



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUISE CARVALHO DIAS

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO
GC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE MARCADORES
NITROGENADOS EM PETRÓLEO**

Salvador - BA
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUISE CARVALHO DIAS

**DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO
GC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE MARCADORES
NITROGENADOS EM PETRÓLEO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestra em
Química

Profa. Dra. Maria Elisabete Machado
Orientadora

Salvador – BA
2020





TERMO DE APROVAÇÃO

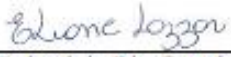
LUISE CARVALHO DIAS


"DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO GC-MS/
MS PARA A DETERMINAÇÃO DE MARCADORES NITROGENADOS
EM PETRÓLEO"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr.ª Maria Elisabete Machado 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (UFRGS)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr.ª Eliane Lazzari 
Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Universidade de Liège - Bélgica

Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz 
Doutorado em Geologia Geoquímica do Meio Ambiente, Université Louis Pasteur de Strasbourg
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 06 de janeiro de 2021.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

D541 Dias, Luise Carvalho

Desenvolvimento, validação e aplicação de método GC-MS/MS para a determinação de marcadores nitrogenados em petróleo – Salvador, 2021.

136.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Elisabete Machado

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química, 2021.

1. Química Analítica. 2. GC-MS/MS. 3. Petróleo. 4. Análise Quantitativa. I. Machado, Maria Elisabete. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 543.631

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde, sustento e fonte de todas as graças para que eu cumprisse mais esta etapa importante em minha vida.

Sou grata a várias pessoas que de modo direto ou indireto contribuíram e me apoiaram para que eu chegasse até aqui. Obrigada aos familiares, amigos e colegas da universidade, em especial, citarei alguns nomes.

Aos meus amados pais Getúlio e Luciene, por todo amor, carinho, cuidado, incentivo, motivação, paciência, compreensão e ajuda para realização desta etapa e em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada!

A minha Orientadora, Maria Elisabete Machado, pelo conhecimento, ensino, incentivo, correções, dedicação, atenção, paciência e confiança depositada em mim. Obrigada pela motivação, crescimento profissional e amizade durante todo este processo.

Ao professor Sérgio Luis Costa Ferreira que sempre me incentivou ao conhecimento e ao progresso profissional. Sou grata pelo ensino, amizade e por ter aberto as portas do laboratório me apresentando a pesquisa.

A Welderson, por estar ao meu lado, me apoiando durante esta trajetória. Obrigada pela paciência, incentivo, amor e carinho.

Ao LEPETRO e toda a equipe de Professores, Coordenadores, Técnicos e profissionais de apoio por terem me proporcionado a estrutura e o ambiente necessário ao desenvolvimento do meu trabalho. Em especial, Regina pelo apoio durante o uso do cromatógrafo, Liliane, Carol, Juci e todo o corpo técnico pela assistência prestada durante a realização da pesquisa no laboratório. Agradeço a Sara e Karina pelo apoio profissional, permitindo o desenvolvimento deste projeto e ao Professor Antônio Fernando pelas contribuições.

Ao Grupo de Pesquisa em Cromatografia (GPC) pela promoção de um ambiente de cooperação, profissionalismo e aprendizado. Ao meu colega Fábio, pela convivência, troca de informações e colaboração durante este período de desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Núcleo de Processamento Primário e Reúso da Água Produzida e Resíduos (NUPPRAR) pelo fornecimento das amostras de petróleo utilizadas neste trabalho.

Agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Agência Nacional do Petróleo e a Royal Dutch Shell pelo investimento financeiro.

A Universidade Federal da Bahia, ao Instituto de Química e a todos os Professores que contribuíram para a minha formação.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho e para que eu cumprisse mais esta etapa, minha sincera gratidão!

RESUMO

Compostos nitrogenados (N-compostos) constituem uma pequena fração da composição química do petróleo (0,1 a 2,0%) e estão presentes principalmente em estruturas aromáticas e heterocíclicas, classificadas em dois grupos: básicos (piridinas, quinolinas e benzoquinolinas) e neutros (indóis, carbazóis e benzocarbazóis). Carbazóis e seu análogos alquilados e benzocarbazóis são empregados como marcadores geoquímicos (N-marcadores) e podem fornecer informações sobre origem, migração, ambiente deposicional e maturidade do petróleo. A determinação de N-marcadores convencionalmente é realizada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) após etapas de pré-fractionamento de amostra associados a um posterior fractionamento direcionado para separar os nitrogenados básicos e neutros. Neste trabalho foi desenvolvido, validado e aplicado, pela primeira vez, um método analítico empregando a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (GC-MS/MS) para N-marcadores. Amostras de petróleo coletadas em oito pontos da Bacia Potiguar foram analisadas sem etapa prévia de fractionamento e os seguintes N-marcadores foram determinados: carbazol, 1-metilcarbazol, 2-metilcarbazol, 9-metilcarbazol, 1,8-dimetilcarbazol, 2,7-dimetilcarbazol, 3,6-dimetilcarbazol, 3-etilcarbazol, 1,4,8-trimetilcarbazol, benzo[a]carbazol, benzo[b]carbazol, benzo[c]carbazol e dibenzocarbazol. O método GC-MS/MS no modo MRM, apresentou LOQ 7,71 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 389,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOD 2,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 95,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ com valores de coeficiente de determinação superiores a 0,98. Os ensaios de precisão resultaram em desvio padrão relativo inferiores de 20%. Recuperações entre 78,63% e 117,34% foram obtidas. Nas amostras, os resultados das concentrações referentes aos N-marcadores variaram de $0,29 \pm 0,01 \text{ ug g}^{-1}$ para benzo[c]carbazol na P6 a $59,74 \pm 0,35 \text{ ug g}^{-1}$ para 1,8-dimetilcarbazol na P1. O emprego da Análise de Componentes Principais (PCA) permitiu diferenciar amostras de ambiente lacustre e amostras de ambiente marinho. Por fim, razões diagnósticas baseadas em gráficos de correlação de acordo com os dados da avaliação quantitativa permitiram avaliar o ambiente de deposição e maturidade.

Palavras-chave: marcadores nitrogenados; GC-MS/MS; petróleo; análise quantitativa

ABSTRACT

Nitrogen compounds (N-compounds) are a small fraction chemical composition of oil (0,1 to 2,0%) and are present mainly as aromatic and heterocyclic structures, classified in two groups: basic (pyridines, quinolines and benzoquinolines) and neutral (indoles, carbazoles and benzocarbazoles). Carbazoles their alkylated analogues and benzocarbazoles are used as geochemical markers (N-markers) providing information about origin, migration, depositional environment and oil maturity. The determination of N-markers is conventionally performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) after sample pre-fractionation steps associated with a directed fractionation to separate the neutral from the basic nitrogen compounds. In this work, an analytical method was developed, validated and applied for the first time using gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS) for N-markers. Petroleum samples collected at eight points in the Potiguar Basin were analyzed without fractionation steps being the following N-markers determined: carbazole, 1-methylcarbazole, 2-methylcarbazole, 9-methylcarbazole, 1,8-dimethylcarbazole, 2,7-dimethylcarbazole, 3,6-dimethylcarbazole, 3-ethylcarbazole, 1,4,8-trimethylcarbazole, benzo[a]carbazole, benzo[b]carbazole, benzo[c]carbazole and dibenzocarbazole. The GC-MS/MS method in MRM mode, presented LOQ from 7,71 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 389,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ and LOD from 2,54 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 95,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ with determination coefficient values greater than 0,98. The precision tests resulted in relative standard deviation less than 20%. Recoveries between 78,63% and 117,34% were obtained. In the samples, the results obtained for the N-markers ranged from $0,29 \pm 0,01 \text{ ug g}^{-1}$ to benzo[c]carbazole in P6 and $59,74 \pm 0,35 \text{ ug g}^{-1}$ for 1,8-dimethylcarbazole in P1. The use of Principal Component Analysis (PCA) made it possible to differentiate samples from the lake environment and samples from the marine environment. Finally, diagnostic reasons based on correlation graphs according evaluation data of the quantitative assessment allowed to assess the environment of deposition and maturity.

Keywords: nitrogen markers; GC-MS/MS; petroleum; quantitative analyze

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico representativo da composição elementar do óleo cru	23
Figura 2 - Estruturas químicas de compostos nitrogenados básicos e neutros utilizados como marcadores geoquímicos de petróleo	25
Figura 3 - Esquema ilustrando as partes que compõem o analisador triplo quadrupolo	42
Figura 4 - Esquema representativo para o modo de operação de íons produtos	43
Figura 5 - Esquema representativo para o modo de operação varredura do íon precursor	44
Figura 6 - Esquema representativo para o modo de operação varredura da constante perda de fragmentos neutros	44
Figura 7 - Esquema representativo para o modo de operação monitoramento seletivo de reações (SRM)	45
Figura 8 - Esquema representativo para o modo de operação monitoramento de reações múltiplas (MRM)	46
Figura 9 - Esquema representativo para o modo de operação varredura de íons totais (SCAN)	47
Figura 10 - Esquema representativo para o modo de operação monitoramento de íon seletivo (SIM).	47
Figura 11 - Localização da Bacia Potiguar: (a) Localização da Bacia Potiguar no mapa do Brasil e (b) ampliação mostrando a região da Bacia).	49
Figura 12 - Imagem do instrumento GC-MS/MS utilizado neste trabalho indicando as partes principais	55
Figura 13 - Cromatograma no modo SCAN para o mix contendo os 13 padrões de compostos nitrogenados ($1000\mu\text{g L}^{-1}$).....	69
Figura 14 - Ilustração da interação entre grupo SiOH presente na fase estacionária da coluna cromatográfica com o carbazol e o metilcarbazol	69
Figura 15 - Cromatograma no modo SCAN – (EIC = m/z 167 + m/z 181) para comparação entre injeções de padrões individuais e mix de N-marcadores no modo SCAN	71
Figura 16 - Cromatograma mix de nitrogenados - modo SIM ($250\mu\text{g L}^{-1}$)	73

Figura 17 - Espectro de massas referente ao (a) dimetilcarbazol e ao (b) etilcarbazol.	74
Figura 18 - Etapas de avaliação no modo PIS: (a) Escolha dos íons precursor e produtos. (b) Tabela: Energia de Colisão (eV) empregada nas análises PIS e abundancia dos íons produtos (m/z 152) e (m/z 127).....	75
Figura 19 - Gráficos de Energia de colisão (eV) em função da abundância do íon produzido (%).	76
Figura 20 - Cromatograma no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) para o mix contendo os 13 padrões de compostos nitrogenados diluídos no branco da matriz [1] a [13] (1000 µg L ⁻¹), PI (500 µg L ⁻¹).	80
Figura 21 - Comparação entre cromatogramas no modo (a) SCAN, (b) SIM e (c) MRM mostrando a separação dos picos [1] e [2]	83
Figura 22 - Cromatogramas MRM: [a], [c], [e], [g], [i], [l], [n] ; SIM: [b], [d], [f], [h], [j], [m] e [o] para a amostra P1 contendo com adição de 500 µg L ⁻¹ da solução mix de nitrogenados.....	86
Figura 23 - Exemplo do método usado para avaliar a relação sinal ruído (S/N). Comparação obtida para a amostra P1 com adição do mix dos padrões a 500 ug L ⁻¹ (a) MRM e (b) SIM	87
Figura 24 - Cromatograma MRM com a transição primaria (em preto) e transição secundaria (em azul) para a janela de eluição dos C3-carbazol para a amostra de petróleo.	90
Figura 25 - Curvas de calibração em solvente (azul) e matriz (vermelho)	95
Figura 26 - Curvas de calibração utilizadas para a quantificação dos treze N-compostos em estudo	98
Figura 27 - Distribuição das concentrações (µg g ⁻¹) dos N-marcadores nas amostras de petróleo (P1 a P8) da Bacia Potiguar	105
Figura 28 - Distribuição das concentrações (µg g ⁻¹) para (a) Σ C ₂ -Carbazóis e (b) 2,7-;3,6-; 1,8-dimetilcarbazol e 3-etilcarbazol nas amostras de P1 a P8 de petróleo da Bacia Potiguar	107
Figura 29 - Distribuição das concentrações (µg g ⁻¹) para benzocarbazóis nas amostras de petróleo (P1 a P8) da Bacia Potiguar	107
Figura 30 - Distribuição das concentrações (µg g ⁻¹) para 1,4,8-trimetilcarbazol nas amostras de P1 a P8.....	108

Figura 31 - Gráfico de <i>scores</i> PC1XPC2 para avaliação de N-marcadores para as amostras P1 a P8.....	110
Figura 32 - Gráfico <i>loadings</i> PC1 X PC2 para avaliação de N-marcadores para as oito amostras de petróleo.....	110
Figura 33 - Correlação entre benzo[a]carbazol/benzo[c]carbazol <i>versus</i> Σ benzocarbazóis para as oito amostras de petróleo da bacia Potiguar.....	113
Figura 34 - Correlações indicativas de maturidade térmica: (a) B[a]C/B[a]C+B[c]C <i>versus</i> C29S/S+R, (b) B[a]C/B[c]C <i>versus</i> Ts/Ts+Tm (c) Σ benzocarbazóis <i>versus</i> Ts/Ts+Tm (d) B[a]C/B[a]C+B[c]C <i>versus</i> Ts/Ts+Tm (e) C1/C3 <i>versus</i> Ts/TS+Tm (f) 1,8-DMC/1-MC <i>versus</i> Ts/Ts+Tm e (g) 1,8-DMC/CA <i>versus</i> Ts/Ts+Tm	115
Figura 35 - Correlações indicativas de paliomambiente (a) B[a]C/B[a]C+B[c]C <i>versus</i> P/F e (b) B[a]C/B[c]C <i>versus</i> P/F	117
Figura A - Análise SCAN do branco do sistema.....	134
Figura B - Análises MRM do branco do solvente diclorometano.....	134
Figura C - Cromatograma de transições totais referente ao branco da matriz análise MRM.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Razões diagnósticas de N-compostos encontradas na literatura e suas associações com origem, maturidade, ambiente deposicional e migração	26
Tabela 2 - Colunas utilizadas em cromatografia a gás para a determinação de marcadores de nitrogênio pirrólico em petróleo	33
Tabela 3 - Faixa de concentração de N-marcadores em amostras de petróleo descritas na literatura.	35
Tabela 4 - Coeluições de N-marcadores em amostras petroquímicas por GC-MS. .	38
Tabela 5 - Especificação dos padrões empregados no estudo qualitativo e quantitativo de N-marcadores em petróleo	51
Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos otimizados para análise dos marcadores nitrogenados.....	59
Tabela 7 - Parâmetros experimentais otimizados para análise dos marcadores nitrogenados por GC-MS/MS no modo SIM.....	60
Tabela 8 - Resultados das análises de nitrogênio total (%) para as oito amostras de óleo cru P1 a P8.....	67
Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos otimizados no modo SIM para a determinação dos compostos nitrogenados estudados e padrão interno	72
Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos otimizados no modo MRM para a determinação dos treze compostos nitrogenados em estudado	79
Tabela 11 - Avaliação da resolução entre picos adjacentes para o modo SCAN. ..	81
Tabela 12 - Valores de S/N calculados para o monitoramento seletivo de íons (SIM) e para o monitoramento de reações múltiplas (MRM) para os marcadores nitrogenados na amostra de petróleo P1	88
Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas utilizando matriz e solvente e resultados do efeito de matriz	92

Tabela 14 - Parâmetros obtidos da faixa linear e coeficiente de correlação (R^2) através da curva de calibração para os padrões dos marcadores nitrogenados por GC-MS/MS no modo MRM.....	97
Tabela 15 - Valores de LOD e LOQ obtidos para os marcadores estudados por GC-MS/MS	99
Tabela 16 - Resultados dos ensaios de recuperação e precisão (intra-dia e inter-dia) do método GMS/MS no modo MRM para os N-marcadores estudados	101
Tabela 17 - Concentração dos N-marcadores em $\mu\text{g g}^{-1}$ nas oito amostras de petróleo da bacia Potiguar por GC-MS/MS (MRM)	103
Tabela 18 - Razões diagnósticas para os N-marcadores presentes nas amostras de óleo cru P1 a P8 da Bacia Potiguar.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AED** Detector de Emissão Atômica (do inglês, *Atomic Emission Detector*)
- API** Instituto de Petróleo Americano (do inglês, *American Petroleum Institute*)
- B[a]C** Benzo[a]carbazol
- B[b]C** Benzo[b]carbazol
- B[c]C** Benzo[c]carbazol
- CA** Carbazol
- C29S/S+R** Razão de estereoisômeros R e S do esterano
- CV** Coeficiente de Variação
- DMC** Dimetilcarbazol
- EC** Etilcarbazol
- EIC** Cromatograma íon extraído (*Extracted Ion Chromatogram – EIC*)
- EM** Efeito de Matriz
- Eq** Equação
- GC** Cromatografia a gás (do inglês, *Gas Chromatography*)
- GC×GC** Cromatografia bidimensional abrangente (do inglês, *comprehensive two-dimensional gas chromatography*)
- GC-qMS** Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar (do inglês, *Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectrometry*)
- GC-MS/MS** Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas em Série (do inglês, *Gas Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry*)
- HPA's** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- HPLC** Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performace Liquid Chromatography*)
- IUPAC** União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- INMETRO** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- LOD** Limite de Detecção

LOQ Limite de Quantificação

m/z Razão massa/carga

MC Metilcarbazol

MIC Monitoramento da corrente de íons (do inglês, *Monitoring Ion Current*)

MPLC Cromatografia líquida de média pressão (do inglês, *Media Pressure Liquid Chromatography*)

MRM Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*)

MS1 Espectrômetro de Massas 1 (do inglês, *Mass Spectrometry 1*)

MS2 Espectrômetro de Massas 2 (do inglês, *Mass Spectrometry 2*)

NB Nitrogênio básico

N-compostos Compostos nitrogenados

NIST National Institute of Standards and Technology

N-marcadores Marcadores nitrogenados

NUPPRAR Núcleo de Processamento Primário e Reuso de Água Produzida e Resíduo

NPD Detector de nitrogênio e fósforo (do inglês *Nitrogen Phosphorous Detector*)

NSO Nitrogênio, Enxofre e Oxigênio (do inglês, *nitrogen, sulfur and oxygen*)

Ntotal Nitrogênio total

PI Padrão Interno

PIS Varredura do Íon precursor (do inglês, *precursor-ion scan*)

Ph Fitano (do inglês, *Phytane*)

Pr Pristano (do inglês, *Pristane*)

SARA Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos

SCAN Varredura de íons totais (do inglês, *Full Scan mode*)

SIM Monitoramento seletivo de íons (do inglês, *Selected Ion Monitoring*)

Sm Coeficiente angular da curva de calibração preparada com a matriz

SPE Extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

Ss Coeficiente angular da curva de calibração preparada em solvente

TOFMS Espectrometria de Massas por Tempo de Vôo (do inglês, *Time-of-Flight Mass Spectrometry*)

TOC Carbono orgânico total (do inglês, *Total Organic Carbon*)

Tm Trisnorhopano

t_R Tempo de retenção

Ts Trisnorneopano

TSD: Detector Termiônico Seletivo (do inglês, *Thermionic Specific Detector - TSD*)

VRE Reflectância de vitrinita

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Objetivo geral	21
1.1.2 Objetivos específicos	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 PETRÓLEO	23
2.1.1 Marcadores nitrogenados no petróleo	23
2.2 MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE MARCADORES NITROGENADOS EM PETRÓLEO	30
2.3 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE MARCADORES NITROGENADOS NO PETRÓLEO	31
2.3.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas	34
2.3.2 Detectores específicos	39
2.3.3 Cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente	40
2.3.4 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo	41
2.4 ÁREA DE ESTUDO – BACIA POTIGUAR	48
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	51
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	51
3.2 INSTRUMENTAÇÃO	54
3.3 ANÁLISE DE NITROGÊNIO TOTAL	56
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	56
3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS	57
3.5.1 Branco da matriz	57
3.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATÓGRÁFICOS	59

3.6.1 Condições de análise no modo SCAN	58
3.6.2. Condições de análise no modo SIM.....	59
3.6.3. Condições de análise no modo PIS	61
3.6.4. Condições de análise no modo MRM.....	61
3.7 ESTUDO COMPARATIVO GC-MS/MS NO MODO SIM E MRM.....	61
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE N-MARCADORES POR GC-MS/MS	62
3.8.1 Efeito de matriz	62
3.8.2 Linearidade	63
3.8.3 Limites de detecção e quantificação	64
3.8.4 Precisão inter-dia e intra-dia.....	65
3.8.5 Exatidão	65
3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS DE PETRÓLEO PARA AVALIAÇÃO GEOQUÍMICA.....	66
3.10. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS DADOS	66
3.10.1. Análise de Componentes Principais.....	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 NITROGÊNIO TOTAL.....	67
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	68
4.2.1 Modo SCAN	68
4.2.2 Modo SIM.....	71
4.2.3 Modo PIS.....	74
4.2.4 Modo MRM.....	78

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS SCAN, SIM e MRM EM ESTUDO COMPARATIVO PARA O MIX DE NITROGENADOS	80
4.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS SIM E MRM EM ESTUDO COMPARATIVO QUALITATIVO PARA AMOSTRA DE PETRÓLEO	84
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE N-MARCADORES POR GC-MS/MS	91
4.5.1 Efeito de Matriz	91
4.5.2 Linearidade.....	96
4.5.3 Determinação dos valores de LOD e LOQ.....	99
4.5.4 Ensaio de recuperação para avaliação da exatidão e precisão (inter-dia e intra-dia) do método	100
4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO GC-MS/MS MRM EM AMOSTRAS DE PETRÓLEO	102
4.7 EMPREGO DOS MARCADORES NITROGENADOS PARA AVALIAÇÃO GEOQUÍMICA DAS AMOSTRAS.....	109
4.7.1 Interpretação geoquímica através da Análise de Componentes Principais....	109
4.7.2 Interpretação geoquímica através de Razões Diagnósticas.....	110
5. CONCLUSÕES	118
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	120
7. REFERÊNCIAS	121
ANEXO I.....	134
ANEXO II.....	135
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA	136

1. INTRODUÇÃO

O petróleo, também conhecido como óleo cru, consiste em uma matriz extremamente complexa, composta predominantemente por hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos e, em menores proporções, compostos contendo heteroátomos como nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O) além de alguns metais ^{1,2}.

Os compostos nitrogenados (N-compostos) constituem uma pequena fração do petróleo, com teores variando de 0,1 a 2,0% ³⁻⁵. Esses compostos podem ser classificados em dois grupos, de acordo com suas características químicas: básicos e neutros. As espécies de nitrogênio básicas incluem piridinas, quinolinas, benzoquinolinas e seus análogos alquilados, enquanto as espécies de nitrogênio neutros compreendem pirrol, indol, carbazol e benzocarbazol e seus análogos alquilados. Diversos estudos têm empregado principalmente os N-compostos neutros como marcadores geoquímicos (N-marcadores) ^{6,7} a fim de obter informações, de forma isolada ou através de razões diagnósticas, sobre maturidade, origem, ambiente deposicional e migração ⁶.

Devido à alta complexidade do petróleo, normalmente a avaliação de N-marcadores descrita na literatura, envolve uma série de etapas de preparo de amostras sendo o fracionamento SARA e o fracionamento direcionado os mais empregados. O fracionamento SARA, desenvolvido por Jewell et al. (1974) ⁸ tem por objetivo separar frações contendo compostos Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos utilizando solventes em ordem crescente de polaridade ⁹. Entretanto, N-compostos podem eluir nas frações resina (ou NSO) e aromática diminuindo a eficiência da separação ¹⁰⁻¹³. Muitos trabalhos realizam um fracionamento direcionado para a separação entre N-compostos básicos e neutros após eluição da fração NSO, via procedimento SARA ^{3,5,7,10,14-29}. Ambas as metodologias são demoradas, empregam elevados volumes de solventes, além de ocasionarem a perda de analitos, o que resulta em baixas recuperações.

Para a determinação dos N-marcadores em petróleo, a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar (do inglês, *gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry* - GC-qMS) no modo

monitoramento seletivo de íons (do inglês, *Selected Ion Monitoring* - SIM) é a mais empregada ^{30,31}. Na literatura também estão descritas para determinação dos N-marcadores a cromatografia utilizando detectores específicos como o detector de nitrogênio e fósforo (do inglês, *Nitrogen Phosphorous Detector* - NPD) ³², detector termiônico seletivo (do inglês, *Thermionic Specific Detector* - TSD) ^{26,32-37} e o detector de emissão atômica (do inglês, *Atomic Emission Detector* - AED) ³⁸ sendo este menos relatado.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e validar um método GC-MS/MS para a determinação quantitativa de compostos nitrogenados considerados como N-marcadores e aplicar esta metodologia em diferentes amostras de petróleo não fracionadas, a fim de caracterizá-las geoquimicamente.

Objetivos específicos

- Otimizar um método GC-MS/MS utilizando padrões de N-marcadores nos modos de aquisição SCAN e SIM;
- Desenvolver um método GC-MS/MS utilizando padrões de N-marcadores no modo de aquisição MRM;
- Comparar a metodologia GC-MS/MS desenvolvida utilizando padrões nos modos de aquisição SCAN, SIM e MRM;
- Aplicar a metodologia GC-MS/MS nos modos SIM e MRM em amostra de petróleo para comparação qualitativa;

- Avaliar a extensão do efeito da matriz na determinação quantitativa dos N-marcadores;
- Validar e aplicar, pela primeira vez, um método quantitativo por GC-MS/MS no modo MRM, utilizando calibração compatibilizada com matriz para determinação de N-marcadores em diferentes amostras de petróleo;
- Aplicar a PCA para interpretação dos N-marcadores determinados em amostras de petróleo;
- Calcular razões diagnósticas de N-marcadores e correlacionar com razões de biomarcadores a fim de interpretar geoquimicamente as amostras de petróleo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PETRÓLEO

O petróleo ou óleo cru é o termo utilizado para descrever uma mistura extremamente complexa, rica em hidrocarbonetos que se acumularam em reservatórios subterrâneos e tem variações em cor, odor e escoamento refletindo, desse modo em diversidades de origens. A formação do petróleo é resultado de transformações ocorridas por milhares de anos em camadas do subsolo de bacias sedimentares em condições específicas de pressão e isolamento ³⁹.

O petróleo é composto principalmente de hidrocarbonetos, embora também estejam presentes em menores proporções, compostos contendo heteroátomos como nitrogênio, enxofre e oxigênio, além de alguns metais ^{1,2}. Ainda que a composição do petróleo varie de local para local ou mesmo dentro de um único poço, a composição elementar básica mostra pouca alteração de uma fonte para outra, conforme Figura 1¹.

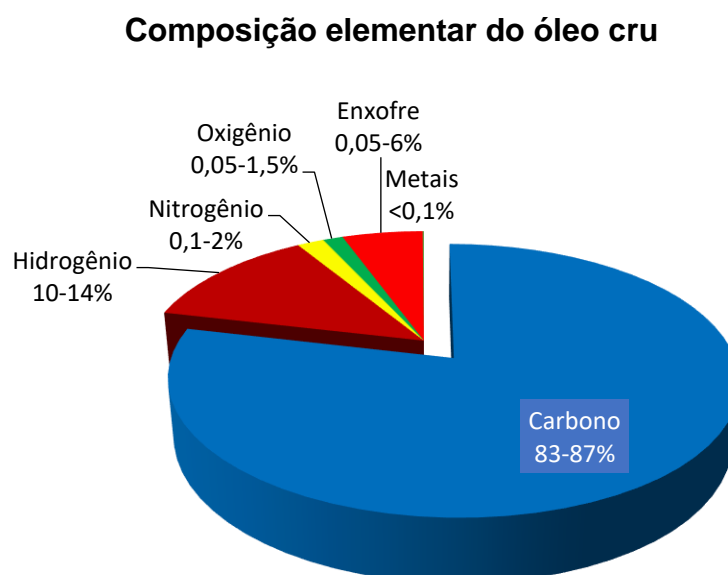


Figura 1 - Gráfico representativo da composição elementar do óleo cru. Fonte: *Adaptado de E. Stauffer, J. A. Dolan e R. Newman, (2008)⁴⁰*. As cores representam o teor de um elemento no óleo cru sendo azul: carbono; vermelho: enxofre; oxigênio: verde; nitrogênio: amarelo e hidrogênio: vermelho escuro.

Os compostos contendo heteroátomos são classificados de acordo com o elemento presente na molécula em: compostos sulfurados, compostos nitrogenados (N-compostos), compostos oxigenados e compostos contendo metais (vanádio, níquel, ferro e cobre).

As diferentes classes químicas de N-compostos podem fornecer informações importantes para possíveis fontes de hidrocarbonetos no ambiente e para rastrear as moléculas de petróleo de volta aos seus precursores biológicos ⁴¹. Além disso, esses compostos causam problemas ambientais associados ao processamento de combustíveis como envenenamento nos processos de craqueamento e refino, alterações de cor em frações do petróleo, além de poluição ambiental ⁴¹⁻⁴³. A alta complexidade do petróleo, a baixa concentração e o grande número de isômeros presentes no petróleo, dificultam a caracterização dos N-compostos ^{43,44}.

2.1.1 Marcadores nitrogenados no petróleo

Os marcadores caracterizam-se por serem moléculas orgânicas estáveis que conservam em suas estruturas básicas partes de suas moléculas precursoras, as quais fornecem pistas geoquímicas sobre origem, maturidade, migração e ambiente deposicional. No caso específico dos compostos nitrogenados, são chamados de N-marcadores e, na maioria dos casos, as investigações e interpretações ocorrem por meio de razões diagnósticas ⁶.

Os N-compostos, estão presentes no óleo cru como constituintes minoritários em concentrações que variam de 0,1 a 2% ³⁻⁵. A maior parte são de estruturas heterocíclicas aromáticas e classificados em dois diferentes grupos: neutros (também chamados de pirrólicos por apresentarem anel pirrólico com par de elétrons do nitrogênio participando da nuvem eletrônica do anel, o que confere um caráter neutro a molécula) e básicos (ou piridínicos, assim designados, pois apresentam anel piridínico. Nesse caso o par de elétrons do nitrogênio não é compartilhado na estrutura, conferindo um caráter básico à molécula) ⁷. As formas básicas, que incluem: piridina, quinolina e benzoquinolina são menos comuns do que as formas neutras, que incluem os indóis, carbazóis e os benzocarbazóis (Figura 2) ^{3,5,17,32,45-54}

Segundo Prado et al. (2017) ⁴ a relação entre nitrogênio básico e o total (*NB/NT*) varia de 0,25 a 0,35 independentemente da origem do petróleo.

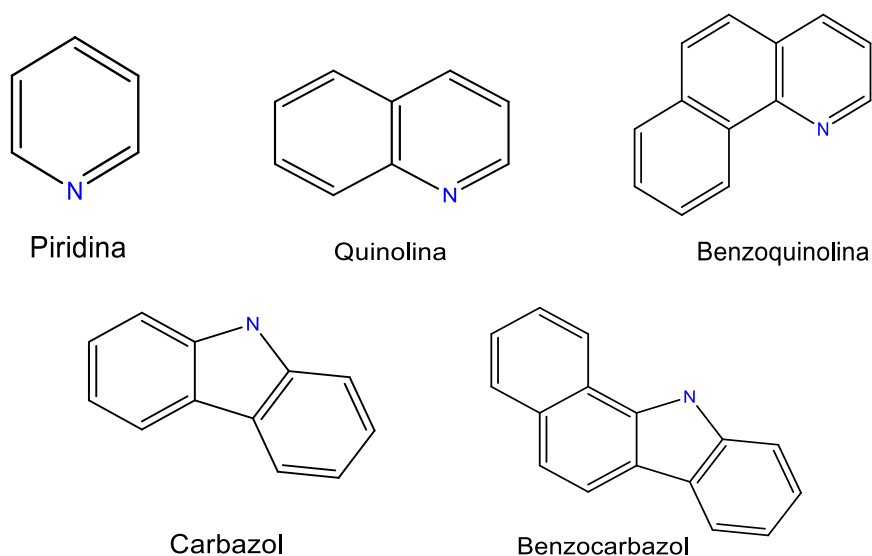


Figura 2 - Estruturas químicas de compostos nitrogenados básicos e neutros utilizados como marcadores geoquímicos de petróleo. Fonte: Adaptado de *National Institute of Standards and Technology* – NIST ⁵⁵

A origem dos N-compostos nos óleos crus ainda é controversa. Dorbon et al. (1965) ⁵⁶ propuseram que a maioria dos pirróis como alquilcarbazóis e alquilbenzocarbazóis presente em óleos brutos pode ser derivada de alcalóides com um núcleo indol presentes em plantas superiores e algas verde-azuladas (cianobactérias). Posteriormente, foi descoberto que a distribuição e as composições de N-compostos nos óleos brutos de fontes marinhas e lacustres são significativamente diferentes dos óleos derivados de plantas superiores. Foi mencionado que os alcalóides não são a principal fonte de carbazóis nos óleos brutos ⁵. Além disso, uma contribuição de proteínas e pigmentos vegetais na matéria orgânica sedimentar durante a diagênese não pode ser descartada ^{57,58,56}.

Os N-marcadores presentes no petróleo são avaliados de forma isolada ou por meio de razões diagnósticas (na maioria dos casos). Na Tabela 1 estão descritas as razões diagnósticas dos N-marcadores encontradas na literatura e as principais informações geológicas aos quais estão relacionadas: origem, maturidade, ambiente deposicional e migração ⁶.

Tabela 1 - Razões diagnósticas de N-marcadores encontradas na literatura e suas associações com origem, maturidade, migração e ambiente deposicional ⁶

N°	Razão diagnóstica	Informação	Referências
1	benzo[a]carbazol/benzo[a]carbazol+benzo[c]carbazol	Origem	17,21,59
		Maturidade	17,18,21,35,59,60
		Ambiente deposicional	59
		Migração	18,35
2	1-metilcatbazol / 1-metilcarbazol + 1-etilcarbazol	Maturidade	60,61,17
		Ambiente deposicional	17
3	3-metilcarbazol/4-metilcarbazol	Ambiente deposicional	17
		Maturidade	62
4	1,8-dimetilcarbazol/1,8-dimetilcarbazol+ 1-etilcarbazol	Ambiente deposicional	17,59,60
		Maturidade	18,61
5	4-metilcarbazol/4-metilcarbazol+1etilcarbazol	Fonte	18
6	3-metilcarbazol/3-metilcarbazol+2-metilcarbazol		

Tabela 1 - Razões diagnósticas de N-marcadores encontradas na literatura e suas associações com origem, maturidade, migração e ambiente deposicional ⁶ (continuação)

N°	Razão diagnóstica	Informação	Referências
7	4-metilcarbazol/4-metilcarbazol+2-metilcarbazol		
8	4-metilcarbazol/3-metilcarbazol	Fonte	18
9	4-metilcarbazol/2-metilcarbazol		
10	1-metilcarbazol/4-metilcarbazol	Maturidade	62
11	1,8-dimetilcarbazol/2,4-dimetilcarbazol	Maturidade	62
		Migração	54
12	1,3-dimetilcarbazol/2,4-dimetilcarbazol	Maturidade Migração	54,62
13	1,8-dimetilcarbazol/1,3-dimetilcarbazol	Maturidade	62
		Migração	54
14	benzo[a]carbazol/benzo[c]carbazol	Maturidade	61,62
		Migração	54
15	C1-alkilcarbazol/C3-alkilcarbazol	Maturidade	21
16	benzo[a]carbazol+benzo[c]carbazol(reservatório)/benzo[c]carbazol(fonte)	Maturidade Migração	
17	1-metilcarbazol/1-metilcarbazol+2-metilcarbazol	Maturidade	18
18	1-metilcarbazol/1-metilcarbazol+3-metilcarbazol		

Tabela 1 - Razões diagnósticas de N-marcadores encontradas na literatura e suas associações com origem, maturidade, migração e ambiente deposicional ⁶ (continuação)

N°	Razão diagnóstica	Informação	Referências
19	2-metilcarbazol/2-metilcarbazol+3-metilcarbazol	Maturidade	18
20	1-metilcarbazol/1-metilcarbazol+4-metilcarbazol		
21	3-metilcarbazol/3-metilcarbazol+4-metilcarbazol		
22	2-metilcarbazol/2-metilcarbazol+4-metilcarbazol		
23	4-metilcarbazol/4-metilcarbazol+carbazol		
24	3-metilcarbazol+2-metilcarbazol/3-metilcarbazol+2-metilcarbazol+carbazol		
25	1,8-dimetilcarbazol/1-metilcarbazol	Maturidade	61
26	1,8-dimetilcarbazol/carbazol		
27	C3-benzoquinolina/C2-benzoquinolina	Migração	63
28	carbazol/carbazol+benzocarbazol		5
29	C3-alquilcarbazol/C2-alquilcarbazol		25
30	alquilcarbazol/aquilcarbazol+alquilbenzocarbazol		63
31	C5-carbazol+C6-carbazol/C1-carbazol+C2-carbazol	Maturidade	64
32	C3-carbazol+C4-carbazol/C0-carbazol+C1-carbazol		

Fonte: Li et al. (1995) ⁵; Loufu et al. (2010) ¹⁵; Bakr (2009) ²³; Clegg., Wilkes & Horsfield (1997) ²⁴; Bennett et al. (2002) ²⁷; Larter et al. (1996) ³⁵; Abrakasa et al. (2018) ⁵⁰; Bennett & Olsen (2007) ⁵⁹; Bakr & Wilkes (2002) ⁶⁰; Silliman et al. (2002) ⁶¹; Li et al. (1997) ⁶²; Yamamoto (1992) ⁶³; Wang., Li & Zhang (2004) ⁶⁴.

A razão (1) (Tabela 1), comparada às demais apresentadas, é a mais empregada pelos autores, uma vez que indica origem, maturidade, ambiente deposicional e migração. Além disso, ela também pode ser relacionada ao teor de carbono orgânico total (TOC) ²¹, para indicar a origem do petróleo, o aumento da razão (1) aumenta com o TOC. Avaliada em conjunto com os biomarcadores saturados, Ts/(Ts+Tm) e Pr/Ph, a razão (1) pode indicar condições de paleoambiente ⁵⁹. A maturidade do petróleo também pode ser avaliada por essa mesma razão na qual valores baixos indicam óleo maturo e valores altos correspondem a óleo imaturo. As razões diagnósticas (3), (4), (11), (12), (14) (15) (19), (20), (21) e (22) também são usadas para indicar maturidade, porém, para a (3) e (14), o comportamento é inverso ao grau de maturidade. Para as razões (2), (3), (4), (15), (26) e (27), apesar das variações serem pequenas, elas indicam aumento da maturidade.

Carbazóis e benzocarbazóis são também empregados para diferenciar petróleo de ambiente marinho e terrestre sendo esses mais abundantes em óleo marinho ^{5,65}. Concentrações diferentes de metilcarbazóis também podem ser empregadas para diferenciar óleos de origens marinha e terrestre ^{17,47}. Ambientes deposicionais (óxido e subóxido) são diferenciados através de correlações das razões diagnósticas de N-marcadores utilizando-se concentrações de alquilcarbazóis em associação a biomarcadores saturados ¹⁷. As amostras de ambientes deposicionais óxido expressaram maiores valores para a razão de esteranos (C29/C27), pristano/fitano (Pr/Ph) e menores concentrações de alquilcarbazóis em relação aos ambientes deposicionais subóxido ^{24,47}. Na Tabela 1, as razões (1), (2), (3) e (4) são empregadas para avaliar ambiente deposicional. Óleos crus de origem terrestre geralmente têm valores relativamente baixos para as razões (3) e (4), em comparação com os óleos brutos de origem marinha ^{17,45,70}.

A avaliação dos marcadores de N-compostos através das razões diagnósticas permite interpretações que vão desde a origem até a migração do petróleo. Entretanto, na literatura, para a avaliação de N-marcadores normalmente são empregadas etapas de preparo de amostra que objetivem o isolamento e separação dos N-marcadores da matriz, altamente complexa, para posterior análise por técnicas cromatográficas convencionais.

2.2 MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE MARCADORES NITROGENADOS EM PETRÓLEO

Devido à complexidade e as baixas concentrações dos N-marcadores no petróleo, o fracionamento preliminar, de acordo com a classe química, geralmente precede a sua identificação por técnicas cromatográficas instrumentais convencionais, como a GC-MS.

Os trabalhos descritos na literatura, específicos para N-marcadores, podem ser classificados de forma geral em duas categorias: o fracionamento SARA e fracionamento direcionado (separações para isolar uma fração com propriedades específicas ou subclasse específica de compostos).

O método SARA desenvolvido por Jewell et al. (1974)⁸ leva o nome das frações produzidas, a saber, saturados (S), aromáticos (A), resinas (R) e asfaltenos (A). O procedimento é baseado na adsorção da amostra em uma coluna de sílica ou alumina e ocorre a eluição sequencial das frações através de solventes com polaridades crescentes⁹. O método SARA tem sido adaptado ao longo do tempo, o emprego da HPLC^{66,67} e o uso de procedimentos miniaturizados²² são exemplos de modernização da metodologia original.

Os N-compostos eluem na fração resina (também conhecida como fração NSO), que compreendem estruturas policíclicas, contendo heteroátomos de nitrogênio, oxigênio e enxofre. Embora o fracionamento SARA seja uma metodologia baseada na diferença de polaridade dos compostos, N-compostos como benzocarbazóis, podem eluir na fração aromática, prejudicando a eficiência do processo. A sílica é preferida em relação a alumina quando se trata de N-compostos¹⁰⁻¹³. No entanto, uma coluna de sílica por si só é incapaz de remover todos os interferentes e não é efetiva para separação seletiva de compostos básicos neutros^{10,12}. Por esse motivo, a maioria das metodologias do tipo SARA para determinar N-compostos, são empregadas como uma etapa de pré-fracionamento para obtenção da fração resina e, posteriormente, um novo processo de fracionamento (aqui chamado de fracionamento direcionado), a fim de separar os N-compostos neutros dos básicos é realizado. O fracionamento direcionado inclui cromatografia em coluna

aberta com sílica ácida ^{3,5,10,24–26} cromatografia de coordenação ^{7,14–16,27–29}, cromatografia líquida de média pressão - MPLC (do inglês, *Medium Pressure Liquid Chromatography*) ^{17–19} e extração em fase sólida – SPE (do inglês, *Solid Phase Extraction*) ^{20–23}.

Entre as metodologias de fracionamento usadas para separar os N-compostos neutros e básicos, a mais empregada é a cromatografia em coluna utilizando sílica ácida ^{5,32,36,46,68,69}. Nessa separação são utilizados diferentes solventes e reagentes, ajustes de pH são realizados com o objetivo de obter duas frações: uma contendo os N neutros e a outra os básicos ^{5,36,46}. Para obtenção da fração básica, ácido clorídrico é utilizado a fim de auxiliar na eluição dos N-compostos retidos mais fortemente na coluna contendo sílica ácida e, posteriormente, é necessário o ajuste do pH da fração eluída para viabilizar a análise por GC-MS ⁶⁹. Esse processo pode ser realizado em coluna aberta de vidro ou em instrumento MPLC ^{12,17,46,60,68}. A SPE também é uma das metodologias utilizadas para obtenção de classes de N-compostos sendo realizada através da modificação do nitrato de prata associado à sílica ⁷⁰ e cartucho C18 ^{59,70,71}.

Tanto o fracionamento SARA quanto o fracionamento direcionado, são procedimentos que demandam tempo, quantidades adequadas de amostras além de consumo considerável de solventes, muitos deles com toxicidades relevantes.

2.3 TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE MARCADORES NITROGENADOS NO PETRÓLEO

A GC é a principal técnica utilizada para a determinação de N-compostos no petróleo. A análise por GC envolve a vaporização de uma solução líquida no injetor, seguida da separação dos compostos em uma coluna capilar contendo uma fase estacionária (FE) específica e por fim, os analitos chegam ao detector em diferentes tempos de retenção. A resposta do detector proporcional a massa de amostra introduzida na coluna dentro de um determinado intervalo.

A escolha adequada de comprimento, FE, diâmetro interno, e espessura do filme em uma coluna é fundamental para que uma mistura de compostos seja bem separada e detectada. As colunas comumente usadas para a separação de N-compostos em petróleo são de característica apolar, compreendendo as colunas de 5% fenilmetilpolisiloxano de 30 m (DB-5, DB-5MS, HP-5 e HP-5MS) e colunas de FE 100% de dimetilpolisiloxano (BP-1, DB-1, ultra-1, SE-30), estas em menor número.

Um resumo das colunas usadas para determinar N-compostos marcadores em petróleo pode ser visualizado na Tabela 2.

Não há estudos específicos sobre otimização de colunas na investigação de N-marcadores em petróleo. No entanto, alguns autores estudaram N-compostos em matrizes de combustíveis fósseis e relataram o uso de FE de maior polaridade (V-17, BPX-70 e Wax), além de líquidos iônicos ⁷², obtendo bons resultados de separação ^{37,73-75}. Provavelmente, isso se deve às interações entre átomos com pares de elétrons livres, como grupos ciano (BPx-70) e átomos de oxigênio (Wax) que podem interagir com o grupo NH pertencente aos compostos neutros por meio de interações permanentes dipolo-dipolo. No entanto, colunas de alta polaridade têm um limite de temperatura de 270 °C para BPx-70 e Wax de 290 °C e OV-1701 de 280 °C, o que pode limitar seu uso. Embora o uso de colunas polares não tenha sido especificamente relatado em estudos sobre N-marcadores em petróleo, elas podem auxiliar, por exemplo, na separação dos isômeros de carbazol e benzocarbazol ⁶.

Tabela 2 - Colunas utilizadas em cromatografia a gás para a determinação de marcadores de nitrogênio pirrólico em petróleo ⁶

Nome comercial	Fase estacionária	Dimensões	Detector	Referências
BP-1	100% metilpolixilosano	60 m x 0,25 mm x 0,25 mm		64
BPX5	5% fenil polisilfenilsiloxano	50 m x 0,22 mm x 0,33 mm	GC-MS	46,68
BPX5	5% fenil polisilfenilsiloxano	50 m x 0,22 mm x 0,25 mm	GC-MS	49,60
BPX5	5% fenil polisilfenilsiloxano	50 m x 0,25 mm x 0,25 mm		17
BPX5	5% fenil polisilfenilsiloxano	25 m x 0,22 mm x 0,25 mm	GC-MS	5
CP-Sil 5	100% dimetilpolixilosano	60 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	53
DB-1	100% dimetilpolixilosano	60 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	29,76,77
DB-5	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,32 mm x 0,25 mm	GC-MS GC-NPD	34,36
DB-5	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS GC/NPD	78
DB-5MS	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	79
DB-5MS	5% fenil metilpolixilosano	25 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	80
DB-wax	polietilenoglicol	30 m x 0,32 mm x 0,25 mm	GC-MS GC-TSD	81
HP-5	5% fenil metilpolixilosano	25 m x 0,32 mm	GC-MS	80
HP-5	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,32 mm x 0,25 mm		59
HP-5	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	3,82,83
HP-5	5% fenil metilpolixilosano	25 m x 0,32 mm	GC-MS	61
OV-73	5% difenil dimetilpolisiloxano	40 m x 0,30 mm x 0,15 mm	GC-MS	84
SE-52	5% fenil metilpolixilosano	20 m x 0,30 mm x 0,25 mm	GC-MS GC/NPD	26
HP-5MS	5% fenil metilpolixilosano	50 m x 0,20 mm x 0,33 mm	GC-MS	22
DB-5	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	33,69
DB-5 MS	5% fenil metilpolixilosano	25 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	33
HP-5MS	5% fenil metilpolixilosano	30 m x 0,25 mm x 0,25 mm	GC-MS	32,85
ultra-1	100% dimetilfenilpolixilosano	25 m x 0,33 mm x 0,20 mm	GC-MS	47

Fonte: Song., Wen & Bao (2016) ³; Li et al. (1995) ⁵; Larter et al. (1981) ¹⁶; Dorbon et al. (1984) ¹⁹; Bastow et al. (2003) ²⁸; Bakel & Philp (1990) ³²; Merdrignac et al. (1998) ³³; Chunming et al. (2002) ³⁴; Li et al. (1992) ³⁶; Bechtel et al. (2013) ⁵²; Zhang., Zhang, & Cai (2011) ⁵³; Bennett & Olsen (2007) ⁵⁹; Silliman et al. (2002) ⁶¹; Li & Larter (2001) ⁶⁹; Yang et al. (2016) ⁷⁶; Zhang et al. (2008) ⁷⁷; Conceição Oliveira et al. (2004) ⁷⁸; Baxby., Patience & Bartle (1994) ⁷⁹; Luofu & Yongshang (1999) ⁸⁰; Clegg et al. (1998) ⁸¹; Bowler et al. (1997) ⁸²; Frolov et al. (1989) ⁸³; Singh et al. (2011) ⁸⁴; Li et al. (1999) ⁸⁵.

2.3.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

A GC-qMS é a principal técnica utilizada para identificar N-compostos em petróleo devido à sua robustez, resolução e sensibilidade ^{30,31}. A GC-qMS pode ser operada nos modos de varredura total (SCAN) e monitoramento seletivo de íons (do inglês, *Single Ion Monitoring* - SIM). Todos os íons gerados na fonte de ionização podem ser monitorados pelo espectrômetro de massas no modo SCAN. No modo SIM, apenas íons de massa/carga característicos do composto de interesse são monitorados, resultando em um tempo de permanência maior no MS para cada íon monitorado (geralmente entre 25 e 100ms). Conseqüentemente, comparado ao modo SCAN, o modo SIM tem limites de detecção de cerca de uma ordem de grandeza mais baixos, a análise é menos ruidosa e a faixa de quantificação é maior para análises de traços ⁸⁶.

Para quantificação de N-compostos individuais, o modo SIM é o mais empregado ^{3,18,22,24,32,46,47,59,64,87,88}. Utiliza-se os íons $M + 14n$, onde M é o íon molecular do composto não alquilado e n representa os grupos metil adicionados a molécula. Assim, para o carbazol monitora-se o íon $M=167$ e para alquilcarbazóis (C1 a C6), $n = 181, 195, 209, 223, 237, 251$. Para a classe dos benzocarbazóis $M=217$ e alquilbenzocarbazóis $n= 231, 245, 259$ ⁷¹.

Para a identificação de N-marcadores, alguns autores ^{17,33,51,60,61,63,68,81,89}, empregam análise pelo método cromatograma íon extraído (do inglês, *Extracted Ion Chromatogram* – EIC), também chamado de monitoramento de íons de varredura completa ou método de monitoramento da corrente de íons (do inglês, *Monitoring Ion Current* – MIC) que consiste numa ferramenta *offline* do software do sistema MS. A partir do modo SCAN, seleciona-se os íons de interesse e esses compõem um cromatograma reconstruído no qual se analisa apenas o que for importante para a pesquisa. Entretanto, esse método é menos sensível quando comparado ao SIM. Na Tabela 3 estão especificadas as faixas de concentrações de N-marcadores em amostras de petróleo descritas na literatura e referências.

Tabela 3 - Faixa de concentração de N-marcadores em amostras de petróleo descritas na literatura

N-composto	Faixa de concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Referências
Carbazol		
carbazol	0,0213 a 17,70	32,85
C1-carbazol		
1-metilcarbazol	0,04 a 26,6	3,90
2-metilcarbazol	0,01 a 15,2	3, 81
3-metilcarbazol	0,02 a 11,8	3,81
4-metilcarbazol	0,06 a 13,71	85,92
1- + 2- + 3- + 4-(metilcarbazol)	0,10 a 55,97	3,85
Σ alquilcarbazóis	1,240 a 27,020	25
Σ C1-carbazol	0,087 a 358,1	25,70
C2-carbazol		
1,2-dimetilcarbazol	0,02 a 9,2	17,81
1,3-dimetilcarbazol	0,01 a 10,38	3,85
1,4-dimetilcarbazol	2,206 a 18,7	22,81
1,5-dimetilcarbazol	1,3 a 13,2	81
1,6-dimetilcarbazol	0,14 a 11,79	60,85
1,7-dimetilcarbazol	0,21 a 11,27	60
1,8-dimetilcarbazol	0,15 a 18,94	3,85
2,4-dimetilcarbazol	0,02 a 6,55	3,85
2,5-dimetilcarbazol	0,07 a 9,67	17,85

2,6-dimetilcarbazol	0,08 a 36,66	60
2,7-dimetilcarbazol	0,02 a 2,3	17,97
1,2- + 2,6- + 2,7- (dimetilcarbazol)	2,69 a 21,19	85
1,3- + 1,6- + 1,7- (dimetilcarbazol)	19,29 a 125,8	85
Σ dimetilcarbazóis	6,5 a 238,5	92
etilcarbazol	0,34 a 1,97	85
1-etilcarbazol	0,02 a 5,4	60,81
1,4-dimetilcarbazol + 4-etilcarbazol	0,23 a 8,22	17,60
1,5-dimetilcarbazol + 3-etilcarbazol	0,23 a 10,32	60
		80
1,5- + 1,4-(dimetilcarbazol) + 3- + 4- (etilcarbazol)	4,68 a 26,30	
C2-carbazol	0,028 a 321,4	25,70
Σ C0 a C2 alquilcarbazóis	20,2	93
Σ C2-alquilcarbazóis	15,4	93
C3-Carbazol		
Σ trimetilcarbazóis	7,7 a 424,5	92
Benzocarbazol		
benzo[a]carbazol	0,006 a 8,74	25,46
benzo[b]carbazol	0,008 a 8,00	25,70
benzo[c]carbazol	0,004 a 19,94	23,46
Σ benzocarbazóis	0,03 a 5,182	25,92
Quinolina		

quinolina	4,8 a 35	32
C1-Quinolina		
8-metilquinolina	1,6 a 216	32
Dimetilquinolina		
2,4-dimetilquinolina	4,3 a 139,4	32
2,6-dimetilquinolina	4,3 a 49,2	32
Benzoquinolina		
benzoquinolina	1,6 a 125,1	32

Fonte: Song., Wen & Bao (2016) ³; Luofuet al. (2010) ¹⁵; Oliveira et al. (2006) ¹⁷; Bakr (2009) ²³; Hallmann et al. (2007) ²⁹; Bakel & Philp (1990) ³²; Bechtel et al. (2013) ⁵²; Bakr & Wilkes (2002) ⁶⁰; Bennett & Love (2000) ⁷⁰; Clegg et al. (1998) ⁸¹; Li et al. (1999) ⁸⁵; Clegg et al. (1998) ⁹⁰; Hwang et al. (2002) ⁹²; Larter et al. (2000) ⁹³; Ruckmick & Hurtubiseau (1995) ⁹⁷.

De acordo com a Tabela 3, a concentração mais baixa foi 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$ para benzo[c]carbazol por separação dos hidrocarbonetos saturados e aromáticos por MPLC sendo a fração enriquecida de carbazóis obtida através de SPE, determinações por GC-MS (SIM) com coluna HP-5 e os valores quantitativos determinados em relação ao padrão interno 9-fenilcarbazol ²³. A concentração mais alta de acordo com a Tabela 3 correspondeu a 139,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para 2,4-dimetilquinolina cujo preparo da amostra se deu através do fracionamento SARA, determinações por GC-TSD com coluna DB-WAX e os valores quantitativos determinados por curva de calibração na faixa 0,008 – 450 ng mL^{-1} com utilização da resposta do fator do padrão interno piridina ³².

Com relação a análise quantitativa através da curva analítica, poucas referências são encontradas ^{18,32,49,68,81,90}, para N-marcadores em amostras de petróleo, apesar de ser o mais indicado.

O emprego da GC-MS sem a utilização de etapas de fracionamento da amostra não possibilita a adequada separação e, conseqüentemente, a identificação de N-marcadores devido a coeluição entre compostos de diferentes classes. Em amostras de petróleo, a separação entre grupos neutros e básicos não é suficientemente efetiva

devido a sobreposição de compostos como piridinas, anilinas, quinolinas e acridinas⁹⁴.

Problemas de coeluição entre isômeros de C2-Carbazóis foram descritos por Bowler et al. (1997)⁸² ao empregar uma coluna com fase estacionária 5% fenil de 30 m. Os autores então avaliaram uma coluna mais longa, de 50 m que possibilitou a separação e a ordem de eluição para os isômeros 1,5-dimetilcarbazol e 3-etilcarbazol, mas não para o 4-etilcarbazol e o 1,5-dimetilcarbazol. Coeluição entre carbazóis e fluorenonas por GC-MS em coluna com as mesmas especificações do estudo anterior foram apontadas por Wilkes et al. (1998)⁸⁹ (Tabela 4). As coeluições têm implicações cautelares na quantificação devido ao emprego desses N-compostos como marcadores. Na Tabela 4 estão descritas coeluições de N-marcadores de acordo com as colunas utilizadas (quando informadas).

Tabela 4 - Coeluições de N-marcadores em amostras petroquímicas por GC-MS⁶

Coeluição	Coluna	Referências
C1 e C2-carbazol com (<i>n</i> -alquil)tiofenos	DB-5 (30 m x 0,32 x 0,25 µm)	36
4-etilcarbazol com 1,4-dimetilcarbazol e 3-etilcarbazol com 1,5-dimetilcarbazol	HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	82
4-etilcarbazol com 3-etilcarbazol	BPX5 (50 m x 0,22 mm x 0,25 µm)	17
carbazol com fluorenona	BPX5 (50 m x 0,22 mm x 0,25 µm)	89
indol com quinolina	-	95
carbazol com acridina	-	95
carbazol com dibenzotiofeno	DB5	96
dimetilquinolina com bifenila	DB5	96
C1-quinolina, C1-naftaleno e C1-benzotiofeno	DB5	96

Fonte: Bakr (2009)²³; Li et al. (1992)³⁶; Bowler et al. (1997)⁸²; Wilkes (1998)⁸⁹; Adam et al. (2009)⁹⁵; da Silva et al. (2014)⁹⁶.

Problemas de coeluição entre classes, como por exemplo para N-marcadores e compostos do enxofre (alquil tiofenos, alquil tiolanos), foram relatados ao empregar GC-MS e para resolver a separação e identificação, os autores usaram a GC-NPD^{36,97} Coeluições entre C2-carbazóis foram relatados por Bakr (2009)¹⁷. Outros exemplos de coeluições são descritos por da Silva et al. (2014)⁹⁶ em amostra de combustível fóssil, sem etapa previa de fracionamento, onde resultados promissores foram obtidos ao empregar a cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, *comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry GCxGC-TOFMS*)⁹⁶.

De forma geral, no que se refere ao emprego da GC-MS especificamente para a determinação de N-marcadores, ainda há espaço para o desenvolvimento de metodologias mais confiáveis do ponto de vista analítico pois não há trabalhos, por exemplo, com validação.

2.3.2 Detectores específicos

O detector de nitrogênio e fósforo (do inglês, *Nitrogen Phosphorous Detector – NPD*) também conhecido como detector termoiônico específico (do inglês, *thermionic specific detector - TSD*), é sensível e específico (responde a compostos nitrogenados e fosforados)⁷².

Bakel e Philp (1990)³² usaram GC-NPD para quantificar nitrogenados básicos e neutros em óleos crus de diferentes origens, analisando diretamente as frações de hidrocarbonetos aromáticos obtidas a partir pré-fracionamento em coluna de sílica/alumina. Porém, poucos compostos nitrogenados foram identificados, em concentrações na faixa de mg L⁻¹ (Tabela 3). Os autores não informaram sobre limite de detecção. Os demais trabalhos que empregam GC-NPD tiveram como objetivo avaliar a pureza das frações nitrogenadas obtidas por diferentes técnicas de extração³³ e fracionamento²⁶, a fim de evitar possíveis coeluições de N-compostos com HPAs³⁴⁻³⁷.

Outro detector usado em GC é o detector de emissão atômica (do inglês, *atomic emission detector* - AED). Há poucos relatos sobre a detecção de N-marcadores usando GC-AED. Um exemplo, é o estudo desenvolvido por Damsté et al. (1992)³⁸ para monitorar numerosos alquil pirróis presentes no óleo.

Há na literatura, determinações de N-marcadores através do uso de detectores específicos, porém, as avaliações de razões diagnósticas em estudos geoquímicos são comumente realizadas por GC-MS no modo SIM.

2.3.3 Cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente

A GC×GC é uma das técnicas analíticas mais poderosas para análise de amostras complexas, como o petróleo. A GC×GC emprega dois estágios consecutivos de separação em fase gasosa com seletividade distintas, desse modo, o poder de resolução dessa técnica é incrementado geometricamente, permitindo grande capacidade de picos separados em uma única análise⁹⁸.

A GC×GC tem sido aplicada na identificação de N-compostos em uma série de amostras de combustíveis fósseis^{44,73,87,96,99-102}. Entretanto, especificamente para avaliar N-marcadores ainda há poucos estudos^{91,103,104}.

Gao e colaboradores¹⁰⁴ empregaram a GC×GC-TOFMS para identificar carbazóis e benzocarbazóis em petróleos com diferentes níveis de biodegradação. Com o uso dos íons característicos selecionados, de acordo com o número de carbonos da classe, os carbazóis alquilados C4-C5 e os benzocarbazóis C2-C3 foram detectados livres de coeluição com outros constituintes da matriz, o que permitiu avaliar o grau de biodegradação das amostras. O mesmo grupo de pesquisa⁹¹ relatou o uso da GC×GC-TOFMS para avaliar migração em um conjunto de amostras de óleo cru. Distribuição específica de razões isométricas dos C2-carbazóis 1,8- / 1,7-DMC, 1,8- / 2,7-DMC, 1,8- / 2,4-DMC, 1,8- / 1,6-DMC auxiliou na avaliação da migração do óleo.

Assim, a GC×GC constitui uma das melhores técnicas para análise molecular de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis em amostras complexas¹⁰⁵.

Entretanto, o custo elevado do equipamento e consumíveis, bem como a necessidade de treinamento operacional mais avançado (comparado a GC), são pontos a serem considerados para a escolha da técnica.

2.3.4 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo

A GC-MS/MS surge como uma alternativa ao GC-qMS para amostras altamente complexas, como o petróleo, porque une as vantagens da separação GC à espectrometria de massas em série (MS/MS). Nesse tipo de espectrometria de massas, ocorre a alteração na massa ou carga de um íon por meio de dissociação ou reação química ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

A GC-MS/MS é uma técnica analítica de fundamental relevância para a detecção rápida de componentes específicos em uma mistura complexa com preparação mínima da amostra. Além disso, é particularmente útil para análise e confirmação dos compostos alvo em níveis de traços por fornecer maior seletividade do que a GC-MS.

O MS/MS é constituído por três quadrupolos em série, sendo o primeiro (MS1) e o último (MS2) utilizados para separar íons de mesma razão m/z e o segundo opera como cela de colisão através de dissociações induzidas por colisões (*collision-induced dissociation*, CID) de baixa energia com gás inerte (Figura 3) ¹⁰⁹.

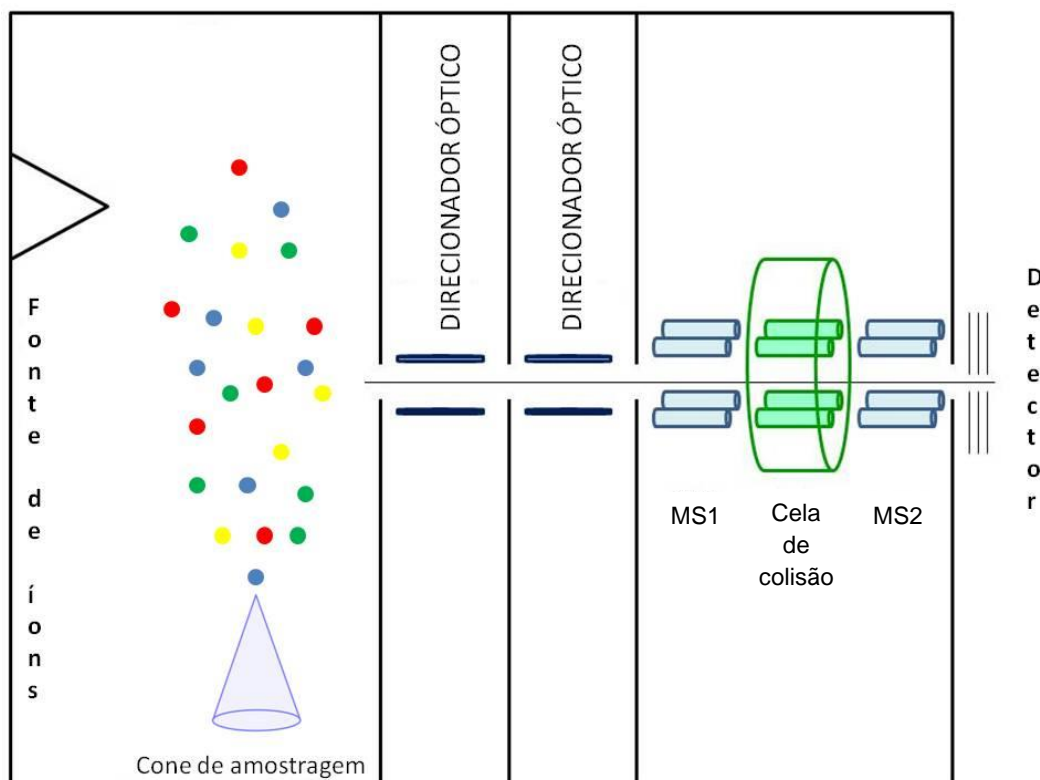


Figura 3 - Esquema ilustrando as partes que compõem o analisador triplo quadrupolo. Onde MS1 e MS2 representam os quadrupolos em série. Fonte: Adaptado de Chiaradia et al. (2008)¹⁰⁹.

No GC-MS/MS a utilização de quadrupolos foi estendida para multipolos que consistem de seis (hexapolo) e oito (octapolo) hastes sendo os princípios semelhantes ao quadrupolo. As hastes são dispostas paralelas e simetricamente para formar um longo tubo ao redor do eixo da transferência de íons. A focalização dos íons é mais eficiente num quadrupolo comparado aos multipolos tendo maior eficiência de transmissão. No entanto, essa eficiência não se aplica a uma faixa mais ampla de massas.

A técnica GC-MS/MS permite maiores sensibilidade e seletividade através da seleção de diferentes modos de aquisição dos analisadores MS1 e MS2. Essas características têm permitido a aplicação da técnica aos mais variados tipos de matriz¹⁰⁷. Os principais modos de operação em MS/MS são descritos a seguir.

a) Varredura de íons produzidos (do inglês, *product-ion scan* - PIS)

Também descrito como “varredura de íons filhos” nesse modo, no primeiro quadrupolo (MS1), o íon de interesse, chamado de precursor (ou “íon pai”) é isolado e, em seguida, é fragmentado na cela de colisão com uma determinada energia. No último quadrupolo (MS2), é feita a varredura dos íons produtos (ou “íons filhos”) gerados para obtenção do espectro de massas, a partir da fragmentação do íon isolado em MS1^{107,109} (Figura 4). Esse modo de operação é empregado quando não se conhece os íons produtos, ou seja, não há dados já relatados na literatura para o composto de interesse. Após a aplicação do modo PIS, avalia-se os íons gerados no MS2 e então realiza-se uma nova análise, com os íons gerados, agora no modo MRM, descrito na sequência¹⁰⁷.

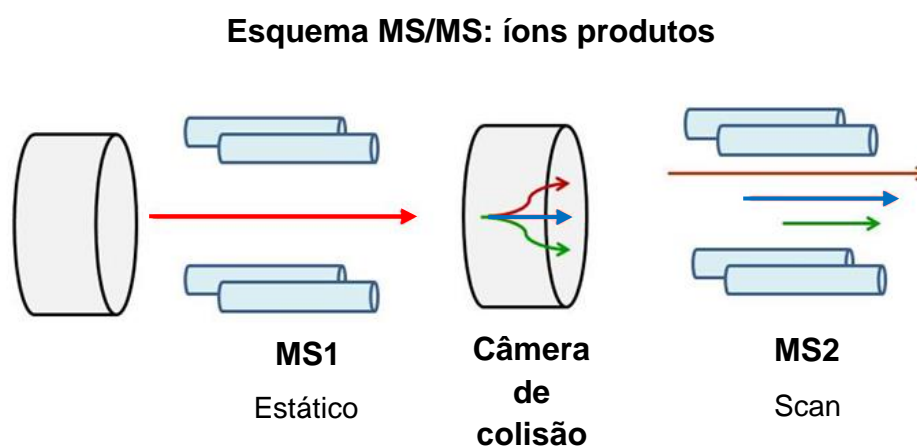


Figura 4 - Esquema representativo para o modo de operação de íons produtos. Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016)¹¹⁰.

b) Varredura do íon precursor (do inglês, *precursor-ion scan* - PIS)

Também chamado de “varredura dos íons pai” nesse modo, o MS1 é ajustado para transmitir os íons precursores dentro de uma faixa (m/z) selecionada, sendo posteriormente fragmentados na cela de colisão, com determinada energia, e transmitidos para o MS2 onde apenas um íon produto de razão (m/z) é detectado (Figura 5). Esse modo de operação é empregado quando deseja-se isolar o íon de

interesse para fragmentá-lo na cela de colisão e realizar a varredura dos íons produzidos ^{107,109}.

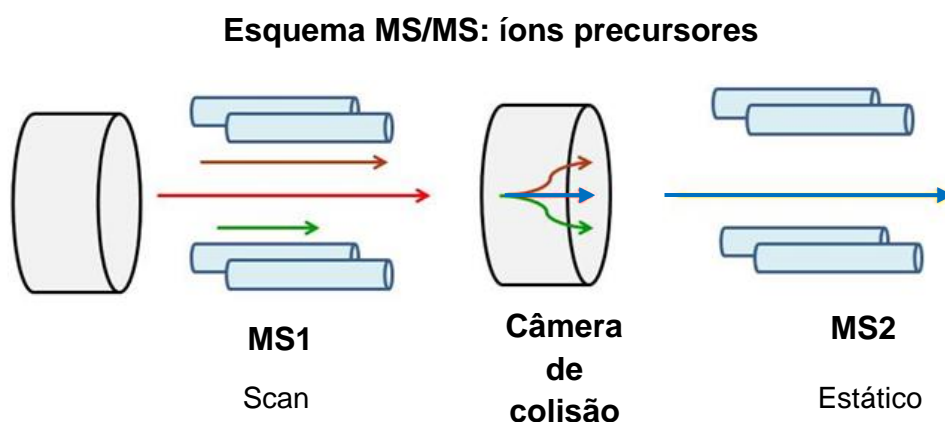


Figura 5 - Esquema representativo para o modo de operação varredura do íon precursor. Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016) ¹¹⁰.

c) Varredura da constante perda de fragmentos neutros

Nesse tipo de varredura é possível monitorar íons que se fragmentam perdendo uma massa neutra correspondente a uma estrutura química. Nesse modo de varredura os dois quadrupolos (MS1 e MS2) operam simultaneamente para comparar as diferenças entre as massas varridas entre eles (Figura 6). Esse modo de varredura é empregado quando deseja-se saber reações que ocorrem com perda de um fragmento neutro, sendo muito importante para a determinação da estrutura de uma molécula do analito ^{107,109}.

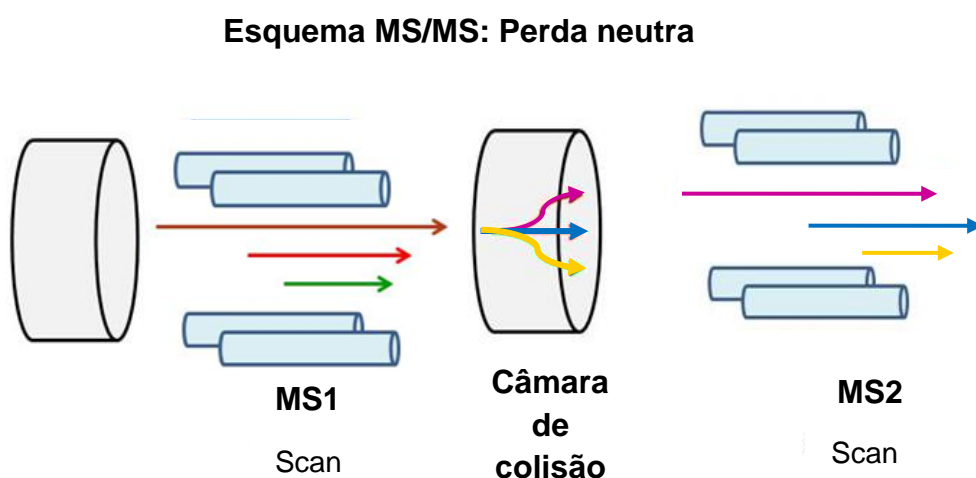


Figura 6 - Esquema representativo para o modo de operação varredura da constante perda de fragmentos neutros. Fonte: Adaptado de Santos et al (2016) ¹¹⁰.

d) Monitoramento seletivo de reações (do inglês, *selected reaction monitoring – SRM*)

Este modo de varredura consiste em selecionar uma reação de fragmentação. O íon precursor é monitorado em MS1, fragmentado na cela de colisão e seus correspondentes íons produtos atravessam o MS2. Neste caso, serão monitorados os íons no MS2 se apenas produzirem um dado fragmento por uma reação selecionada. A ausência de varredura de outros íons, permite o foco apenas no íon precursor e a fragmentação deste por um tempo mais longo, aumentando a sensibilidade de monitoramento que é associada a um aumento da seletividade. Este tipo de varredura está representado de forma ilustrativa na Figura 7. É empregado quando deseja-se saber quais íons se fragmentam perdendo uma massa de estrutura específica e neutra ^{107,109}.

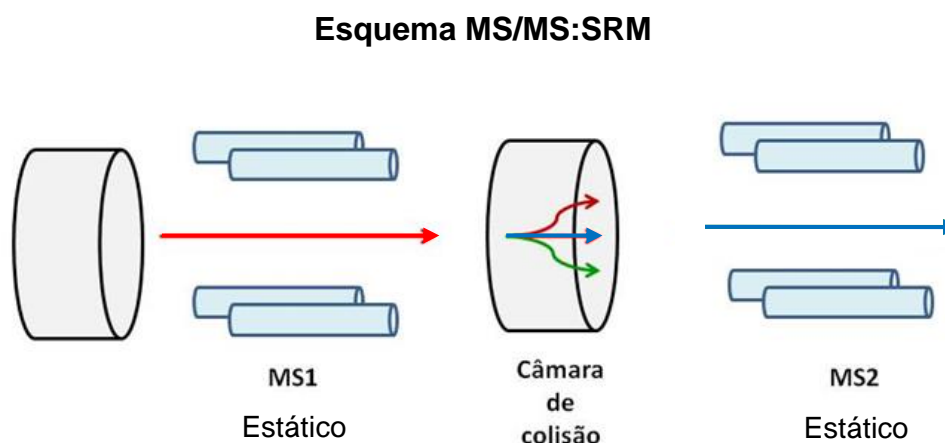


Figura 7 - Esquema representativo para o modo de operação monitoramento seletivo de reações (SRM). Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016) ¹¹⁰.

e) Monitoramento de reações múltiplas (do inglês, *multiple reaction monitoring* – MRM)

O modo MRM é uma aplicação do modo SRM. Nesse caso, ocorre o monitoramento para múltiplos íons produtos no MS2, provenientes de um ou mais íons precursores (MS1). Esse tipo de varredura está representado de forma ilustrativa na Figura 8, sendo empregado quando deseja-se monitorar reações específicas, já selecionadas através do modo PIS^{107,109}. É o modo de operação geralmente usado em análises GC-MS/MS.

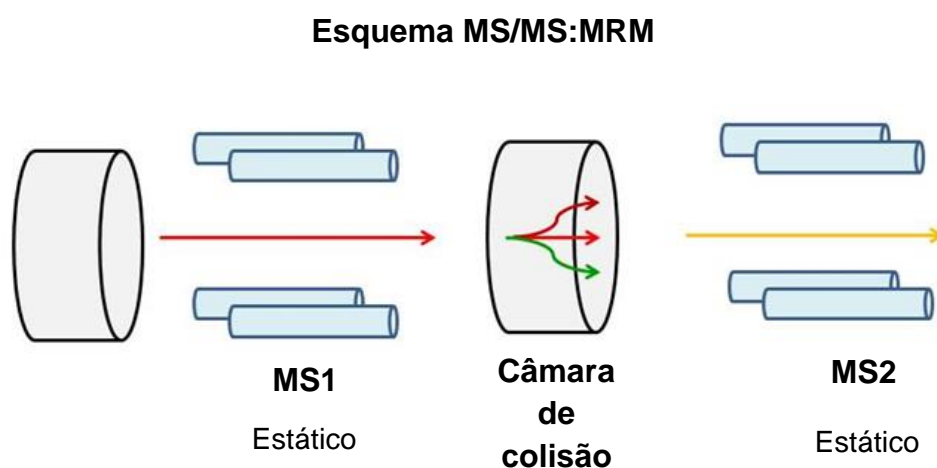


Figura 8 - Esquema representativo para o modo de operação monitoramento de reações múltiplas (MRM). Adaptado de Santos et al. (2016)¹¹⁰.

f) Modo de varredura completa (SCAN) e Modo monitoramento seletivo de íons (SIM)

Assim, como em um sistema de quadrupolo comum, o MS/MS também pode ser operado nos modos de varredura SCAN (Figura 9) e SIM (Figura 10). No MS/MS operando no modo SCAN, seleciona-se apenas um dos quadrupolos, geralmente o MS1, realizando a varredura completa da amostra em uma faixa selecionada de razões m/z . No MS/MS operando no modo SIM, a cela de colisão e o MS2 servem somente para transmitir os íons precursores no primeiro quadrupolo^{107,109}.

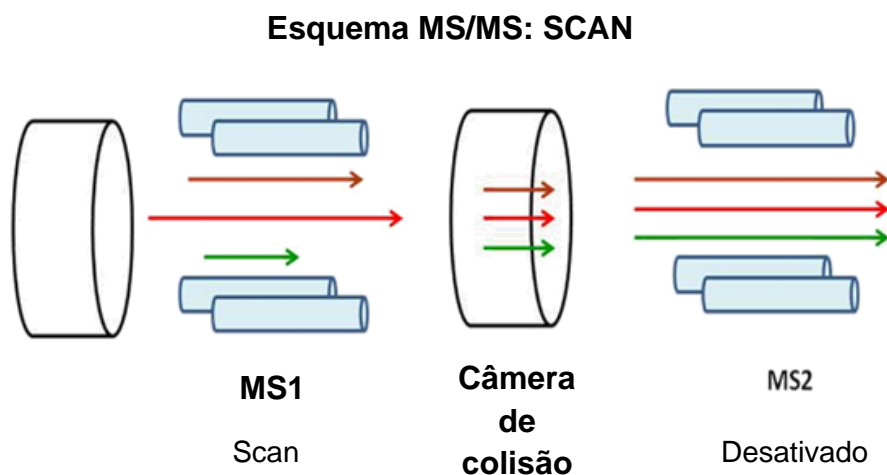


Figura 9 - Esquema representativo para o modo de operação varredura de íons totais (SCAN). Adaptado de Santos et al. (2016) ¹¹⁰.

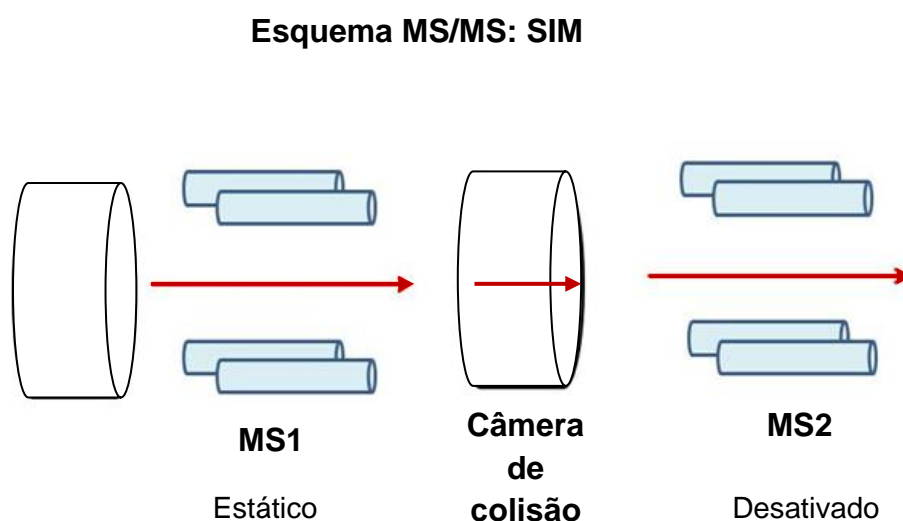


Figura 10 - Esquema representativo para o modo de operação monitoramento de íon seletivo (SIM). Adaptado de Santos et al. (2016) ¹¹⁰.

Devido aos diversos modos de operação seletivos do GC-MS/MS, é possível identificar vários compostos alvo (por exemplo, n-alcenos, terpanos, esteranos, HPAs) a partir de matrizes complexas em uma única análise cromatográfica, permitindo assim a identificação e quantificação de analitos em concentrações muito baixas e com boa relação S/N.

Há na literatura estudos que empregam essa técnica nos mais variados campos de aplicação, como por exemplo, na determinação de pesticidas em amostras alimentícias e ambientais ¹¹¹⁻¹¹⁴, poluentes em diferentes matrizes (água, ar e solo)

^{115,116}, análises forenses ^{117–119}, estudos em biotecnologia ^{120–122}, avaliações toxicológicas ^{116,123}, farmacologia e medicina ^{124–126}.

Para combustíveis fósseis, a GC-MS/MS tem sido ainda relativamente pouco aplicada. Estudos existentes determinaram HPAs ¹²⁷, asfaltenos ¹²⁸, *fingerprinting* de hidrocarbonetos ^{129,130} e de compostos sulfurados^{131,132}. Em todos os casos, o modo de operação é o MRM.

Entretanto, até o momento, não há nenhum estudo de N-compostos por GC-MS/MS publicados na literatura científica, seja em matrizes petroquímicas ou em qualquer outro tipo de amostra.

2.4 ÁREA DE ESTUDO – BACIA POTIGUAR

A Bacia Potiguar possui uma área de 222.699km² e está localizada no extremo leste da bacia equatorial brasileira, estando sua maior parte no estado do Rio Grande do Norte e uma pequena parte no estado do Ceará (Figura 11). É tradicional produtora de petróleo, atualmente em atividade. A exploração de hidrocarbonetos iniciou-se na Bacia Potiguar em 1949 e as atividades de exploração foram intensificadas na década de 70, e novos levantamentos levaram a descoberta de diversos campos ¹³³.

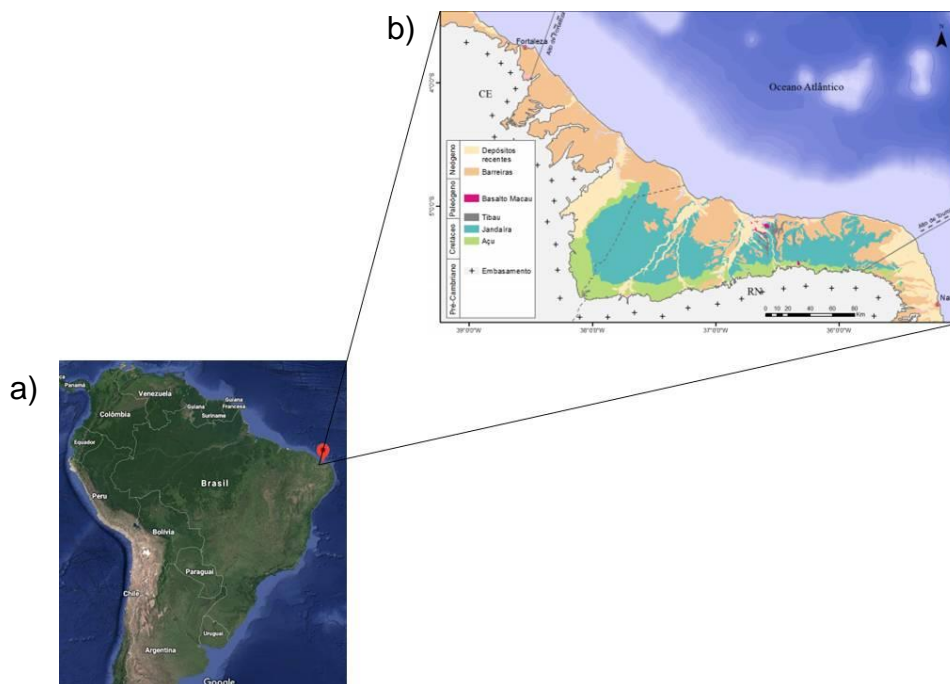


Figura 11 - Localização da Bacia Potiguar: **(a)** Localização da Bacia Potiguar no mapa do Brasil e **(b)** ampliação mostrando a região da Bacia Potiguar. Fonte: Adaptado de Angelim et al. (2006)¹³⁴ e Mohriak (2003)¹³⁵.

Na Bacia Potiguar há diferentes tipos de rochas geradoras, devido as condições físico-químicas dos paleoambientes deposicionais aos quais a matéria orgânica deu origem e foi depositada como por exemplo, ambiente lacustre, transicional e marinho^{136–138}. Conseqüentemente, há petróleos com diferentes características químicas e físicas.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a determinação de N-marcadores na Bacia Potiguar. No entanto, há estudos de biomarcadores como esteranos e terpanos para avaliar nível de biodegradação¹³⁹, além de trabalhos relacionados a modelagem geoquímica¹⁴⁰ e a variabilidade composicional de óleos associados a diferentes tipos de rochas geradoras¹⁴¹.

De particular importância para o presente estudo, é o trabalho de Alves et al. (2018)¹⁴², os autores avaliaram oito amostras de petróleo (denominadas de P1 a P8) de diferentes pontos da Bacia Potiguar a fim de estudar as correlações geoquímicas entre as amostras e suas possíveis rochas geradoras. A pesquisa se baseou na interpretação dos biomarcadores saturados como as razões de pristano/fitano, hopano/esterano, tetracíclicos/poliprenóides, gamacerano/hopano e tetracíclico C₂₄/

tricíclico C₂₆. O estudo permitiu inferir que as amostras de óleos P1, P2, P5 e P8 seriam oriundas de rochas geradoras depositadas em palioambiente marinho, mais redutor, representado pela formação Alagamar, enquanto que os petróleos identificados como P3, P4, P6 e P7 foram provenientes de uma geradora lacustre em condições subóxicas.

Alves et al. (2018) ¹⁴² realizaram etapas de fracionamento das amostras através da metodologia SARA e as porcentagem de recuperação da fração resina (ou NSO) foram entre $10 \pm 0,8$ e $21,3 \pm 0,3$. Outros estudos descrevem uma baixa taxa de recuperação para essa fração. Por exemplo, Suatoni et al. (1975) ¹⁴³, empregando HPLC encontraram valores de 0,6 a 27,6%, estudos mais recentes como os de Song et al. (2016) ³ a faixa de recuperação foi entre 4,70 a 14,07%, Silliman et al. (2002) ⁶¹ de 1,7 a 22,1% e Hwang et al. (2002)⁹² 4,7 a 29,6%. De modo geral, a baixa recuperação da fração NSO, em torno de 20%, é o resultado da complexidade da amostra e da baixa proporção desses constituintes no petróleo.

Conforme já relatado, a avaliação de compostos utilizando etapas de pré-fracionamento da amostra pode significar perda dos analitos de interesse principalmente se esses compostos estão presentes em baixas concentrações comprometendo, desse modo, a autenticidade de análises quantitativas. Assim, faz-se necessário o emprego de análises que reduzam etapas de pré-tratamento e, conseqüentemente, perdas do analito. No entanto, a utilização de amostras brutas ou com menos etapas de pré-tratamento, principalmente em matrizes complexas como o petróleo, requer a utilização de técnicas sensíveis e seletivas.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os solventes empregados em todas as etapas foram: n-hexano e diclorometano, todos grau P.A (Merck, Darmstadt, Alemanha). Também utilizou-se sulfato de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha), sílica gel com granulometria de 60 mesh (Merck, Darmstadt, Alemanha) para etapa de fracionamento. Foram utilizadas vidrarias comuns de laboratório, e para o fracionamento, coluna de vidro (12 cm × 0,8 cm d.i.). Para a limpeza das vidrarias foi utilizado detergente neutro Extran® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para medida de volumes empregadas nas diluições de padrões foram utilizadas micropipetas de capacidades de 2-20 µL e de 100-1000 µL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Padrões de referência foram adquiridos via importação da Chiron (Trondheim, Noruega) e o padrão interno (PI) pireno-d10 adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As especificações dos padrões estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Especificação dos padrões empregados no estudo qualitativo e quantitativo de N-marcadores em petróleo

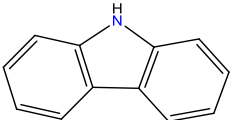
Padrões	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Concentração (mg L ⁻¹)	CAS NUMBER
CARBAZOL				
9H-carbazol		C ₁₂ H ₉ N	*	86-74-8

Tabela 5 - Especificação dos padrões empregados no estudo qualitativo e quantitativo de N-marcadores em petróleo

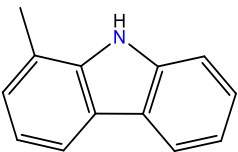
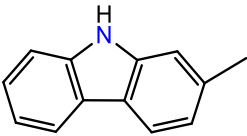
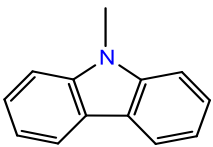
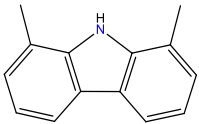
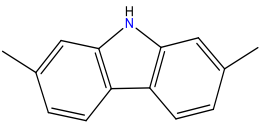
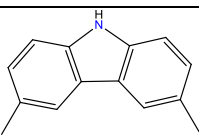
Padrões	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Concentração (mg L ⁻¹)	CAS NUMBER
METILCARBAZOL				
1-metilcarbazol		C ₁₃ H ₁₁ N	200	27323-29-1
2-metilcarbazol		C ₁₃ H ₁₁ N	200	3652-91-3
9-metilcarbazol		C ₁₃ H ₁₁ N	120	1484-12-4
DIMETILCARBAZOL				
1,8-dimetilcarbazol		C ₁₄ H ₁₃ N	100	6558-83-4
2,7-dimetilcarbazol		C ₁₄ H ₁₃ N	100	18992-65-9
3,6-dimetilcarbazol		C ₁₄ H ₁₃ N	100	5599-50-8

Tabela 5 - Especificação dos padrões empregados no estudo qualitativo e quantitativo de N-marcadores em petróleo

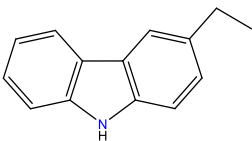
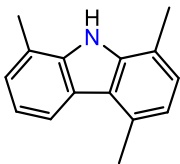
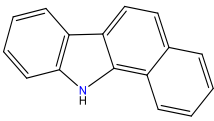
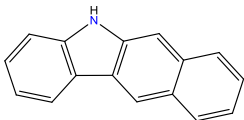
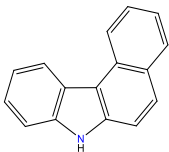
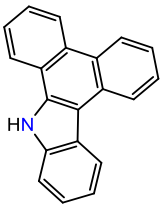
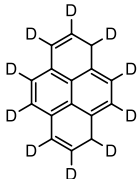
Padrões	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Concentração (mg L ⁻¹)	CAS NUMBER
ETILCARBAZOL				
3-etilcarbazol		C ₁₄ H ₁₃ N	1000	5599-49-5
TRIMETILCARBAZOL				
1,4,8-trimetilcarbazol		C ₁₅ H ₁₅ N	200	78787-83-4
BENZOCARBAZOL				
11H-benzo[a]carbazol		C ₁₆ H ₁₁ N	200	239-01-0
5H-benzo[b]carbazol		C ₁₆ H ₁₁ N	200	243-28-7

Tabela 5 - Especificação dos padrões empregados no estudo qualitativo e quantitativo de N-marcadores em petróleo

Padrões	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Concentração (mg L ⁻¹)	CAS NUMBER
7H-benzo[c]carbazol		C ₁₆ H ₁₁ N	200	205-25-4
DIBENZOCARBAZOL				
13(H)-dibenzo[a,i]carbazol		C ₂₀ H ₁₃ N	200	239-64-5
PADRÃO INTERNO				
pireno d-10		C ₁₆ D ₁₀	100	1718-52-1

*padrão em estado sólido de pureza 99,20% Fonte: Autoria própria com base nas informações da Chiron.As¹⁴⁴, Sigma Aldrich¹⁴⁵ e NIST⁵⁵ (2020).

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Todo o procedimento experimental foi desenvolvido no LEPETRO, localizado no Instituto de Geociências (IGEO) / Universidade Federal da Bahia (UFBA). Para a pesagem dos padrões nitrogenados, reagentes e amostras foi utilizada balança

analítica de precisão AUY220 (Shimadzu, Kioto, Japão) com limites mínimo e máximo de pesagens 0,01g e 220 g, respectivamente.

Para a determinação de nitrogênio total (N_{total}) utilizou-se o analisador elementar por combustão LECO CN628 (St. Joseph, MI, EUA) com sistema de aquisição de dados CHN628SERIES (California, EUA).

A mufla (QUIMIS[®], Brasil) foi utilizada para secagem da sílica em gel a temperatura de 400°C durante 4 horas e a estufa 4106ND (Nova Ética, São Paulo, Brasil) para secagem de vidrarias.

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema GC-MS/MS (Figura 12) equipado com um cromatógrafo a gás 7890B, com injetor *split/splitless* e um detector de massas 7000C com cela de colisão hexapolo linear, todos da Agilent (Santa Clara, CA, EUA). O sistema é conectado a um amostrador automático G4513A (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). A coluna capilar foi uma DB-5MS (5%-fenil-dimetilpolisiloxano) de 30 m com 0,25 mm de d.i e 0,25 µm de espessura de filme (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Para a aquisição de dados, empregou-se o sistema MassHunter B.07.00 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). A biblioteca comercial para tratamento dos dados foi a NIST versão 2.7.

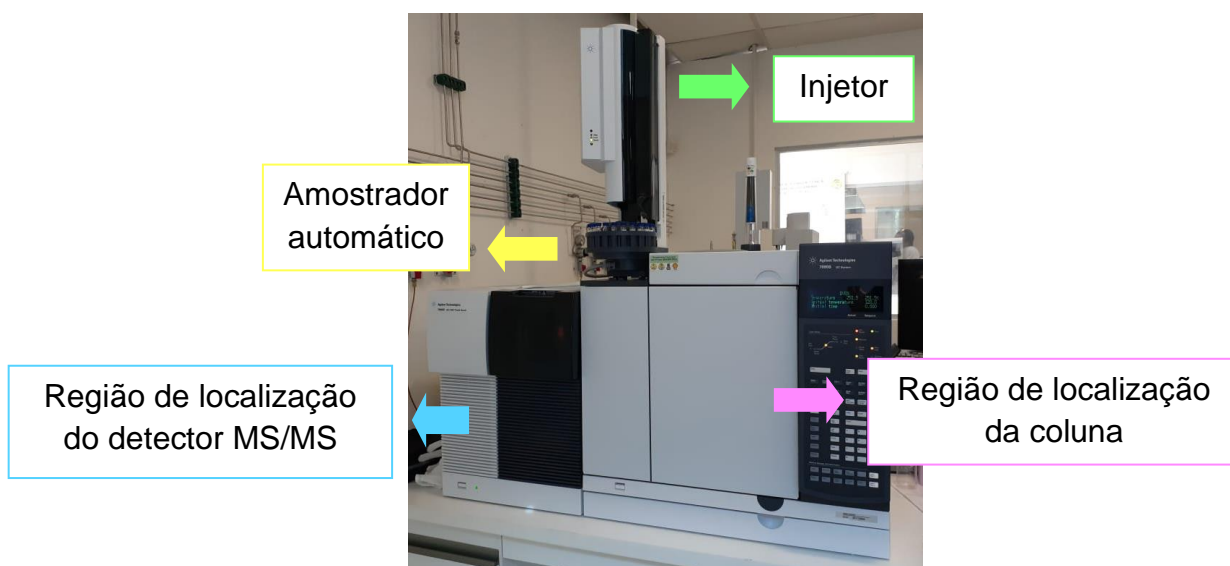


Figura 12 - Imagem do instrumento GC-MS/MS utilizado neste trabalho indicando as partes principais. Fonte: Autoria própria (2020).

O gás de arraste utilizado no GC foi o hélio com pureza 99,999%; o gás de colisão para o MS foi o nitrogênio de pureza 99,999% e o oxigênio foi utilizado como

gás de combustão no analisador elementar LECO com pureza 99,9999%; todos da White Martins (Bahia, Brasil).

3.3. ANÁLISE DE NITROGÊNIO TOTAL

As análises de nitrogênio total foram realizadas com a finalidade de verificar a presença e o teor de N nas amostras de petróleo e assim, certificar-se de que seria possível a posterior análise por GC.

Para cada amostra de petróleo foi pesado cerca de 1,0 g em cadinhos de estanho. Após a pesagem esses cadinhos foram encapsulados e levados ao carregador do equipamento LECO CHN-528. A amostra foi introduzida no forno primário resultando em uma rápida e completa combustão da amostra a uma temperatura de 1050 °C. No sistema, carbono, hidrogênio e oxigênio são oxidados a dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e óxido nítrico (NO). A faixa de precisão corresponde a 0,02 mg ou 0,5%. O resultado é expresso em porcentagem.

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

As soluções padrão armazenadas em ampola foram transferidas para vials novos previamente identificados. Para o padrão no estado sólido (carbazol), foi realizada a diluição em DCM usando balão volumétrico (50 mL) e a solução foi armazenada em um frasco de vidro âmbar.

O preparo das soluções padrão foi realizado em duas etapas: (i) preparo de soluções estoque e (ii) soluções de trabalho. Foram preparadas soluções estoque de 100 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹ e as soluções trabalho consistiram em *mix* contendo todos os padrões nitrogenados (Tabela 5) com concentrações de 1 mg L⁻¹ e 0,250 mg L⁻¹ utilizada na análise SCAN e de 0,250 mg L⁻¹ para análises SIM, PIS e MRM. Para a curva de calibração, as soluções estoque foram empregadas, conforme será especificado posteriormente no item 3.8.2. Todas as soluções foram diluídas com solvente diclorometano e foram armazenadas a temperatura inferior a -10°C.

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

As oito amostras de petróleo empregadas neste estudo (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8) são provenientes da Bacia Potiguar e foram cedidas pelo Núcleo de Processamento Primário e Reuso de Água Produzida e Resíduo (NUPPRAR) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Natal, Natal-RN. As amostras foram coletadas em poços distintos da bacia, porém sem o fornecimento da localização.

As amostras P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8 foram pesadas em balança analítica diretamente em vials de 1,5 mL e na sequência diluídas com DCM para concentração de 0,02 mg uL⁻¹ e encaminhadas para análise cromatográfica.

3.5.1 Branco da matriz

O branco da matriz (ou branco do método) se refere a amostra que contém os constituintes exceto o analito, é a estimativa mais completa da contribuição da matriz para a resposta analítica. No presente trabalho foi usado para avaliar o efeito de matriz.

O branco da matriz foi obtido a partir do fracionamento SARA, separando a fração saturada (livre de N-compostos). Procedimento semelhante foi empregado por Franchina et al. (2015)¹⁴⁶.

Para o fracionamento SARA, inicialmente pesou-se a amostra P1 em triplicata (0,0223g); (0,0221g) e (0,0222g). Na ponta da coluna foi inserido algodão previamente extraído e realizou-se o empacotamento com sílica no comprimento de 12 cm. Após o preenchimento da coluna, uma fina camada de sulfato de sódio previamente calcinado em mufla foi adicionada. A amostra foi então transferida para a coluna. A eluição da fração saturada foi realizada utilizando-se 30 mL de *n*-hexano. Esse procedimento foi realizado para a triplicata, obtendo-se um total de 90 mL da fração saturada.

3.6 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

O método GC-MS/MS foi otimizado empregando-se os 13 padrões analíticos de N-compostos nos modos SCAN, SIM e MRM, com destaque para a última forma de aquisição que foi utilizada para a quantificação por apresentar uma maior sensibilidade e seletividade quando comparada ao modo SCAN e SIM.

Sempre antes das análises no GC-MS/MS, foram realizadas injeções do branco do sistema e do solvente. Desse modo, as análises foram realizadas com a garantia de não haver contaminantes que interferissem na determinação dos analitos. O cromatograma do branco do sistema encontra-se na Figura A do Anexo I e o cromatograma do branco do solvente diclorometano encontra-se na Figura B do Anexo I.

3.6.1 Condições de análise no modo SCAN

As análises no modo SCAN foram necessárias para determinar as melhores condições de programação de temperatura do forno, verificar os tempos de retenção dos analitos bem como identificar e confirmar através do espectro de massas os íons correspondentes a cada composto nitrogenado.

Realizaram-se injeções de solução padrão contendo os treze compostos e o PI pireno d-10 na concentração de 1000 ug mL^{-1} . A confirmação da identidade dos analitos foi obtida com injeção individual dos nitrogenados.

As condições cromatográficas otimizadas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos otimizados para análise dos marcadores nitrogenados

Parâmetro	Condição
Vazão do gás He	1mL min ⁻¹
Volume de injeção	1 µL
Modo de Injeção	<i>splitless</i>
Temperatura do Injetor	280°C
Rampa de temperatura	120°C/ (4°C min ⁻¹) 300°C
Temperatura da transferline	300°C
Tempo total de corrida	45 min

Fonte: Autoria própria (2020).

Para a detecção, a temperatura da fonte de íons foi de 230 °C, o MS1 foi empregado para a varredura de massas no intervalo de 40 a 400 e os quadrupolos MS1 e MS2 operaram no modo de transmissão dos íons.

3.6.2. Condições de análise no modo SIM

As análises no modo SIM foram realizadas com o objetivo de obter um parâmetro de comparação com o modo MRM, já que na literatura, a grande maioria dos estudos emprega o modo SIM para a determinação de marcadores nitrogenados.

Para as análises no modo SIM, as condições do GC foram as mesmas otimizadas para o modo SCAN (Tabela 6). Para o sistema de detecção, foram monitorados dois íons de m/z específicos para cada analito: um íon principal (íon de quantificação) e o

outro secundário (íon de confirmação), conforme Tabela 7. As análises foram realizadas usando mix de padrões de N-compostos a 250 µg L⁻¹.

Tabela 7 - Parâmetros experimentais otimizados para análise dos marcadores nitrogenados por GC-MS/MS no modo SIM

Composto	Sigla	Íon principal (m/z)	Íon secundário (m/z)
9-metilcarbazol	9-MC	181	152
carbazol	CA	167	139
1-metilcarbazol	2-MC	181	152
2-metilcarbazol	9-MC	181	152
3,6-dimetilcarbazol	3,6-DMC	195	180
1,8-dimetilcarbazol	1,8-DMC	195	180
2,7-dimetilcarbazol	2,7-DMC	195	180
3-etilcarbazol	3-EC	195	180
1,4,8-trimetilcarbazol	1,4,8-TMC	209	194
benzo[a]carbazol	B[a]C	217	189
benzo[b]carbazol	B[b]C	217	189
benzo[c]carbazol	B[c]C	217	189
dibenzocarbazol	DBC	267	133
pireno d-10	PI	212	176

^a T_r tempo de retenção

Para análise no modo SIM os quadropolos MS1 e MS2 foram utilizados no modo estático.

3.6.3. Condições de análise no modo PIS

Este é o primeiro trabalho que emprega a GC-MS/MS (MRM) para a determinação de N-marcadores em petróleo sem a etapa de fracionamento prévio. Por isso, o primeiro passo foi a seleção dos íons produtos a partir do íon precursor.

Para a análise no modo de varredura íons produtos (PIS), foi realizada a seleção do íon precursor de maior intensidade no espectro de massas de cada analito no MS1. Na cela de colisão cada um desses íons foi fragmentado com diferentes energias (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60eV), e o MS2 operou no modo SCAN.

A partir dos resultados dos espectros de massas obtidos, correspondentes aos íons produzidos de acordo com o íon precursor selecionado e energia empregadas, foram construídos gráficos com auxílio do programa Excel[®] (2019), plotando a energia de colisão *versus* abundância relativa do íon produto (fragmentos obtidos no MS2). Com a avaliação dos gráficos foi definida a menor energia capaz de fragmentar o íon precursor, de modo a obter a maior abundância do íon produto para cada analito de interesse. Foram selecionadas as fragmentações primárias (mais intensa) e secundária para realizar a análise no modo MRM.

3.6.4. Condições de análise no modo MRM

A combinação de íons precursores e íons produtos mais intensos com suas correspondentes energias ideais de colisão foram empregadas para formar as transições do MRM para cada analito; duas transições MRM diferentes foram monitoradas: uma transição quantitativa e outra transição confirmatória. Ajustou-se o método com os tempos de retenção; e as transições de cada analito com o mix de padrões.

3.7 ESTUDO COMPARATIVO GC-MS/MS NO MODO SIM E MRM

Um estudo comparativo foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia do método MRM frente ao modo SIM, na determinação simultânea dos N-marcadores sem etapa prévia de fracionamento. Para tal finalidade, foi selecionada a amostra que apresentou um maior teor de nitrogênio total.

O procedimento adotado para a interpretação do estudo comparativo consistiu na avaliação qualitativa individual dos compostos considerando-se a intensidade do sinal (relação sinal/ruído) de ambos os métodos e a seletividade.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE N-MARCADORES POR GCMS/MS

Para garantir a qualidade analítica dos resultados, foram realizados procedimentos para validação do método. Os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, efeito de matriz foram avaliados no modo MRM. O protocolo de validação seguiu as recomendações do INMETRO (2016) ¹⁴⁷.

3.8.1 Efeito de matriz

Antes da avaliação dos parâmetros de validação, verificou-se o efeito de matriz. Duas curvas de calibração foram avaliadas a fim de verificar a presença do efeito de matriz (EM%): (1) compatibilizada com a matriz e (2) preparada em solvente. As faixas de concentração para ambas as curvas foram de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para benzocarbazóis, de 50 a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para dibenzocarbazol, de 0,5 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para carbazol, metilcarbazóis, e 1,4,8-trimetilcarbazol, de 35 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 3-etilcarbazol, de 500 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 1,8- e 3,6-dimetilcarbazol e de 13 a 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 2,7-dimetilcarbazol.

A curva de calibração (1) foi preparada pela adição de diferentes volumes do mix contendo os 13 padrões de N-compostos e o PI na solução do branco de matriz (obtida conforme descrito no item 3.5.1). A curva de calibração (2) foi preparada da mesma forma, no entanto usando solvente (DCM) ao invés do branco da matriz. O PI (pireno-d10) foi adicionado à concentração constante de $50\mu\text{g L}^{-1}$ em ambas as curvas. Todas as curvas de calibração foram injetadas em triplicata.

O efeito de matriz (EM%) foi avaliado pela comparação dos coeficientes angulares obtidos nas curvas feitas com diluição na matriz (S_m) e diluídas em solvente (S_s), conforme a equação abaixo:

$$\text{EM (\%)} = \left[\left(\frac{S_m}{S_s} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde S_m corresponde ao coeficiente angular da curva de calibração preparada com a matriz e S_s ao coeficiente angular da curva de calibração diluída em solvente. Se EM (%) for igual a zero quer dizer que não há influência da matriz no sinal do analito; valores negativos indicam supressão do sinal do analito pela matriz e valores positivos indicam que o sinal do analito é aprimorado pelos componentes da matriz ¹⁴⁸. Para resultados acima de 10% é considerado que a matriz começa a exercer influência sob a respostas dos analitos ¹⁴⁹.

Foi aplicado o teste t com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$), utilizando o software Excel® (2019) para comparar estatisticamente os coeficientes angulares das curvas de calibração.

3.8.2 Linearidade

A linearidade indica a proporcionalidade entre a concentração e os resultados fornecidos pelo método em uma determinada faixa de aplicação ¹⁵⁰. Avaliou-se a linearidade das curvas de calibração através do coeficiente de determinação R^2 .

Para quantificação dos analitos a linearidade foi avaliada pela curva de calibração (1) compatibilizada com a matriz. As faixas de concentração foram de 35 a

250 $\mu\text{g L}^{-1}$ (carbazol, metilcarbazóis, 3-etilcarbazol e 1,4,8-trimetilcarbazol); 100 a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (1,8-dimetilcarbazol, 3,6-dimetilcarbazol e dibenzocarbazol); 50 a 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2,7-dimetilcarbazol); 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 150 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (benzocarbazóis). Todas as curvas foram injetadas em ordem crescente de concentração e em triplicata. No mínimo 5 e no máximo 7 pontos (excluindo-se o ponto zero) foram considerados, conforme especificações do INMETRO (2016) ¹⁴⁷.

3.8.3 Limites de detecção e quantificação

O Limite de detecção (LOD) representa a menor concentração do analito que pode ser determinada, mas não necessariamente quantificada sob determinadas condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com nível aceitável de exatidão e precisão (INMETRO, 2016) ¹⁴⁷.

Os LOD e LOQ foram avaliados de acordo com os parâmetros da curva de calibração sendo esse mais estatisticamente confiável em relação aos métodos visual e relação sinal-ruído ^{147,150}. Além disso, nas determinações realizadas através do sistema de massas em série, a linha de base é quase anulada quando comparado ao sistema quadrupolar simples, desse modo, a avaliação dos limites de detecção e quantificação por s/n não seria o mais adequado. O limite de detecção foi calculado de acordo com a equação (Eq.2) e o de quantificação de acordo com a equação (Eq.3):

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq.2})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta estimada pela equação da linha de regressão e S o coeficiente angular da curva. Estes parâmetros foram estimados através do software Microsoft Excel[®] versão 2019.

3.8.4 Precisão inter-dia e intra-dia

A precisão refere-se a dispersão dos resultados entre ensaios repetidos e independentes ¹⁵¹. Neste trabalho a avaliação da precisão intra-dia foi realizada efetuando-se 3 injeções de cada concentração (50 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹ e 500 µg L⁻¹) das soluções fortificadas e para a precisão inter-dia foram efetuadas 5 injeções em 3 dias diferentes da solução 500 µg L⁻¹ fortificada.

O cálculo da precisão foi realizado através da medida do desvio padrão relativo (RSD%) ou coeficiente de variação (CV %) (Eq.4). O intervalo de confiança da média (IC) a 95 % (Eq.5) também foi empregado para expressar o resultado quantitativo das amostras avaliadas.

$$\text{RSD \% ou CV \%} = \frac{s}{\bar{X}} \quad (\text{Eq.4})$$

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Eq.5})$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão absoluto, \bar{X} representa a média aritmética das medições, t_{n-1} valor crítico da distribuição de *Student* com $n-1$ graus de liberdade, sendo t um valor tabelado.

3.8.5 Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método foram realizados testes de recuperação expresso em percentual através da fortificação com os padrões de interesse, em três níveis diferentes, no branco da matriz. Os níveis adicionados foram: 50 µg L⁻¹, 100 µg L⁻¹ e 500 µg L⁻¹.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO NAS AMOSTRAS DE PETRÓLEO PARA AVALIAÇÃO GEOQUÍMICA

O método desenvolvido e validado foi aplicado nas oito amostras de petróleo (item 4.6) e os resultados obtidos foram empregados para a interpretação geoquímica. Nessa etapa, razões diagnósticas foram calculadas a partir dos valores dos N-marcadores quantificados.

3.10. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS DADOS

3.10.1. Análise de Componentes Principais

A PCA consiste em uma avaliação exploratória que entre amostras de um determinado conjunto de dados evidencia similaridades e diferenças. Em uma análise PCA dados n-dimensionais são projetados em uma menor dimensão. Na PCA, os gráficos *scores* e *loadings* definem o agrupamento das amostras de modo que os *scores* forcem a composição das PCs em relação as amostras e *loadings* em relação as variáveis. A associação dos gráficos *scores* e *loadings* fornece a influência de cada variável em cada amostra ^{152,153}.

A análise PCA foi realizada utilizando-se os dados em triplicata da análise quantitativa das amostras analisadas utilizando-se o software Statistic 8.0. Essa abordagem foi realizada com o objetivo de facilitar a interpretação geoquímica dos dados, identificando grupos com características similares.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 NITROGÊNIO TOTAL

A análise de nitrogênio total (N_{total}) foi a primeira a ser realizada e teve como objetivo principal verificar a presença e o teor de N nas oito amostras em estudo e certificar-se de que seria possível a detecção por GC. Os resultados estão descritos na Tabela 8 para as amostras P1 a P8.

Tabela 8 - Resultados das análises de nitrogênio total (%) para as oito amostras de óleo cru P1 a P8

Amostra	N_{total} (%)
P1	0,49
P2	0,34
P3	0,31
P4	0,24
P5	0,22
P6	0,28
P7	0,17
P8	0,21

Limite de quantificação instrumental = 0,10%

Fonte: Autoria própria (2020).

Conforme dados apresentados na Tabela 8 as concentrações de N_{total} variaram entre 0,17% (amostra P7) a 0,49% (amostra P1). Esses resultados estão de acordo com a faixa de valores de 0,1 a 2% descritas na literatura ^{4,5,7,10,11,154}.

Através dos valores de N_{total} é possível obter informações sobre a densidade (grau API) de um óleo. Baixos teores de N_{total} correspondem a API mais elevados e, portanto, mais fáceis de processar^{66,160}. Apesar do presente trabalho não ter como um dos objetivos avaliar a densidade dos petróleos, devido às amostras avaliadas terem sido coletadas na bacia para caracterização geoquímica, a informação serve apenas como uma avaliação interessante do ponto de vista da exploração.

Os resultados foram importantes para certificar-se da presença de N_{total} nas amostras e assim constatar a viabilidade da continuidade do estudo cromatográfico com os pontos selecionados.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

4.2.1 Modo Scan

A análise do mix de padrões de N-marcadores no modo SCAN (faixa de varredura de massas: 40 – 400) foi realizada com a finalidade de otimizar as condições cromatográficas e obter os espectros de massas dos respectivos analitos. O cromatograma da análise SCAN está representado na Figura 13, no modo íon extraído (do inglês, *Extracted Ion*: EIC). Antes da injeção dos padrões, foram realizadas corridas cromatográficas para brancos do sistema e solvente sendo verificado a ausência de compostos que pudessem interferir na análise (Anexo 1).

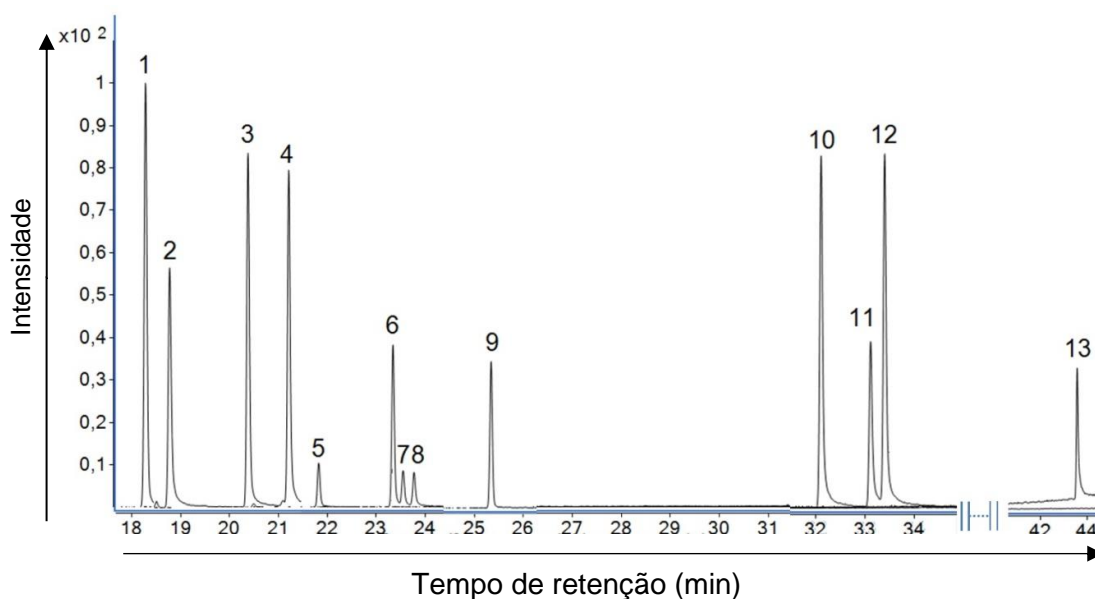


Figura 13 - Cromatograma no modo SCAN para o mix contendo os 13 padrões de compostos nitrogenados ($1000\mu\text{g L}^{-1}$). Identificação dos picos: **[1]** 9-metilcarbazol; **[2]** carbazol; **[3]** 1-metilcarbazol; **[4]** 2-metilcarbazol; **[5]** 1,8-dimetilcarbazol; **[6]** 3-etilcarbazol; **[7]** 3,6-dimetilcarbazol; **[8]** 2,7-dimetilcarbazol; **[9]** 1,4,8-trimetilcarbazol; **[10]** benzo[a]carbazol; **[11]** benzo[b]carbazol; **[12]** benzo[c]carbazol e **[13]** dibenzocarbazol. *Condições cromatográficas descritas no item 5.6.* Fonte: Autoria própria (2020).

A ordem de eluição dos compostos (m/z 167) avaliados deu-se com o aumento da massa molecular com exceção do carbazol (CA) (m/z 167) cujo tempo de retenção foi maior comparado ao 9-metilcarbazol (m/z 181). Esse comportamento provavelmente se deve à interação dos compostos avaliados com a fase estacionária da coluna cromatográfica (5%-fenil-dimetilpolisiloxano), pois grupos SiOH interagem mais fracamente com substituintes do tipo alquil fazendo com que seja diminuído o tempo de retenção (t_R) desses compostos ¹⁵⁶, conforme ilustrado na Figura 14.

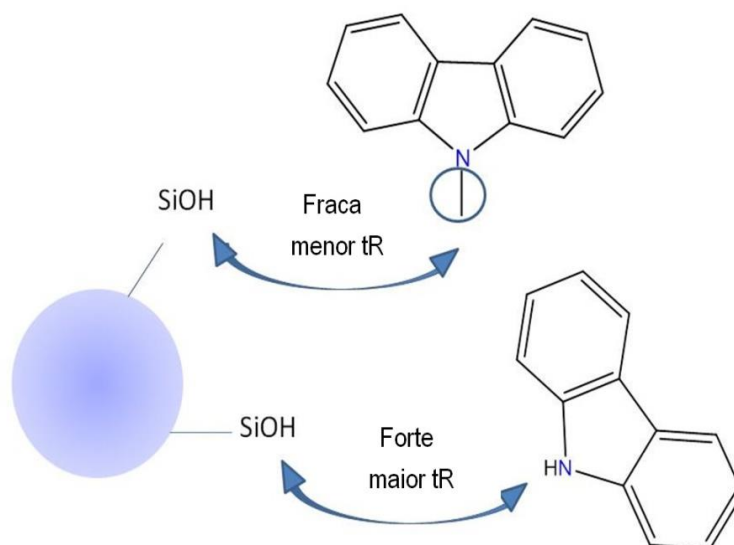


Figura 14 - Ilustração da interação entre os grupos SiOH presentes na fase estacionária da coluna cromatográfica com o carbazol e o metilcarbazol. Fonte: Adaptado de Amorim (2019) ¹⁵⁶.

Além disso, trabalhos na literatura utilizando diferentes tipos de colunas com fase 5% fenil, evidenciaram a retenção de compostos de maiores massas moleculares em t_R inferiores a compostos mais leves (de menor massa molecular). No trabalho de Bakr (2009) ¹⁷ os cromatogramas no modo EIC (m/z 167, 181, 195 e 217) apresentam a identificação do CA. No entanto, outros picos não identificados anteriores ao t_R do CA foram evidenciados sugerindo que compostos de $m/z \geq 167$ foram retidos antes do CA em uma coluna BPX5. Bechtel et al. (2013) ⁴⁶ demonstraram cromatogramas no modo SIM (m/z 195 + 217) e também houve a presença de picos anteriores ao CA utilizando uma coluna DB-5MS.

No presente trabalho as análises dos padrões através da solução mix e confirmação do espectro de massas e da injeção individual dos padrões carbazol, 9-metilcarbazol, 1-metilcarbazol, 2-metilcarbazol permitiram a confirmação dos t_R dos N-marcadores avaliados conforme ilustrado na Figura 15.

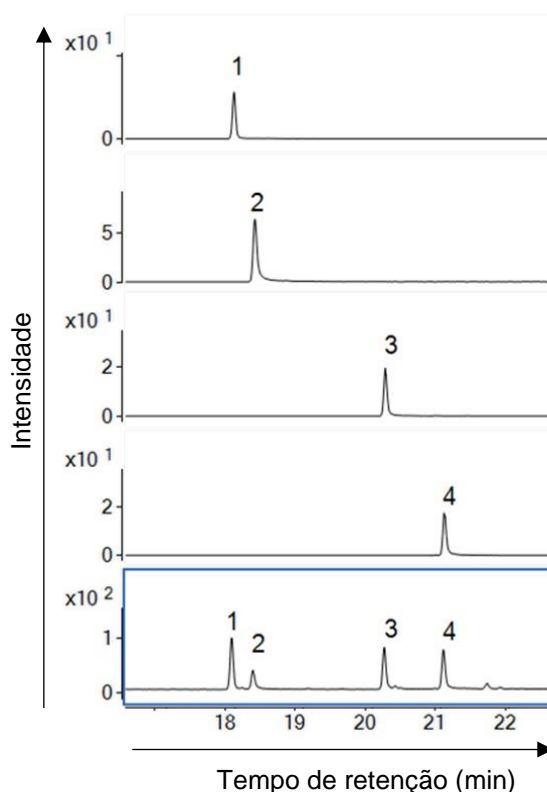


Figura 15 - Cromatograma no modo SCAN – (EIC = m/z 167 + m/z 181) para comparação entre injeções de padrões individuais e mix de N-marcadores no modo SCAN. Identificação dos picos: **[1]** 9-metilcarbazol **[2]** carbazol **[3]** 1-metilcarbazol **[4]** 2-metilcarbazol. *Condições cromatográficas descritas no ítem 3.6.1.* Fonte: Autoria própria (2020).

4.2.2 Modo SIM

A partir dos espectros de massas obtidos através da análise do mix de padrões nitrogenados no modo SCAN, foram selecionados os íons (m/z) principais e secundários para cada analito que foi monitorado na análise SIM. Foram estabelecidas 5 janelas de tempo e determinados os t_R de cada composto. Na Tabela 9 estão as condições cromatográficas otimizadas e na Figura 16 está ilustrado o cromatograma da análise.

Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos otimizados no modo SIM para a determinação dos compostos nitrogenados estudados e padrão interno

Composto	Nº pico	t_R (min)	Janela de tempo (min)	Íon principal (m/z)	Íon secundário (m/z)
9-metilcarbazol	[1]	18,28	9 – 21,5	181	152
carbazol	[2]	18,55	9 – 21,5	167	139
1-metilcarbazol	[3]	20,38	9 – 21,5	181	152
2-metilcarbazol	[4]	21,21	9 – 21,5	181	152
1,8-dimetilcarbazol	[5]	21,83	21,5 - 24	195	180
3-etilcarbazol	[6]	23,34	21,5 - 24	180	195
3,6-dimetilcarbazol	[7]	23,55	21,5 - 24	195	180
2,7-dimetilcarbazol	[8]	23,77	21,5 - 24	195	180
1,4,8-trimetilcarbazol	[9]	24,59	21 - 31	209	194
pireno-d10	PI	24,73	24 - 31	212	176
benzo[a]carbazol	[10]	32,10	31 - 43	217	189
benzo[b]carbazol	[11]	33,11	31 - 43	217	189
benzo[c]carbazol	[12]	33,40	31 - 43	217	189
dibenzocarbazol	[13]	43,56	43 - 45	267	133

t_R: Tempo de retenção e m/z: relação massa/carga
 Fonte: Autoria própria (2020).

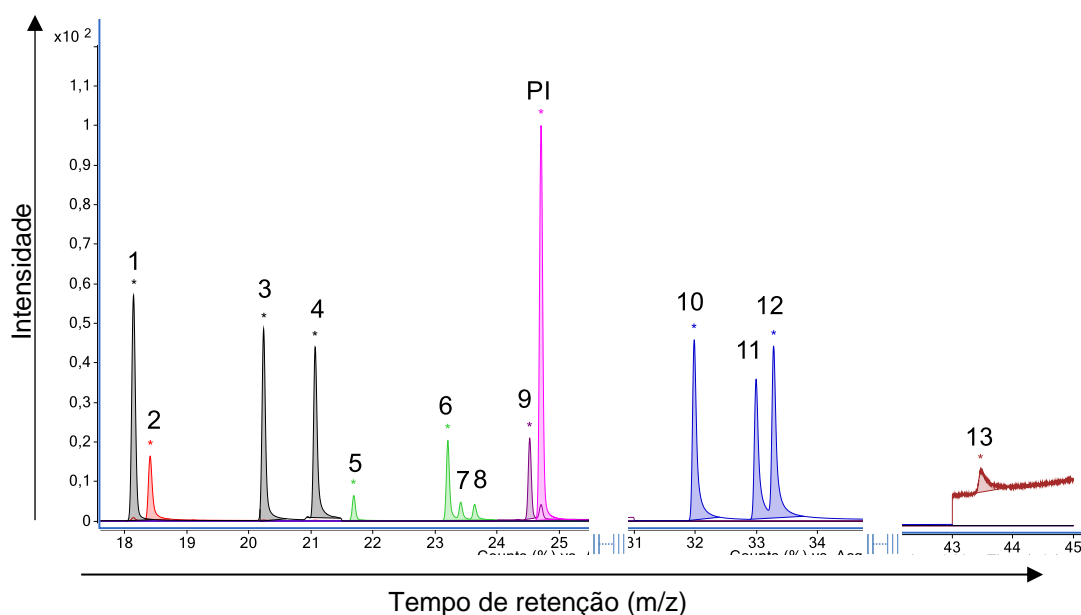


Figura 16 - Cromatograma mix de nitrogenados - modo SIM ($250 \mu\text{g L}^{-1}$). Identificação dos íons m/z 181 (preto), m/z 167 (vermelho), m/z 195 (verde), m/z 209 (roxo), m/z 212 (rosa), m/z 217 (azul) e m/z 267 (marrom). Identificação dos picos: **[1]** 9-metilcarbazol; **[2]** carbazol; **[3]** 1-metilcarbazol; **[4]** 2-metilcarbazol; **[5]** 1,8-dimetilcarbazol; **[6]** 3-etilcarbazol; **[7]** 3,6-dimetilcarbazol; **[8]** 2,7-dimetilcarbazol; **[9]** 1,4,8-trimetilcarbazol; **[10]** benzo[a]carbazol; **[11]** benzo[b]carbazol; **[12]** benzo[c]carbazol e **[13]** dibenzocarbazol. *Condições cromatográficas descritas no item 3.6.1.* Fonte: Autoria própria (2020).

Os espectros de massas dos isômeros das subclasses metilcarbazol (9-, 1-, e 2-MC), dimetilcarbazol (1,8-, 3,6- e 2,7-DMC) e benzocarbazol ([a], [b] e [c]) avaliados neste trabalho são similares. Assim, a identificação individual para esses compostos é através do t_R . Já para o dimetilcarbazol e etilcarbazol, por serem isômeros de posição, o espectro de massas é diferente em relação aos íons primário e secundário, conforme pode ser visualizado na Figura 17. Com base nessa avaliação, o íon principal selecionado para identificação do dimetilcarbazol foi o m/z 195 e para o etilcarbazol o m/z 180 (Tabela 9).

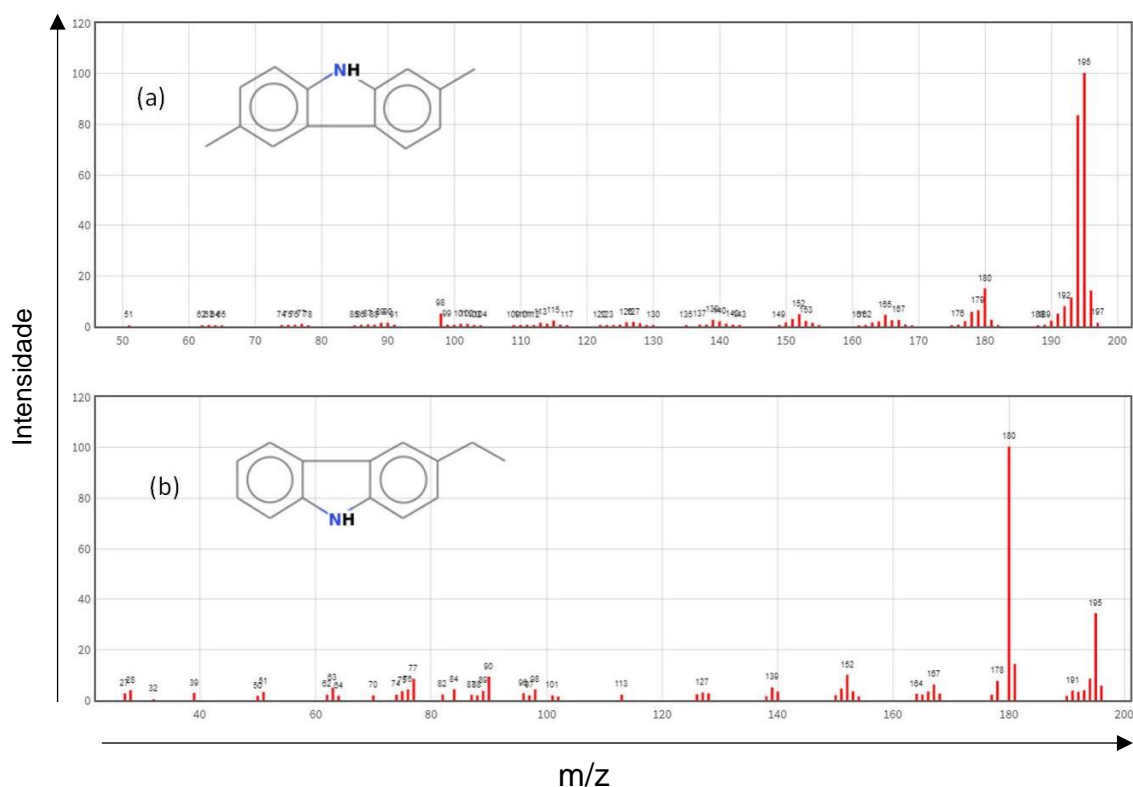


Figura 17 - Espectro de massas referente ao (a) dimetilcarbazol e ao (b) etilcarbazol. Fonte: Adaptado de *National Institute of Standards and Technology* – NIST⁵⁵.

4.2.3 Modo PIS

A partir dos resultados obtidos em SCAN, procedeu-se a análise cromatográfica no modo *Product Ion Scan* (PIS), conforme descrito no item 3.6.3. A identificação do íon precursor foi obtida pelo espectro de massas no modo SCAN. A partir da seleção do íon precursor de cada composto avaliado, várias energias de colisão (variando de 5 a 60 eV, em intervalos de 5 e 10 eV) foram testadas, a fim de obter os espectros PIS (conforme exemplificado na Figura 18 para o composto 1-metilcarbazol).

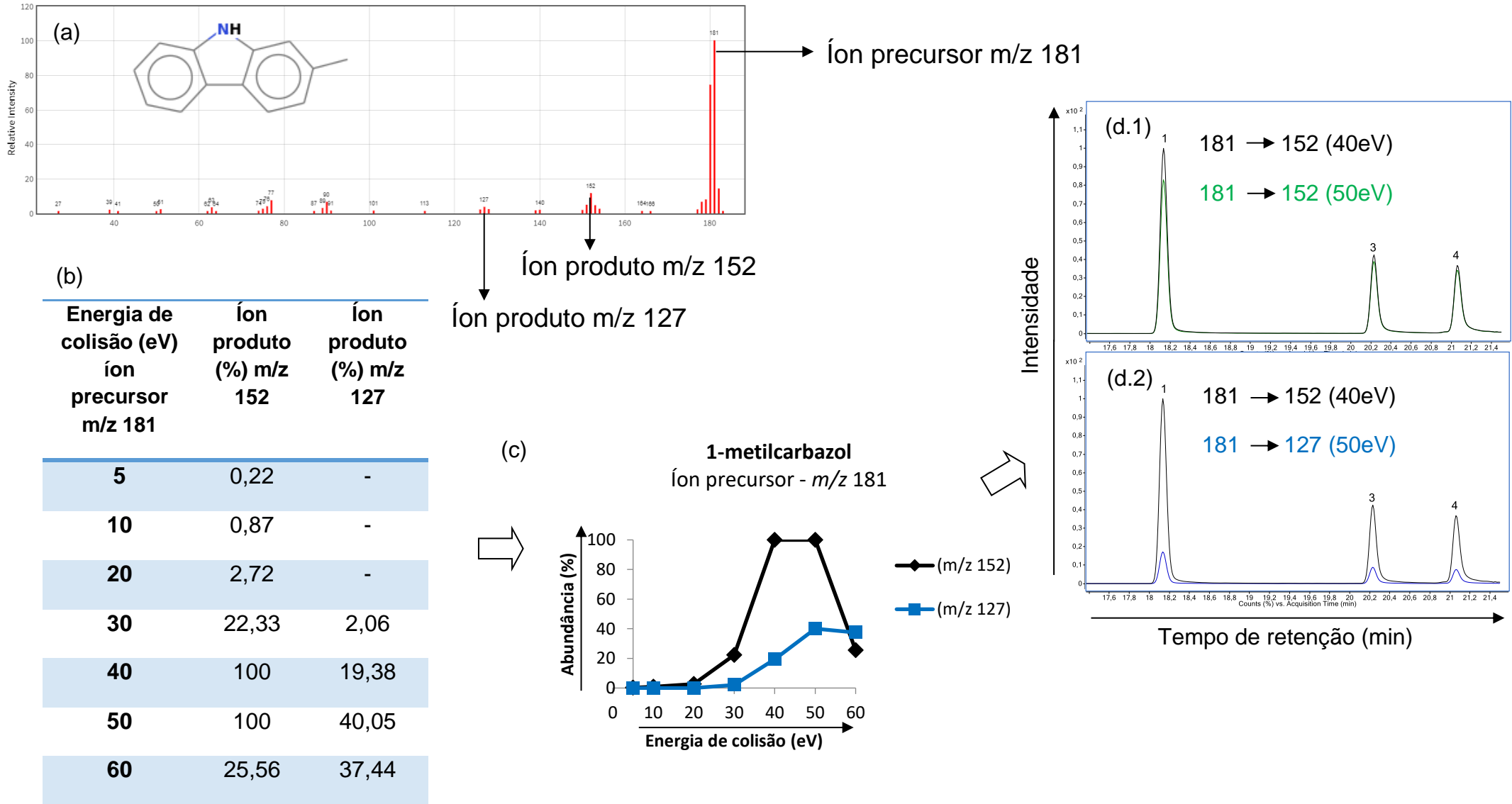
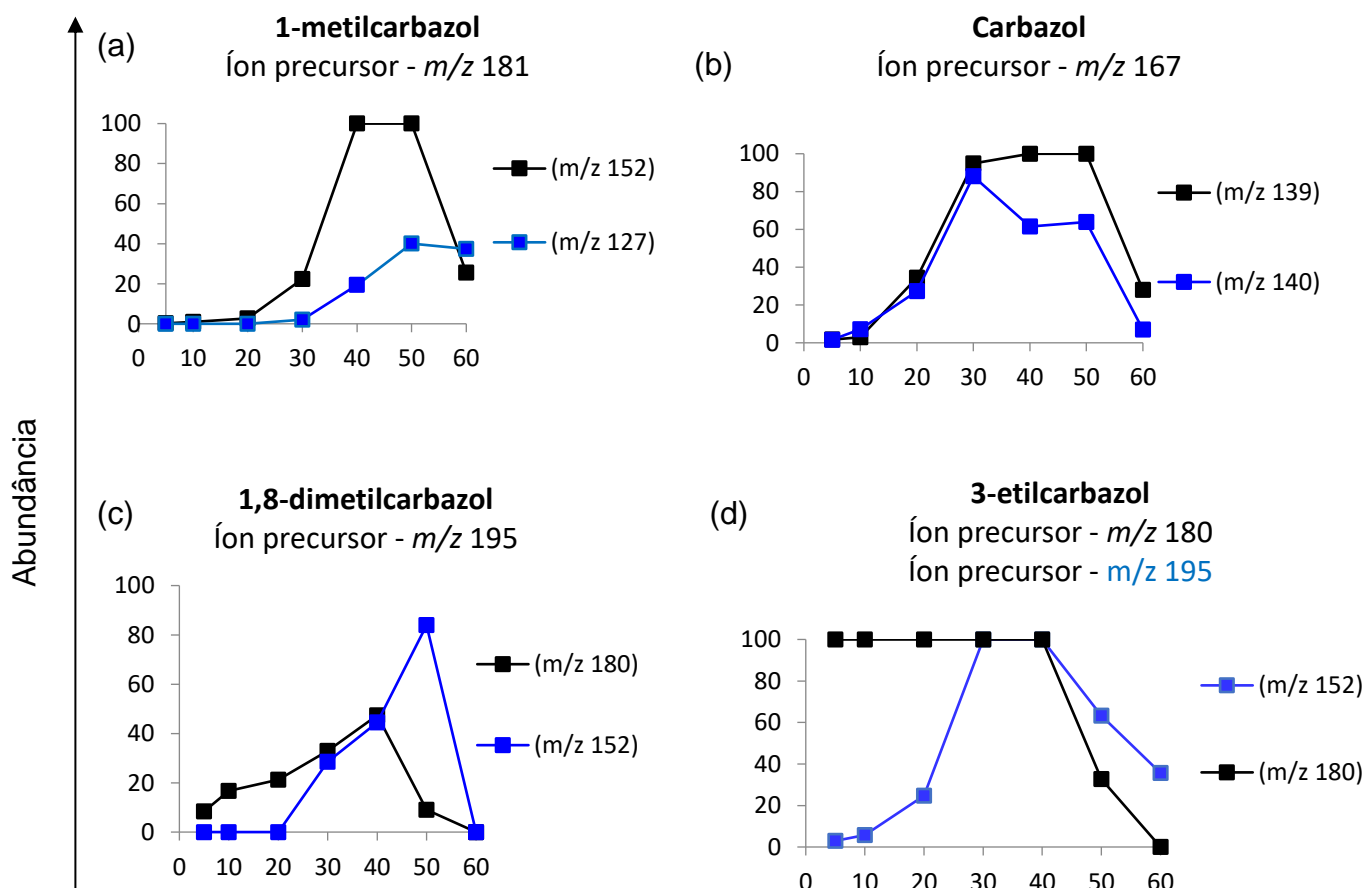


Figura 18 - Etapas de avaliação no modo PIS: **(a)** Escolha dos íons precursor e produtos. **(b)** Tabela: Energia de Colisão (eV) empregada nas análises PIS e abundancia dos íons produtos (m/z 152) e (m/z 127). **(c)** Gráfico: Energia de colisão X abundância dos íons produto. **(d.1)** Cromatograma MRM: diferentes energias aplicadas para a mesma transição e **(d.2)** Sobreposição dos cromatogramas: transições primária e secundária. Identificação dos picos: **[1]** 9-metilcarbazol, **[2]** 1-metilcarbazol e **[3]** 2-metilcarbazol. Fonte: Autoria própria (2020)

Na Figura 18, a fragmentação do íon m/z 181 iniciou-se com o aumento da abundância do íon produzido m/z 152. Ao atingir as energias 40 e 50 eV a abundância permaneceu constante em 100% e depois ocorreu o decréscimo em 60 eV. Desse modo, a fim de garantir qual seria a energia que promovesse o pico de maior intensidade, foi realizada a análise no modo MRM empregando-se as energias de 40 e 50 eV tendo o íon precursor m/z 181 e o íon produto m/z 152. A energia de 40 eV foi a que promoveu maior intensidade de pico comparado a 50 eV nessa transição para determinação dos metilcarbazóis avaliados neste trabalho. Todos os demais compostos foram avaliados seguindo esse mesmo procedimento exemplificado na Figura 18. Para algumas outras classes de N-marcadores avaliados neste estudo também ocorreram situações similares ao demonstrado para o 1-metilcarbazol. No entanto, foi escolhida a energia com a transição que apresentou a maior intensidade do pico no modo MRM.

Na Figura 19, estão os gráficos de energia de colisão para os N-marcadores. Como entre isômeros, o comportamento da análise PIS segue a mesma tendência, optou-se pela representação gráfica de apenas um dos padrões (Figura 19 (a), (c) e (f)).



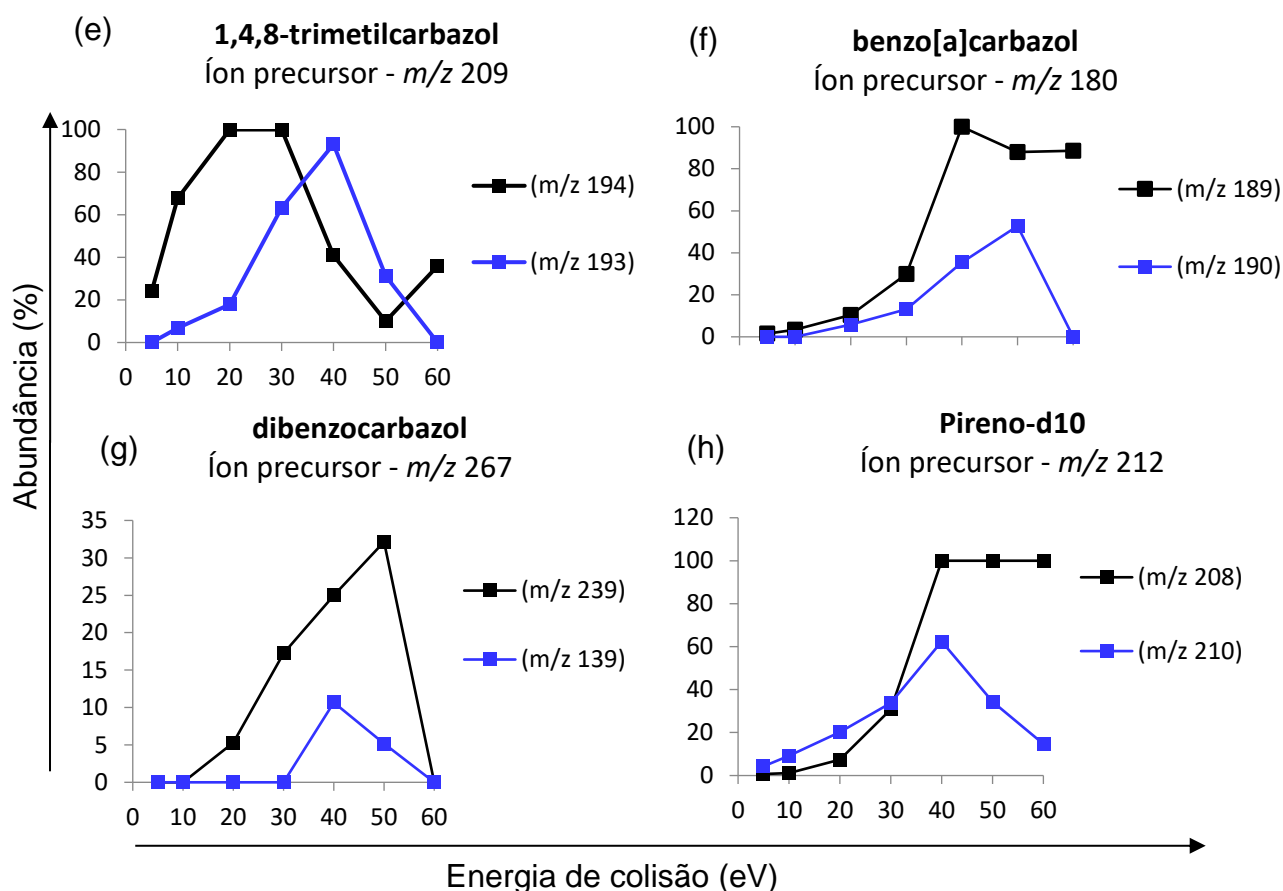


Figura 19 - Gráficos de Energia de colisão (eV) em função da abundância do íon produzido (%). Identificação dos gráficos: **(a)** 1-metilcarbazol, **(b)** carbazol, **(c)** 1,8-dimetilcarbazol, **(d)** 3-etilcarbazol, **(e)** 1,4,8-trimetilcarbazol, **(f)** benzo[a]carbazol e **(g)** dibenzocarbazol **(h)** pireno-d10. Linhas em preto: transições primárias, linhas em azul: transições secundárias). Fonte: Autoria própria (2020).

A partir do comportamento dos gráficos elaborados pelos dados obtidos no modo PIS (Figura 19), foram definidas as transições primárias (de maior intensidade) utilizadas para análise quantitativa e as secundárias (transições de confirmação) que auxiliam nas análises qualitativas a serem monitoradas no modo MRM.

4.2.4 Modo MRM

A seleção de transições MRM a partir de dados obtidos no modo PIS são escolhidas para melhorar a seletividade e a sensibilidade do método GC-MS/MS ¹⁵⁷. Na Tabela 10 estão as condições de análise para os 13 N-marcadores avaliados por GC-MS/MS, modo MRM, com seus respectivos tempos de retenção, janela de análise, íons precursores e produtos e a energia de colisão das transições monitoradas. O cromatograma com as transições primárias e secundárias para cada padrão de N-marcador pode ser visualizado na Figura 29, todos os analitos alvo foram separados em 45 min.

Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos otimizados no modo MRM para a determinação dos treze compostos nitrogenados em estudo

Composto	Janela	t _R (min.)	Transição primária			Transição secundária		
			Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (eV)
9-metilcarbazol	9 – 21,5	18,12	181	152	40	181	127	50
carbazol	9 – 21,5	18,39	167	139	40	167	140	30
1-metilcarbazol	9 – 21,5	20,22	181	152	40	181	127	50
2-metilcarbazol	9 – 21,5	21,05	181	152	40	181	127	50
1,8-dimetilcarbazol	21,5 – 24	21,66	195	180	40	195	152	50
3-etilcarbazol	21,5 – 24	23,04	180	152	30	195	180	5
3,6-dimetilcarbazol	21,5 – 24	23,40	195	180	40	195	152	50
2,7-dimetilcarbazol	21,5 – 24	23,61	195	180	40	195	152	50
1,4,8-trimetilcarbazol	24 – 31	24,50	209	194	20	209	193	40
pireno-d10	24 – 31	24,71	212	208	40	212	210	40
benzo[a]carbazol	31 – 43	31,95	217	189	40	217	190	40
benzo[b]carbazol	31 – 43	32,97	217	189	40	217	190	40
benzo[c]carbazol	31 – 43	33,25	217	189	40	217	190	40
dibenzocarbazol	43 – 45	43,45	267	239	50	267	139	40

t_R: Tempo de retenção

Fonte: Autoria própria (2020)

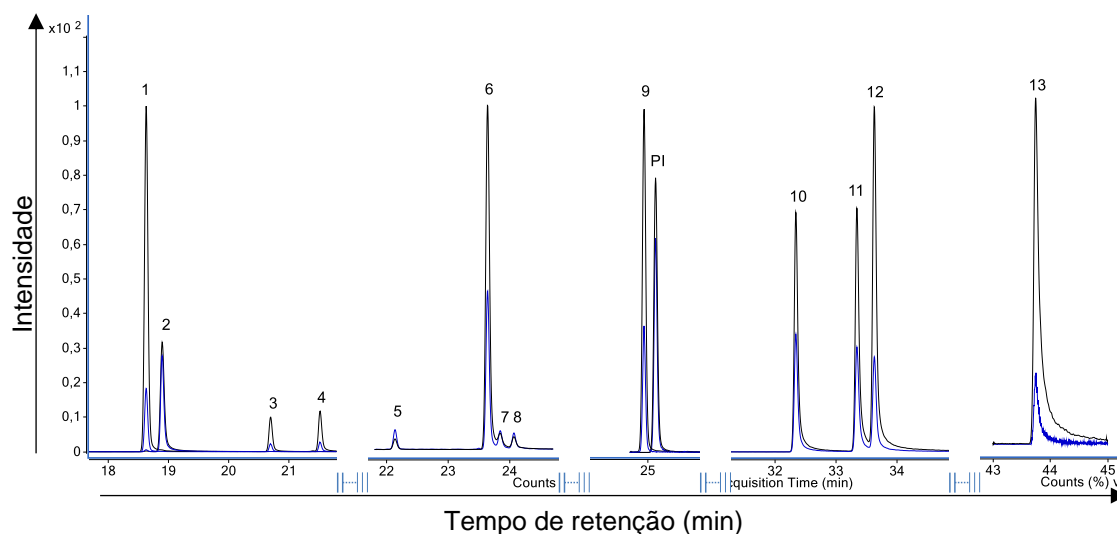


Figura 20 - Cromatogramas no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) para o mix contendo os 13 padrões de compostos nitrogenados diluídos no branco da matriz [1] a [13] ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$), PI ($500 \mu\text{g L}^{-1}$). Identificação dos picos: **[1]** 9-metilcarbazol; **[2]** carbazol; **[3]** 1-metilcarbazol; **[4]** 2-metilcarbazol; **[5]** 1,8-dimetilcarbazol; **[6]** 3-etilcarbazol; **[7]** 3,6-dimetilcarbazol; **[8]** 2,7-dimetilcarbazol; **[PI]** padrão Interno **[9]** 1,4,8-trimetilcarbazol; **[10]** benzo[a]carbazol; **[11]** benzo[b]carbazol; **[12]** benzo[c]carbazol e **[13]** dibenzocarbazol. Linhas em preto correspondem as transições primárias e as linhas em azul as transições secundárias. *Condições cromatográficas descritas no ítem 3.6.1.* Fonte: Autoria própria (2020).

É possível verificar na Figura 20 que as transições primárias têm intensidades superiores às transições secundárias. Esse comportamento de intensidades dos picos está de acordo com a abundância dos íons no espectro de massas padrão de cada analito e também com a teoria de MS/MS descrita na literatura ¹¹⁰.

As transições otimizadas (Tabela 10) foram então empregadas para a determinação dos N-compostos nas amostras de petróleo.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS SCAN, SIM e MRM EM ESTUDO COMPARATIVO PARA O MIX DE NITROGENADOS

Uma comparação entre os diferentes modos de operação otimizados no MS/MS foi avaliada através da resolução cromatográfica. O objetivo foi, através da

resolução, verificar o comportamento da separação cromatográfica principalmente para os isômeros. Sabe-se que isômeros de posição não diferem em seus espectros de massas e com isso, o emprego da análise no modo MRM não é suficiente, necessitando de técnicas de separação mais eficientes, como por exemplo, GCxGC.

Conceitualmente, a resolução (R_s) é uma medida que avalia o grau de separação entre dois picos adjacentes^{158,159}. Em uma análise SCAN é realizada uma varredura de íons totais dentro de uma determinada faixa pré-estabelecida e quando não há uma boa resolução, a análise quantitativa pode ser prejudicada por uma separação não eficiente. Já no modo MRM o monitoramento de uma reação é específico para cada analito, entretanto, compostos que são isômeros descrevem os mesmos íons e as mesmas transições. Desse modo, avaliar a resolução entre os picos é conveniente principalmente entre os isômeros^{158,159}.

Para a avaliação da resolução, empregou-se a equação:

$$RS = 2x \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad (\text{Eq.6})$$

Onde t_{r1} e t_{r2} correspondem aos tempos de retenção de dois picos adjacentes e W_{b1} e W_{b2} a largura dos picos na linha de base.

Valores de R_s acima de 1,5 são considerados, indicando uma boa separação entre os picos^{158,159}. Na Tabela 11 estão os valores de R_s calculados para o mix de padrões dos N-compostos.

Tabela 11 - Avaliação da resolução entre picos adjacentes para o modo SCAN.

Picos	T_{r1}	T_{r2}	W_{b1}	W_{b2}	R_s
1-2	18,28	18,55	0,27	0,33	0,45
2-3	18,55	20,38	0,33	0,17	3,66
3-4	20,38	21,21	0,17	0,29	1,80
4-5	21,21	21,83	0,29	0,13	1,48
5-6	21,21	23,34	0,13	0,23	5,92

Tabela 11 - Avaliação da resolução entre picos adjacentes para o modo SCAN (continuação)

Picos	T _{r1}	T _{r2}	W _{b1}	W _{b2}	R _s
6-7	23,34	23,55	0,23	0,17	0,53
7-8	23,55	23,77	0,17	0,25	0,53
9-10	24,66	32,10	0,26	0,30	13,29
10-11	32,10	33,11	0,30	0,27	1,77
11-12	33,11	33,40	0,27	0,28	0,53
12-13	33,40	43,56	0,28	0,43	14,31

t_{r1} e t_{r2} = tempos de retenção dos picos adjacentes, W_{b1} e W_{b2}: largura dos picos. R_s: resolução. Números de 1 a 13 referem-se aos compostos identificados na Figura 20. Fonte: Autoria própria (2020).

Dentre as 12 resoluções avaliadas, quatro foram inferiores a 1,5 (Tabela 11) sendo estas: 1-2, 6-7, 7-8 e 11-12. Entre os picos 1 e 2 há subclasses diferentes de compostos: carbazol (íon m/z 167) e metilcarbazol (íon m/z 181) e a baixa resolução entre esses picos no modo SCAN para efeitos de quantificação é inadequada. A avaliação desses analitos nos modos SIM e MRM tornam as análises específicas. No modo SIM a coeluição entre os picos 1-2 é resolvida em razão do monitoramento de íons específicos e no modo MRM através do monitoramento de reação conforme ilustrado na Figura 21.

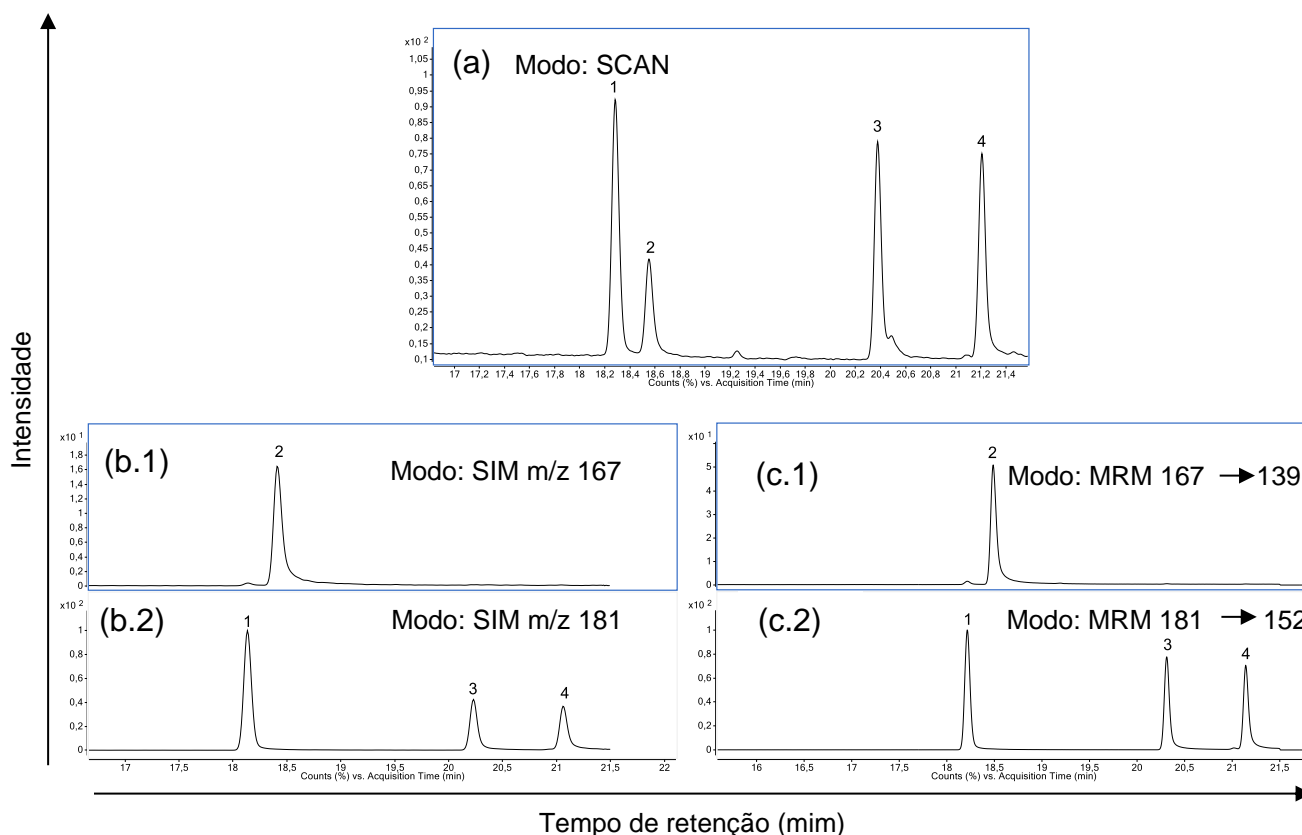


Figura 21 - Comparação entre cromatogramas no modo (a) SCAN, (b) SIM e (c) MRM mostrando a separação dos picos [1] e [2]. Onde: SCAN **(a)**, SIM (m/z 167) **(b.1)** SIM (m/z 181) **(b.2)**, MRM íon precursor (m/z 167) e íon produto (m/z 139) **(c.1)** e íon precursor m/z 181 e íon produto m/z 152 **(c.2)**. Identificação dos picos: **[1]**: 9-metilcarbazol, **[2]** carbazol, **[3]** 1-metilcarbazol e **[4]** 2-metilcarbazol. Fonte: Autoria própria (2020).

A resolução calculada entre os picos 6 e 7 também é menor que 1,5, mas ocorre entre isômeros de posição, com íons diferentes e o problema da baixa resolução é resolvido ao usar o modo SIM e MRM similar ao exemplo entre carbazóis e metilcarbazóis.

A resolução entre os picos 7-8 (3,6- e 2,7-dimetilcarbazol) e 11-12 (benzo[b]carbazol e benzo[c]carbazol) não pode ser aprimorada nos modos SIM e MRM pois correspondem a picos com mesmos íons principais e mesmas transições. A coeluição parcial entre dimetilcabazóis em colunas com fase estacionária 5% fenil

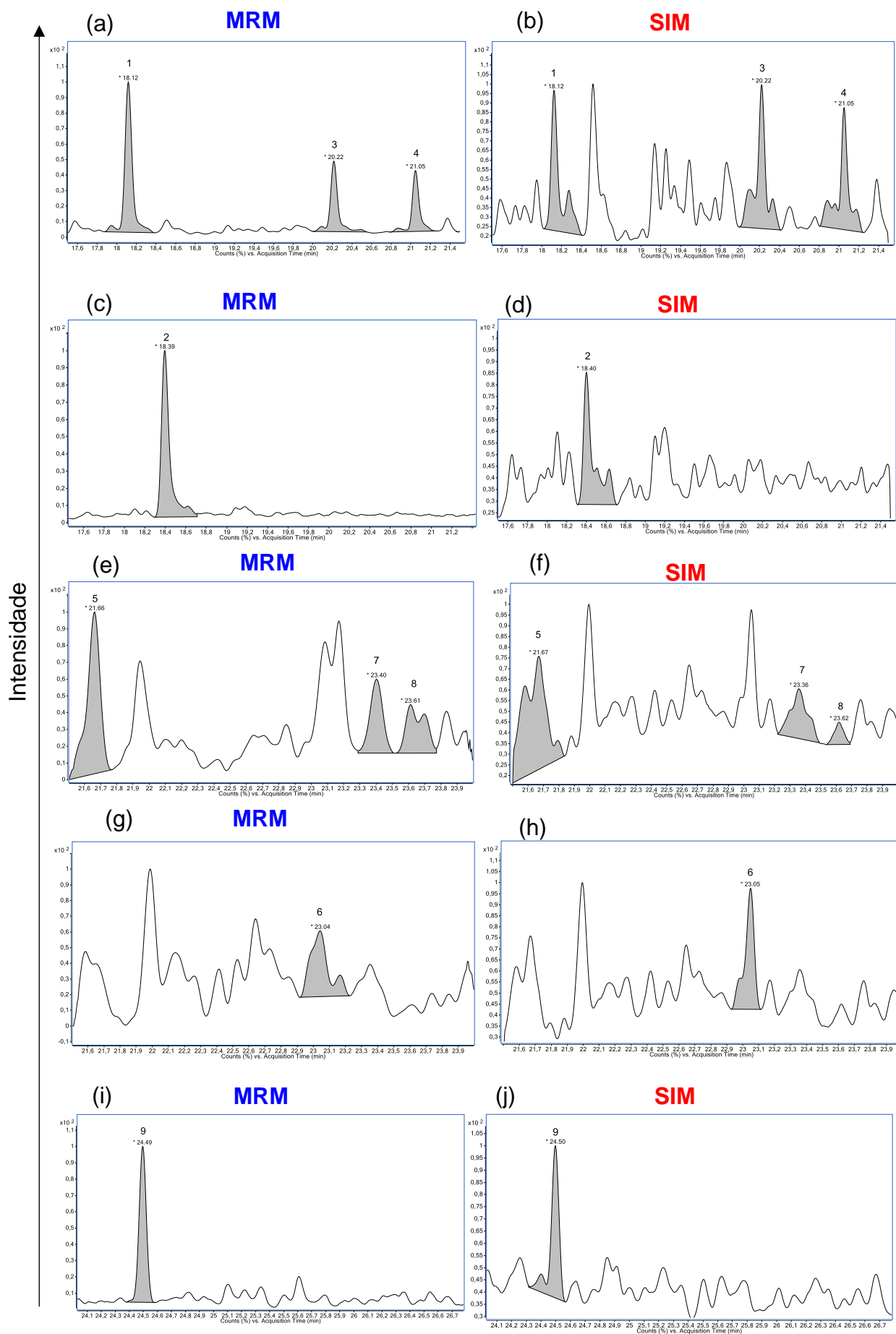
é mencionada na literatura ¹⁴², bem como entre benzo[b]carbazol e benzo[c]carbazol ^{23,160,161}.

4.4 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS SIM E MRM EM ESTUDO COMPARATIVO QUALITATIVO PARA AMOSTRA DE PETRÓLEO

Embora muitos estudos tenham sido publicados com foco na identificação dos N-marcadores, existem várias dificuldades analíticas que ainda precisam ser abordadas para determinar uma análise quantitativa individual correta. Em trabalhos anteriores, os compostos considerados N-marcadores são caracterizados por GC/MS no modo SIM após etapas prévias de fracionamento ^{8,21,36,88,89,162,163}. No entanto, o cromatograma obtido usando esse protocolo, geralmente mostra uma forte presença de interferências que afetaram a quantificação. Isso ocorre devido à presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de isômeros que possuem um tempo de retenção de GC semelhante e/ou a mesma massa nominal (m/z) ⁹⁶. Está provado que o modo MRM tem uma seletividade mais alta que o modo SIM ^{164,165}, pois somente moléculas que possuem os padrões de fragmentação selecionados são levadas em consideração. Portanto, esse método permite uma melhor resolução do sinal sem um fracionamento preliminar da amostra. Logo, as interferências são drasticamente reduzidas e a relação sinal/ruído (do inglês, *signal-to-noise* -S/N) aumenta em muitas ordens de grandeza.

Neste item foi realizada uma avaliação qualitativa, baseada na análise sem etapa prévia de fracionamento da amostra de petróleo através do modo MRM e SIM, com intuito de avaliar o ganho analítico do emprego da GC-MS/MS no modo MRM frente ao SIM para os N-marcadores, já que é a primeira vez que esses compostos são avaliados por MS/MS.

Foi adicionada a amostra P1, a concentração de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ da solução mix de nitrogenados. Foram realizadas as análises SIM e MRM (Figura 22) conforme as condições otimizadas descritas nos itens 3.6.1, 3.6.2 e 3.6.4. A comparação qualitativa entre os cromatogramas baseou-se no número de picos, na seletividade e intensidade do sinal (avaliada pela relação S/N) associada a cada composto no cromatograma.



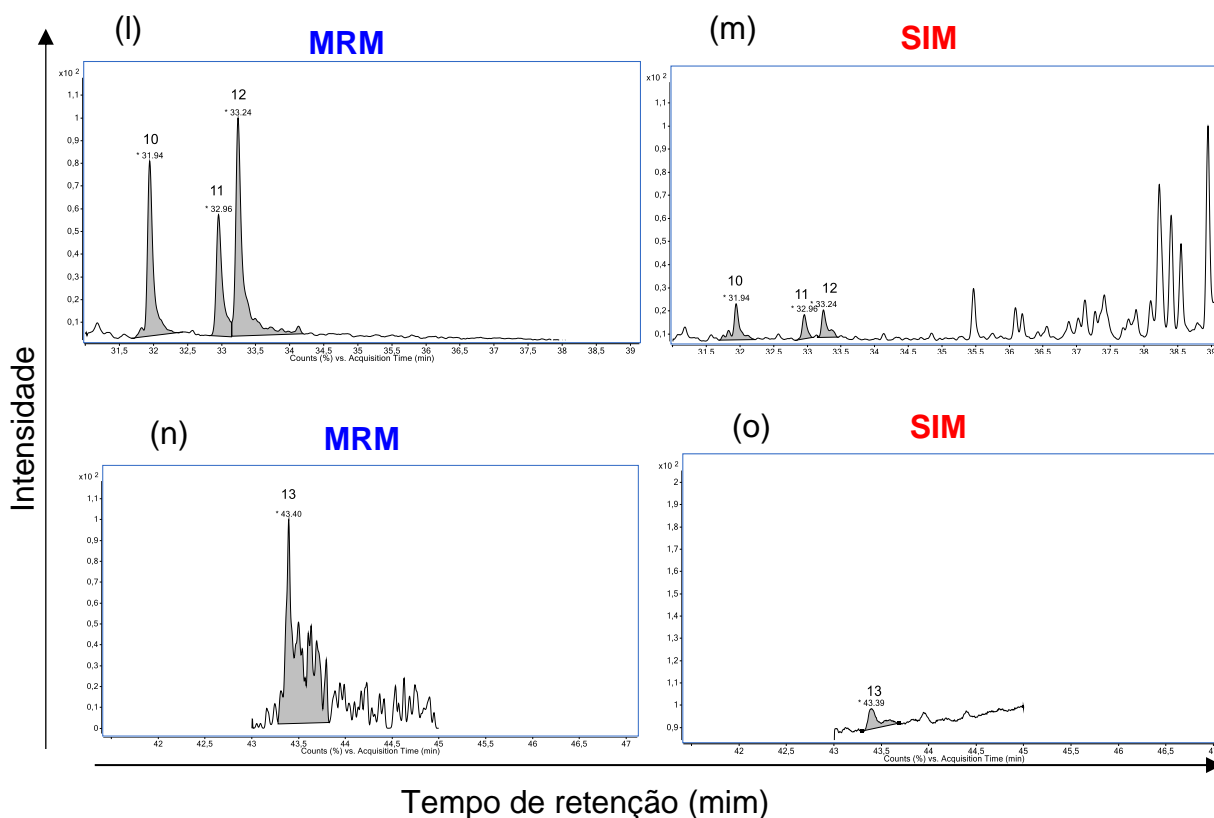


Figura 22 - Cromatogramas MRM: [a], [c], [e], [g], [i], [l], [n]; SIM: [b], [d], [f], [h], [j], [m] e [o] para a amostra P1 contendo com adição de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ da solução mix de nitrogenados. Identificação dos picos: [1] 9-metilcarbazol; [2] carbazol; [3] 1-metilcarbazol; [4] 2-metilcarbazol; [5] 1,8-dimetilcarbazol; [6] 3-etilcarbazol; [7] 3,6-dimetilcarbazol; [8] 2,7-dimetilcarbazol; [9] 1,4,8-trimetilcarbazol; [10] benzo[a]carbazol; [11] benzo[b]carbazol; [12] benzo[c]carbazol e [13] dibenzocarbazol. Fonte: Autoria própria (2020).

Sinal/ Ruído

A razão S/N de um pico cromatográfico é um parâmetro adequado para avaliar o desempenho de diferentes métodos analíticos de MS e tem sido empregada por alguns autores em estudos comparativos de MRM, SIM e SCAN ^{113,166}. O cálculo da relação S/N é baseado na altura do pico e na altura do nível de ruído e pode ser obtido manualmente ou pela integração automática realizada pelo software do equipamento. A relação S/N é calculada a partir da Equação 7 ¹⁶⁷:

$$SN = 2S/N \quad (\text{Eq.7})$$

Onde S corresponde ao sinal da altura do pico, inerente ao componente em questão e N o ruído de fundo.

A Figura 23 ilustra a abordagem usada para calcular as razões S/N nos diferentes métodos para o carbazol na amostra P1. Usando o método MRM o S/N foi cerca de 16 vezes maior que o modo SIM. Os valores calculados automaticamente pelo software do equipamento para todos os demais N-marcaadores estão na Tabela 12. Notavelmente, o modo MRM permite alcançar uma relação S/N muito alta e, ao mesmo tempo, obter um cromatograma sem interferências.

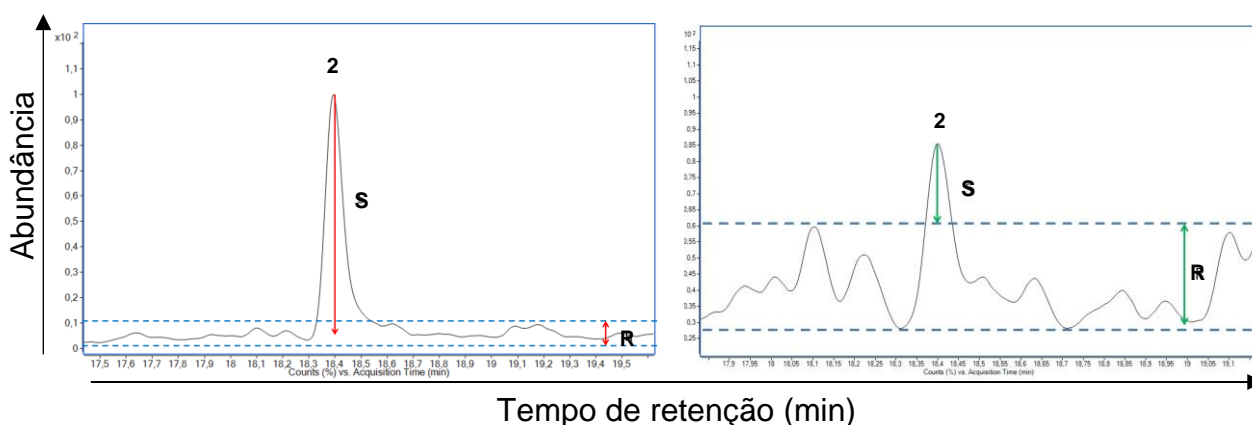


Figura 23 - Exemplo do método usado para avaliar a relação sinal ruído (S/N). Comparação obtida para a amostra P1 com adição do mix dos padrões a 500 ug L⁻¹ **(a)** MRM e **(b)** SIM. Onde: **[2]** Carbazol; **[S]** sinal e **[R]** ruído. Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 12 - Valores de S/N calculados para o monitoramento seletivo de íons (SIM) e para o monitoramento de reações múltiplas (MRM) para os marcadores nitrogenados na amostra de petróleo P1

Composto	Razão S/N	
	Modo SIM	Modo MRM
9-metilcarbazol	1,4	8,4
carbazol	1,6	25,4
1-metilcarbazol	1,4	3,9
2-metilcarbazol	1,3	3,4
1,8-dimetilcarbazol	0,6	2,8
3-etilcarbazol	1,7	0,4
3,6-dimetilcarbazol	0,2	1,2
2,7-dimetilcarbazol	0,3	0,8
1,4,8-trimetilcarbazol	1,2	4,4
benzo[a]carbazol	0,8	18,7
benzo[b]carbazol	0,9	12,8
benzo[c]carbazol	1,1	22,5
dibenzocarbazol	0,1	2,7

S/N: Sinal/ruído (do inglês: signal/noise)
 Fonte Autoria própria (2020).

A relação S/N é um dos modos empregados na avaliação do limite de detecção ao comparar a matriz insenta de analitos e a matriz apresentando baixas concentrações do analito. A relação S/N 3:1 é aceita, como estimativa do limite de detecção. Entretanto, neste trabalho serão empregados para limites de detecção e quantificação os parâmetros obtidos através da curva de calibração por serem mais

confiáveis e também em razão da linha de base (ruído) no MS/MS ser subestimada ^{150,151}.

A maioria dos valores das razões S/N são superiores no modo MRM, confirmando a maior sensibilidade desse modo de operação comparado ao modo SIM. Para o 3-etilcarbazol, observou-se comportamento inverso, o que pode estar relacionado a possíveis coeluições no modo SIM com outros compostos da matriz que também apresentam o íon m/z 180.

Carbazol e metilcarbazóis

Na comparação dos cromatogramas SIM e MRM para os metilcarbazóis e o carbazol (Figura 22 a e b; c e d, respectivamente), observa-se uma intensidade e seletividade maior para a análise MRM. A presença de interferentes (baixa especificidade) e uma menor sensibilidade no modo SIM dificulta a análise do composto alvo. Notavelmente, a relação S/N é mais de dez vezes maior no modo MRM do que no modo SIM (Tabela 12), portanto a integração dos picos para análise quantitativa se torna mais confiável.

Dimetil e etilcarbazóis

Os cromatogramas referentes aos dimetilcarbazóis no modo MRM e SIM podem ser visualizados na Figura 22e e 22f, respectivamente. Observa-se que para o 1,8-dimetilcarbazol (pico 5) e 3,6-dimetilcarbazol (pico 7) ocorre coeluição no modo SIM com outros componentes da matriz, o que não ocorre no modo MRM. Já para o 2,7-Dimetilcarbazol (pico 8) houve coeluição em ambos os modos, considerando a seletividade do modo MRM, essa coeluição refere-se a isômeros de posição, conforme já relatado por Bowler et al. (1997) ³⁶ e Bakr (2009) ¹⁷, porém não sendo possível a identificação individual devido à ausência de demais padrões da mesma subclasse. A razão S/N (Tabela 12) mostrou-se, em geral, mais intensa no modo MRM comparado ao SIM, devido a maior especificidade e conseqüentemente diminuição de ruído e aumento da sensibilidade. Observa-se também que não houve grande diferença de seletividade entre o MRM e o SIM, o que se deve ao grande número de isômeros possíveis para a classe dos C2-carbazóis.

Trimetilcarbazóis

Para a janela de eluição dos trimetilcarbazóis (Figura 22 i e 22 j) pode-se observar a presença do 1,4,8-trimetilcarbazol (pico 9) com maior seletividade e razão S/N no modo MRM, além de outros picos em menor intensidade, que correspondem a isômeros, conforme confirmado pela transição secundária (Figura 24). Essa é outra vantagem da análise no modo MRM, a identificação de isômeros pode ser facilmente visualizada pelo comportamento da transição primária e secundária. Porém, essa é uma avaliação qualitativa e não podem ser determinadas quantitativamente em razão da ausência de padrões dos outros isômeros dessa classe.

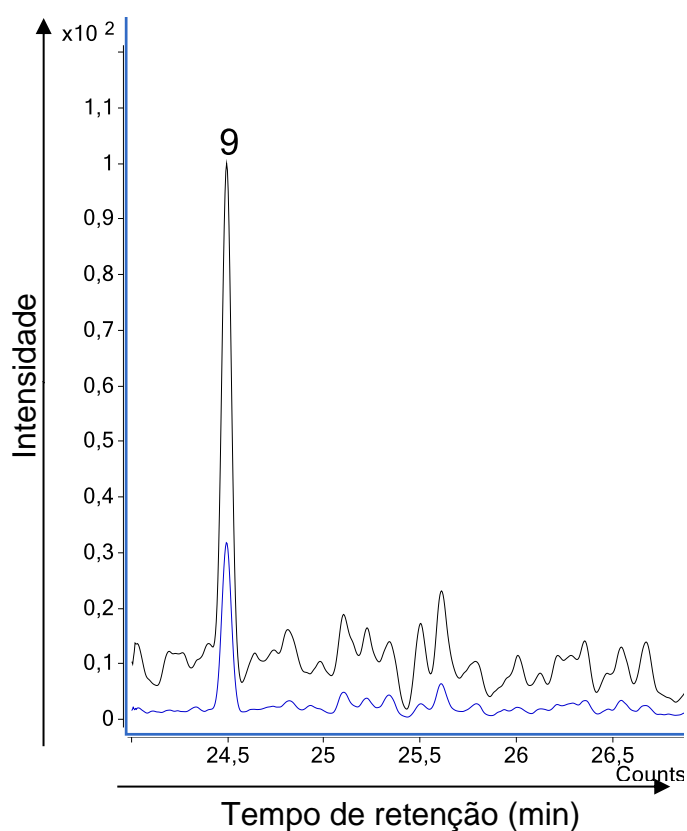


Figura 24 - Cromatograma MRM com a transição primária (em preto) e transição secundária (em azul) para a janela de eluição dos C3-carbazol para a amostra de petróleo. Identificação de pico: [9] 1,4,8-trimetilcarbazol. Fonte: Autoria própria (2020).

Benzocarbazóis e dibenzocarbazol

Para os três benzocarbazóis (Figura 22 l e 22m), benzo[a]carbazol (pico 10), benzo[b]carbazol (pico 11) e benzo[c]carbazol (pico 12) houve considerável aumento na razão S/N, bem como melhor seletividade no modo MRM confirmando a maior sensibilidade frente ao modo SIM.

Para a janela de eluição do dibenzocarbazol (Figura 22 n e 22 o), o pico 13 apresentou razão S/N < 3 no modo SIM e no modo MRM, não sendo possível a partir do critério S/N identificá-lo em uma concentração igual ou inferior a 500 µg L⁻¹.

Através da comparação qualitativa entre os modos SIM e MRM, realizada com a amostra de óleo bruto com adição dos padrões de interesse, notavelmente para a maioria dos cromatogramas MRM, observou-se maior especificidade na determinação do analito e, conseqüentemente, aumento do sinal analítico e diminuição do ruído. Em razão da maior especificidade e sensibilidade no modo MRM, o próximo passo foi a realização da análise quantitativa para as oito amostras selecionadas, utilizando esse modo de aquisição.

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DE N-MARCADORES POR GCMS/MS

4.5.1 Efeito de matriz

A avaliação do efeito de matriz foi realizada antes de iniciar a análise quantitativa para que os erros associados a este fenômeno fossem corrigidos ou minimizados na quantificação dos analitos de interesse. Antes de qualquer experimento, o branco da matriz foi injetado, nas condições otimizadas do método GC-MS/MS-MRM a fim de certificar a ausência de N-marcadores. O cromatograma de transições totais, encontra-se na Figura C no Anexo 2.

Na Tabela 13 estão os parâmetros das curvas de calibração no solvente e na matriz para avaliação do efeito de matriz. Na Figura 25 estão representadas as curvas de calibração realizadas em solvente (em azul) e compatibilizadas na matriz (em vermelho) para as classes e subclasses dos N-marcadores avaliados.

Tabela 13 - Parâmetros das curvas analíticas utilizando matriz e solvente e resultados do efeito de matriz

Composto	MATRIZ (CM)		SOLVENTE (CS)		Faixa linear $\mu\text{g L}^{-1}$	Efeito de matriz (%)
	S_m	R^2	S_s	R^2		
9-metilcarbazol	77,62	0,9922	30,76	0,9236	0,5-250	152,34
carbazol	11,55	0,9964	6,64	0,9905	0,5-250	73,88
1-metilcarbazol	23,54	0,9950	12,46	0,9943	0,5-250	88,96
2-metilcarbazol	22,47	0,9921	12,74	0,9936	0,5-250	76,37
3-etilcarbazol	32,11	0,9915	10,23	0,9902	35-250	213,95
1,8-dimetilcarbazol	0,12	0,9881	0,39	0,9761	500-1000	-68,70
3,6-dimetilcarbazol	0,11	0,9875	0,12	0,9710	500-1000	-8,33
2,7-dimetilcarbazol	0,097	0,9919	0,086	0,9917	13-800	13,43
1,4,8-trimetilcarbazol	28,57	0,9837	14,80	0,9452	0,5-250	93,00
benzo[a]carbazol	12,22	0,9971	18,89	0,9915	0,5-50	-35,31
benzo[b]carbazol	9,41	0,9913	9,43	0,9907	0,5-50	-0,25
benzo[c]carbazol	14,36	0,9956	16,82	0,9937	0,5-50	-13,43
dibenzocarbazol	0,69	0,9661	0,80	0,9959	50-1500	-13,55

Fonte: Autoria própria (2020)

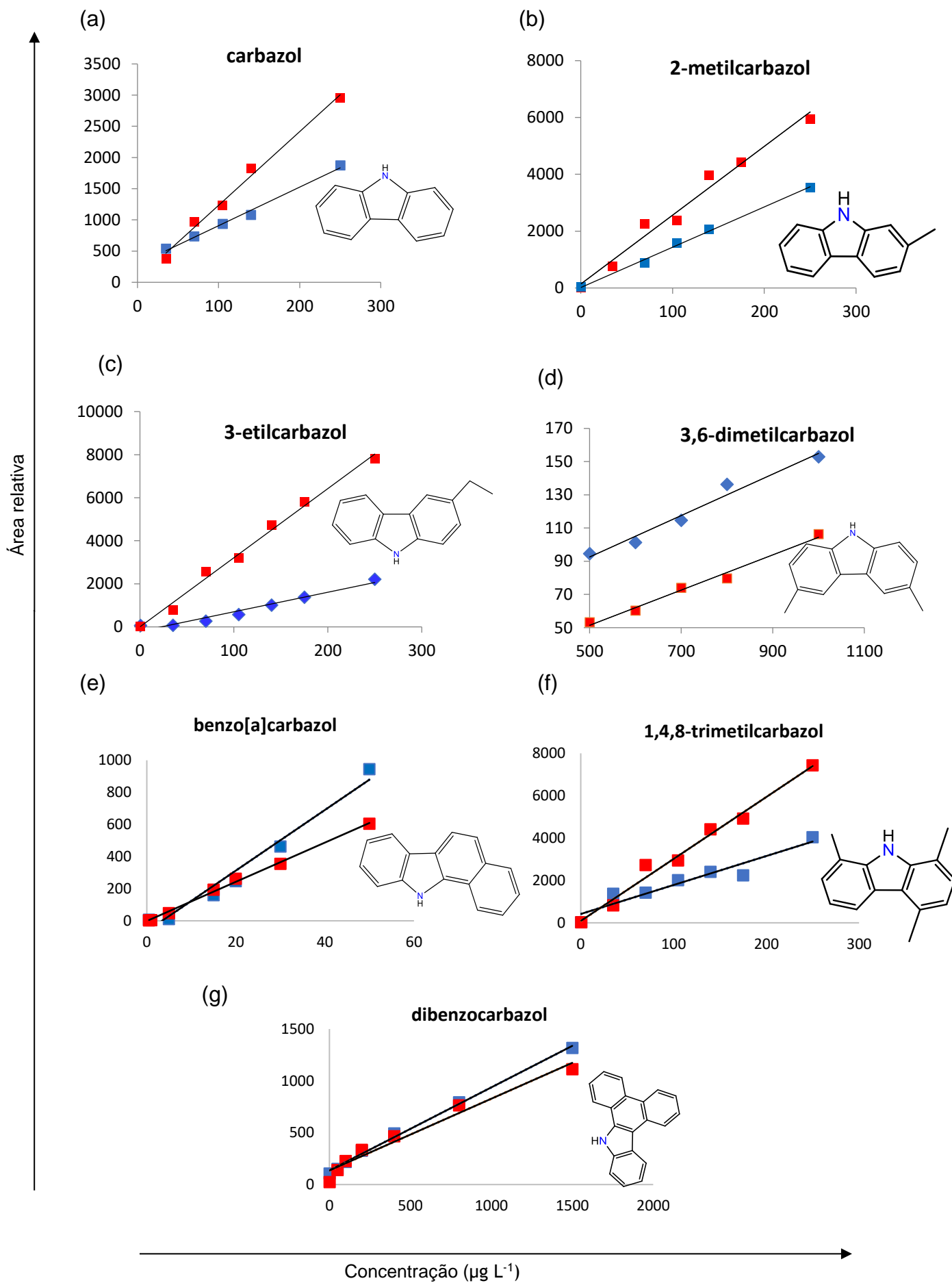


Figura 25 - Curvas de calibração em solvente (azul) e matriz (vermelho). Identificação: **[a]** carbazol, **[b]** 2-metilcarbazol, **[c]** 3-etilcarbazol, **[d]** 3,6-dimetilcarbazol, **[e]** benzo[a]carbazol, **[f]** 1,4,8-trimetilcarbazol e **[g]** dibenzocarbazol. Fonte: Autoria própria (2020).

Em geral, houve influência da matriz, seja por incremento ou supressão do sinal analítico para maior parte dos N-marcadores avaliados (Tabela 13 e Figura 25). Esse fato pode ser explicado em razão do petróleo bruto tratar-se de uma matriz complexa. Além disso, a linearidade foi expressamente aumentada para a maioria das curvas de calibração com o uso da matriz.

O efeito matriz pode ser resultado de uma combinação de fatores que vão desde as características inerentes à própria matriz até a resposta do detector, passando pelas condições associadas ao instrumento, como injetor e coluna cromatográfica ¹⁶⁸.

A análise de soluções padrão em solvente e na matriz se dá com interações distintas no *liner* do injetor. No primeiro caso, os sítios ativos de silanol presentes no *liner* podem reagir com o analito resultando em retenção e menor transferência para a coluna. No segundo caso, há uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do *liner* e isso faz com que haja uma espécie de *cleanup* da amostra antes de entrar na coluna, resultando no aumento do sinal analítico quando comparado à análise de padrões dissolvidos diretamente em solvente ^{168,169}.

As conexões entre injetor, coluna e detector também podem promover o efeito de matriz ¹⁶⁸. Outros fatores como frequência de uso da coluna e diâmetro interno, além do próprio MS através da superfície metálica, estão entre os diversos fatores que influenciam o incremento ou a supressão do sinal analítico pela matriz ¹⁶⁸.

Conforme valores descritos na Tabela 13 para o carbazol, 1- e 2- e 9-metilcarbazol, 2,7-dimetilcarbazol, 3-etilcarbazol e 1,4,8-trimetilcarbazol houve influência da matriz, com acréscimo do sinal do analito. Já para o 1,8- e benzo[a]carbazol e benzo[c]carbazol o efeito de matriz foi negativo evidenciando a supressão do sinal analítico. Para 3,6-dimetilcarbazol e o benzo[b]carbazol o efeito matriz não foi muito pronunciado, com valores inferiores a 10%.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliem o efeito de matriz em petróleo bruto por GC-MS/MS, este é o primeiro estudo que realiza esta avaliação. Portanto, não é possível fazer uma comparação dos valores encontrados para a mesma matriz. No entanto, conforme avaliado por Lazzari, (2019)¹⁷⁰ na caracterização de bio-óleos por cromatografia bidimensional, o efeito de matriz, que também foi calculado a partir da inclinação das curvas realizadas em solvente e na matriz, variou de -4,08 a 50,09 %.

Para GC-MS/MS, há na literatura avaliação do efeito de matriz calculado a partir da fortificação das amostras para determinação de agrotóxicos em água cujo resultado alcançou valores de até 857,9 %¹⁷¹. Bandeira et al. (2014)¹⁷² descreveram valores do efeito de matriz variando de -6,8 a 28,0% através das inclinações das curvas analíticas na determinação de agrotóxicos em leite bovino por GC-MS/MS¹⁷².

Os valores dos coeficientes angulares obtidos com a curva realizada na matriz compatibilizada (S_m) e com solvente (S_s) refletiram nos resultados do cálculo do efeito de matriz de modo que $S_m > S_s$ para carbazol, metilcarbazóis, 3-etilcarbazol, 2,7-dimetilcarbazol e 1,4,8-trimetilcarbazol. Para 1,8-dimetilcarbazol, 3,6-dimetilcarbazol, benzocarbazóis e dibenzocarbazol o $S_s < S_m$.

A solução aplicada para a correção do efeito matriz foi a realização da curva de calibração utilizando a matriz¹⁴⁷. Dessa forma, os resultados quantitativos para as amostras de petróleo serão mais exatos.

4.5.2 Linearidade

A faixa linear, a equação da curva e o coeficiente de determinação linear (R^2) para cada N-marcador estão descritos na Tabela 14. As curvas utilizadas estão representadas na Figura 26.

Tabela 14 - Parâmetros obtidos para faixa linear e coeficiente de correlação (R^2) através da curva de calibração para os padrões dos N-marcadores por GC-MS/MS no modo MRM

Composto	Faixa linear $\mu\text{g L}^{-1}$	Equação da reta	R^2
carbazol	35-250	$y = 11,82x - 40,582$	0,9943
9-metilcarbazol	35-250	$y = 78,492x + 318,06$	0,9871
1-metilcarbazol	35-250	$y = 26,65x + 340,19$	0,9916
2-metilcarbazol	35-250	$y = 24,226x + 31,833$	0,9923
1,8-dimetilcarbazol	100-1500	$y = 2,0363x + 47,147$	0,9888
3-etilcarbazol	35-250	$y = 33,007x - 189,38$	0,9912
3,6-dimetilcarbazol	100-1500	$y = 1,8519x + 44,646$	0,9960
2,7-dimetilcarbazol	50-1500	$y = 1,5593x + 1,7452$	0,9998
1,4,8-trimetilcarbazol	35-250	$y = 30,486x - 190,59$	0,9929
	150-1000	$y = 67,992x + 2568,6$	0,9956
benzo[a]carbazol	5 - 50	$y = 12,06x + 3,957$	0,9970
	150-1000	$y = 6,3719x - 484,33$	0,9952
benzo[b]carbazol	5-50	$y = 9,261x + 6,8036$	0,9858
	150-1000	$y = 2,6074x - 137,64$	0,9947
benzo[c]carbazol	5-50	$y = 14,117x + 9,5908$	0,9932
	150-1000	$y = 6,7464x - 459,48$	0,9949
dibenzocarbazol	100-1500	$y = 0,7738x + 164,54$	0,9985

Fonte: Autoria própria (2020).

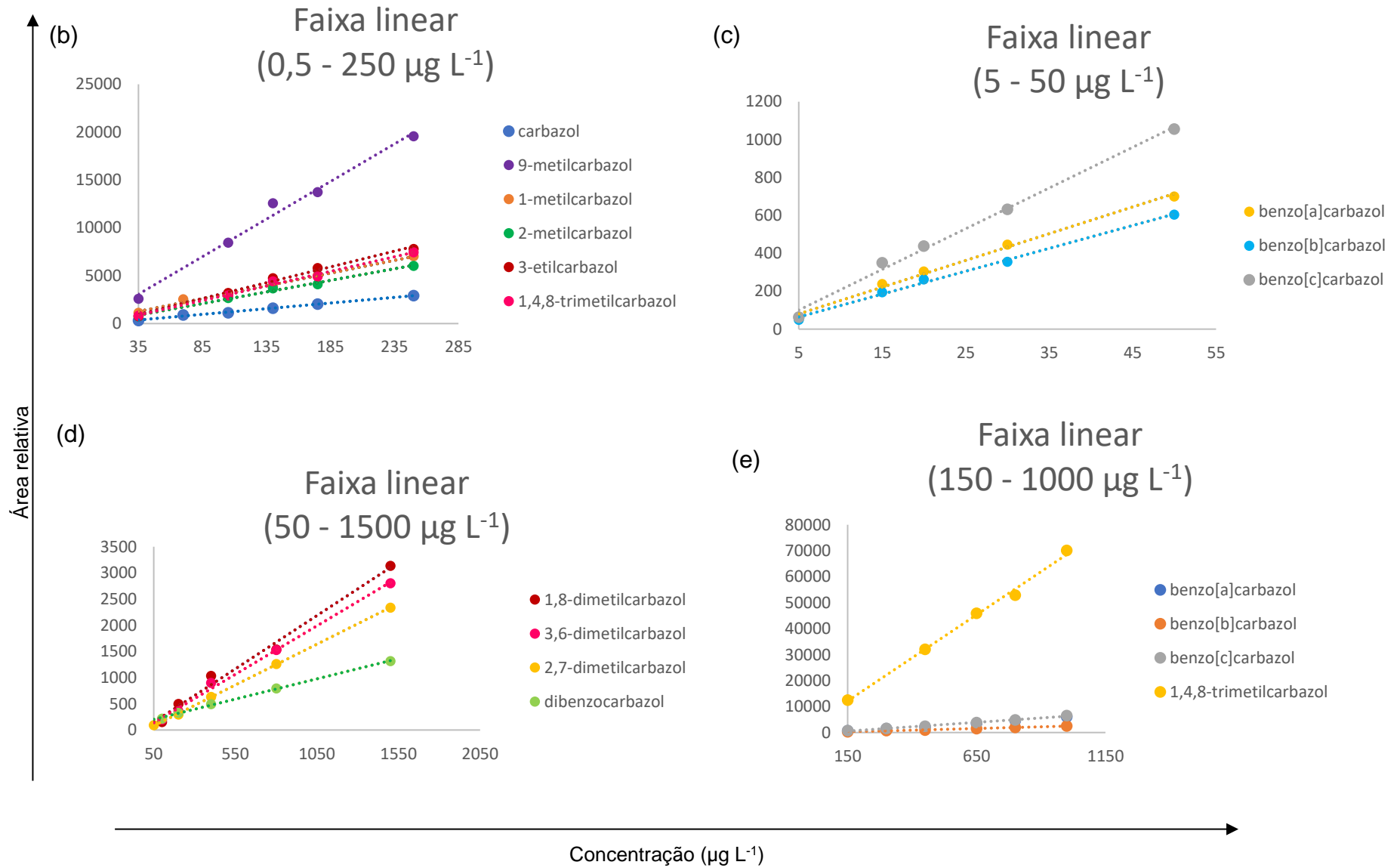


Figura 26 - Curvas de calibração utilizadas para a quantificação dos treze N-compostos em estudo. Fonte: Autoria própria (2020).

Analisando-se as equações das curvas de calibração, os valores de coeficiente de correlação (R^2) variaram de 0,9858 a 0,9998 (Tabela 14), indicando que o modelo é linear e adequado, ou seja, dentro da faixa de aplicação o método fornece resultados diretamente proporcionais a concentração. Valores do coeficiente de correlação maior que 0,999 são considerados ideais de acordo com a IUPAC ¹⁷³, enquanto que a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO acima de 0,90 ^{147,151,173,174}.

4.5.3 Determinação dos valores de LOD e LOQ

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estabelecidos a partir do erro relativo e da inclinação da curva conforme descrito no item 3.8.3 da experimental. Os valores estão descritos na Tabela 15

Tabela 15 - Valores de LOD e LOQ obtidos para os marcadores estudados por GC-MS/MS

N-marcador	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
9-metilcarbazol	16,73	50,70
carbazol	10,49	31,79
1-metilcarbazol	11,58	35,09
2-metilcarbazol	14,38	43,57
1,8-dimetilcarbazol	58,36	176,90
3-etilcarbazol	18,10	54,85
3,6-dimetilcarbazol	95,38	389,03
2,7-dimetilcarbazol	27,92	84,61
1,4,8-trimetilcarbazol	13,76	41,70
benzo[a]carbazol	2,54	7,71

Tabela 15 - Valores de LOD e LOQ obtidos para os marcadores estudados por GC-MS/MS (continuação)

N-marcador	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
benzo[b]carbazol	4,93	16,40
benzo[c]carbazol	3,05	9,25
dibenzocarbazol	58,57	117,50

LOD: Limite de detecção e LOQ: Limite de quantificação
 Fonte: Autoria própria (2020).

Os limites de detecção variaram de $2,54 \mu\text{g L}^{-1}$ (benzo[a]carbazol) a $95,38 \mu\text{g L}^{-1}$ (3,6-dimetilcarbazol) e os limites de quantificação de $7,71 \mu\text{g L}^{-1}$ (benzo[a]carbazol) a $389,03 \mu\text{g L}^{-1}$ (3,6-dimetilcarbazol). Como este estudo é o primeiro a quantificar N-marcadores em petróleo empregando a GC-MS/MS, não é possível realizar uma comparação dos valores obtidos com a literatura. Estudos por GC-MS no modo SIM são relatados para benzocarbazóis (LOD = 8 ng g^{-1} de óleo), não sendo informado o valor do LOQ³⁵. Vale destacar que o LOD e LOQ não necessariamente correspondem aos possíveis limites do sistema GC-MS/MS, pois as faixas das curvas analíticas foram construídas visando detectar a faixa de concentração nas amostras (previamente avaliada com amostra com maior teor de Ntotal).

4.5.4 Ensaio de recuperação para avaliação da exatidão e precisão (inter-dia e intra-dia) do método

Os resultados dos ensaios de recuperação foram calculados a fim de avaliar a exatidão do método. Foram considerados em três níveis de concentração (baixo: $50 \mu\text{g L}^{-1}$ médio: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e alto: $500 \mu\text{g L}^{-1}$), a partir do branco da matriz. A precisão foi avaliada em triplicata, considerando 3 injeções consecutivas no mesmo dia (intra-dia) e em três dias diferentes (n=9), para a precisão inter-dia. Os resultados estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados dos ensaios de recuperação e precisão (intra-dia e inter-dia) do método GC MS/MS no modo MRM para os N-marcadores estudados

Analito	Recuperação Nível	Recuperação (%)	RSD%	
			Intra-dia	Inter-dia
9-metilcarbazol	Baixo	78,63	0,59	
	Médio	99,83	4,93	
	Alto	94,46	0,75	0,81
carbazol	Baixo	96,58	0,19	
	Médio	99,70	0,31	
	Alto	112,96	0,98	5,96
1-metilcarbazol	Baixo	92,20	2,04	
	Médio	98,90	1,53	
	Alto	117,34	3,13	6,51
2- metilcarbazol	Baixo	85,75	2,28	
	Médio	99,18	1,90	
	Alto	114,40	0,97	1,11
1,8-dimetilcarbazol	Baixo	90,64	1,70	
	Médio	96,83	1,82	
	Alto	111,01	2,23	5,76
3-etilcarbazol	Baixo	101,89	0,67	
	Médio	101,70	1,57	
	Alto	118,45	3,02	5,77
3,6-dimetilcarbazol	Baixo	110,43	3,33	
	Médio	96,01	2,54	
	Alto	119,61	1,80	5,95
2,7-dimetilcarbazol	Baixo	86,94	1,30	
	Médio	104,20	4,73	
	Alto	104,70	3,04	5,47
1,4,8-trimetilcarbazol	Baixo	100,40	2,34	
	Médio	101,70	0,74	
	Alto	116,33	3,46	7,35
benzo[a]carbazol	Baixo	99,26	0,14	
	Médio	100,40	0,74	
	Alto	119,85	2,08	3,14
benzo[b]carbazol	Baixo	89,84	2,31	
	Médio	101,30	1,37	
	Alto	106,48	1,98	9,12
benzo[c]carbazol	Baixo	103,45	3,22	
	Médio	99,23	0,75	
	Alto	106,48	1,98	3,41
dibenzocarbazol	Baixo	93,08	3,54	
	Médio	99,89	0,42	19,47
	Alto	112,06	1,45	

Fonte: Autoria própria (2020).

Os valores de recuperação variaram de 78,63 % no nível mais baixo para o 9-metilcarbazol a 117,34 % no nível mais alto para o 1-metilcarbazol. Todos os valores ficaram dentro da faixa recomendada entre 70% e 120% e a precisão inferior a 20%.

4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO GC-MS/MS MRM EM AMOSTRAS DE PETRÓLEO

O método GC-MS/MS MRM desenvolvido e validado foi aplicado nas oito amostras de petróleo (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8), sem nenhuma etapa de fracionamento prévio, a fim de determinar as concentrações dos N-marcadores de interesse. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 17. Os compostos com maiores concentrações nas amostras foram 1,8-dimetilcarbazol ($59,74 \pm 0,35 \mu\text{g g}^{-1}$) e o carbazol ($32,86 \pm 0,16 \mu\text{g g}^{-1}$) na amostra P1. Os valores de RSD (%) para cada analito (Tabela 17) variaram de 0,15 % para 1,8-dimetilcarbazol na amostra P2 a 12,80% para 3-etilcarbazol na amostra P5. Em métodos de análise de traços, são aceitos RSD de até 20% dependendo da complexidade da amostra ⁴¹, todos os N-marcadores avaliados estão abaixo desse valor.

Tabela 17- Concentração dos N-marcadores em $\mu\text{g g}^{-1}$ nas oito amostras de petróleo da Bacia Potiguar por GC-MS/MS (MRM)

Compostos	Amostras (média $\mu\text{g g}^{-1}$ \pm IC 95%)							
	P1	RSD%	P2	RSD%	P3	RSD%	P4	RSD%
9-metilcarbazol	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
carbazol	32,86 \pm 0,16	0,27	4,38 \pm 0,09	1,17	<LOQ	-	<LOQ	-
1-metilcarbazol	7,81 \pm 0,78	6,78	5,36 \pm 0,08	0,78	<LOD	-	<LOQ	-
2-metilcarbazol	<LOQ	-	<LOQ	-	n.d	-	<LOD	-
1,8-dimetilcarbazol	59,74 \pm 0,35	0,32	47,37 \pm 0,15	0,15	35,55 \pm 0,22	0,34	34,58 \pm 0,82	1,28
3-etilcarbazol	6,13 \pm 0,03	0,24	6,66 \pm 0,03	0,28	6,40 \pm 0,05	0,40	6,61 \pm 0,11	0,90
3,6-dimetilcarbazol	2,94 \pm 0,06	1,02	21,97 \pm 0,28	0,70	<LOQ	-	<LOQ	-
2,7-dimetilcarbazol	6,77 \pm 0,14	1,12	12,80 \pm 0,20	0,85	5,11 \pm 1,05	11,10	4,30 \pm 0,15	1,89
1,4,8-trimetilcarbazol	7,83 \pm 0,04	0,25	16,82 \pm 0,30	0,98	6,43 \pm 0,06	0,5	10,66 \pm 0,46	0,23
benzo[a]carbazol	12,87 \pm 0,22	0,91	12,70 \pm 0,05	0,22	0,88 \pm 0,04	2,56	0,70 \pm 0,04	3,08
benzo[b]carbazol	22,90 \pm 2,03	4,83	13,70 \pm 0,72	2,84	1,13 \pm 0,05	2,59	0,78 \pm 0,14	9,50
benzo[c]carbazol	13,50 \pm 0,23	0,42	19,97 \pm 0,23	0,62	0,76 \pm 0,07	5,24	0,28 \pm 0,02	3,14
dibenzocarbazol	<LOQ	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

Tabela 17- Concentração dos N-marcadores em $\mu\text{g g}^{-1}$ nas oito amostras de petróleo da bacia Potiguar por GC-MS/MS (MRM) (continuação)

Compostos	Amostras (média $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{IC } 95\%$)							
	P5	RSD%	P6	RSD%	P7	RSD%	P8	RSD%
9-metilcarbazol	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
carbazol	2,55 \pm 0,28	5,88	2,35 \pm 0,02	0,45	<LOQ	-	<LOQ	-
1-metilcarbazol	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	-
2-metilcarbazol	n.d	-	<LOD	-	<LOD	-	n.d	-
1,8-dimetilcarbazol	20,98 \pm 0,69	1,78	30,21 \pm 1,80	3,24	26,22 \pm 0,70	1,45	22,44 \pm 0,91	2,20
3-etilcarbazol	9,24 \pm 2,17	12,80	6,78 \pm 0,46	3,68	3,59 \pm 0,08	1,20	9,56 \pm 0,63	3,57
3,6-dimetilcarbazol	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOD	-
2,7-dimetilcarbazol	6,19 \pm 1,31	11,50	4,77 \pm 0,08	0,94	<LOQ	-	5,71 \pm 0,83	7,91
1,4,8-trimetilcarbazol	10,37 \pm 0,11	0,58	9,61 \pm 0,37	2,11	4,66 \pm 0,09	0,98	10,70 \pm 0,24	1,21
benzo[a]carbazol	0,53 \pm 0,02	1,96	11,10 \pm 0,19	0,93	7,81 \pm 1,03	7,16	0,46 \pm 0,05	6,22
benzo[b]carbazol	0,74 \pm 0,05	3,93	1,72 \pm 0,30	9,46	0,95 \pm 0,32	18,20	1,03 \pm 0,14	7,48
benzo[c]carbazol	0,58 \pm 0,09	8,52	0,29 \pm 0,01	2,77	3,05 \pm 0,18	3,19	0,71 \pm 0,20	15,70
dibenzocarbazol	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-

<LOD: inferior ao limite de detecção, <LOQ: inferior ao limite de quantificação n.d: não detectado, RSD%: desvio padrão relativo e IC: intervalo de confiança. Fonte: Autoria própria (2020).

Na Figura 27 é possível visualizar a distribuição das concentrações dos N-marcadores nas amostras analisadas.

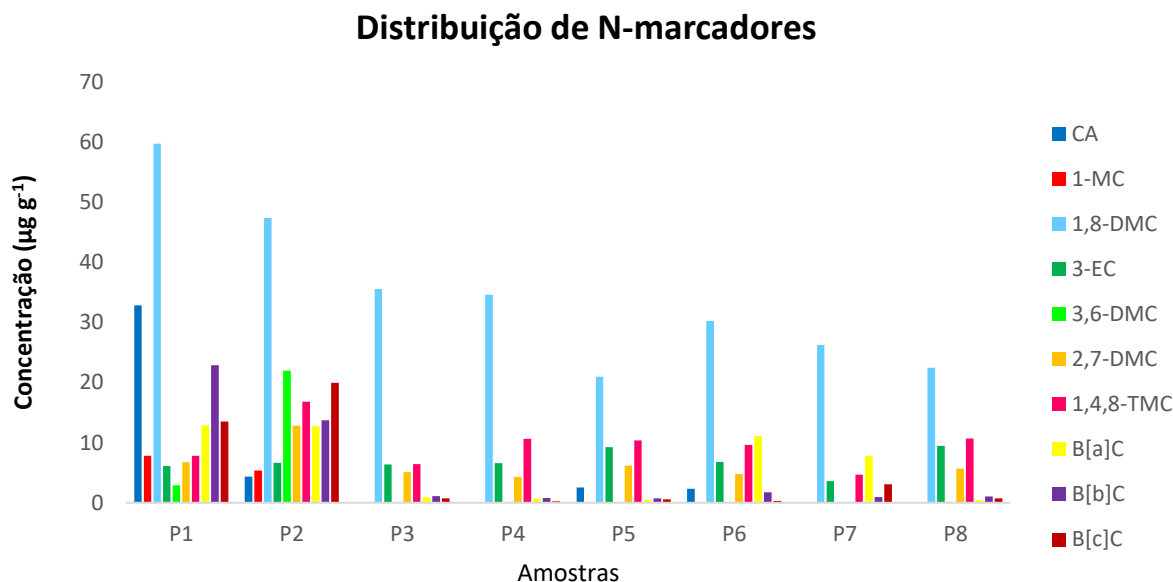


Figura 27 - Distribuição das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos N-marcadores nas amostras de petróleo (P1 a P8) da Bacia Potiguar. Autoria própria (2020).

Para uma avaliação mais específica, os valores quantificados serão discutidos por classe e subclasse, relacionando os dados encontrados com a literatura para amostras de petróleo e análise GC-MS.

Carbazol e C1-carbazóis

O carbazol foi detectado e quantificado nas amostras P1, P2, P5 e P6 sendo o valor mais baixo na amostra P6 ($2,35 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$) e mais alto na amostra P1 ($32,86 \pm 0,16$) (Tabela 17). Para as demais amostras de petróleo, os valores foram inferiores ao LOQ. Na literatura, foram encontrados valores na faixa de 0,021 a $17,70 \mu\text{g g}^{-1}$. Vale destacar que as concentrações variam, a depender do tipo de petróleo e técnica empregada ^{32,85}.

Os isômeros 9- e 2-metilcarbazol não foram quantificados em nenhuma das amostras, pois os valores foram inferiores aos LOD e LOQ ou não foram detectados sinais correspondentes no t_R desses N-marcadores. O 1-metilcarbazol foi determinado nas amostras P1 e P2 variando de ($5,36 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$) na amostra P2 a ($7,81 \pm 0,78$

$\mu\text{g g}^{-1}$) na amostra P1. Na literatura, os valores para 1-metilcarbazol estão entre 0,04 a $26,6 \mu\text{g g}^{-1}$ ^{3,90} comparando esses valores com os determinados nas amostras em estudo, verifica-se que eles estão dentro da faixa de concentração mais baixa encontrada. Essa comparação, assim como as demais devem ser observadas com cautela, pois nos trabalhos citados, os autores determinaram as concentrações através do método da calibração interna como também adição do PI para fins de quantificação utilizando as áreas do pico com ausência de validação.

C₂-carbazóis

Os C₂-carbazóis foram mais abundantes para a amostra P2 e menos abundantes na amostra P7 (Figura 28.a). Dentre C₂-carbazóis, os dimetilcarbazóis foram mais abundantes do que o etilcarbazol nas amostras que apresentavam estes N-marcadores. Bakr (2009) ¹⁷ também observou esse comportamento, que foi ratificado por Li et al. (1995) ⁵, onde segundo os autores, carbazóis parcialmente blindados com um dos grupos alquil na posição 1 são dominantes.

Entre os três isômeros avaliados para essa subclasse, o 1,8-dimetilcarbazol apresentou a maior concentração (Figura 28.b). As concentrações determinadas no presente estudo, foram superiores as descritas na literatura ^{3,85}. Não foram encontrados valores de concentração específicos para o isômero 3-etilcarbazol em petróleo na literatura, apenas para o isômero 1- etilcarbazol ^{60,81} e os resultados encontrados neste trabalho para o isômero 3- foram superiores ao isômero descrito na literatura.

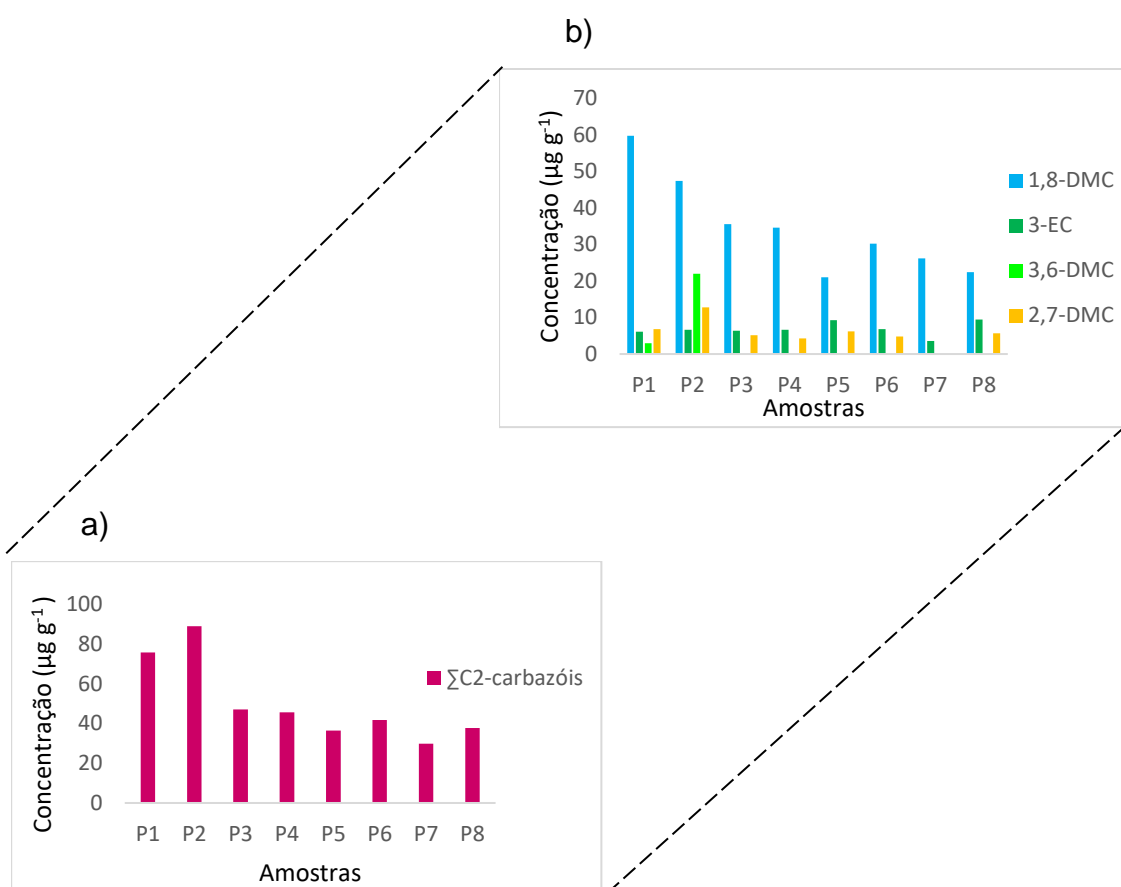


Figura 28 - Distribuição das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) para (a) ΣC_2 -Carbazóis e (b) 2,7-;3,6-; 1,8-dimetilcarbazol e 3-etilcarbazol nas amostras de P1 a P8 de petróleo da Bacia Potiguar. Fonte: Autoria própria (2020).

Benzocarbazóis

Entre as oito amostras avaliadas, a P1 foi a que apresentou maiores concentrações de benzocarbazóis com predomínio do isômero [b] e a amostra P4, as concentrações mais baixas (Figura 29). Todos os benzocarbazóis quantificados neste trabalho estão em concordância com a faixa determinada em trabalhos anteriores descritos na literatura para petróleo^{25,46,81}.

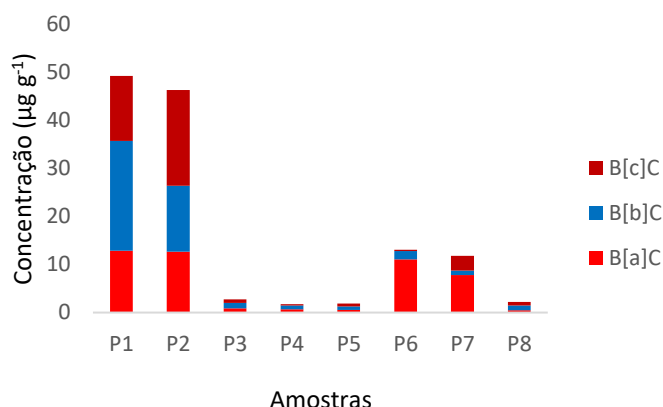


Figura 29 - Distribuição das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) para benzocarbazóis nas amostras de petróleo (P1 a P8) da Bacia Potiguar. Fonte: Autoria própria (2020).

Trimetilcarbazol

Não foram encontrados na literatura valores de quantificação para isômeros individuais para a subclasse dos trimetilcarbazóis em petróleo por GC-MS. Neste trabalho, a faixa encontrada para o 1,4,8-trimetilcarbazol compreendeu valores entre $4,66 \pm 0,09 \mu\text{g g}^{-1}$ na amostra P7 e $16,82 \pm 0,30 \mu\text{g g}^{-1}$ para a amostra P2. Estas concentrações estão entre as mais altas para os N-marcadores quantificados e a distribuição pode ser vista na Figura 30.

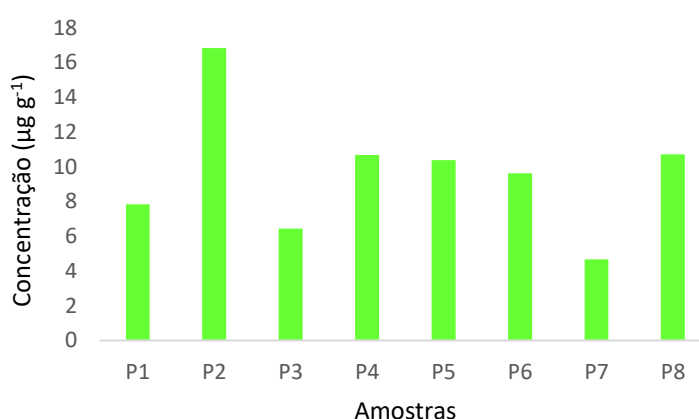


Figura 30 - Distribuição das concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) para 1,4,8-trimetilcarbazol nas amostras de petróleo (P1 a P8) da Bacia Potiguar. Fonte: Autoria própria (2020).

Dibenzocarbazol

Assim como para a subclasse dos C₃-carbazóis, não foram encontrados na literatura valores de quantificação para dibenzocarbazol em amostras de petróleo por GC-MS. No entanto, neste trabalho os valores obtidos para essa classe foram abaixo do limite de detecção.

Na geoquímica do petróleo, as concentrações de N-compostos são empregadas para obter informações sobre maturidade, migração e paleoambiente deposicional. Geralmente, através de razões diagnósticas, conforme será discutido no próximo item.

4.7 EMPREGO DOS MARCADORES NITROGENADOS PARA AVALIAÇÃO GEOQUÍMICA DAS AMOSTRAS

4.7.1 Interpretação geoquímica através da Análise de Componentes Principais

Para interpretação geoquímica, os N-marcadores são avaliados individualmente ou através de suas razões diagnósticas. No primeiro caso, concentrações de carbazóis e benzocarbazóis podem informar sobre a origem do petróleo.

A fim de melhor visualizar as similaridades e diferenças entre as amostras de petróleo, de acordo com as concentrações dos N-marcadores, procedeu-se a PCA. Para construção do gráfico de *scores* (Figura 31) e *loadings* (Figura 32), foram levados em consideração os valores obtidos em triplicata de cada N-marcador, nas oito amostras.

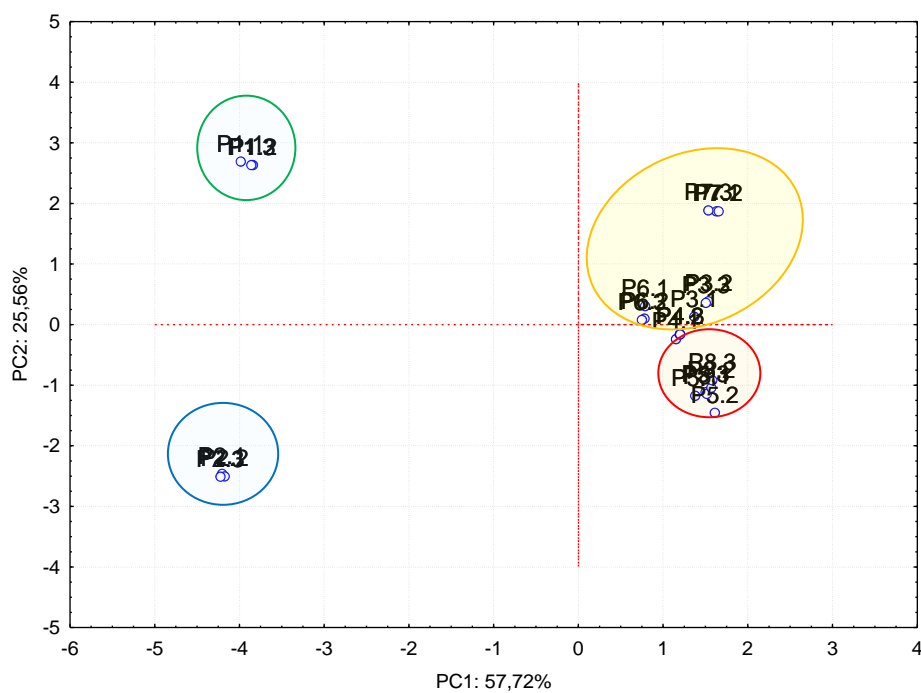


Figura 31 - Gráfico de scores PC1 X PC2 para avaliação de N-marcadores nas amostras de petróleo (P1 a P8) da Bacia Potiguar. Fonte: Autoria própria (2020).

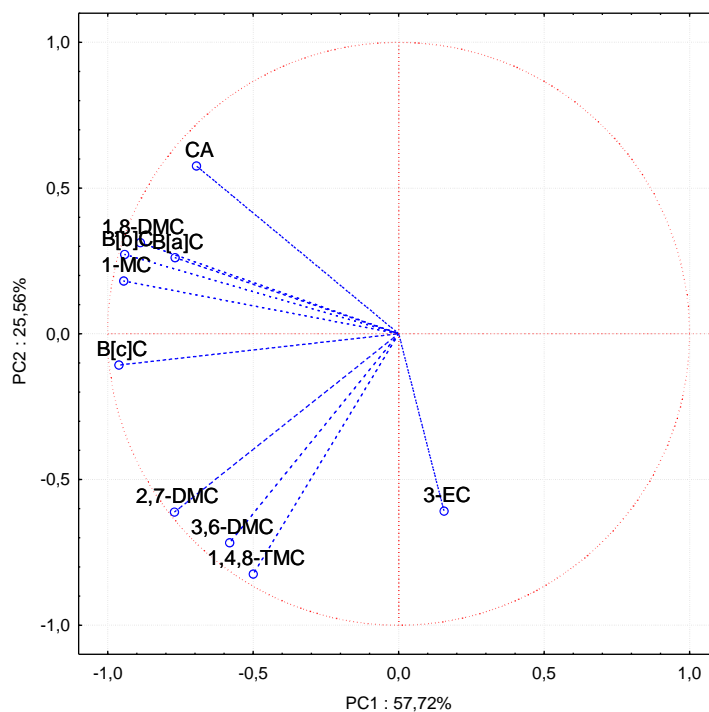


Figura 32-Gráfico *loadings* PC1 X PC2 para avaliação de N-marcadores para as oito amostras de petróleo da Bacia Potiguar. Fonte: Autoria própria (2020).

Pela PCA (Figuras 31 e 32), verifica-se que PC1 e PC2 descrevem 83,28 % da variância total dos dados.

Na Figura 31, é possível observar a discriminação de 4 grupos: P1 (em verde); P2 (em azul); P3, P4, P6 e P7 (em amarelo) e P5 e P8 (em laranja). As amostras P1 e P2 localizam-se negativamente em relação a PC2 enquanto que as amostras P3 a P8 estão localizadas positivamente em relação a esta mesma componente. Em associação ao gráfico dos *loadings* (Figura 32), que mostra a influência das variáveis sobre as amostras, pode-se inferir que esta separação ocorreu em razão das amostras P1 e P2 apresentarem maiores concentrações da maioria dos N-marcadores determinados (carbazol, C1-carbazóis, C2-carbazóis, C3-carbazol e benzocarbazóis).

Na Figura 31, as amostras de P3 a P8 estão localizadas positivamente em relação a PC2. Entretanto, P5 e P8 apresentam valores negativos em relação a PC1 e as amostras P3, P4, P6 e P7 valores mais positivos em relação a esta mesma componente. Em associação ao gráfico dos *loadings* (Figura 32), observa-se que esta separação ocorreu em razão das amostras P5 e P8 apresentarem maiores concentrações de 3-etilcarbazol comparado as demais amostras.

Desse modo, pode-se inferir que as amostras P1, P2, P5 e P8 por apresentarem maiores concentrações de carbazol, C1-carbazóis e C2-carbazóis têm características de petróleos de ambiente marinho enquanto que as amostras P3, P4, P6 e P7 por apresentarem menores concentrações dos mesmos N-marcadores têm características de petróleos de ambiente lacustre ¹⁷. Além disso, as amostras P1 e P2 também indicam valores maiores de maturidade em relação as demais ^{80,175}. Interpretações geoquímicas baseadas em migração não puderam ser realizadas pois não há informações de localização e profundidades sobre as amostras.

4.7.2 Interpretação geoquímica através de Razões Diagnósticas

A partir da análise quantitativa das amostras, determinaram-se as razões diagnósticas baseadas em carbazóis alquilados e benzocarbazóis para a caracterização geoquímica dos óleos crus da Bacia Potiguar. Essas razões foram calculadas com base na concentração individual ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos analitos alvo (Tabela 18).

As razões calculadas de N-marcadores a partir da média das triplicatas estão descritas na Tabela 18. Apesar de existir um número muito maior de razões baseadas em N-compostos, nem todas foram avaliadas devido a falta de padrões. Estudos da literatura também avaliam as razões através do cálculo das áreas individuais relacionadas ao padrão interno. Entretanto, neste trabalho optou-se por realizar a análise quantitativa devido a maior confiabilidade analítica dos dados obtidos.

Tabela 18 - Razões diagnósticas para os N-marcadores presentes nas amostras de óleo cru P1 a P8 da Bacia Potiguar

Amostra	$\text{B[a]C} / \text{B[a]C} + \text{B[c]C}$	$\text{B[a]C} / \text{B[c]C}$	$\text{C1} / \text{C3}$	$1,8\text{-DMC} / 1\text{MC}$	$1,8\text{-DMC} / \text{CA}$
P1	0,49	0,95	1,00	7,65	1,82
P2	0,39	0,64	0,32	8,84	10,82
P3	0,54	1,16	-	-	-
P4	0,71	2,50	-	-	-
P5	0,48	0,91	-	-	8,23
P6	0,97	38,3	-	-	12,86
P7	0,72	2,56	-	-	-
P8	0,39	0,65	-	-	-

B[a]C: benzo[a]carbazol, **B[c]C:** benzo[c]carbazol, **C1:** C1-carbazol, **C3:** C3-carbazol, **1MC:** 1-metilcarbazol, **2MC:** 2-metilcarbazol, **1,8DMC:** 1,8-dimetilcarbazol e **CA:** carbazol
 Autoria própria (2020).

As razões de N-marcadores foram avaliadas conforme os parâmetros adotados na literatura como indicativos de maturidade, ambiente deposicional e origem. A migração não foi avaliada em razão da ausência de dados de profundidade e/ou distância.

Maturidade

A maturidade é convencionalmente avaliada em petróleo empregando-se diferentes razões de biomarcadores saturados: C29S/S+R^{17,142}, reflectância de vitrinita (%)^{18,35,59,60,90}, Ts/Ts+Tm^{21,60,61,85,142}, C29-esterano/C30-hopano²¹ e VRE (%)⁶¹. No presente trabalho, a avaliação da maturidade foi realizada empregando N-marcadores, conforme proposto por Silliman et al. (2002)⁶¹. Segundo esses autores, a interpretação ocorre pela correlação entre a razão benzo[a]carbazol/benzo[c]carbazol e o somatório dos isômeros benzocarbazóis (Σ benzocarbazóis [a+b+c]). Essa correlação pode ser visualizada na Figura 33.

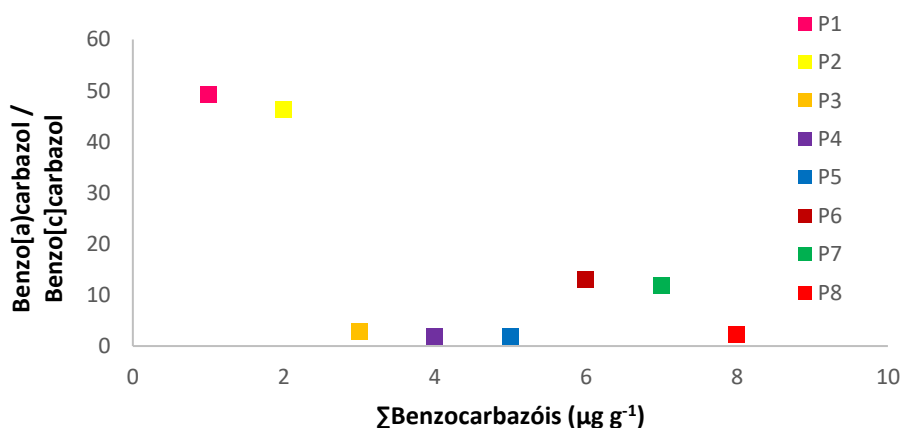


Figura 33 - Correlação entre benzo[a]carbazol/benzo[c]carbazol versus Σ benzocarbazóis para as oito amostras de petróleo da Bacia Potiguar. Fonte: Autoria própria (2020).

Na Figura 33 observa-se que há uma predominância dos pontos que representam as amostras em valores mais baixos na correlação aplicada, exceto para as amostras P1 e P2 que apresentaram valores mais elevados. De acordo com Silliman et al. (2002) uma correlação positiva pode ser consequência de um aumento

da maturidade térmica ⁶¹. Com base nos resultados, pode-se afirmar que as amostras têm grau de maturidade semelhante, com exceção da P1 e P2, que indica ser mais matura.

Outro parâmetro para avaliar maturidade térmica, pode ser obtido pela correlação de N-marcadores com biomarcadores saturados ^{17,60,64}. No presente trabalho, tal correlação foi avaliada empregando-se dados de biomarcadores (razões C29S/S+R e Ts/Ts+Tm) determinados por Alves et al. (2018) ¹⁴², para o mesmo conjunto de amostras. Os resultados podem ser visualizados na Figura 34. Vale destacar que tal avaliação foi interpretada como comparação com dados de biomarcadores da literatura. Para estudo específico sobre interpretação geoquímica, sugere-se realizar análise dos biomarcadores nas mesmas condições de tempo e preparo de amostras.

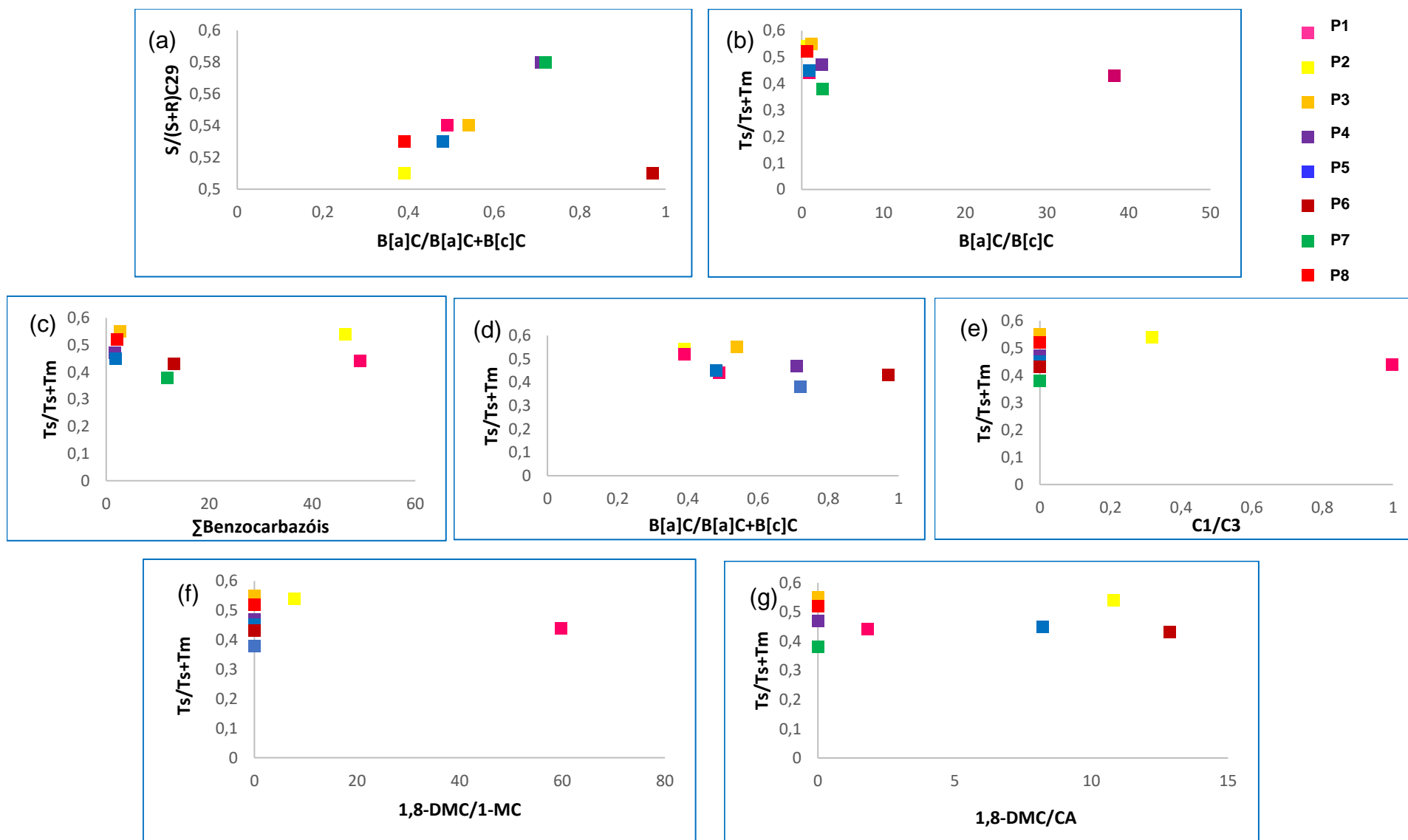


Figura 34 - Correlações indicativas de maturidade térmica: **(a)** $B[a]C/B[a]C+B[c]C$ versus $C29S/S+R$, **(b)** $B[a]C/B[c]C$ versus T_s/T_s+T_m **(c)** Σ benzocarbazóis versus T_s/T_s+T_m **(d)** $B[a]C/B[a]C+B[c]C$ versus T_s/T_s+T_m **(e)** $C1/C3$ versus T_s/T_s+T_m **(f)** 1,8-DMC/1-MC versus T_s/T_s+T_m e **(g)** 1,8-DMC/CA versus T_s/T_s+T_m . Autoria própria (2020).

Na Figura 34, observa-se em geral, uma tendência dos pontos que representam as amostras estarem mais elevados no gráfico, ao contrário do observado na Figura 33 (exceto para amostra P1 e P2) quando a correlação apenas foi aplicada a N-marcadores. Não foi observada tendência positiva ou negativa de correlação em todos os parâmetros empregados, o que pode indicar similaridade de maturidade térmica nessas amostras. A correlação aplicada, conforme a Figura 34.a, foi a mesma empregada por Bakr (2009) ¹⁷ e a dispersão entre os pontos foi relatado como indicativo da possível não influência de maturação térmica na distribuição da razão empregada. No entanto, as correlações utilizadas nas Figuras 34.b, 34.c e 34.d foram utilizadas por Li et al. (1999) ⁸⁵ e Bennet et al. (2007) ⁵⁹ indicando influência da maturidade térmica sob as razões através da correlação positiva. A razão C1/C3 foi avaliada por Abrakasa et al. (2018) ⁵⁴ como indicativo de maturidade utilizando-se o parâmetro VRE (%). Entretanto, devido a ausência desse parâmetro para as amostras avaliadas neste trabalho foi utilizada a razão Ts/Ts+Tm (Figura 34.e) e consideradas apenas para efeito de cálculo da razão C1/C3 os isômeros que foram determinados na análise quantitativa. As correlações das Figuras 34.f e 34.g foram empregadas por Silliman et al. (2002) ⁶¹ mas a variação foi pouco significativa.

Neste trabalho a pouca variação das correlações pode estar relacionada a similaridade da maturidade térmica entre as amostras conforme relatado por Alves et al. (2018) ¹⁴².

Paleoambiente

Para avaliar o paleoambiente deposicional, empregou-se a correlação entre a razão dos N-marcadores ($B[a]C/B[a]C+B[c]C$ e $B[a]C/B[c]C$) (Tabela 18) e a razão dos biomarcadores saturados P/F, determinada por Alves et al. (2018) ¹⁴², conforme descrito em Bakr (2009) ⁶⁴. Os resultados podem ser vistos na Figura 35.

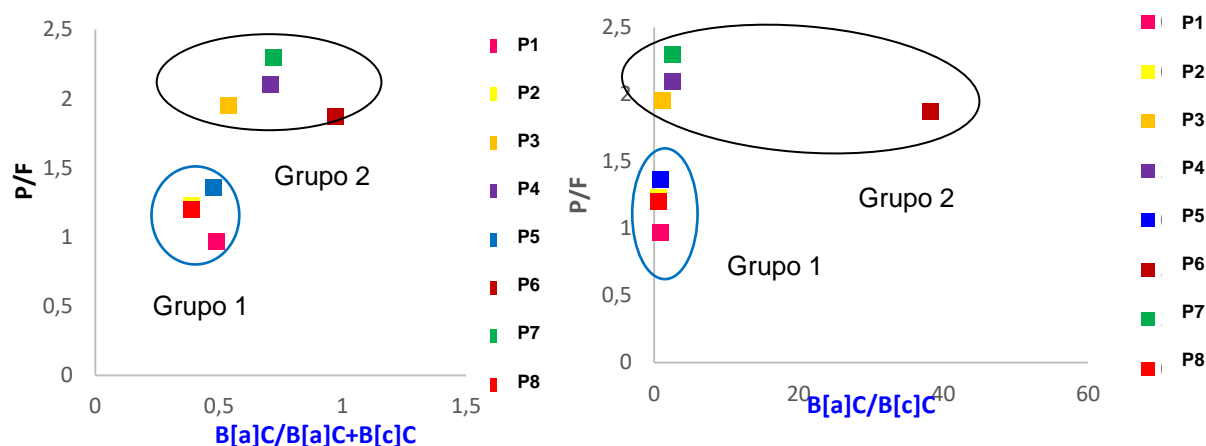


Figura 35 - Correlações indicativas de palimambiente (a) $B[a]C/B[a]C+B[c]C$ versus P/F e (b) $B[a]C/B[c]C$ versus P/F . Autoria própria (2020).

Na Figura 35 observa-se a tendência de formação de dois grupos. O primeiro, formado pelas amostras P1, P2, P5 e P8 (em azul) com menores valores das razões $B[a]C/B[a]C+B[c]C$ e P/F e o segundo, formado pelas amostras P3, P4, P6 e P7 (em preto). Bakr (2009)¹⁷ diferenciou origens marinha e terrestre de óleos empregando essas correlações, onde valores mais altos da razão dos benzocarbazóis (0,59 a 0,61) foram relacionados a óleos marinhos e valores mais baixos (0,39 a 0,59) óleos terrestres¹⁷. No presente trabalho, o grupo 1 (em azul) compreendeu valores $B[a]C/B[a]C+B[c]C$ entre 0,39 a 0,49 e o grupo 2 (em preto) entre 0,54 a 0,97. As amostras contidas no grupo 1 e 2 (Figura 36) foram classificadas por Alves et al. (2018)¹⁴² como de origem de deposição marinha e lacustre, respectivamente. Logo, os valores de N-marcadores confirmaram os resultados obtidos por Alves, para o mesmo conjunto de amostras.

Diferenças encontradas entre os dados obtidos no presente trabalho e os descritos por Alves et al. (2018)¹⁴² provavelmente se devem as diferenças inerentes aos parâmetros avaliados, instrumentais, bem como das condições da amostra, avaliadas em períodos diferentes. Entretanto, serviu como um parâmetro de comparação já que este é o primeiro trabalho que avalia marcadores nitrogenados em amostras de petróleo brasileiro por GC-MS/MS. Para estudos futuros, sugere-se a avaliação dos biomarcadores em conjunto com os N-marcadores, usando mesma instrumentação analítica.

5. CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho que apresentou o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação de marcadores nitrogenados em amostras de petróleo, sem fracionamento, empregando GC-MS/MS no modo MRM.

Foram desenvolvidas metodologias no GC-MS/MS usando padrões de treze N-marcadores nos modos de operação: SCAN, SIM, PIS e MRM. As metodologias SIM e MRM foram aplicadas em estudo comparativo para a amostra de petróleo P1 da Bacia Potiguar. Através de avaliações qualitativas como relação S/N, resolução e seletividade, verificou-se o ganho analítico do modo MRM e esse foi então empregado para as análises quantitativas.

A avaliação do efeito de matriz indicou que os componentes da matriz interferem na quantificação dos N-compostos 9-metilcarbazol, carbazol, 1-metilcarbazol, 2-metilcarbazol, 3-eticarbazol, 1,8-dimetilcarbazol, 2,7-dimetilcarbazol, 1,4,8-trimetilcarbazol, benzo[a]carbazol, benzo[c]carbazol e dibenzocarbazol. Assim, empregou-se na análise quantitativa a curva de calibração compatibilizada com a matriz.

O método quantitativo GC-MS/MS no modo MRM, apresentou LOD de $2,54 \mu\text{g L}^{-1}$ (benzo[a]carbazol) a $95,38 \mu\text{g L}^{-1}$ (3,6-dimetilcarbazol) e LOQ de $7,71 \mu\text{g L}^{-1}$ (benzo[a]carbazol) a $389,03 \mu\text{g L}^{-1}$ (3,6-dimetilcarbazol) com valores de coeficiente de determinação superiores a 0,98. Os ensaios de precisão resultaram em desvio padrão relativo inferiores a 20% e resultado expresso em intervalo com 95% de confiança. As taxas de recuperação ficaram entre 78,63% no nível mais baixo para 9-metilcarbazol e 117,34% no nível mais alto para 1-metilcarbazol. Esses resultados indicam o potencial uso da técnica para fins quantitativos para N-marcadores em baixas concentrações presentes em amostras de petróleo.

O método MRM foi, por fim, aplicado para a quantificação de oito amostras de petróleo sem etapa de fracionamento, o que resultou em economia de tempo de análise, solventes, além de minimizar a perda de analitos quando comparado as técnicas convencionais para N-marcadores em amostras de petróleo, as quais

envolvem fracionamento e separações específicas de classes de compostos nitrogenados.

O emprego da PCA possibilitou discriminar amostras contendo quantidades distintas e similares de N-marcadores, indicando a origem marinha das amostras P1, P2, P5 e P8 por descreverem maiores concentrações de carbazóis; e de origem lacustre a P3, P4, P6 e P7 por descreverem menores quantidades dos n-marcadores.

O uso de razões diagnósticas de N-marcadores, associados a biomarcadores saturados, foram empregadas de modo a comparar parâmetros geoquímicos indicativos de maturidade e ambiente deposicional. Foi possível inferir que as oito amostras têm maturidade semelhante. Com relação ao ambiente deposicional, a formação dos grupos foi concordante com resultados da literatura para as mesmas amostras, indicando deposições de origem marinha (amostras P1, P2, P5 e P8) e lacustre (P3, P4, P6 e P7).

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões de etapas futuras propõe-se:

- Otimização das condições cromatográficas através do emprego de diferentes colunas e transições, de modo a atenuar coeluições entre compostos isômeros;
- Fazer um estudo comparativo entre o modo SIM e MRM do GC-MS/MS empregando amostras fracionadas e brutas;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de petróleo e óleo onde seja possível avaliar a migração;
- Avaliar amostras de petróleo de diferentes origens, ambientes deposicionais, maturidade e migração;
- Realizar estudo avaliando os N-marcadores em conjunto com biomarcadores a fim de comparar os resultados para avaliação dos mesmos parâmetros geoquímicos;
- Empregar o método da adição de padrão para a análise quantitativa a fim de compensar os efeitos de matriz.

REFERÊNCIAS

1. Speight, J. G. The Chemistry and Technology of Petroleum. *Chem. Technol. Pet.* (2014) doi:10.1201/b16559.
2. Tissot, B. P., Welte, D. H., Tissot, B. P. & Welte, D. H. *Petroleum Formation and Occurrence. Petroleum Formation and Occurrence* (1978). doi:10.1007/978-3-642-96446-6_5.
3. Song, H., Wen, Z. & Bao, J. Influence of biodegradation on carbazole and benzocarbazole distributions in oils from the Bongor Basin, Chad. *Org. Geochem.* (2016) doi:10.1016/j.orggeochem.2016.07.005.
4. Prado, G. H. C., Rao, Y. & De Klerk, A. Nitrogen removal from oil: A review. *Energy and Fuels* **31**, 14–36 (2017).
5. Li, M., Larter, S. R., Stoddart, D. & Bjorøy, M. Fractionation of pyrrolic nitrogen compounds in petroleum during migration: Derivation of migration-related geochemical parameters. *Geol. Soc. Spec. Publ.* **86**, 103–123 (1995).
6. Carvalho Dias, L., Bomfim Bahia, P. V., Nery do Amaral, D. & Machado, M. E. Nitrogen compounds as molecular markers: An overview of analytical methodologies for its determination in crude oils and source rock extracts. *Microchem. J.* **157**, 105039 (2020).
7. Richter, F. P., Caesar, P. D., Meisel, S. L. & Offenbauer, R. D. Distribution of Nitrogen in Petroleum According to Basicity. *Ind. Eng. Chem.* **44**, 2601–2605 (1952).
8. Jewell, D. M., Albaugh, E. W., Davis, B. E. & Ruberto, R. G. Integration of Chromatographic and Spectroscopic Techniques for the Characterization of Residual Oils. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **13**, 278–282 (1974).
9. Drews, A. Standard Test Method for Characteristic Groups in Rubber Extender and Processing Oils and Other Petroleum-Derived Oils by the Clay-Gel Absorption Chromatographic Method. *Man. Hydrocarb. Anal. 6th Ed.* **19**, 311–311–7 (2008).
10. Zhang, G. *et al.* Characterization of Nitrogen-Containing Polycyclic Aromatic Heterocycles in Crude Oils and Refined Petroleum Products. in *Advances in Marine Biology* 59–96 (2018). doi:10.1016/bs.amb.2018.09.006.
11. Snyder, L. R. & Buell, B. E. Nitrogen and Oxygen Compound Types in Petroleum: A General Separation Scheme. *Anal. Chem.* (1968) doi:10.1021/ac60264a004.
12. Radke, M., Willsch, H. & Welte, D. H. Preparative hydrocarbon group type determination by automated medium pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.* **52**, 406–411 (1980).
13. Drushel, H. V. & Sommers, A. L. Isolation and Identification of Nitrogen Compounds in Petroleum. *Anal. Chem.* **38**, 19–28 (1966).

14. Snyder, L. R. Petroleum Nitrogen Compounds and Oxygen Compounds. *Acc. Chem. Res.* **3**, 290–299 (1970).
15. Snyder, L. R. Nitrogen and Oxygen Compound Types in Petroleum. Total Analysis of an 850-1000 °F Distillate from a California Crude Oil. *Anal. Chem.* **41**, 1084–1094 (1969).
16. Snyder, L. R., Buell, B. E. & Howard, H. E. Nitrogen and Oxygen Compound Types in Petroleum: Total Analysis of a 700–850 °F Distillate from a California Crude Oil. *Anal. Chem.* **40**, 1303–1317 (1968).
17. Bakr, M. M. Y. Occurrence and geochemical significance of carbazoles and xanthenes in crude oil from the Western Desert, Egypt. *J. King Abdulaziz Univ. Earth Sci.* (2009) doi:10.4197/Ear.20-2.7.
18. Clegg, H., Wilkes, H. & Horsfield, B. Carbazole distributions in carbonate and clastic source rocks. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 5335–5345 (1997).
19. Rodrigues Covas, T. *et al.* Fractionation of polar compounds from crude oils by hetero-medium pressure liquid chromatography (H-MPLC) and molecular characterization by ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Fuel* **267**, 117289 (2020).
20. Hua, R. *et al.* Determination of sulfur-containing compounds in diesel oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography with a sulfur chemiluminescence detector. *J. Chromatogr. A* **1019**, 101–109 (2003).
21. Bennett, B., Chen, M., Brincat, D., Gelin, F. J. P. & Larter, S. R. Fractionation of benzocarbazoles between source rocks and petroleums. in *Organic Geochemistry* (2002). doi:10.1016/S0146-6380(02)00017-7.
22. Bastow, T. P., Van Aarssen, B. G. K., Chidlow, G. E., Alexander, R. & Kagi, R. I. Small-scale and rapid quantitative analysis of phenols and carbazoles in sedimentary matter. *Org. Geochem.* **34**, 1113–1127 (2003).
23. Hallmann, C. O. E., Arouri, K. R., McKirdy, D. M. & Schwark, L. Temporal resolution of an oil charging history - A case study of residual oil benzocarbazoles from the Gidgealpa Field. *Org. Geochem.* **38**, 1516–1536 (2007).
24. Faboya, O. L., Sonibare, O. O., Liao, Z., Ekundayo, O. & Tian, Y. Occurrence and Distribution of Carbazoles and Benzocarbazoles in Tertiary Niger Delta Source Rocks. *Pet. Sci. Technol.* **32**, 2938–2952 (2014).
25. Luofu, L. *et al.* Characteristics of Oil Sources from the Chepaizi Swell, Junggar Basin, China. *Acta Geol. Sin. - English Ed.* **84**, 1209–1219 (2010).
26. Later, D. W., Lee, M. L., Bartle, K. D., Kong, R. C. & Vassilaros, D. L. Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels. *Anal. Chem.* **53**, 1612–1620 (1981).
27. Oliveira, E. C. *et al.* Identification of alkyl carbazoles and alkyl benzocarbazoles in Brazilian petroleum derivatives. *J. Chromatogr. A* **1105**, 186–190 (2006).

28. Östman, C. E. & Colmsjö, A. L. Isolation and classification of polycyclic aromatic nitrogen heterocyclic compounds. *Fuel* **67**, 396–400 (1988).
29. Dorbon, M. *et al.* Identification of carbazoles and benzocarbazoles in a coker gas oil and influence of catalytic hydrotreatment on their distribution. *Fuel* **63**, 565–570 (1984).
30. Vékey, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr. A* **921**, 227–236 (2001).
31. Bayona, J. M., Domínguez, C. & Albaigés, J. Analytical developments for oil spill fingerprinting. *Trends Environ. Anal. Chem.* **5**, 26–34 (2015).
32. Bakel, A. J. & Philp, R. P. P. The distribution and quantitation of organonitrogen compounds in crude oils and rock pyrolysates. *Org. Geochem.* **16**, 353–367 (1990).
33. Merdrignac, I., Behar, F., Albrecht, P., Briot, P. & Vandenbroucke, M. Quantitative extraction of nitrogen compounds in oils: Atomic balance and molecular composition. *Energy and Fuels* **12**, 1342–1355 (1998).
34. Chunming, Z., Bowen, M., Larter, S. R., Koopmans, M. P. & Qianhua, X. Effects of biodegradation on the distribution of alkylcarbazoles in crude oils. *Chinese J. Geochemistry* **21**, 140–146 (2002).
35. Larter, S. R. *et al.* Molecular indicators of secondary oil migration distances. *Nature* (1996) doi:10.1038/383593a0.
36. Li, M., Larter, S. R., Stoddart, D., Bjorøy, M. & Bjorøy, M. Liquid Chromatographic Separation Schemes for Pyrrole and Pyridine Nitrogen Aromatic Heterocycle Fractions from Crude Oils Suitable for Rapid Characterization of Geochemical Samples. *Anal. Chem.* **64**, 1337–1344 (1992).
37. Dorbon, M. *et al.* Distribution of carbazole derivatives in petroleum. *Org. Geochem.* **7**, 111–120 (1984).
38. Sinninghe Damsté, J. S., Eglinton, T. I. & de Leeuw, J. W. Alkylpyrroles in a kerogen pyrolysate: Evidence for abundant tetrapyrrole pigments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**, 1743–1751 (1992).
39. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Petróleo E Derivados –. **5**, 4 (2016).
40. Stauffer, E., Dolan, J. A. & Newman, R. Flammable and Combustible Liquids. in *Fire Debris Analysis* 199–233 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-012663971-1.50011-7.
41. Wang, Z., Fingas, M., Yang, C. & Christensen, J. H. Crude Oil and Refined Product Fingerprinting: Principles. *Environ. Forensics Contam. Specif. Guid.* 339–407 (1964) doi:10.1016/B978-012507751-4/50038-0.
42. Moreira, E. M., Pereira, C. G. & Borges, M. B. Craqueamento catalítico fluido de GOP Cabiúnas desnitrificado: O impacto da redução de nitrogenados na carga no desempenho do FCC. *Bol. Tec. da PETROBRAS* **45**, 274–283 (2002).

43. H.L. Lochte and E.R. Littmann. The petroleum acids and bases. *J. Chem. Educ.* **33**, A466 (1956).
44. Machado, M. E. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of nitrogen-containing compounds in fossil fuels: A review. *Talanta* **198**, 263–276 (2019).
45. ZHAO, Y. *et al.* Evidence of Oil Sources and Migration in Triassic-Jurassic Reservoirs in the South Tianhuan Depression of the Ordos Basin, China Based on Analysis of Biomarkers and Nitrogen-Bearing Compounds. *Acta Geol. Sin. - English Ed.* **88**, 1798–1810 (2014).
46. Bechtel, A., Gratzner, R., Linzer, H.-G. & Sachsenhofer, R. F. Influence of migration distance, maturity and facies on the stable isotopic composition of alkanes and on carbazole distributions in oils and source rocks of the Alpine Foreland Basin of Austria. *Org. Geochem.* **62**, 74–85 (2013).
47. Zhang, C., Zhang, Y. & Cai, C. Maturity effect on carbazole distributions in source rocks from the saline lacustrine settings, the western Qaidam Basin, NW China. *J. Asian Earth Sci.* **42**, 1288–1296 (2011).
48. Bennett, B. & Larter, S. R. Quantitative Separation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons Using Silver Ion–Silica Solid-Phase Extraction. *Anal. Chem.* **72**, 1039–1044 (2000).
49. Horsfield, B., Clegg, H., Wilkes, H. & Santamaría-Orozco, D. Effect of maturity on carbazole distributions in petroleum systems: new insights from the Sonda de Campeche, Mexico, and Hils Syncline, Germany. *Naturwissenschaften* **85**, 233–237 (1998).
50. Bennett, B., Bowler, B. F. J. & Larter, S. R. Determination of C0-C3 Alkylphenols in Crude Oils and Waters. *Anal. Chem.* **68**, 3697–3702 (1996).
51. Yamamoto, M., Taguchi, K. & Sasaki, K. Basic nitrogen compounds in bitumen and crude oils. *Chem. Geol.* **93**, 193–206 (1991).
52. Han, Y., Poetz, S., Mahlstedt, N., Karger, C. & Horsfield, B. Fractionation of Pyrrolic Nitrogen Compounds during Primary Migration of Petroleum within the Barnett Shale Sequence of Marathon 1 Mesquite Well, Texas. *Energy & Fuels* **32**, 4638–4650 (2018).
53. Ziegs, V. *et al.* Unravelling maturity- and migration-related carbazole and phenol distributions in Central Graben crude oils. *Mar. Pet. Geol.* **94**, 114–130 (2018).
54. Abrakasa, S., Onojake, M. C., Ukaegbu, V. & Nwankwoala, H. O. Carbazoles and benzocarbazoles confirm migration of leaked petroleum through caprocks and overlying formations of Valhall Well 2/8-8 in the North Sea. *Acta Geochim.* (2018) doi:10.1007/s11631-017-0247-2.
55. NIST. Nist Livro de Química na Web. *National Institute of Standards and Technology* <https://webbook.nist.gov/chemistry/> (2017).
56. Distribution of benzocarbazole isomers in petroleum as evidence for their biogenic origin. *Nature*, 205. (1965).

57. Oldenburg, T. B. P. Geochemical Significance of Heterocompounds in Petroleum Systems, Offshore Norway. 315 (2004).
58. Hesse, M. Progress in Mass Spectrometry, vol 1. Verlag Chemie, Weinheim. **3**, 3 (1974).
59. Bennett, B. & Olsen, S. D. The influence of source depositional conditions on the hydrocarbon and nitrogen compounds in petroleum from central Montana, USA. *Org. Geochem.* **38**, 935–956 (2007).
60. Bakr, M. M. Y. & Wilkes, H. The influence of facies and depositional environment on the occurrence and distribution of carbazoles and benzocarbazoles in crude oils: a case study from the Gulf of Suez, Egypt. *Org. Geochem.* **33**, 561–580 (2002).
61. Silliman, J. E., Li, M., Yao, H. & Hwang, R. Molecular distributions and geochemical implications of pyrrolic nitrogen compounds in the Permian Phosphoria Formation derived oils of Wyoming. *Org. Geochem.* **33**, 527–544 (2002).
62. Li, M., Yao, H., Stasiuk, L. D., Fowler, M. G. & Larter, S. R. Effect of maturity and petroleum expulsion on pyrrolic nitrogen compound yields and distributions in Duvernay Formation petroleum source rocks in central Alberta, Canada. *Org. Geochem.* **26**, 731–744 (1997).
63. Yamamoto, M. Fractionation of azaarenes during oil migration. *Org. Geochem.* **19**, 389–402 (1992).
64. Wang, T. G., Li, S. M. & Zhang, S. C. Oil migration in the Lunnan region, Tarim Basin, China based on the pyrrolic nitrogen compound distribution. *J. Pet. Sci. Eng.* (2004) doi:10.1016/S0920-4105(03)00148-7.
65. Zhu, Y., Fu, J., Sheng, G., Xiang, T. & Mei, B. Geochemical significance of pyrrolic nitrogen compounds in various kinds of crude oils from the Tarim Basin. *Chinese Sci. Bull.* **43**, 1366–1370 (1998).
66. Fan, T., Wang, J. & Buckley, J. S. Evaluating Crude Oils by SARA Analysis. *Proc. - SPE Symp. Improv. Oil Recover.* 883–889 (2002) doi:10.2523/75228-ms.
67. Islas-Flores, C. A., Buenrostro-Gonzalez, E. & Lira-Galeana, C. Comparisons between open column chromatography and HPLC SARA fractionations in petroleum. *Energy and Fuels* **19**, 2080–2088 (2005).
68. Willsch, H., Clegg, H., Horsfield, B., Radke, M. & Wilkes, H. Liquid Chromatographic Separation of Sediment, Rock, and Coal Extracts and Crude Oil into Compound Classes. *Anal. Chem.* **69**, 4203–4209 (1997).
69. Li, M. & Larter, S. R. Potential bias in the isolation of pyridinic nitrogen fractions from crude oils and rock extracts using acid extraction and liquid chromatography. *Org. Geochem.* **32**, 1025–1030 (2001).
70. Bennett, B. & Love, G. D. Release of organic nitrogen compounds from kerogen via catalytic hydrolysis. *Geochem. Trans.* **1**, 61–67 (2000).

71. Yang, Y. & Arouri, K. A Simple Geotracer Compositional Correlation Analysis Reveals Oil Charge and Migration Pathways. *Sci. Rep.* **6**, 23066 (2016).
72. Lott, P. F. Selective gas chromatographic detectors. *Microchem. J.* **36**, 408 (1987).
73. Flego, C. & Zannoni, C. N-containing species in crude oil fractions: An identification and quantification method by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry. *Fuel* **90**, 2863–2869 (2011).
74. Van Stee, L. L. P., Brinkman, U. A. T. & Bagheri, H. Gas chromatography with atomic emission detection: A powerful technique. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **21**, 618–626 (2002).
75. Barman, B. N., Cebolla, V. L. & Membrado, L. Chromatographic techniques for petroleum and related products. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **30**, 75–120 (2000).
76. Yang, L., Li, M., Wang, T. G. & Shi, Y. Dibenzothiophenes and benzonaphthothiophenes in oils, and their application in identifying oil filling pathways in Eocene lacustrine clastic reservoirs in the Beibuwan Basin, South China Sea. *J. Pet. Sci. Eng.* **146**, 1026–1036 (2016).
77. Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, M., Zhao, H. & Cai, C. Carbazole distributions in rocks from non-marine depositional environments. *Org. Geochem.* **39**, 868–878 (2008).
78. Conceição Oliveira, E., Vaz De Campos, M. C., Sant'Ana Lopes, A., Rodrigues Vale, M. G. & Bastos Caramão, E. Ion-exchange resins in the isolation of nitrogen compounds from petroleum residues. *J. Chromatogr. A* **1027**, 171–177 (2004).
79. Baxby, M., Patience, R. L. & Bartle, K. D. the Origin and Diagenesis of Sedimentary Organic Nitrogen. *J. Pet. Geol.* **17**, 211–230 (1994).
80. Luofu, L. & Yongshang, K. Study on secondary migration of hydrocarbons in Tazhong area of Tarim Basin in terms of carbazole compounds. *Chinese J. Geochemistry* **18**, 97–103 (1999).
81. Clegg, H., Wilkes, H., Oldenburg, T., Santamaría-orozco, D. & Horsfield, B. Influence of maturity on carbazole and benzocarbazole distributions in crude oils and source rocks from the Sonda de Campeche, Gulf of Mexico. in *Organic Geochemistry* vol. 29 183–194 (1998).
82. Bowler, B. F. J. *et al.* Dimethylcarbazoles in Crude Oils: Comment on “Liquid Chromatographic Separation Schemes for Pyrrole and Pyridine Nitrogen Aromatic Heterocycle Fractions from Crude Oils Suitable for Rapid Characterization of Geochemical Samples”. *Anal. Chem.* **69**, 3128–3129 (1997).
83. Frolov, Y. B., Smirnov, M. B., Vanyukova, N. A. & Sanin, P. I. Carbazoles of crude oil. *Pet. Chem. U.S.S.R* **29**, 87–102 (1989).
84. Singh, D., Chopra, A., Patel, M. B. & Sarpal, A. S. A comparative evaluation of nitrogen compounds in petroleum distillates. *Chromatographia* **74**, 121–126

- (2011).
85. Li, M., Fowler, M. G., Obermajer, M., Stasiuk, L. D. & Snowdon, L. R. Geochemical characterisation of Middle Devonian oils in NW Alberta, Canada: possible source and maturity effect on pyrrolic nitrogen compounds. *Org. Geochem.* **30**, 1039–1057 (1999).
 86. Livros. 809659 doi:10.1016/B978-0-12-809659-8.00004-8.
 87. Von Mühlen, C., De Oliveira, E. C., Zini, C. A., Caramão, E. B. & Marriott, P. J. Characterization of nitrogen-containing compounds in heavy gas oil petroleum fractions using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Energy and Fuels* **24**, 3572–3580 (2010).
 88. Galya, L. G. & Suatoni, J. C. Rapid sara separations by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **3**, 229–242 (1980).
 89. Wilkes, H. Fluoren-9-ones and carbazoles in the Posidonia Shale, Hils Syncline, northwest Germany. *Fuel* **77**, 657–668 (1998).
 90. Clegg, H., Horsfield, B., Wilkes, H., Sinninghe Damsté, J. & Koopmans, M. P. Effect of artificial maturation on carbazole distributions, as revealed by the hydrous pyrolysis of an organic-sulphur-rich source rock (Ghareb Formation, Jordan). *Org. Geochem.* **29**, 1953–1960 (1998).
 91. Gao, X. *et al.* Gas purge microsyringe extraction coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography for the characterization of petroleum migration. *Org. Geochem.* **106**, 30–47 (2017).
 92. Hwang, R. ., Heidrick, T., Mertani, B., Qivayanti & Li, M. Correlation and migration studies of North Central Sumatra oils. *Org. Geochem.* **33**, 1361–1379 (2002).
 93. Larter, S. *et al.* An experimental investigation of geochromatography during secondary migration of petroleum performed under subsurface conditions with a real rock. *Geochem. Trans.* **1**, 54–60 (2000).
 94. Lissitsyna, K., Huertas, S., Quintero, L. C. & Polo, L. M. Quantitation method of N,N '-disalicylidene-1,2-propanediamine by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to a nitrogen chemiluminescence detector. *J. Sep. Sci.* **36**, 1768–1763 (2013).
 95. Adam, F. *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography for basic and neutral nitrogen speciation in middle distillates. *Fuel* **88**, 938–946 (2009).
 96. da Silva, J. M., Machado, M. E., Maciel, G. P. S., Dal Molin, D. & Caramão, E. B. Speciation of nitrogen-containing compounds in an unfractionated coal tar sample by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1373**, 159–168 (2014).
 97. Ruckmick, S. C. & Hurtubiseau, R. J. Liquid chromatographic systems for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbon and nitrogen heterocycle compounds present in coal liquids. *Journal of Chromatography A* vol. 321 343–352 (1985).

98. Wang, Z. *et al.* 4 - Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification. *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-803832-1/00004-0.
99. Dutriez, T. *et al.* Challenge in the speciation of nitrogen-containing compounds in heavy petroleum fractions by high temperature comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3190–3199 (2011).
100. Ristic, N. D., Djokic, M. R., Konist, A., Van Geem, K. M. & Marin, G. B. Quantitative compositional analysis of Estonian shale oil using comprehensive two dimensional gas chromatography. *Fuel Process. Technol.* **167**, 241–249 (2017).
101. Deese, R. D. *et al.* Characterization of organic nitrogen compounds and their impact on the stability of marginally stable diesel fuels. *Energy and Fuels* **33**, 6659–6669 (2019).
102. Vanini, G. *et al.* Analytical advanced techniques in the molecular-level characterization of Brazilian crude oils. *Microchem. J.* **137**, 111–118 (2018).
103. Robson, W. J., Sutton, P. A., McCormack, P., Chilcott, N. P. & Rowland, S. J. Class Type Separation of the Polar and Apolar Components of Petroleum. *Anal. Chem.* **89**, 2919–2927 (2017).
104. Gao, X. *et al.* Analysis of crude oils using gas purge microsyringe extraction coupled to comprehensive two dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Fuel* **182**, 788–797 (2016).
105. Wang, Z., Stout, S. A. & Fingas, M. Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. *Environ. Forensics* **7**, 105–146 (2006).
106. Maccoll, A. *Metastable ions*, by R. G. Cooks, J. H. Beynon, R. M. Caprioli, G. R. Lester Elsevier, Amsterdam, 1973. pp. ix + 296. Dfi. 75-00, approx. £11.50, approx. \$28.90. *Org. Mass Spectrom.* **9**, 156–156 (1974).
107. Edmond de Hoffmann, V. S. *Mass spectrometry : principles and applications*. – 3rd ed. in.
108. Musselman, B. D. K. Busch, G. Glish and S. Mcluckey. *Mass spectrometry/mass spectrometry: Techniques and applications of tandem mass spectrometry*, VCH publishing, New York, 1988. *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. Biol. Mass Spectrom.* **18**, 942–942 (1989).
109. Chiaradia, M. C., Collins, C. H. & Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova* **31**, 623–636 (2008).
110. Santos, F. & Ul, D. Q. B. F. C. *Mass spectrometry Mass spectrometry*. (2016).
111. Dutta, A., Hingmire, S. & Banerjee, K. Multiresidue Analysis of Pesticides in Moringa Pods by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *J. AOAC Int.* (2020) doi:10.1093/jaoacint/qsaa053.

112. Pre-proofs, J. Determination of 400 pesticide residues in green tea leaves by UPLC-MS / MS and GC-MS / MS combined with QuEChERS extraction and mixed-mode SPE clean-up method. *Food Chem.* 126928 (2020) doi:10.1016/j.foodchem.2020.126928.
113. Han, L. & Sapozhnikova, Y. Semi-automated high-throughput method for residual analysis of 302 pesticides and environmental contaminants in catfish by fast low-pressure GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS. *Food Chem.* **319**, 126592 (2020).
114. García, L. *et al.* Comparison of gas chromatography techniques for the analysis of organochlorine pesticides in sediments. *Soil Sediment Contam.* **29**, 257–271 (2020).
115. Perrino, C. *et al.* Air Quality Characterization at Three Industrial Areas in Southern Italy. *Front. Environ. Sci.* **7**, (2020).
116. Nardelli, V. *et al.* Study of effects of fipronil and fipronil sulphone on meat nutritional quality and validation of confirmatory GC-MS/MS method for their analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* **55**, 1162–1170 (2020).
117. Kaki, Y. *et al.* Sensitive determination of midazolam and propofol in human plasma by GC-MS/MS. *Forensic Toxicol.* (2020) doi:10.1007/s11419-020-00529-8.
118. Van Renterghem, P. *et al.* Validation of an ultra-sensitive detection method for steroid esters in plasma for doping analysis using positive chemical ionization GC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1141**, 122026 (2020).
119. Woźniak, M. K. *et al.* Development and validation of a GC-MS/MS method for the determination of 11 amphetamines and 34 synthetic cathinones in whole blood. *Forensic Toxicol.* **38**, 42–58 (2020).
120. Mairinger, T., Weiner, M., Hann, S. & Troyer, C. Selective and Accurate Quantification of N -Acetylglucosamine in Biotechnological Cell Samples via GC-MS/MS and GC-TOFMS . *Anal. Chem.* **92**, 4875–4883 (2020).
121. Janke, C., Gaida, S. & Jennewein, S. The production of isoprene from cellulose using recombinant *Clostridium cellulolyticum* strains expressing isoprene synthase. *Microbiologyopen* **9**, 1–6 (2020).
122. Yang, Q. *et al.* Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Adv.* **9**, 37245–37257 (2019).
123. Lee, H. K. *et al.* Targeted toxicometabolomics of endosulfan sulfate in adult zebrafish (*Danio rerio*) using GC-MS/MS in multiple reaction monitoring mode. *Journal of Hazardous Materials* vol. 389 (Elsevier B.V., 2020).
124. Marinelli, E. *et al.* Gamma-hydroxybutyrate abuse: pharmacology and poisoning and withdrawal management. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **71**, 19–26 (2020).
125. Li, C. *et al.* A Systems Pharmacology Approach for Identifying the Multiple Mechanisms of Action for the Rougui-Fuzi Herb Pair in the Treatment of

- Cardiocerebral Vascular Diseases. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2020**, (2020).
126. Zaitso, K. & Hayashi, Y. GC / MS / MS based targeted metabolomics for pathophysiological analysis of animal models. **3**, (2019).
 127. Han, Y., Yin, F., John, G. F. & Clement, T. P. Understanding the relative performance of SCAN, SIM, PMRM and MRM methods for quantifying polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **34**, 0–2 (2020).
 128. Corrick, A. J. *et al.* A second type of highly asphaltic crude oil seepage stranded on the South Australian coastline. *Mar. Pet. Geol.* **112**, 104062 (2020).
 129. Adhikari, P. L., Wong, R. L. & Overton, E. B. Application of enhanced gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for monitoring petroleum weathering and forensic source fingerprinting in samples impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Chemosphere* **184**, 939–950 (2017).
 130. Adhikari, P. L.; Overton, E. B.; Maiti, K.; Wong, R. L. Fingerprinting Deepwater Horizon Oil in the northern Gulf of Mexico using biomarkers and Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry (GC / MS / MS).
 131. Mei, M., Bissada, K. K. (Adry), Malloy, T. B., Darnell, L. M. & Szymczyk, E. B. Improved method for simultaneous determination of saturated and aromatic biomarkers, organosulfur compounds and diamondoids in crude oils by GC–MS/MS. *Org. Geochem.* **116**, 35–50 (2018).
 132. Chiaberge, S., Fiorani, T. & Cesti, P. Methylthiophene isomer ratio in crude oils: Gas chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Fuel Process. Technol.* **92**, 2196–2201 (2011).
 133. Batista, C. M. A. Bacia Potiguar - Sumário Geológico e Setores em Oferta. *Agência Nac. do Petróleo, Gás Nat. e Biocombustíveis* 17 (2017).
 134. ANGELIM, L.A.A., MEDEIROS, V.C., NESI, J. R. Mapa geológico do Estado do Rio Grande do Norte. Programa Geologia do Brasil – PGB. Projeto Geologia e Recursos Minerais do Estado do Rio Grande do Norte. Recife: CPRM/FAPERN, 2006. 1mapa color., 130 cm x 91 cm. Escala. 1:500.000.
 135. Mohriak, W. U. Bacias Sedimentares da Margem Continental Brasileira. *Geol. Tectônica e Recur. Minerais do Bras.* 151–165 (2003).
 136. BERTANI, R. T., COSTA, I. G., MATOS, R. M. D. Evolução tectono-sedimentar, estilo estrutural e habitat do petróleo na Bacia Potiguar. *Alergia Astma Immunologia* (1990).
 137. Gomes, N. S. & Fernandes, S. M. Petrologia e diagênese dos hialoclastitos da Formação Macau, Bacia Potiguar, RN, Brasil. *Bol. Geociências da Petrobras* **9**, 223–236 (1995).
 138. Vaz Dos Santos Neto, E., Hayes, J. M. & Takaki, T. Isotopic biogeochemistry of the Neocomian lacustrine and upper Aptian marine-evaporitic sediments of the Potiguar Basin, Northeastern Brazil. *Org. Geochem.* **28**, 361–381 (1998).

139. Lopes, J. A. D. Estudo de biomarcadores em oleos do campo fazenda Belem, bacia Potiguar - nova classe de biomarcadores. 223 (1995).
140. CARLOS HENRIQUE RABELLO BALOGH. *MODELAGEM TÉRMICA DO GERADOR PENDÊNCIA EM POÇOS DA BACIA POTIGUAR, BRASIL*. https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/28943/1/DISSERTAÇÃO_BALOGH.pdf (2017).
141. Luiz, A. *et al.* Linking the geochemistry of crude oils and petroleum inclusions in the Ubarana and Lorena oilfields, Potiguar Basin, Brazilian Equatorial Margin. *Org. Geochem.* (2018) doi:10.21577/0100-4042.20170195.
142. Alves, J. C. *et al.* Geochemical correlations between petroleum samples from the potiguar basin and definition of their possible generating rocks. *Quim. Nova* **41**, 417–428 (2018).
143. Suatoni, J. C. & Swab, R. E. Rapid hydrocarbon group type analysis by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **13**, 361–366 (1975).
144. No | Chiron.no. <http://www.chiron.no/no/>.
145. Brazil | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>.
146. Franchina, F. A. *et al.* Determination of aromatic sulphur compounds in heavy gas oil by using (low-)flow modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1387**, 86–94 (2015).
147. INMETRO. Doq-Cgcre-008 - Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos. *Inst. Nac. Metrol. Qual. e Tecnol.* 31 (2016).
148. Moreno-González, D., Alcántara-Durán, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F. & Molina-Díaz, A. Matrix-effect free quantitative liquid chromatography mass spectrometry analysis in complex matrices using nanoflow liquid chromatography with integrated emitter tip and high dilution factors. *J. Chromatogr. A* **1519**, 110–120 (2017).
149. Hajslova, J. & Godula, M. Performance of programmed temperature vaporizer , pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **937**, 73–86 (2001).
150. Beatriz, C., Bottoli, G., Collins, C. H., Sales, C. & Jardim, F. Revisão. **27**, 771–780 (2004).
151. Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S. & Costa Melo, L. F. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quim. Nova* **27**, 771–780 (2004).
152. Panero, F. D. S., Vieira, M. de F. P., Cruz, Â. M. P., De Moura, M. de F. V. & Da Silva, H. E. B. 33 Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco. *Eclética Química J.* **34**, 33 (2018).
153. Correia, P. R. M. & Ferreira, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos

- não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. *Quim. Nova* **30**, 481–487 (2007).
154. Speight, J. G. & Özüm, B. *Petroleum refining processes. Petroleum Refining Processes* (2001). doi:10.1201/b17048.
 155. Edition, S. *The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History Vol 2*.
 156. AMORIM, A. F. V. de. *Química - Métodos Cromatográficos*. 84 (2019).
 157. John, G. F., Yin, F., Mulabagal, V., Hayworth, J. S. & Clement, T. P. Development and application of an analytical method using gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry for characterizing alkylated chrysenes in crude oil samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 948–956 (2014).
 158. FARMACOPEIA MERCOSUL: CROMATOGRAFIA. 93 (1393).
 159. Methods, C. Reviewer Guidance ' Validation of Chromatographic Methods. (1994).
 160. DZIDIC, I., BALICKI, M. & HART, H. Identification and quantification of carbazole and benzocarbazole homologues in clarified slurry oils by an ammonia chemical ionization g.c.-m.s. *Fuel* **67**, 1155–1159 (1988).
 161. Huang, H., Ren, F. & Larter, S. R. Influence of biodegradation on benzocarbazole distributions in reservoir oils. *Chinese Sci. Bull.* **47**, 1734–1739 (2002).
 162. Sivan, P., Datta, G. C. & Singh, R. R. Aromatic biomarkers as indicators of source, depositional environment, maturity and secondary migration in the oils of Cambay Basin, India. *Org. Geochem.* **39**, 1620–1630 (2008).
 163. Greibrokk, T., Radke, M., Skurdal, M. & Willsch, H. Multistage supercritical fluid extraction of petroleum source rocks: application to samples from Kimmeridge clay and Posidonia Shale formations. *Org. Geochem.* **18**, 447–455 (1992).
 164. Burchill, P., Herod, A. A., Mahon, J. P. & Pritchard, E. Comparison of methods for the isolation of basic nitrogen compounds from coal tars. *J. Chromatogr. A* **265**, 223–238 (1983).
 165. Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V. & Cerdà, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC - Trends Anal. Chem.* **80**, 641–654 (2016).
 166. Cristale, J., Silva, F. S. & Marchi, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eclét. Quim.* **33**, 69–78 (2008).
 167. Shrivastava, A. & Gupta, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* **2**, 21 (2011).

168. Pinho, G. P., Neves, A. A., Queiroz, M. E. L. R. & Silvério, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Quim. Nova* **32**, 987–995 (2009).
169. Erney, D. R., Gillespie, A. M., Gilvydis, D. M. & Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* **638**, 57–63 (1993).
170. Eliane Lazzari. Emprego da cromatografia bidimensional e análise multivariada no desenvolvimento de metodologias analíticas aplicáveis a caracterização completa de bio-óleos. (2019).
171. SOUZA, D. R. C. de; FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. do N. de; VILHENA, E.; NARDOCCI, A. C. Desenvolvimento e validação de um método multiresíduo para determinação de pesticidas em água utilizando extração em fase sólida (SPE) e GC-MS/MS. 2013–2016 (2017).
172. Bandeira, D. D. *et al.* DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN BOVINE MILK USING A MODIFIED QuEChERS METHOD AND GC-MS/MS. *Quim. Nova* **37**, 900–907 (2014).
173. Thompson, M., Ellison, S. L. R. & Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835–855 (2002).
174. BRASIL. ANVISA. *Agência Nac. Vigilância Sanitária* **2017**, 1–21 (2017).
175. Galimberti, R., Ghiselli, C. & Chiaramonte, M. A. Acidic polar compounds in petroleum: A new analytical methodology and applications as molecular migration indices. *Org. Geochem.* **31**, 1375–1386 (2000).

Anexo I

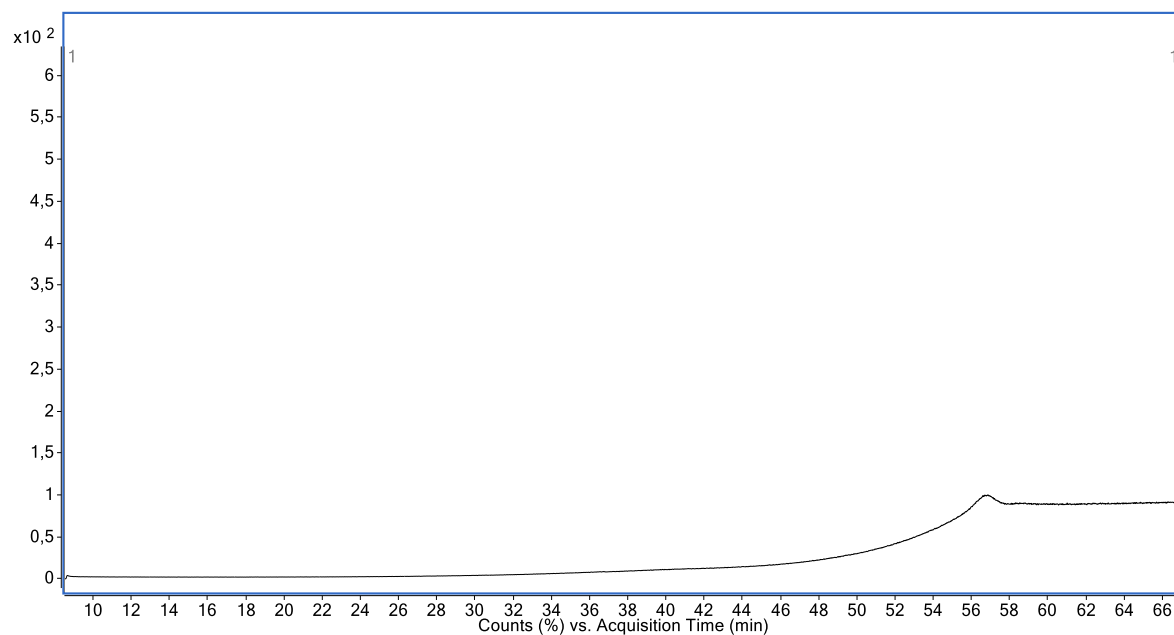


Figura A - Análise SCAN do branco do sistema. Fonte: Autoria própria (2020).

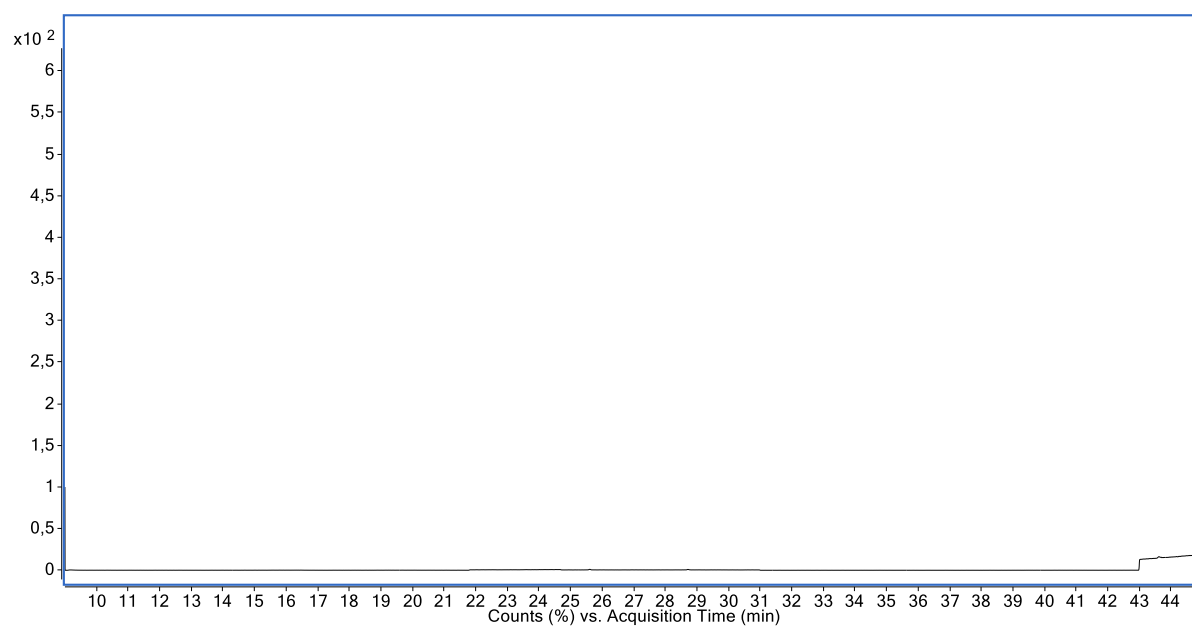


Figura B - Análises MRM do branco do solvente diclorometano. Fonte: Autoria própria (2020).

Anexo II

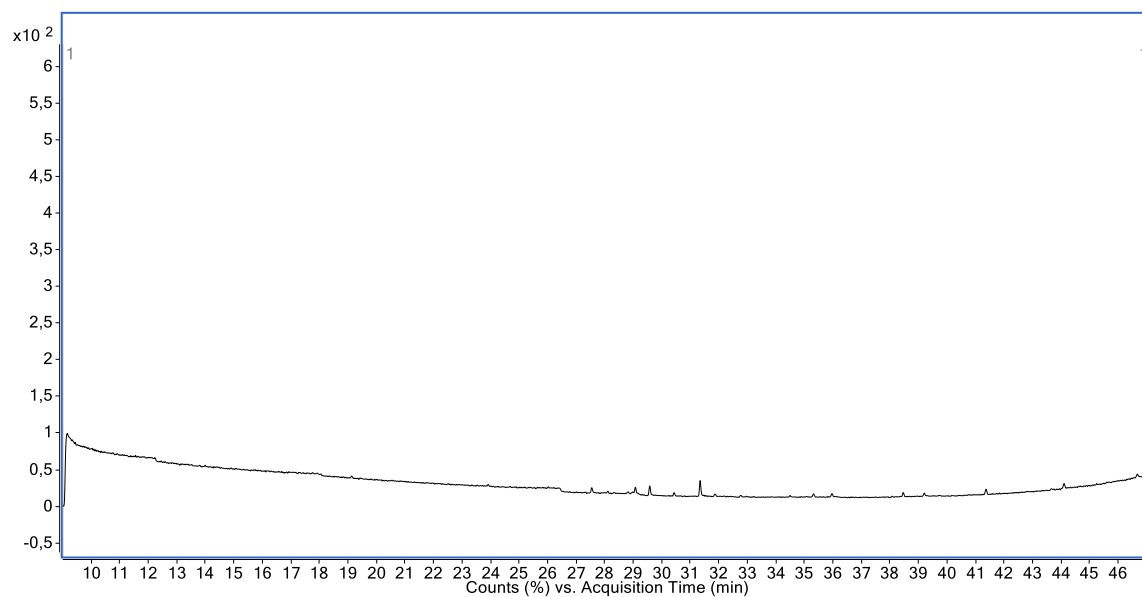


Figura C - Cromatograma de transições totais referente ao branco da matriz análise MRM. Fonte: Autoria própria (2020).

8. Produção científica gerada

8.1 Artigo completo publicado em periódico

1. Carvalho Dias, L., Bomfim Bahia, P. V., Nery do Amaral, D. & Machado, M. E. Nitrogen compounds as molecular markers: An overview of analytical methodologies for its determination in crude oils and source rock extracts. *Microchem. J.* **157**, 105039 (2020).

8.2 Artigo em fase de preparação

1. Carvalho Dias, L., Garcia Santos. K., Fernando de Souza Queiroz, A., Machado, M.E.,
Development and application of analytical methodology using gas chromatography / tandem mass spectrometry to characterize N-markers in crude oils

8.3 Apresentação oral em eventos

1. Carvalho Dias, L., A., Machado, M.E., Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação simultânea demarcadores nitrogenados em petróleo por GC-MS/MS
V Workshop do Lepetro e Pospetro – 2019, Salvador–BA.

2. Nery do Amaral, D., Xavier Antunes Sampaio, F., Lima e Cima Miranda, F., Morena Leoncio de Oliveira, L., Carvalho Dias, L., Lima dos Anjos, S. Evaluation of conventional petroleum systems of the Recôncavo Basin
XI Workshop de petróleo, energia, ambiente e tecnologia – 2020, Salvador–BA.

3. Carvalho Dias, L., Garcia Santos. K., Fernando de Souza Queiroz, A., Machado, M.E.,
Análise multivariada aplicada a interpretação geoquímica de marcadores nitrogenados em amostras de petróleo.
XI Workshop de Quimiometria online – 2020, Campina Grande–PB.

8.4 Resumo em evento

1. Carvalho Dias, L., Garcia Santos. K., Fernando de Souza Queiroz, A., Machado, M.E.,
Desenvolvimento e aplicação de metodologia analítica para determinação de marcadores nitrogenados em óleo cru por GC-MS/MS
Congresso virtual UFBA – 2020, Salvador-BA.