock quality as measured by hopane stereochemistry, *Phys. Chem. Earth.* 12 (1980) 229–237. [https://doi.org/10.1016/0079-1946\(79\)90107-1](https://doi.org/10.1016/0079-1946(79)90107-1).
- [92] L.F. de Oliveira, S.C.G.N. Braga, F. Augusto, R.J. Poppi, Correlating comprehensive two-dimensional gas chromatography volatile profiles of chocolate with sensory analysis, *Brazilian J. Anal. Chem.* 8 (2021) 131–140. <https://doi.org/10.30744/BRJAC.2179-3425.AR-23-2021>.
- [93] N.E. Song, J.Y. Lee, Y.Y. Lee, J.D. Park, H.W. Jang, Comparison of headspace–SPME

- and SPME-Arrow-GC-MS methods for the determination of volatile compounds in Korean salt-fermented fish sauce, *Appl. Biol. Chem.* 62 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0424-6>.
- [94] N. Delbecque, S. Mascrez, E. Psillakis, G. Purcaro, Sub-ambient temperature sampling of fish volatiles using vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Theoretical considerations and proof of concept, *Anal. Chim. Acta.* 1192 (2022) 339365. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339365>.
- [95] S. Mascrez, E. Psillakis, G. Purcaro, A multifaceted investigation on the effect of vacuum on the headspace solid-phase microextraction of extra-virgin olive oil, *Anal. Chim. Acta.* 1103 (2020) 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.053>.
- [96] M.L. Glykioti, E. Yiantzi, E. Psillakis, Room temperature determination of earthy-musty odor compounds in water using vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction, *Anal. Methods.* 8 (2016) 8065–8071. <https://doi.org/10.1039/c6ay02210c>.
- [97] A. Fujimoto, F. Augusto, T.P. Fill, R.K. Moretto, K.C. Kupper, Biocontrol of *Phyllosticta citricarpa* by *Bacillus* spp.: biological and chemical aspects of the microbial interaction, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2022) 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03214-z>.
- [98] J.R. Belinato, V.R. Acquaro, L.T. Dias Cappelini, F. Augusto, New prospects and problems in sample preparation methods for microbiome analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 143 (2021) 116356. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116356>.
- [99] A. Kremser, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, PAL SPME Arrow - Evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 943–952. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9187-z>.
- [100] E. Yiantzi, K. Murtada, K. Terzidis, J. Pawliszyn, E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace thin-film microextraction: Theoretical formulation and method optimization for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *Anal. Chim. Acta.* 1189 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339217>.
- [101] N. Solomou, C. Bicchi, B. Sgorbini, E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace sorptive extraction: Theoretical considerations and proof-of-concept extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *Anal. Chim. Acta.* 1096 (2020) 100–107.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.050>.

- [102] S.J. Sun, Z. Bin Zhao, B. Li, L.X. Ma, D.L. Fu, X.Z. Sun, S. Thapa, J.M. Shen, H. Qi, Y.N. Wu, Occurrence, composition profiles and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in municipal sewage sludge in China, *Environ. Pollut.* 245 (2019) 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.067>.
- [103] E. Psillakis, The effect of vacuum: an emerging experimental parameter to consider during headspace microextraction sampling, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 5989–5997. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02738-x>.