



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Michel Moreira de Freitas Vieira

Comparação de técnicas de extração e caracterização de ácidos
naftênicos em águas produzidas

GOIÂNIA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Michel Moreira de Freitas Vieira

3. Título do trabalho

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NAFTÊNICOS EM ÁGUAS PRODUZIDAS

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Professor do Magistério Superior**, em 20/06/2022, às 07:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MICHEL MOREIRA DE FREITAS VIEIRA, Discente**, em 20/06/2022, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2966113** e o código CRC **E67B9437**.

Michel Moreira de Freitas Vieira

Dissertação de Mestrado

Comparação de técnicas de extração e caracterização de ácidos
naftênicos em águas produzidas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como requisito necessários para a obtenção do título de Mestre em Química, na área de concentração em Química, com a linha de pesquisa em espectrometria de massas.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz

GOIÂNIA
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Vieira, Michel Moreira de Freitas

Comparação de técnicas de extração e caracterização de ácidos naftênicos em águas produzidas [manuscrito] / Michel Moreira de Freitas Vieira. - 2022.

0 135 f.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2022.
Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Ácidos naftênicos. 2. Águas produzidas. 3. Espectrometria de massas. 4. Extração em fase sólida. 5. Ultra-alta resolução. I. Vaz, Boniek Gontijo, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 359 da sessão da Defesa de Mestrado de **Michel Moreira de Freitas Vieira**, que confere o título de **Mestre em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **27 (vinte e sete) dias do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois)**, a partir das **14h00**, via **videoconferência**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada "**UM ESTUDO SOBRE COMPARAÇÕES DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NAFTÊNICOS EM ÁGUAS PRODUZIDAS**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG) e Prof.ª Dr.ª. Jandyson Machado dos Santos (UFRPE)**. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 27 (vinte e sete) dias do mês de abril de 2022 (dois mil e vinte e dois).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS NAFTÊNICOS EM ÁGUAS PRODUZIDAS



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 27/04/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jandyson Machado Santos, Usuário Externo**, em 27/04/2022, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2858965** e o código CRC **15C73639**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

DESPACHO

À Direção da Biblioteca Central Prof. Alpheu da Veiga Jardim (BC) - Câmpus Samambaia, para os devidos fins.

Verificada a divergência no nome de um componente da banca de defesa de mestrado do discente: Michel Moreira de Freitas Vieira, o docente, Prof. Dr. Jandyson Machado Santos, por meio deste informamos a grafia correta, Jandyson Machado Santos, e não, Jandyson Machado **dos** Santos, como é constante no corpo da ata de defesa nº 359, documento SEI 2858635.

Sem mais para o momento.

Nos colocamos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Danilo Neres Santana Oliveira

Secretário do Programa de Pós-Graduação em Química



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Neres Santana Oliveira, Secretário**, em 13/07/2022, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3041810** e o código CRC **69043C4A**.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, que proveram meu sustento durante toda minha vida acadêmica e sempre fizeram o necessário para que eu tivesse todas as oportunidades que eu tive.

Agradeço aos órgãos de fomento, especialmente a Capes, pelo auxílio prestado durante o período de mestrado. Agradeço à Petrobras, por fornecer as amostras e as condições necessárias para cumprimento do estudo apresentado.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Boniek Gontijo Vaz, pela oportunidade, orientações e amparo oferecidos durante essa trajetória. Agradeço também ao Dr. Gabriel Franco, pelas orientações e pela amizade, e a todos os demais colegas do LaCEM que estiveram envolvidos direta e indiretamente na minha formação.

Sumário

Listas de figuras	7
Lista de tabelas	13
Lista de abreviaturas	17
1.1 Petróleo e águas produzidas	21
1.2 Ácidos naftênicos	23
1.3 Extração líquido-líquido	26
1.4 Extração em fase sólida.....	28
1.5 Espectrometria de massas de ultra-alta resolução (UHR-MS).....	33
2. Objetivos	36
2.1 Objetivos específicos	36
3. Metodologia	37
3.1 Reagentes e amostras	37
3.2 Comparação das metodologias apresentadas na literatura utilizando AP de matriz brasileira.....	37
3.2.1 Preparo da amostra de AP	37
3.2.2 Reproduções das metodologias de extração em fase sólida	37
3.2.2.1 Metodologia do grupo I	38
3.2.2.2 Metodologias do grupo II.....	39
3.2.2.3 Metodologias do grupo III.....	39
3.2.2.4 Metodologias do grupo IV	40
3.2.3 Extração líquido-líquido.....	40
3.2.4 Semiquantificação dos ácidos naftênicos	41
3.2.4.1 Preparo das soluções e curva de calibração	41
3.2.4.2 Validação analítica da metodologia de semiquantificação	42
3.2.5 Análise por espectrometria de massas de ultra-alta resolução	43
3.2.6 Processamento de dados.....	43
3.3 Extração em fase sólida automatizada	43

3.3.1	Preparação da solução padrão de ANs	44
3.3.2	Extração em fase sólida utilizando a fase sólida ISOLUTE® ENV+	44
3.3.3	Extração em fase sólida utilizando a fase sólida C8.....	44
3.3.4	Extração em fase sólida utilizando a fase sólida C18.....	45
3.3.5	Extração em fase sólida utilizando a fase sólida APS	45
3.4	Otimização do sistema de extração em fase sólida	46
3.4.1	Preparo da amostra de AP.....	46
3.4.2	Fase sólida ENV.....	46
3.4.3	Fase sólida C18	47
3.4.4	Fase sólida HLB	47
3.4.5	Fase sólida Strata-X.....	48
4.	Resultados e discussões	49
4.1	Comparação de extrações das metodologias apresentadas na literatura utilizando matriz de AP brasileira.....	49
4.1.1	Resultados da metodologia do grupo I	49
4.1.2	Resultados da metodologia do grupo II	54
4.1.3	Resultados da metodologia do grupo III	64
4.1.4	Resultados da metodologia do grupo IV	76
4.1.5	Comparação dos resultados apresentados nas metodologias	87
4.2	Semiquantificação dos ácidos naftênicos extraídos da matriz de água produzida brasileira.....	89
4.2.1	Construção e validação da metodologia semiquantitativa	89
4.2.2	Semiquantificação e caracterização das espécies da classe O2 extraídas	92
4.2.2.1	Resultados da metodologia do grupo I	92
4.2.2.2	Resultados da metodologia do grupo II	94
4.2.2.3	Resultados das metodologias do grupo III.....	97
4.2.2.4	Resultados da metodologia do grupo IV	100
4.2.2.5	Comparação dos resultados apresentados nas metodologias.....	102
4.3	Otimização e testes de metodologias de extração em fase sólida para ácidos naftênicos.....	103
4.3.1	Testes de metodologias de EFS com padrão de ácido naftênico.....	103
4.3.1.1	Extração com a fase sólida C8	103
4.3.1.2	Extração com a fase sólida C18	108
4.3.1.3	Extração com a fase sólida APS.....	112
4.3.1.4	Extração com a fase sólida ENV+	114

4.3.1.5	Extração utilizando a fase sólida Strata-X	117
4.3.2	Identificação de problemas nas extrações	120
4.3.3	Otimização das metodologias de extração em fase sólida	122
5.	Conclusão.....	129
6.	Referências bibliográficas	131

Listas de figuras

Figura 1. Exemplos de estruturas de ácidos naftênicos com suas classificações..... (BERTHEUSSEN, A. et al., 2018).....	24
Figura 2. Etapas da SPE no modo de concentração ou isolamento do analito de interesse (Jardim, 2010).....	32
Figura 3. Fluxograma das metodologias de extração utilizadas no seguinte trabalho. Os grupos das extrações são referentes aos autores que apresentam em seus trabalhos as respectivas metodologias. Grupo I: Headley <i>et al.</i> ; Grupo II: Thomas <i>et al.</i> ; Grupo III: Samanipour <i>et al.</i> ; Grupo IV: Alharbi <i>et al.</i>	38
Figura 4. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela duplicata de extrações do grupo I com o extrato da metodologia padrão de ELL utilizando diclorometano. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.....	50
Figura 5. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo I.	51
Figura 6. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo I.....	52
Figura 7. Diagrama de Venn construído a partir do número médio de fórmulas atribuídas dos extratos ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS apresentados no grupo I.....	53
Figura 8. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo II, utilizando a fase sólida C ₁₈ e solventes de eluição sequenciais com o extrato utilizando a metodologia padrão de ELL com solvente diclorometano. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.	54

Figura 9. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de	56
Figura 10. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária C ₁₈	57
Figura 11. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos ELL e metanol e diclorometano utilizando a fase sólida C ₁₈ , a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS apresentado no grupo II.	58
Figura 12. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS do extrato obtido pela ELL com os extratos obtidos utilizando a fase sólida ENV+ da metodologia apresentada no grupo II. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.	59
Figura 13. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária ENV+	61
Figura 14. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária ENV+	62
Figura 15. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos grupo II MeOH e DCM utilizando a fase sólida ENV+ e o extrato de ELL utilizando DCM como solvente extrator, construído após o processamento dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS.	63
Figura 16. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo III utilizando-se a fase sólida ENV com o extrato da metodologia ELL padrão utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.	65
Figura 17. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros	

de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária ENV..... **68**

Figura 18. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária ENV. **69**

Figura 19. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos do grupo III, obtidos pelo processamento dos espectros de ESI(-)-Orbitrap-MS, utilizando a fase sólida ENV e os solventes HEX, DCM e IPA e do extrato da metodologia padrão de ELL utilizando o solvente extrator DCM..... **70**

Figura 20. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo III utilizando-se a fase sólida HLB com o extrato da metodologia padrão de ELL utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata. **72**

Figura 21. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária HLB. **73**

Figura 22. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária HLB..... **74**

Figura 23. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas, após o processamento dos espectros de massa por ESI(-)-Orbitrap-MS, dos extratos ELL; HEX; DMC e IPA utilizando a fase sólida HLB apresentada no grupo III..... **76**

Figura 24. Comparação dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo IV utilizando a fase sólida C₁₈ com o extrato da ELL padrão utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata..... **77**

Figura 25. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros

de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária C₁₈. 79

Figura 26. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária C₁₈. 80

Figura 27. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas, obtidas pelo processamento dos espectros de massa de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos do grupo IV, utilizando a fase sólida C₁₈ e o extrato da ELL padrão com DCM. 81

Figura 28. Comparação dos espectros de massas do extrato de ESI(-)-Orbitrap-MS obtido pela extração do grupo IV utilizando a fase sólida Strata-X e solvente MeOH com o extrato da ELL padrão utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata. 82

Figura 29. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária Strata-X. 85

Figura 30. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária Strata-X. 86

Figura 31. Diagrama de Venn construído após o processamento do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos ELL; e fase sólida Strata-X apresentada na metodologia do grupo IV. 87

Figura 32. Curva analítica da intensidade absoluta *versus* concentração do padrão deuterado de ácido mirístico obtida por ESI(-)-Orbitrap-MS na faixa de 0,5 a 5,0 mg.mL⁻¹. 89

Figura 33. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE do extrato ACN para a classe O2 utilizando a

metodologia do grupo I com a fase estacionária ENV+. 93

Figura 34. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de MeOH e DCM para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo II com a fase estacionária C₁₈. 95

Figura 35. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de MeOH e DCM para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo II com a fase estacionária ENV+. 96

Figura 36. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de HEX, DCM e IPA para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo III com a fase estacionária ENV. 98

Figura 37. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de HEX, DCM e IPA para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo III com a fase estacionária HLB. 99

Figura 38. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE do extrato MeOH para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo IV com a fase estacionária C₁₈. 100

Figura 39. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE do extrato MeOH para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo IV com a fase estacionária Strata-X. 102

Figura 40. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com metanol, e do extrato eluído com metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v) para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida C8. 104

Figura 41. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando o sorvente C8 com as amostras de pH 2 e pH 7. 106

Figura 42. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do

Padrão Sigma, do extrato eluído com metanol, e do extrato eluído com metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v) para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida C18. **108**

Figura 43. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando o sorvente C18 com as amostras de pH 2 e pH 7..... **110**

Figura 44. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com diclorometano para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida APS..... **112**

Figura 45. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com diclorometano para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida ENV+..... **114**

Figura 46. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida ENV+ com as amostras de pH 2 e pH 7. **116**

Figura 47. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com metanol/ácido fórmico (9:1 v/v) para as extrações em pH 7 e pH 2. **118**

Figura 48. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida Strata-X com as amostras de pH 2 e pH 7. **119**

Figura 49. Espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS da água de lavagem das metodologias APS, ENV+, C8, C18 e Strata-X. **121**

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo I..... **51**
- Tabela 2.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações do grupo II, utilizando C18 e da ELL padrão utilizando DCM, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS **55**
- Tabela 3.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações do grupo II utilizando a fase sólida ENV+ e da metodologia padrão de ELL utilizando o solvente DCM, a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS .. **60**
- Tabela 4.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, a partir dos espectros de ESI(-)-Orbitrap-MS das extrações EFS sequencial do grupo III utilizando a fase sólida ENV e da ELL padrão utilizando o solvente extrator DCM..... **66**
- Tabela 5.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das EFS sequencial do grupo III utilizando a fase sólida HLB e da ELL padrão utilizando o DCM **73**
- Tabela 6.** Número médio de fórmulas de espécies atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas após o processamento dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, das extrações ELL e C18 da metodologia apresentada no grupo IV **78**
- Tabela 7.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações ELL e Strata-X, obtidas pelo processamento do espectro de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS da metodologia apresentada no grupo IV **83**
- Tabela 8.** Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para todas as metodologias apresentadas no trabalho **88**
- Tabela 9.** Valores intradia e interdia da concentração teórica, da média de

concentração observada para $n = 3$, do desvio padrão, do desvio padrão relativo, da recuperação e do coeficiente de variação obtidos pelas análises das soluções padrões de ácido mirístico para as concentrações 0,75; 2,75 e 4,75 mg.mL⁻¹ calculados a partir da equação da reta obtida pela curva analítica da Figura 32 Erro! Indicador não definido.

Tabela 10. Valores da média de intensidade absoluta do branco (IA), desvio padrão da intensidade do branco analítico (DP), coeficiente angular da equação da curva (IC), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) **91**

Tabela 11. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo I **93**

Tabela 12. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo II com a fase estacionária C18 **94**

Tabela 13. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo II com a fase estacionária ENV+ **95**

Tabela 14. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo III com a fase estacionária ENV **97**

Tabela 15. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo III com a fase estacionária HLB **98**

Tabela 16. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo IV com a fase estacionária C18 **100**

Tabela 17. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia

apresentada no grupo IV com a fase estacionária Strata-X.....	101
Tabela 18. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa das frações de metanol e metanol acidificado do extrato da metodologia utilizando o sorvente C8. ..	105
Tabela 19. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida C8	106
Tabela 20. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa das frações de metanol e metanol acidificado do extrato da metodologia utilizando o sorvente C18 .	109
Tabela 21. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida C18	111
Tabela 22. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa dos extratos da metodologia utilizando o sorvente APS.....	113
Tabela 23. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida ENV+	115
Tabela 24. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida ENV+ (continuação).....	116
Tabela 25. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida Strata-X	119
Tabela 26. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa da água de lavagem das metodologias APS, ENV+, C8, C18 e Strata-X	122
Tabela 27. Número de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para as metodologias apresentadas na otimização	Erro! Indicador não definido.

Tabela 28. Número de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para as metodologias apresentadas na otimização onde F1: primeira fração F2: segunda fração (continuação)
..... **125**

Lista de abreviaturas

AP – Água produzida

ANs – Ácidos naftênicos

API – Ionização a pressão atmosférica

APPI – Fotoionização a pressão atmosférica

DBE – *Double blond equivalent*

DCM – Diclorometano

EFS – Extração em fase sólida

ELL – Extração líquido-líquido

ESI – Ionização por *electrospray*

HEX - Hexano

FT ICR-MS – Espectrometria de massas de ressonância ciclôtrica de íons por Transformada de Fourier

IPA - Isopropanol

m/z – Razão massa/carga

MeOH - Metanol

pH – Cologaritimo de atividade de íons hidrônio

STX – Strata-X

TOG – Teor de óleos e graxas

UHR-MS – Espectrometria de massas de ultra-alta resolução

RESUMO

Na primeira parte do trabalho, para fins de estudo de eficiência de extração dos ANs nas APs brasileiras, estudou-se algumas metodologias de EFS para esses analitos, estabelecidas na literatura, com o objetivo de realizar a comparação e a determinação das melhores metodologias, a fim de otimizá-las e adequá-las aos analitos do cenário brasileiro. As fases estacionárias estudadas nessa primeira parte foram: C18, ENV, ENV+, Strata-X e HLB. Procedeu-se com as extrações replicando de forma integral os parâmetros conforme apresentados na literatura, de modo a poder comparar as metodologias de extração em fase sólida empregadas a uma mesma matriz. As análises foram feitas no espectrômetro de massas de ultra-alta resolução Q-Exactive Orbitrap, utilizando a fonte de ionização por *electrospray* (ESI) no modo negativo. O processamento de dados foi realizado com os *softwares* Composer e Thanus. Os resultados obtidos apontam que as metodologias do grupo III, com as fases sólidas ENV e HLB, apresentaram o maior número de espécies de ANs extraídas com os três solventes utilizados, hexano (HEX), diclorometano (DCM) e isopropanol (IPA), sendo 269 e 324 respectivamente no extrato total para as duas fases estacionárias. Em seguida realizou-se a semiquantificação das espécies ácidas da classe O2 identificadas nos extratos das metodologias supracitadas, os resultados que foram obtidos indicam que o solvente DCM extraiu em maiores concentrações espécies de valor de DBE 1, e o solvente metanol extraiu em maiores concentrações espécies de valor de DBE 2. Além disso, o solvente hexano apresentou espécies com valor de DBE 2 em altas concentrações, indicando que essas espécies são eluídas por esse solvente com maior eficiência. Além disso, os compostos com fórmula molecular $C_7H_{12}O_2$, $C_8H_{14}O_2$, $C_9H_{16}O$, $C_{10}H_{18}O_2$ e $C_{11}H_{20}O_2$ apresentaram alta concentração em praticamente todos os extratos. Por último, testes com metodologias utilizando as fases sólidas ENV, C18, APS, Strata-X e HLB foram realizados, a fim de se determinar o volume ideal de solvente e o pH ideal da amostra para uma extração eficiente. Os resultados apresentados indicam que o pH 2 apresentou maiores resultados de recuperação de espécies ácidas. Ainda, as extrações eluídas com 20 mL de

diclorometano, divididos em duas frações forneceram resultados melhores em questão do número de fórmulas atribuídas. Outro ponto de destaque é o fato de que espécies ácidas foram eluídas pela água durante a etapa de lavagem para a remoção de sais da amostra de AP, sendo necessária a retirada dessa etapa das metodologias de extração.

Palavras-chaves: ácidos naftênicos, águas produzidas, espectrometria de massas, extração em fase sólida, ultra-alta resolução.

Abstract

In the first part of the work, for the purpose of studying the extraction efficiency of NAs in Brazilian PWs, some SPE methodologies were studied for these analytes, established in the literature, in order to perform the comparison and determination of the best methodologies, in order to optimize and adapt them to the analytes of the Brazilian scenario. The stationary phases studied in this first part were: C18, ENV, ENV+, Strata-X and HLB. We proceeded with the extractions by fully replicating the parameters as presented in the literature, in order to be able to compare the solid phase extraction methodologies employed to the same matrix. The analyses were performed on the Q-Exactive Orbitrap ultra-high resolution mass spectrometer, using the electrospray ionization (ESI) source in negative mode. Data processing was performed with Composer and Thanus software. The results obtained indicate that the methodologies of group III, with the solid phases ENV and HLB, showed the highest number of AN species extracted with the three solvents used, hexane (HEX), dichloromethane (DCM) and isopropanol (IPA). The results obtained indicate that the solvent DCM extracted in higher concentrations species with a DBE value of 1, and the solvent methanol extracted in higher concentrations species with a DBE value of 2. Moreover, the solvent hexane presented species with a DBE value of 2 in high concentrations, indicating that these species are eluted by this solvent with greater efficiency.

Finally, tests with methodologies using ENV, C18, APS, Strata-X and HLB solid phases were performed in order to determine the optimum solvent volume and optimum sample pH for efficient extraction. The results presented indicate that pH 2 showed the highest recovery results for acidic species. Also, the extractions eluted with 20 mL of dichloromethane, divided into two fractions provided better results in terms of the number of formulas assigned. Another point of note is the fact that acid species were eluted by water during the washing step for the removal of salts from the PW sample, making it necessary to remove this step from the extraction methodologies.

Keywords: naphthenic acids, produced water, mass spectrometry, solid-phase extraction, ultra-high resolution.

1.1 Petróleo e águas produzidas

O petróleo, também conhecido como óleo cru, trata-se de uma mistura de alta complexidade, contendo uma variedade de espécies orgânicas como hidrocarbonetos saturados e aromáticos, resinas e asfaltenos e em quantidades menores, compostos com heteroátomos como O, N e S. Além disso, esse recurso é encontrado no subsolo, não como uma espécie de rio subterrâneo, mas impregnado em rochas sedimentares, em profundidades que podem variar dependendo do local de extração. (THOMAS *et al.*, 2001). Essas rochas, que naturalmente ocorrem nas formações de reservatórios naturais, são permeadas por diversos fluidos, como óleo, gases e água salina (FAKHRU'L *et al.*, 2009).

Há muitos fatores que influenciam o processo de formação de um reservatório, dentre eles, mencionam-se a mistura dos compostos presentes no reservatório, a pressão, e a temperatura de formação. Dessa forma, classificam-se os reservatórios de petróleo conforme a sua composição e o comportamento da mistura contida nesse reservatório. Os reservatórios podem ser classificados como reservatórios de líquido – também chamados de reservatório de óleo -, reservatório de gases e reservatórios híbridos (THOMAS *et al.*, 2001).

Os reservatórios de líquidos apresentam em sua composição óleo, gases e água, que é aprisionada durante a formação do reservatório. A quantidade de água que é produzida durante a prospecção do óleo vai depender das características do reservatório, principalmente da quantidade de água que se encontra no meio poroso do reservatório (THOMAS *et al.*, 2001).

Durante o processo de extração e produção, são produzidas elevadas quantidades de água salina, contaminadas com hidrocarbonetos, traços de metais e ácidos (ANDRADE *et al.*, 2010) que, em processos posteriores, são separadas do óleo e do gás e condicionadas ao reuso, reinjeção em reservatórios, ou descarte (REYNOLDS *et al.*, 2003). Na produção do petróleo *offshore*, essa água é chamada de água produzida (AP) (STROMGREN *et al.*, 1995).

A AP é resultado da água aprisionada nas formações subterrâneas dos reservatórios - a qual é trazida à superfície juntamente com o petróleo e o gás durante os processos de produção - somada com a água do mar, que é usada para injeção nos

reservatórios, com o objetivo de aumentar a pressão de prospecção, consequentemente a eficiência de recuperação do óleo e gás presentes no reservatório (FAKHURU'L *et al.*, 2009).

Outrossim, é importante destacar alguns aspectos da AP, tais como a salinidade desse resíduo, a elevada quantidade que é produzida e também a alta complexidade dessa matriz (AMINI *et al.*, 2012). Além da elevada quantidade de AP, sua composição ou qualidade pode variar muito. A estrutura geológica e a localização geográfica do reservatório afetam diretamente as características físicas, químicas e biológicas da AP (STEWART & ARNOLD, 2011).

Apesar de possuir uma complexa composição, que varia conforme a sua origem e formação, é possível observar alguns íons e compostos presentes nessas águas, tais como ferro, cloretos, bicarbonato, sulfatos, dióxido de carbono, sulfeto de hidrogênio e oxigênio, ácidos, além de altos teores de sólidos, hidrocarbonetos, óleos, bactérias, e de produtos químicos ocasionados da produção que podem influenciar na sua qualidade e corrosividade (CURBELO *et al.*, 2002).

Entre os compostos presentes na AP, destacam-se os ácidos naftênicos (ANs), que devido à sua complexidade, sua toxicidade ao ambiente marinho e à abundância nas AP, tem requerido uma maior atenção, e consequentemente, um aumento considerável nos custos de produção, sendo assim um desafio para a indústria petrolífera (AMINI *et al.*, 2012).

Um enorme desafio que as empresas petrolíferas encontram está relacionado com o tratamento e destino final das AP, devido principalmente ao enorme volume desse subproduto que é gerado, além da sua complexa composição (MOTTA, 2013). No ano de 2009, a média da proporção de água:petróleo nos processos globais de produção de petróleo alcançou 3:1, ou seja, para cada barril de petróleo produzido tem-se 3 barris de água. (FAKHURU'L *et al.*, 2009). Como resultado desses fatores, o gerenciamento da AP é responsável por custos consideravelmente elevados, refletindo em um percentual significativo dos custos de produção do petróleo e seus derivados (AMINI *et al.*, 2012).

Geralmente os destinos finais das AP são o descarte, injeção e o reuso, no entanto, em todas essas opções, é necessário o tratamento da AP, com a intenção de

evitar danos ao ambiente aquático e às instalações de produção (MOTTA, 2013).

O tipo de processo a ser adotado para o tratamento da AP depende dos compostos que se deseja remover. Os compostos a serem removidos, por sua vez, dependem do destino final a ser adotado para a AP tratada. Uma das principais finalidades do tratamento das APs é a remoção de óleo, que pode estar presente na água sob as formas livre, dissolvida e emulsionada, sendo a última a mais preocupante, devido à dificuldade enfrentada no processo para sua remoção. O descarte desses resíduos deve atender à resolução nº 393 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), a qual tem como principal parâmetro de qualidade o valor de TOG, sendo 29 mg.L^{-1} , para a média aritmética simples mensal, e 42 mg.L^{-1} , para o valor máximo diário. (MOTTA, 2013).

1.2 Ácidos naftênicos

Até o presente momento não há nenhuma legislação brasileira que regulamente acerca dos parâmetros de qualidade dos ANs presentes nos efluentes. Apesar disso, esses compostos merecem devida atenção dos órgãos ambientais regulamentadores devido às suas características.

Ácido naftênico (AN) é o nome geral dado à classe de compostos cuja função é um ácido carboxílico. Com base na definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) o termo ácidos naftênicos engloba ácidos monocarboxílicos, derivados do nafteno (IUPAC Recommendations 1995).

Entretanto, na literatura, a definição que se encontra dos ANs é que são compostos encontrados naturalmente no petróleo, cujo termo “naftênicos” é utilizado na indústria petrolífera para identificar os ácidos carboxílicos do petróleo e compreendem uma mistura complexa de ácidos carboxílicos acíclicos, alifáticos, cíclicos e aromáticos com 2 ou mais átomos de oxigênio, com a fórmula genérica $C_nH_{2n+z}O_2$, na qual “n” representa o número de carbonos, e “z” é o número inteiro negativo que especifica a deficiência de hidrogênio resultante da formação do anel (RUDZINSKI, OEHLERS, ZHANG, 2002). Esses compostos possuem baixa volatilidade, são quimicamente estáveis e agem como surfactantes, apresentando constantes de dissociação entre 10^{-5}

e 10^{-6} , característica da maioria dos ácidos carboxílicos (GRUBER *et al.*, 2012).

Os ANs são responsáveis pela corrosão das tubulações, formação de coque, envenenamento de catalisadores. Além disso, esses compostos têm se mostrado tóxicos a uma variedade de organismos, apresentando assim, efeitos prejudiciais ao meio ambiente, especialmente em ambientes aquáticos (ROSS *et al.*, 2012; FRANK *et al.*, 2008 LAI *et al.*, 1996; CLEMENTE *et al.*, 2005; ALLEN, E. W., 2008).

Os ANs podem ser encontrados na AP tanto de forma dissolvida, quanto na forma dispersa. Além disso, sabe-se que esses ácidos presentes na AP apresentam características surfactantes, o que oferece a esses compostos a qualidade de serem estabilizadores de emulsão. É sabido que os ácidos com cadeias médias e longas são os principais compostos relacionados à estabilização de emulsão, portanto, é necessário compreender se tais compostos se encontram na forma dissolvida ou na forma dispersa (WALSH *et al.* 2014).

Os ANs podem ser divididos em três grandes grupos: lineares, naftênicos e aromáticos, que estão descritos na **Figura 1** (BERTHEUSSEN, A. *et al.*, 2018).

Classificação

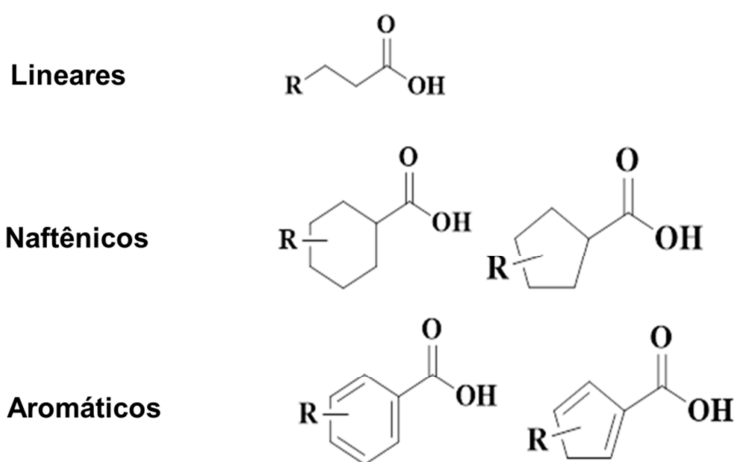


Figura 1. Exemplos de estruturas de ácidos naftênicos com suas classificações (BERTHEUSSEN, A. *et al.*, 2018).

A definição química de dissolvido pode ser descrita como uma molécula solvatada pela água, ou seja, são moléculas com características hidrofílicas que são

facilmente hidratadas. Por outro lado, no óleo disperso observam-se gotículas de óleo emulsionado na fase aquosa originando duas fases (HART *et al.* 2003).

Sabe-se que, a estrutura do ácido naftênico está correlacionada ao grau de toxicidade baseado na ação microbiana (BARTLETT *et al.*, 2017). Estruturas aromáticas são mais difíceis de serem biodegradadas e, portanto, são tidas como mais tóxicas seguidas dos grupos naftênicos e lineares (TOLLEFSEN *et al.*, 2012).

É sabido que a estrutura do ácido naftênicos está correlacionada ao seu grau de toxicidade (BARTLETT *et al.*, 2017), sendo que as estruturas aromáticas são as mais difíceis de serem biodegradadas, conseqüentemente, são as classificadas com a maior toxicidade, seguidas das estruturas dos grupos naftênicos, e por fim, as lineares são tidas como as de menor toxicidade (TOLLEFSEN *et al.*, 2012). Nesse contexto, há estudos que procuram entender e obter mais informações acerca da toxicidade no ambiente aquático dos compostos que se encontram dissolvidos nas APs, dessa forma, tem-se o estudo de FAKSNESS, *et al.* (2004). Para isso, foram coletados frascos de 2 L de água produzida de plataformas *offshore*. Os recipientes permaneceram em repouso empregando diferentes tempos de sedimentação. A conclusão dos autores foi que após 48 h de repouso os compostos orgânicos dispersos na água produzida foram depositados no fundo do recipiente. Sendo assim, os compostos orgânicos detectados (BTEX, ácidos com números de carbono inferiores a C18) após esse tempo de repouso foram considerados como dissolvidos (FAKSNESS *et al.*, 2004).

Além disso, existem outros métodos utilizados para diferenciação entre ácidos dispersos e dissolvidos, um desses métodos se encontra descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* SM 5520 B. No método supracitado, os ácidos naftênicos extraídos com o n-hexano são considerados como dispersos e o material que permanece na água produzida é denominado como dissolvido. O termo que engloba essas duas nomeações é considerado como Teor de óleo e graxa (TOG).

Baseando-se na problemática sobre a poluição ambiental relacionada à produção *offshore* do petróleo, a busca por novos processos de tratamento de AP, e principalmente, metodologias de remoção, caracterização e quantificação dos ANs presentes nas APs são particularmente importantes quando se verifica que a produção de petróleo tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Devido à

complexidade das misturas desses ANs, a separação, quantificação e identificação de compostos individualmente têm se mostrado um desafio para a comunidade científica (CLEMENTE *et al.*, 2005).

Entre as principais técnicas de extração aplicáveis ao estudo de derivados do petróleo pode-se citar a extração líquido-líquido (ELL), a extração em fase sólida (EFS) e a cromatografia líquida preparativa de adsorção e de troca iônica (CLEMENTE *et al.*, 2005).

1.3 Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido (ELL) utiliza o conceito de imiscibilidade entre solventes, se baseando na divisão do soluto entre duas fases que são imiscíveis.

Normalmente uma das fases é um solvente aquoso e a outra fase é um solvente orgânico apolar. Devido à imiscibilidade das fases, ocorre a formação de duas camadas, sendo que a camada mais densa se encontra na parte inferior, possibilitando a separação dos solventes, conseqüentemente a extração (BORGES *et al.*, 2007). Apesar de ser um método tradicional e muito utilizado, a extração líquido-líquido tem sua eficiência vinculada a vários fatores, incluindo a constante de equilíbrio para a partição do soluto, possíveis interações e reações entre o analito e os solventes extratores, solubilidade, entre outros fatores intrínsecos. Além disso, é possível encontrar várias desvantagens, tais como a separação de fases incompleta, formação de emulsão, dificuldade de reprodutibilidade, quantidade excessivas de solventes orgânicos, entre outras. Dessa forma, é necessário considerar tais características ao se optar pela ELL, e dependendo dos casos, esta metodologia pode não ser a adequada.

Metodologias de extração líquido-líquido para AN são amplamente apresentadas na literatura, com métodos consolidados, que apresentam a metodologia semelhante com pré-processos diferentes (ZHAO, CURRIE, MIAN, 2012).

Na metodologia apresentada por Syncrude Canada Ltd (Indústria de Alberta, Canada), a matriz de W é submetida à centrifugação, e posteriormente a filtração em microfiltro de 0,45 µm para remoção do sólido em suspensão. Acidifica-se o meio com uma solução de H₂SO₄ a fim de atingir o pH de 2,0 a 2,5, e como solvente extrator,

utiliza-se diclorometano, realizando a extração da matriz de AP duas vezes. Os dois extratos são combinados e então se tem um único extrato final. Essa metodologia é adequada para porções pequenas de AN, pois como pré-etapas, é indispensável a centrifugação e filtração dos precipitados da amostra bruta (JIVRAJ, MACKINNON, FUNG, 1995).

Semelhante à metodologia desenvolvida por Syncrude, Rogers *et al.* (2002) apresentaram uma metodologia para a extração em escala industrial, no entanto, por se tratar de uma grande quantidade de matriz, foi inviável as etapas de centrifugação e filtração. No método de Rogers *et al.*, a matriz é acidificada para pH 2,5; e então, os ANs são extraídos com diclorometano. O extrato é concentrado em um evaporador rotativo, e em seguida adiciona-se NaOH 0,1 N para reconstituição do extrato orgânico. O elevado pH produz ácidos orgânicos insolúveis que são filtrados em microfiltros de 0,45 µm e então são separados dos ANs por ultracentrifugação (ROGERS, LIBER, MACKINNON, 2002).

Por se tratar de um analíto de natureza ácida (ANs), foi possível a remoção desses analitos da matriz através da ELL utilizando soluções alcalinas ou amoniacais. (LO *et al.*, 2006). Para a extração de ANs das águas do Lago Mildred, foi aplicado a metodologia de ELL. O pH das amostras foi ajustado na faixa de 10,5 a 12 com solução de NaOH, e, posteriormente, removeu-se as partículas em suspensão por centrifugação. Removeu-se ainda os compostos básicos e neutros por extração com diclorometano. A solução aquosa foi acidificada a pH 2 com solução de H₂SO₄ 12 M e então extraiu-se os ANs com diclorometano (LO, BROWNLEE, BUNCE, 2006).

Assim como as metodologias supracitadas, a metodologia apresentada por Grewer *et al.* (2010) também consiste na acidificação da amostra para pH na faixa de 1,5. No entanto, nessa metodologia, cada fração de 1,0 L de amostra é extraída três vezes com 50 mL de diclorometano e ao final da extrações os extratos são combinados e secados em vials previamente pesados (GREWE *et al.*, 2010).

Embora a utilização dos métodos de extração ELL ser amplamente citada na literatura, a utilização desse método envolve processos exaustivos e com grande volume de solventes, além disso, a eficiência no isolamento pode ser prejudicada devido à formação de emulsões e co-extração de impurezas ácidas, como compostos

fenólicos e carbazólicos (CLEMENTE *et al.*, 2005).

1.4 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica amplamente utilizada, devido sua versatilidade na preparação e concentração de amostras. Além disso, essa técnica é empregada também para etapas de dessalinização, derivatização e fracionamento de amostras. Ademais, pode-se destacar a possibilidade de escolha de fases sólidas que sejam seletivas aos analitos, permitindo assim a melhor recuperação desses analitos (ŻWIR-FERENC, A., BIZIUK, M., 2006).

O princípio de funcionamento da EFS consiste na interação entre os analitos da matriz com o sorvente da fase sólida, desta forma, é possível separar esses analitos alvos, desde que estes tenham mais afinidade com o sorvente do que com a matriz. Devido a essa característica, é crucial entender o tipo de interação que ocorrerá entre o analito e fase sólida, a fim de selecionar a fase sólida mais apropriada para a extração. Além disso, a fase móvel deve ser selecionada de forma que consiga promover a eluição dos analitos, ou seja, o solvente deve ser capaz de cessar a interação entre o analito e a fase sólida, permitindo então o arraste desse analito pela fase móvel (ŻWIR-FERENC, A., BIZIUK, M., 2006).

Os mecanismos de retenção dos analitos na EFS seguem os mesmos princípios dos mecanismos da cromatografia. Desta forma, podem-se classificar os sorventes da EFS em fase normal, fase reversa e troca iônica (THURMAN, E. M.; MILLS, M. S., 1998).

O mecanismo de extração por fase normal consiste em uma fase estacionária que é mais polar que o solvente e a matriz da amostra. Dessa forma, o analito fica adsorvido na fase estacionária, e é removido por solventes orgânicos que possuem baixa polaridade e tenha interação com os analitos alvos. As principais interações de retenção que ocorrem no mecanismo de fase normal são ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo. Os sorventes de fase normal mais utilizados são: ciano (CN), amino (NH₂), diol, sílica gel (SiOH), Florisil (Mg₂SiO₃) e alumina (Al₂O₃). Os sorventes à base de sílica apresentam como desvantagem o fato de serem instáveis no intervalo 8 > pH

< 2 e também por conterem os grupos silanóis residuais que podem reter irreversivelmente compostos básicos (NOVÁKOVÁ, VLCKOVÁ, 2009). Os solventes mais utilizados são: hexano, heptano, clorofórmio, isopropanol e diclorometano (ŽWIR-FERENC, A., BIZIUK, M., 2006, THURMAN, E. M.; MILLS, M. S., 1998).

A extração por fase reversa consiste em um sorvente que é mais apolar que a matriz da amostra. Por se basear em um mecanismo hidrofóbico, é geralmente empregada em extrações em que os analitos estejam presentes em fases aquosas. As principais interações que ocorrem nesse mecanismo de extração são interações de Van der Waals. Os sorventes de fase reversa mais utilizados são: C18, C8, C2, ciclohexil, fenil, copolímeros. A escolha de fases reversas possui várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como água, acetonitrila, metanol; fases estacionárias estáveis; facilidade de empregar eluição por gradiente e maior rapidez em análises. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (TONHI *et al.*, 2001, ŽWIR-FERENC, A., BIZIUK, M., 2006, THURMAN, , E. M.; MILLS, M. S., 1998).

O mecanismo de extração por troca iônica consiste na interação dos analitos com a fase sólida, baseando-se na sua carga iônica, podendo ser positiva (catiônica) ou negativa (aniônica). Dessa forma, o analito também deve possuir carga, a fim de interagir com a fase sólida, promovendo a interação entre as cargas, consequentemente sua retenção. Normalmente são utilizados como fase sólida compostos carregados, sendo eles grupo amino (NH₂-), aminas quaternárias, ácidos carboxílicos, ácido sulfônico aromático. Os solventes utilizados deverão variar conforme o mecanismo adotado, mas normalmente são utilizadas soluções tampão de fosfato, acetato, e citrato (E. M.; MILLS, M. S., 1998).

Na maioria das vezes, para a escolha da fase sólida na EFS é seguido os mesmos critérios adotados para a escolha da fase estacionária na HPLC. O primeiro critério a ser considerado é em relação à estrutura química do analito em questão, considerando as propriedades e interações do sorvente com a matriz do analito (JARDIM, 2010).

Uma forma de considerar a interação da fase sólida com o analito é analisar os grupos funcionais presentes no mesmo. A determinação dos grupos funcionais do

analito permite a escolha de uma fase sólida com maior seletividade entre o analito e outros componentes da matriz (JARDIM, 2010).

A partir de dados constados na literatura, pôde-se apresentar o **Quadro 1**, contendo um guia geral para a escolha de uma fase sólida apropriada para analitos orgânicos com massas molares inferiores a 2000 Daltons.

Quadro 1. Guia geral para seleção de fase sólida e eluente, empregando amostras orgânicas contendo analitos com massas molares inferiores a aproximadamente 2000 daltons (GSP, 2008).

Mecanismo	Sorvente	Tipo de analito	Tipo de matriz	Eluente do analito
Apolar (fase reversa) partição e adsorção	C18, C8, C2, cicloexil, fenil, cianopropil, polimérico	Grupos funcionais apolares como alquilas e aromáticos	Soluções polares (tampão aquoso)	Solventes polares como metanol, acetonitrila e água
Polar (fase normal) partição e adsorção	Sílica, diol, ciano, aminopropil, diamino	Grupos funcionais polares como aminas e hidroxilas	Solventes apolares, óleos	Solventes apolares como hexano e diclorometano
Troca catiônica	Forte (ácido sulfônico) ou fraco (ácido carboxílico)	Grupos funcionais carregados positivamente como aminas	Aquosa, força iônica baixa	Tampão como acetato, citrato e fosfato
Troca aniônica	Forte (tetra alquilamônio) ou fraco (amino)	Grupos funcionais carregados negativamente como ácidos	Aquosa, força iônica baixa	Tampão como fosfato e acetato

		orgânicos		
--	--	-----------	--	--

Normalmente, os procedimentos de EFS consistem-se em 4 etapas: 1) condicionamento da fase estacionária com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 2) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; 4) eluição do analito (LANÇAS, 2004).

O volume de amostra utilizado para realizar a metodologia de SPE pode variar de alguns μL a mL. Para que se obtenha a eficiência máxima de extração, é necessário determinar o volume de breakthrough, VB, ou seja, o volume máximo de amostra que deve ser processado para que se obtenha a maior recuperação possível do analito (JARDIM, 2010).

Na etapa de *clean-up*, deve-se utilizar um solvente que tenha força suficiente para arrastar os interferentes, porém não os analitos. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra, desde que ele não remova os analitos de interesse. O eluente deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa de *clean-up*, por estarem muito retidos no sorvente (JARDIM, 2010). Na **Figura 2**, podem ser visualizadas as principais etapas envolvidas na EFS quando o objetivo é isolar e/ou concentrar o(s) analito(s) de interesse (JARDIM, 2010).

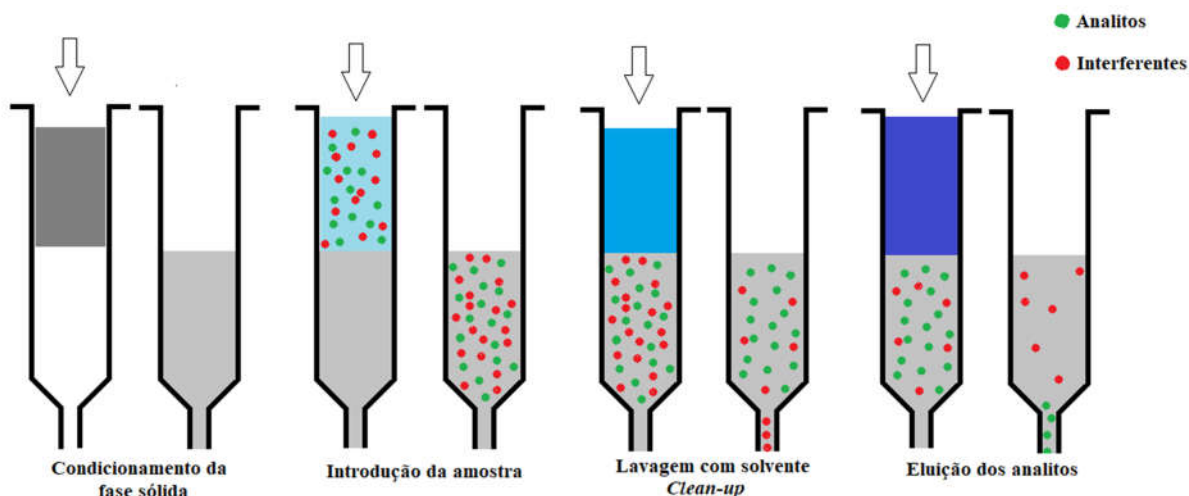


Figura 2. Etapas da EFS no modo de concentração ou isolamento do analito de interesse (Jardim, 2010).

No campo da extração de ANs, podem ser encontradas diversas metodologias de EFS apresentadas por diferentes autores. Entre eles, menciona-se Headley *et al.* (2002), que trouxe em seu trabalho a metodologia de extração com fase sólida com base DVB (divinilbenzeno), sendo o cartucho ENV+ (copolímero de poliestireno-divinilbenzeno) utilizado no processo como fase sólida, e metanol como fase móvel.

Thomas *et al.* (2009) é outro autor que apresenta em seu trabalho a utilização da fase sólida ENV+, além desta, o autor aborda também a utilização da fase sólida C₁₈. No entanto, nesse trabalho foi utilizada duas fases móveis em uma extração sequencial, sendo metanol a primeira fase móvel, seguida por diclorometano.

Samanipour *et al.* (2018) aborda duas metodologias de extrações, em ambas metodologias, é utilizado cartuchos hidrofílicos-lipofílico balanceados. Em seu estudo, Samanipour *et al.* utiliza as fases sólidas Oasis HLB e ENV (C₁₈ + ENV+). Como fase móvel, o autor faz uso dos solventes hexano, diclorometano e isopropanol, de forma sequencial. (SAMANIPOUR *et al.*, 2018). Alharbi *et al.* (2019) apresenta em seu trabalho duas metodologias de extração de ANs em AP utilizando cartuchos distintos. Uma das metodologias apresentadas aborda a utilização da fase sólida C18 e fase móvel metanol. A outra metodologia utiliza a fase sólida Strata-X e a mesma fase móvel, metanol (ALHARBI *et al.* 2019).

O método de EFS se mostrou promissor devido ao uso de volumes relativamente pequenos de solvente na extração, à redução de interferentes presentes nas amostras e à capacidade de separar compostos polares dos não polares. Além disso, a concentração de uma amostra pode ser aumentada por um fator de 100 a 5000, tornando possível a análise qualitativa e quantitativa a nível de traços (HEADLEY et al., 2007; JARDIM, 2010). No entanto, a EFS possui algumas desvantagens, como o elevado tempo de extração, os altos custos dos cartuchos e a baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho (NOVÁKOVÁ, VLCKOVÁ, 2009).

1.5 Espectrometria de massas de ultra-alta resolução (UHR-MS)

A técnica de espectrometria de massas de ultra-alta resolução é utilizada no emprego de análises de matrizes complexas, principalmente nas áreas de metabolômica e petroleômica. Dessa forma, o uso de técnicas de análises de ultra-alta resolução tem se mostrado de grande importância para o estudo de matrizes de ácidos naftênicos. Esta técnica permite discriminar e identificar diversos compostos em forma de íons gasosos mediante a sua relação massa/carga (m/z) com altíssima exatidão de massa (HUGHEY *et al.*, 2001; MARSHALL e RODGERS, 2004).

O sistema de análise por espectrometria de massas consiste em cinco componentes, sendo eles: a unidade de entrada de amostra, a fonte de ionização, o analisador de massas, o detector de massas e por último o sistema de dados (PAVIA *et al.*, 2010).

A unidade de entrada do espectrômetro de massas é responsável pela inserção da amostra até a fonte de ionização, além disso, assim como a fonte de ionização, esse componente pode funcionar sob vácuo ou em pressão atmosférica. A fonte de ionização é o componente responsável por transformar as moléculas em íons em fase gasosa. Na ionização por electrospray (ESI) a ionização ocorre em solução à pressão atmosférica, onde a própria fonte é a responsável por vaporizar os íons para a fase gasosa. Esses íons são acelerados por um campo eletromagnético até o analisador, componente responsável pela discriminação dos íons de acordo com a sua razão m/z . Por fim, ao detector é atribuído o papel de detectar os íons discriminados e enviar

sinais que são processados pelo sistema de dados originando o espectro de massas (PAVIA *et al.*, 2010).

Atualmente, em análises de matrizes de petróleo e de seus derivados, são utilizadas majoritariamente fontes de ionização que não necessitam de operar sob vácuo, chamadas de fontes de ionização à pressão atmosférica (API), dessa forma, devido a essa característica, a ionização das moléculas ocorre de forma branda, o que gera pouco ou nenhum fragmento, se mostrando uma alternativa positiva para análises de compostos dessa matriz. Como exemplo de fontes API, cita-se a ionização a ionização por *electrospray* (ESI), a fotoionização à pressão atmosférica e a ionização química a pressão atmosférica (APCI) (Li D.X. *et al.*, 2015).

O *electrospray* (ESI) representa um método de ionização no qual os íons são obtidos previamente em uma solução e posteriormente são vaporizados para a fase gasosa. Esta técnica é aplicada para a ionização de compostos polares e de massas elevadas. A análise será realizada de acordo com a natureza básica ou ácida da amostra. No modo positivo é observado a ionização de compostos básicos pela adição de um ácido fraco gerando o aduto $[M+H]^+$. Os compostos ácidos formam espécies desprotonadas pela adição de uma base fraca formando íons $[M-H]^-$ para serem analisados no modo negativo (LOBODIN *et al.*, 2013).

Essas gotículas são borrifadas para dentro de uma câmara de ionização e são submetidas a um contrafluxo de gás de secagem, normalmente gás nitrogênio, responsável por evaporar o solvente nas gotículas. A densidade de carga das gotículas é aumentada até que ocorra a repulsão das forças eletrostáticas da gotícula, causando a divisão da gotícula em gotículas menores. Esse processo continua até que se tenha a formação de íons sem a presença de solvente. Os íons formados podem ter tanto cargas negativas quanto positivas (GROSS *et al.*, 2004).

O Q-Exactive Orbitrap, assim como o FT-ICR-MS, são equipamentos de ultra-alta resolução utilizados em análises de matrizes complexas, tal como a petroleômica (ELIUK *et al.*, 2015).

O Orbitrap teve sua introdução no mercado no ano de 1999, se mostrando um detector de massas preciso e compacto. A primeira implementação comercial foi em um instrumento híbrido (LTQ-Orbitrap) com um front-end de armadilha de íons linear e

a partir deste, desenvolveu-se instrumentos baseados em Orbitrap (ZUBAREV, MAKAROV, 2013).

No Orbitrap, os íons são injetados no volume entre os eletrodos central e externo, ao longo de uma ranhura especialmente usinada com um eletrodo de compensação (um “defletor”) em um dos eletrodos externos. Com a tensão aplicada entre os eletrodos central e externo, um campo elétrico radial que é formado curva a trajetória do íon em direção ao eletrodo central, enquanto a velocidade tangencial cria uma força centrífuga oposta. Com a escolha correta dos parâmetros, os íons permanecem em uma espiral quase circular dentro da armadilha. Ao mesmo tempo, o campo elétrico axial causado pela forma cônica especial dos eletrodos empurra os íons para a parte mais larga da armadilha, iniciando oscilações axiais harmônicas. Além disso, dentro desse campo magnético é utilizado um gás tampão, normalmente gás nitrogênio, com a finalidade de diminuir a energia cinética dos íons e estabilizar sua movimentação. Os eletrodos externos são então usados como placas receptoras para detecção de corrente de imagem dessas oscilações axiais. A corrente da imagem digitalizada no domínio do tempo é transformada em Fourier no domínio da frequência, da mesma forma que no FTICR e depois convertida em um espectro de massa (GROSS *et al.*, 2004; ZUBAREV, MAKAROV, 2013).

Dessa forma, os equipamentos de espectrometria de massa de ultra-alta resolução abriram novas possibilidades que permitiram o detalhamento a nível molecular da composição do óleo bruto e de seus derivados, se tornando uma técnica amplamente empregada nessas análises (GROSS *et al.*, 2004).

2. Objetivos

O trabalho tem como objetivo principal comparar e avaliar metodologias de extração em fase sólida para a extração de ácidos naftênicos em matrizes de água produzida e caracterizar os extratos por espectrometria de massas de ultra-alta resolução (UHR-MS).

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Avaliar a eficiência de diferentes metodologias de extração de ácidos naftênicos empregando diferentes fases estacionárias (C_{18} , ENV+, ENV (C_8 + ENV+), HLB e Strata-X, APS);

2.1.2 Avaliar a influência dos solventes orgânicos (acetonitrila, diclorometano, isopropanol, *n*-hexano e metanol) e suas interações com as fases estacionárias estudadas;

2.1.3 Comparar a eficiência das metodologias de extração em fase sólida com a técnica de extração líquido-líquido;

2.1.4 Realizar a semiquantificação das espécies ácidas extraídas pelas metodologias de extração em fase sólida;

2.1.5 Otimizar as metodologias de extração em fase sólida que apresentaram melhores resultados de extração.

3. Metodologia

3.1 Reagentes e amostras

As amostras de AP foram fornecidas pelo CENPES/Petrobras. Os solventes utilizados foram diclorometano (DCM), metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), hexano (HEX) e isopropanol (IPA) grau HPLC da TEDIA (Fairfield, MO, EUA). Foi utilizado ácido clorídrico (HCl), e ácido fórmico (AF) adquiridos da Sigma Aldrich (San Luís, MO, EUA). Sulfato de sódio foi adquirido da Neon Química (Suzano, SP, BR). Padrão de ácido mirístico foi adquirido da Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, EUA). A solução padrão de ácidos naftênicos foi obtida da Sigma Aldrich na concentração estoque de 100 mg.L^{-1} (San Luís, MO, EUA).

3.2 Comparação das metodologias apresentadas na literatura utilizando AP de matriz brasileira

Nessa primeira etapa, foram realizados experimentos com a finalidade de comparar as metodologias de extração em fase sólida, comumente utilizadas em matrizes de águas produzidas para a extração de ácidos naftênicos.

3.2.1 Preparo da amostra de AP

Realizou-se a centrifugação da amostra de AP de código 2020-005312-43 durante 25 minutos a velocidade de 15000 RPM. Após a centrifugação, a água sobrenadante foi coletada e acidificada até pH 2,0 com HCl $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, e prosseguiu-se com as extrações.

3.2.2 Reproduções das metodologias de extração em fase sólida

Para a execução desse trabalho, reproduziram-se as metodologias de extração de ANs por EFS apresentadas na literatura com a mesma matriz de AP, a fim de identificar a metodologia com maior eficiência. As metodologias utilizadas foram as com

fase estacionária ENV+, ENV, C₁₈, Strata X, e HLB. As extrações foram realizadas no equipamento VISIPREP SPE Vacuum Manifold (SUPELCO Inc, Missouri, USA) em duplicata.

As extrações foram separadas em quatro grupos diferentes. No grupo I é apresentada a metodologia utilizada por Headley *et al.* (2002); no grupo II apresentam-se as metodologias utilizadas por Thomas *et al.* (2009); no grupo III as metodologias utilizadas por Samanipour *et al.* (2019); e no grupo IV as metodologias utilizadas por Alharbi *et al.* (2019). **A Figura 3** apresenta o fluxograma das metodologias supracitadas.

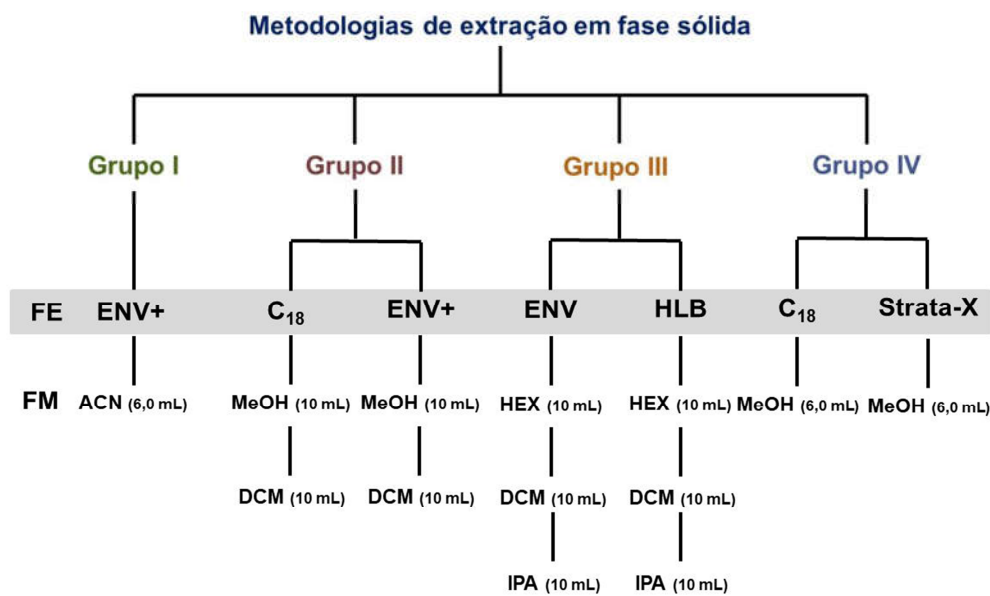


Figura 3. Fluxograma das metodologias de extração utilizadas no seguinte trabalho. Os grupos das extrações são referentes aos autores que apresentam em seus trabalhos as respectivas metodologias, replicando-se as condições apresentadas por cada autor. Grupo I: Headley *et al.*; Grupo II: Thomas *et al.*; Grupo III: Samanipour *et al.*; Grupo IV: Alharbi *et al.*

3.2.2.1 Metodologia do grupo I

Para a execução metodologia do grupo I (segundo Headley *et al.*, 2002), utilizou-se cartuchos comerciais ISOLUTE® ENV+ contendo 200 mg de fase sólida. O cartucho

foi condicionado com 10 mL de metanol, seguido por 10 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. Após a introdução da amostra, o cartucho foi lavado com 25 mL de água ultra-pura e seco durante 30 minutos com ar ambiente. Em seguida, realizou-se a eluição dos analitos com 6,0 mL de acetonitrila. Após a extração completa, os extratos foram concentrados em um concentrador de amostra Thermo SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.2.2.2 Metodologias do grupo II

As metodologias grupo II foram executadas segundo descrito por Thomas *et al.*, 2009. Para a extração Tipo A, utilizou-se cartuchos comerciais ISOLUTE® ENV+ contendo 200 mg de fase sólida. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. O cartucho foi lavado com 25 mL de água ultra-pura e seco durante 30 minutos com ar ambiente. Em seguida realizou-se a eluição dos analitos com 10 mL de metanol, seguido de uma eluição com 10 mL de diclorometano.

Para a execução da extração Tipo B, preparou-se cartuchos de 12 mL com 1000 mg de fase sólida C₁₈. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. O cartucho foi lavado com 25 mL de água ultra-pura e seco durante 30 minutos com ar ambiente. Em seguida realizou-se a eluição dos analitos com 10 mL de metanol, seguido de uma eluição com 10 mL de diclorometano. Após a extração completa, os extratos foram concentrados e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.2.2.3 Metodologias do grupo III

As metodologias do grupo III foram executadas segundo descrito por Samanipour *et al.*, 2019. Para a extração Tipo A, utilizou-se cartuchos comerciais

ISOLUTE® ENV+ contendo 200 mg de fase sólida. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP, e em seguida realizou-se a eluição dos analitos com 10 mL de hexano, 10 mL de diclorometano e 10 mL de isopropanol, totalizando três frações.

Para a execução da extração Tipo B, utilizou-se cartuchos comerciais Waters™ Oasis HLB de 3,0 mL contendo 60 mg de fase sólida. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP, e em seguida realizou-se a eluição dos analitos com 10 mL de hexano, 10 mL de diclorometano e 10 mL de isopropanol, totalizando três frações. Após a extração completa, os extratos foram concentrados e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.2.2.4 Metodologias do grupo IV

As metodologias grupo IV foram executadas segundo descrito por Alharbi *et al.*, 2019. Para a Extração tipo A, utilizou-se cartuchos comerciais Strata-X® de 3,0 mL contendo 200 mg de fase sólida. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido de 6,0 mL de água (0,1% HCl). Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. O cartucho foi lavado com 6 mL de água ultra pura e seco durante 15 minutos com ar ambiente. Em seguida realizou-se a eluição dos analitos com 10 mL metanol.

Para a execução da extração tipo B, preparou-se cartuchos de 12 mL com 1000 mg de fase sólida C₁₈. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água (0,1% HCl). Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. O cartucho foi lavado com 6,0 mL de água ultra-pura e seco durante 15 minutos com ar ambiente. Em seguida realizou-se a eluição dos analitos com 10 mL de metanol. Após a extração completa, os extratos foram concentrados e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.2.3 Extração líquido-líquido

Para execução dessa metodologia, adaptada do método 5520 B retirado do Standard Methods, utilizou-se 25 mL da amostra de AP e procedeu-se com a extração líquido-líquido, utilizando-se 25 mL do solvente orgânico extrator diclorometano por três vezes. Com todo o volume orgânico coletado, adicionou-se 5,0 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remoção de água residual, e em seguida, realizou-se uma filtração simples. A fração orgânica coletada foi concentrada e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.2.4 Semiquantificação dos ácidos naftênicos

Realizou-se a semiquantificação dos ANs presentes nos extratos obtidos das extrações das metodologias propostas no item anterior. Para tal, foi necessária a construção e semivalidação do método de semiquantificação. Com o auxílio de ferramentas analíticas, construiu-se a curva de calibração utilizando-se padrão deuterado de ácido mirístico.

3.2.4.1 Preparo das soluções e curva de calibração

Soluções estoque dos padrões de ácido mirístico foram preparadas, em metanol na concentração de 10 mg.mL^{-1} . Soluções intermediárias do ácido mirístico foram preparadas a partir das soluções estoques nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para a validação da curva analítica, preparou-se soluções intermediárias do ácido mirístico a partir da solução estoque nas concentrações de 0,75; 2,75; $4,75 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Para a construção da curva analítica, foi realizada a injeção direta em triplicata das soluções de padrões de ácido mirístico por ESI(-)-Orbitrap-MS em três diferentes dias. Para a obtenção do branco analítico, foi realizada em triplicata a injeção direta de metanol por ESI(-)-Orbitrap-MS nos três diferentes dias das análises. Para a validação da curva analítica foi realizada em triplicata a injeção direta das soluções de padrões de ácido mirístico por ESI(-)-Orbitrap-MS em três diferentes dias. A intensidade do íon

do padrão de ácido mirístico no espectro de massas foi considerada para a construção da curva de calibração.

3.2.4.2 Validação analítica da metodologia de semiquantificação

A fim de avaliar a validade e a eficiência da metodologia de semiquantificação construída, foi necessário realizar a validação da mesma. Dessa forma, realizaram-se três análises interdias do padrão de ácido mirístico nas concentrações de 0,75; 2,75; 4,75 mg.mL⁻¹, sendo que as análises foram realizadas em triplicata. A partir dos resultados obtidos nas análises por ESI(-)-Orbitrap-MS, calculou-se o limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), e a exatidão (E).

O limite de detecção foi calculado a partir da **Equação 1** (ANVISA, 2003).

$$\text{(Eq. 1) } LD = \frac{3*DP}{IC}$$

No qual:

LD: limite de detecção

DP: desvio padrão das medições de intensidade do branco analítico

IC: inclinação da curva de calibração

O limite de quantificação foi calculado a partir da **Equação 2** (ANVISA, 2003).

$$\text{(Eq. 2) } LQ = \frac{10*DP}{IC}$$

No qual:

LQ: limite de quantificação

DP: desvio padrão das medições de intensidade do branco analítico

IC: inclinação da curva de calibração

A exatidão foi calculada a partir da **Equação 3** (ANVISA, 2003).

$$\text{(Eq. 3)} \ E = \frac{CME}{CT} * 100$$

No qual:

E: exatidão

CME: concentração média experimental

CT: concentração teórica

3.2.5 Análise por espectrometria de massas de ultra-alta resolução

As frações obtidas dos métodos de extração apresentados foram analisadas no Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A fonte de ionização usada foi o *electrospray ionization* (ESI) em modo negativo. Os extratos obtidos foram redissolvidos em metanol a concentração de 0,001 mg.mL⁻¹ e injetados, com o auxílio de uma bomba seringa, no espectrômetro de massas a um fluxo de 5,0 µL.min⁻¹. O nitrogênio foi utilizado como gás auxiliar a uma temperatura de 270°C. A voltagem do capilar foi ajustada para 3,5 kV e a temperatura do capilar foi ajustada em 275°C.

3.2.6 Processamento de dados

As avaliações iniciais dos espectros de massas foram realizadas no *software* Thermo Scientific™ Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific, EUA). O processamento de dados foi realizado utilizando o *software Composer* (Versão 1.5.3 Sierra Analytica, Modesto, EUA) para atribuição de fórmulas e recalibração de séries homólogas conhecidas. A análise dos dados em ferramentas gráficas foi realizada por meio do *software* de processamento de dados Thanus (desenvolvido pela UFG e Petrobras, Brasil) que possibilita a elaboração de diferentes tipos de gráficos e a visualização simultânea de dados de diversas amostras, facilitando a interpretação e comparação do conjunto.

3.3 Extração em fase sólida automatizada

Nessa segunda etapa, foram realizados experimentos no sistema automatizado de extração em fase sólida GX-271 ASPEC, com a finalidade de padronizar os parâmetros de extração. Além disso, as extrações foram realizadas com soluções comerciais de ANs, cuja concentração poderia ser estimada.

3.3.1 Preparação da solução padrão de ANs

Preparou-se uma solução estoque de padrão de ANs na concentração de 25 mg.mL⁻¹ em metanol. A partir dessa solução estoque, preparou-se as demais soluções utilizadas nas extrações, em pH 2 e pH 7. Foram preparadas soluções de 25 mL de NaCl 35% para simular a AP, a essas soluções, foi adicionado 100 µL da solução padrão de ANs. Durante o texto nos referimos a essas soluções de padrão de ANs com padrão sigma.

3.3.2 Extração em fase sólida utilizando a fase sólida ISOLUTE® ENV+

Para a execução dessa metodologia, utilizou-se cartuchos comerciais ISOLUTE® ENV+ contendo 200 mg de fase sólida. As extrações foram realizadas no equipamento de SPE online GX-271 ASPEC (Gilson Inc, Middleton, USA). O cartucho foi condicionado com 10 mL de água, no fluxo de 600 µL.min⁻¹. Após o condicionamento, adicionou-se 25 mL da solução Padrão Sigma, a um fluxo de 600 µL.min⁻¹, após a adição completa da amostra, realizou-se a etapa de lavagem. Lavou-se o cartucho com 20 mL de água a um fluxo de 1000 µL.min⁻¹. Após a lavagem, foi passado 30 mL de ar no cartucho, a um fluxo de 1000 µL.min⁻¹. A eluição foi realizada com 20 mL de diclorometano, a um fluxo de 600 µL.min⁻¹. Após a extração completa, os extratos foram secados e armazenados para futura caracterização.

3.3.3 Extração em fase sólida utilizando a fase sólida C8

Para a execução dessa metodologia, preparou-se cartuchos, pesando-se 1000

mg de fase sólida C₈ e empacotando a fase sólida a cartuchos de vidro de 6,0 mL. As extrações foram realizadas no equipamento de SPE online GX-271 ASPEC (Gilson Inc, Middleton, USA). O cartucho foi condicionado com 10 mL de água, no fluxo de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após o condicionamento, adicionou-se 25 mL da solução Padrão Sigma, a um fluxo de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, após a adição completa da amostra, realizou-se a etapa de lavagem. Lavou-se o cartucho com 20 mL de água a um fluxo de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após a lavagem, foi passado 30 mL de ar no cartucho, a um fluxo de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A eluição foi realizada com 10 mL de metanol, a um fluxo de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ seguido pela eluição com 10 mL de metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v). Após a extração completa, os extratos foram secados e armazenados para futura caracterização.

3.3.4 Extração em fase sólida utilizando a fase sólida C18

Para a execução dessa metodologia, preparou-se cartuchos, pesando-se 1000 mg de fase sólida C₁₈ e empacotando a fase sólida a cartuchos de vidro de 6,0 mL. As extrações foram realizadas no equipamento de SPE online GX-271 ASPEC (Gilson Inc, Middleton, USA). O cartucho foi condicionado com 10 mL de água, no fluxo de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após o condicionamento, adicionou-se 25 mL da solução Padrão Sigma, a um fluxo de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, após a adição completa da amostra, realizou-se a etapa de lavagem. Lavou-se o cartucho com 20 mL de água a um fluxo de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após a lavagem, foi passado 30 mL de ar no cartucho, a um fluxo de 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A eluição foi realizada com 10 mL de metanol, a um fluxo de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ seguido pela eluição com 10 mL de metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v). Após a extração completa, os extratos foram secados e armazenados para futura caracterização.

3.3.5 Extração em fase sólida utilizando a fase sólida APS

Para a execução dessa metodologia, preparou-se cartuchos, pesando-se 1000 mg de fase sólida Aminopropil Sílica e empacotando a fase sólida a cartuchos de vidro de 6,0 mL. As extrações foram realizadas no equipamento de SPE online GX-271 ASPEC (Gilson Inc, Middleton, USA). O cartucho foi condicionado com 10 mL de água,

no fluxo de $600 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após o condicionamento, adicionou-se 25 mL da solução Padrão Sigma, a um fluxo de $600 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, após a adição completa da amostra, realizou-se a etapa de lavagem. Lavou-se o cartucho com 20 mL de água a um fluxo de $1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Após a lavagem, foi passado 30 mL de ar no cartucho, a um fluxo de $1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A eluição foi realizada com 20 mL de diclorometano. Após a extração completa, os extratos foram secados e armazenados para futura caracterização.

3.4 Otimização do sistema de extração em fase sólida

Na última etapa do trabalho foi realizada a otimização das metodologias de extração em fase sólida. Para tal, utilizaram-se as cinco fases estacionárias: C18, ENV, HLB e Strata-X. Além disso, realizaram-se as extrações com os solventes isopropanol e diclorometano.

3.4.1 Preparo da amostra de AP

Realizou-se a centrifugação da amostra de AP de código de identificação 2020-005312-43 durante 25 minutos a velocidade de 15000 RPM. Após a centrifugação, a água sobrenadante foi coletada e acidificada até pH 2,0 com HCl $2,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e prosseguiu-se com as extrações.

3.4.2 Fase sólida ENV

Assim como na etapa anterior, a otimização da fase sólida ENV foi realizada em quatro extrações, para tal utilizou-se cartuchos comerciais ISOLUTE® ENV+ contendo 200 mg de fase sólida e 1000 mg de da fase sólida C8. O cartucho foi condicionado com 10 mL de metanol, seguido por 10 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. Na primeira extração realizou-se a eluição dos analitos com 10,0 mL de diclorometano, já na segunda extração utilizou-se 20 mL de diclorometano, divididos em duas frações de 10 mL. Para a terceira extração, utilizou-se 10 mL de isopropanol, na quarta extração foram utilizados

20 mL de isopropanol, divididos em duas frações de 10 mL. Após as extrações completas, os extratos foram concentrados em um concentrador de amostra Thermo SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.4.3 Fase sólida C18

A otimização da fase sólida C18 foi realizada em quatro extrações, os cartuchos foram empacotados com 1000 mg do sorvente C18. O cartucho foi condicionado com 10 mL de metanol, seguido por 10 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. Na primeira extração realizou-se a eluição dos analitos com 10,0 mL de diclorometano, já na segunda extração utilizou-se 20 mL de diclorometano, divididos em duas frações de 10 mL. Para a terceira extração, utilizou-se 10 mL de isopropanol, na quarta extração foram utilizados 20 mL de isopropanol, divididos em duas frações de 10 mL. Após as extrações completas, os extratos foram concentrados em um concentrador de amostra Thermo SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.4.4 Fase sólida HLB

A otimização da fase sólida HLB foi realizada em quatro extrações, utilizou-se cartuchos comerciais WatersTM Oasis HLB de 3,0 mL contendo 60 mg de fase sólida.. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água. Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. Na primeira extração realizou-se a eluição dos analitos com 10,0 mL de diclorometano, já na segunda extração utilizou-se 20 mL de diclorometano, divididos em duas frações de 10 mL. Para a terceira extração, utilizou-se 10 mL de isopropanol, na quarta extração foram utilizados 20 mL de isopropanol, divididos em duas frações de 10 mL. Após as extrações completas, os extratos foram concentrados em um concentrador de amostra Thermo SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e

armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

3.4.5 Fase sólida Strata-X

A otimização da fase sólida Strata-X foi realizada em quatro extrações, utilizou-se cartuchos comerciais Strata-X[®] de 3,0 mL contendo 200 mg de fase sólida. O cartucho foi condicionado com 6,0 mL de metanol, seguido por 6,0 mL de água (0,1% HCl). Logo após o condicionamento, foram adicionados 25 mL da amostra acidificada de AP. Na primeira extração realizou-se a eluição dos analitos com 10,0 mL de diclorometano, já na segunda extração utilizou-se 20 mL de diclorometano, divididos em duas frações de 10 mL. Para a terceira extração, utilizou-se 10 mL de isopropanol, na quarta extração foram utilizados 20 mL de isopropanol, divididos em duas frações de 10 mL. Após as extrações completas, os extratos foram concentrados em um concentrador de amostra Thermo SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e armazenados em frasco âmbar de 10 mL para futura caracterização.

4. Resultados e discussões

4.1 Comparação de extrações das metodologias apresentadas na literatura utilizando matriz de AP brasileira.

A fim de estudar as metodologias de EFS para AP, e compreender a diferença entre as fases estacionárias na extração desses compostos em uma mesma matriz de estudo, realizou-se a reprodução e comparação das metodologias de extração em fase sólida apresentadas na literatura. Foram reproduzidas sete diferentes metodologias apresentadas por quatro autores. Além disso, servindo como parâmetro de comparação, realizou-se a metodologia de extração líquido-líquido adaptada da metodologia 5520 B do Standard Methods, utilizando como solvente extrator DCM. No experimento apresentado foram avaliados os resultados obtidos pela extração da mesma matriz de AP pelas diferentes metodologias de extração.

Cada extração EFS e ELL foi realizada em duplicada, utilizando-se um volume de 25 mL de AP em pH 2,0. Tendo em vista que para a realização dos experimentos foi utilizada a mesma matriz de AP, é válida a comparação entre os métodos a partir dos espectros de massas e dos processamentos de dados resultantes das análises no espectrômetro de massas de ultra-alta resolução *Q-Exactive Orbitrap*.

4.1.1 Resultados da metodologia do grupo I

Nessa metodologia a extração dos ANs foi realizada utilizando-se a fase sólida Isolute[®] ENV+ 200 mg e o solvente de extração acetonitrila. Os extratos foram analisados por ESI(-)-Orbitrap-MS. A **Figura 4** apresenta o espectro de massas resultante do extrato utilizando a metodologia apresentada no grupo I em comparação com o espectro de massas obtido a partir da ELL a 0,001 mg.mL⁻¹. A partir dos espectros apresentados na **Figura 4**, observa-se uma semelhança entre o perfil da extração do grupo I com o perfil da ELL, o que fica indicado pela presença de íons semelhantes em ambos espectros.

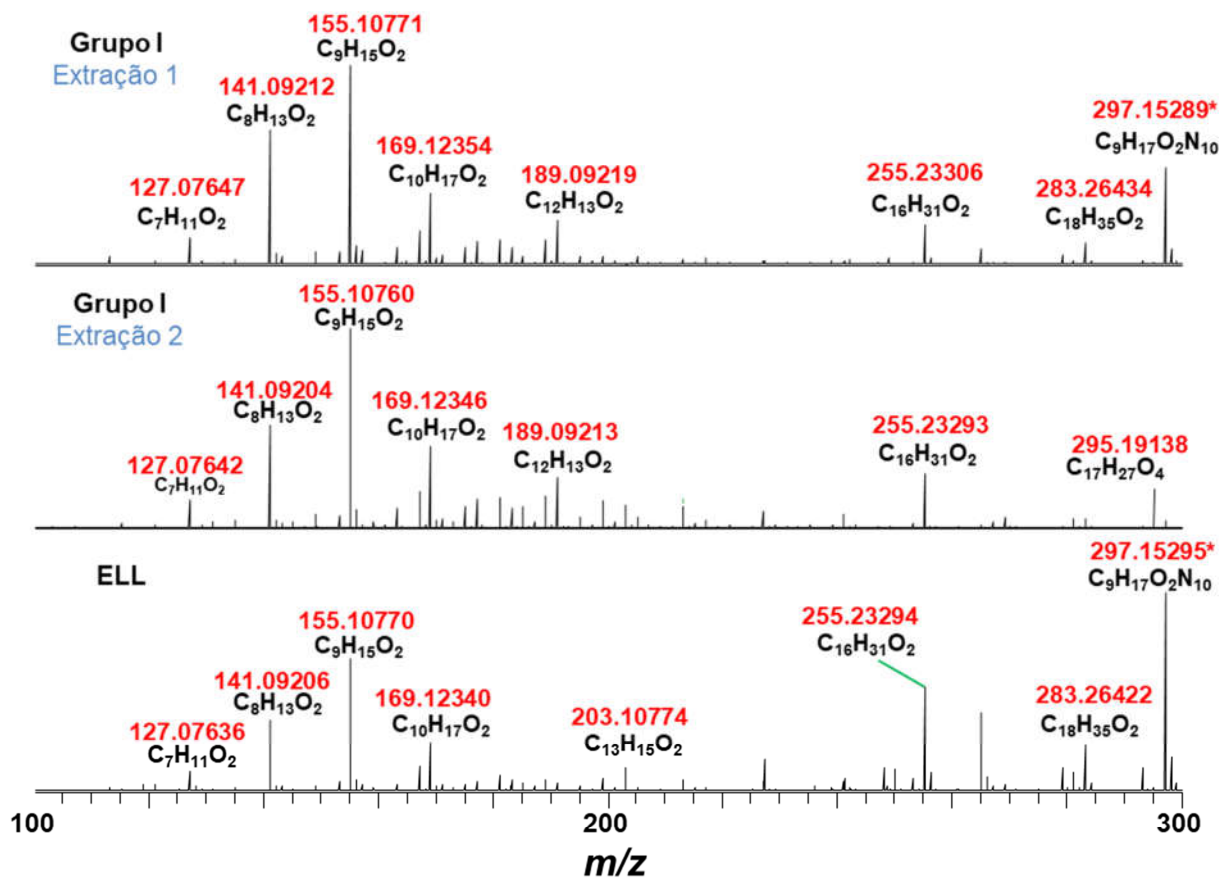


Figura 4. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela duplicata de extrações do grupo I com o extrato da metodologia padrão de ELL utilizando diclorometano. O erro de atribuição utilizado no parâmetro de processamento é de 1 ppm. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse, entretanto, por meio de processamento de dados é possível determinar a fórmula molecular das espécies da classe O3 e O4 neste intervalo de m/z . Além disso, é possível perceber um pico contaminante de m/z 297.15295, sendo esse um contaminante característico encontrado nas amostras, proveniente dos compostos utilizados na limpeza dos frascos. Todos os espectros de massas apresentados foram tratados com o espectro de massas do branco. Para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo *software Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas

Figuras 5 e 6, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe e a **Tabela 1**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4.

Tabela 1. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo I

Número Médio de Fórmulas Atribuídas				
Identificação	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo I – ENV+ - ACN	45 ± 2	31 ± 5	34 ± 4	110 ± 11
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

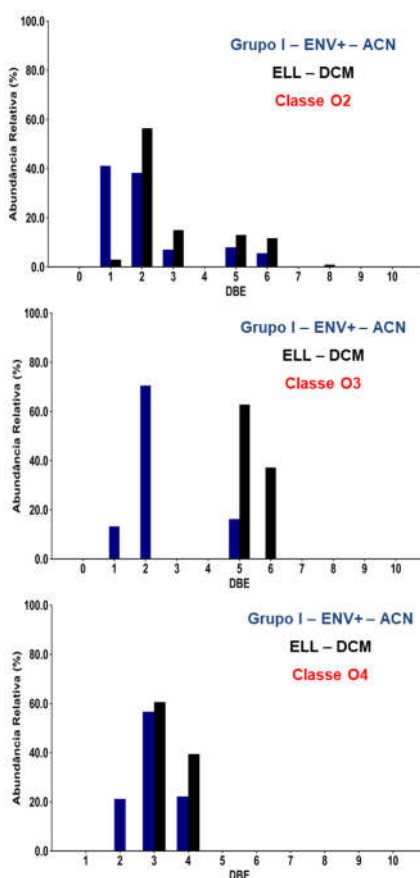


Figura 5. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo I e ELL.

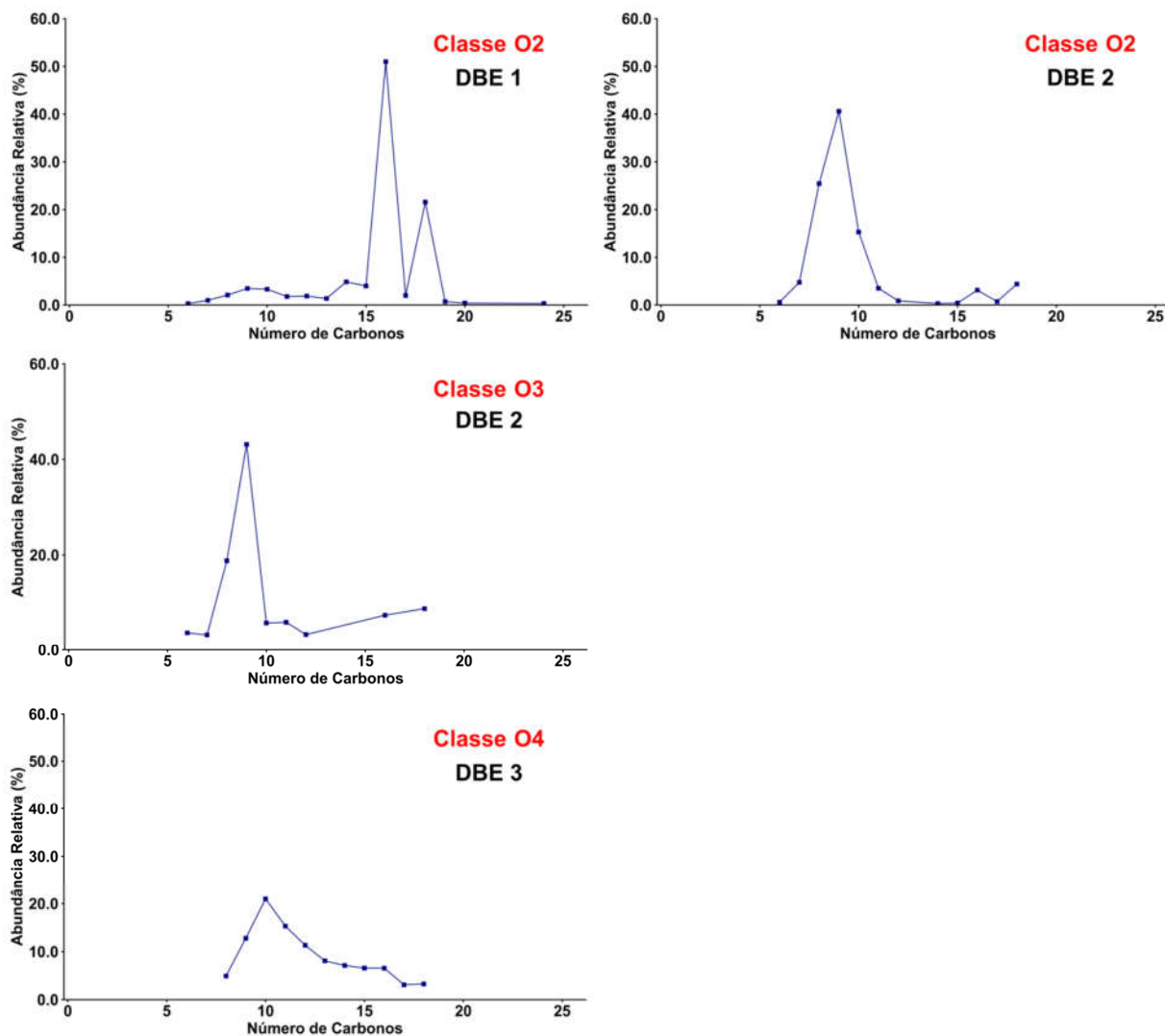


Figura 6. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo I.

Observa-se pela **Tabela 1** que a EFS exibiu uma maior quantidade de fórmulas atribuídas, em relação a ELL, indicando que alguns compostos foram extraídos preferencialmente pela metodologia EFS.

Além disso, a partir da análise das **Figuras 5 e 6**, é possível observar que houve a extração majoritária de compostos de DBE no intervalo de 1 a 4 para as três classes extraídas. Vale ressaltar que dentre as 45 espécies da classe O2 presentes no extrato,

estas se dividem majoritariamente entre os compostos DBE 1 e 2, indicando a presença de ácidos lineares e ácidos naftênicos, com cadeias alquílicas variando de 5 a 20 átomos de carbono. No entanto, ao analisar as espécies das classes O3 e O4 se observa a presença majoritária de compostos de DBE 2 e 3, correspondente aos ácidos naftênicos.

A **Figura 7** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados apresentados na **Tabela 1**.

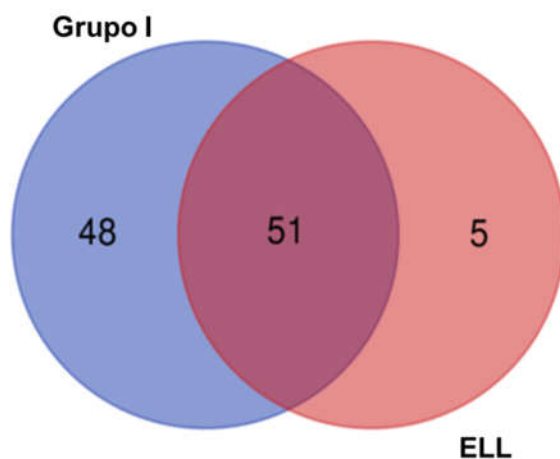


Figura 7. Diagrama de Venn construído a partir do número médio de fórmulas atribuídas em ambas replicatas dos extratos ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS apresentados no grupo I.

Pode-se observar pelo diagrama de Venn que houve a presença exclusiva de 48 espécies no extrato de EFS, sendo 17 espécies da classe O4, 25 da classe O3 e apenas 6 espécies da classe O2. Observa-se também que houve a extração de 51 espécies pelas duas metodologias apresentadas. Além disso, nota-se a presença de 5 espécies exclusivas no extrato da ELL, sendo 2 espécies da classe O4, 1 espécie da classe O3 e 2 espécies da classe O2. Com base no processamento de dados e análises dos resultados, pode-se inferir que em números totais de espécies atribuídas pelo *software*, a metodologia de extração EFS foi mais eficiente na extração dos ANs presentes na matriz do que a metodologia ELL. Ademais, a fase estacionária utilizada nesta metodologia é composta por copolímero de poliestireno-divinilbenzeno se

baseando no mecanismo de extração em fase reversa, e por ser um solvente moderadamente polar, a acetonitrila interage preferencialmente com as espécies polares presentes na matriz, o que indica a maior ocorrência de compostos de DBE 2 e 3, que apresentam maior polaridade, para as três classes extraídas.

4.1.2 Resultados da metodologia do grupo II

Na metodologia apresentada no grupo II a extração dos AN foi realizada utilizando-se a duas fases sólidas; a Isolute[®] ENV+ 200 mg e C₁₈. A eluição foi realizada sequencialmente com 10 mL de MeOH, identificando o primeiro extrato, seguido por 10 mL de DCM, caracterizando o segundo extrato. Os extratos foram concentrados e analisados por ESI(-)-Orbitrap MS.

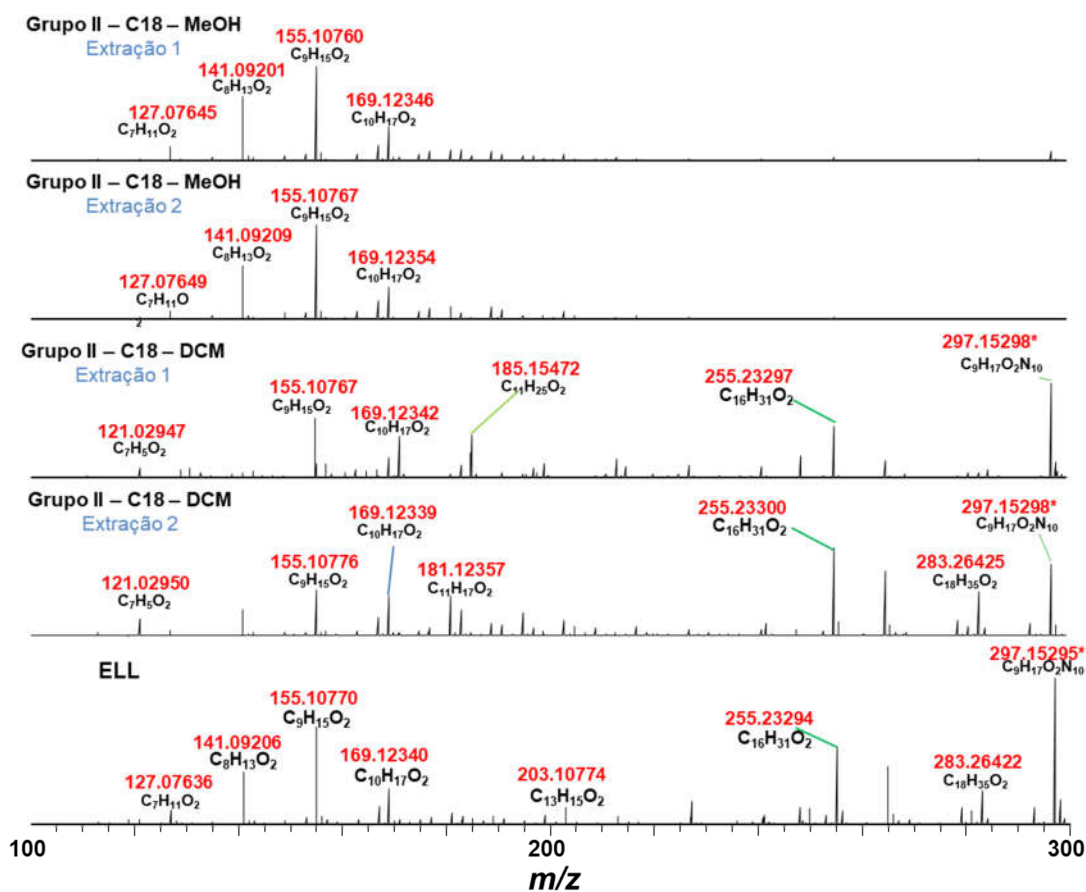


Figura 8. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo II, utilizando a fase sólida C₁₈ e solventes de eluição sequenciais com o

extrato utilizando a metodologia padrão de ELL com solvente diclorometano. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

A **Figura 8** apresenta o espectro de massas resultante dos extratos utilizando as metodologias de extração com C₁₈ apresentadas no grupo II em comparação com o espectro de massas obtido a partir da extração ELL a 0,001 mg mL⁻¹.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 8**, observa-se uma semelhança entre o perfil da ELL com o perfil dos extratos de MeOH, da primeira e da segunda extração, indicando a provável presença de espécies em comum. Nota-se ainda que os espectros das extrações com MeOH não apresentaram os picos mais intensos a partir da *m/z* 200 que foram visualizados nos espectros da ELL e das extrações sequenciais utilizando DCM, o que pode indicar que essas espécies não foram eluídas com metanol, sendo eluídas em seguida com o diclorometano, que é um solvente mais apolar que o MeOH. Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse. Para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo software *Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas **Figuras 9 e 10**, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe e a **Tabela 2**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4.

Tabela 2. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações do grupo II, utilizando C18 e da ELL padrão utilizando DCM, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS

Identificação	Número Médio de Fórmulas Atribuídas			
	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo II – C ₁₈ – MeOH	40 ± 3	8 ± 2	15 ± 5	72 ± 10
Grupo II – C ₁₈ - DCM	54 ± 4	11 ± 1	14 ± 7	79 ± 11
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

Observa-se pela **Tabela 2** que o extrato de DCM exibiu uma maior quantidade

de fórmulas atribuídas, em relação ao extrato de MeOH e à ELL. Observa-se também que houve maior extração de compostos de classe O2 nos três extratos, sendo o extrato de DCM – solvente mais apolar que o MeOH - o que apresentou maior número de fórmulas atribuídas – 54 fórmulas atribuídas - indicando uma possível preferência de extração para compostos de classe O2.

Vale ressaltar que a fase estacionária C₁₈ se baseia no mecanismo de extração de fase reversa, o qual é apropriado para a extração de analitos pouco polares e apolares, devido às interações de Van der Waals entre o sorvente e os analitos (ZWIRFERENC, A.; BIZIUK, M., 2006). Além disso, esse mecanismo permite a eluição dos compostos pelo uso de solventes pouco polares ou apolares, como é o caso dos solventes utilizados nessa metodologia, procedendo a eluição de forma sequencial, inicialmente com o uso do MeOH, solvente pouco polar e posteriormente o DCM, moderadamente apolar.

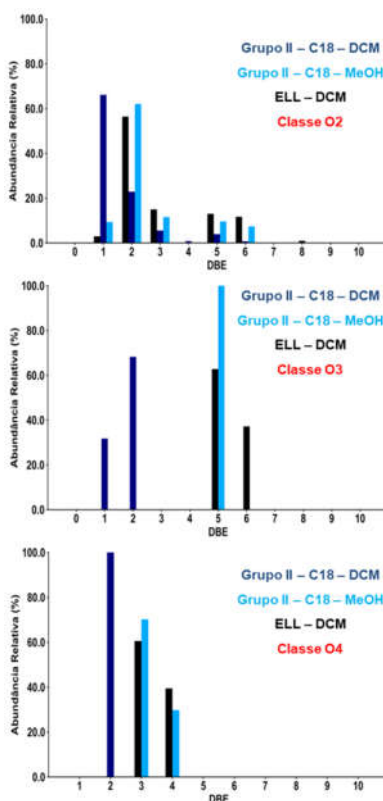


Figura 9. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de

massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária C₁₈ e da ELL.

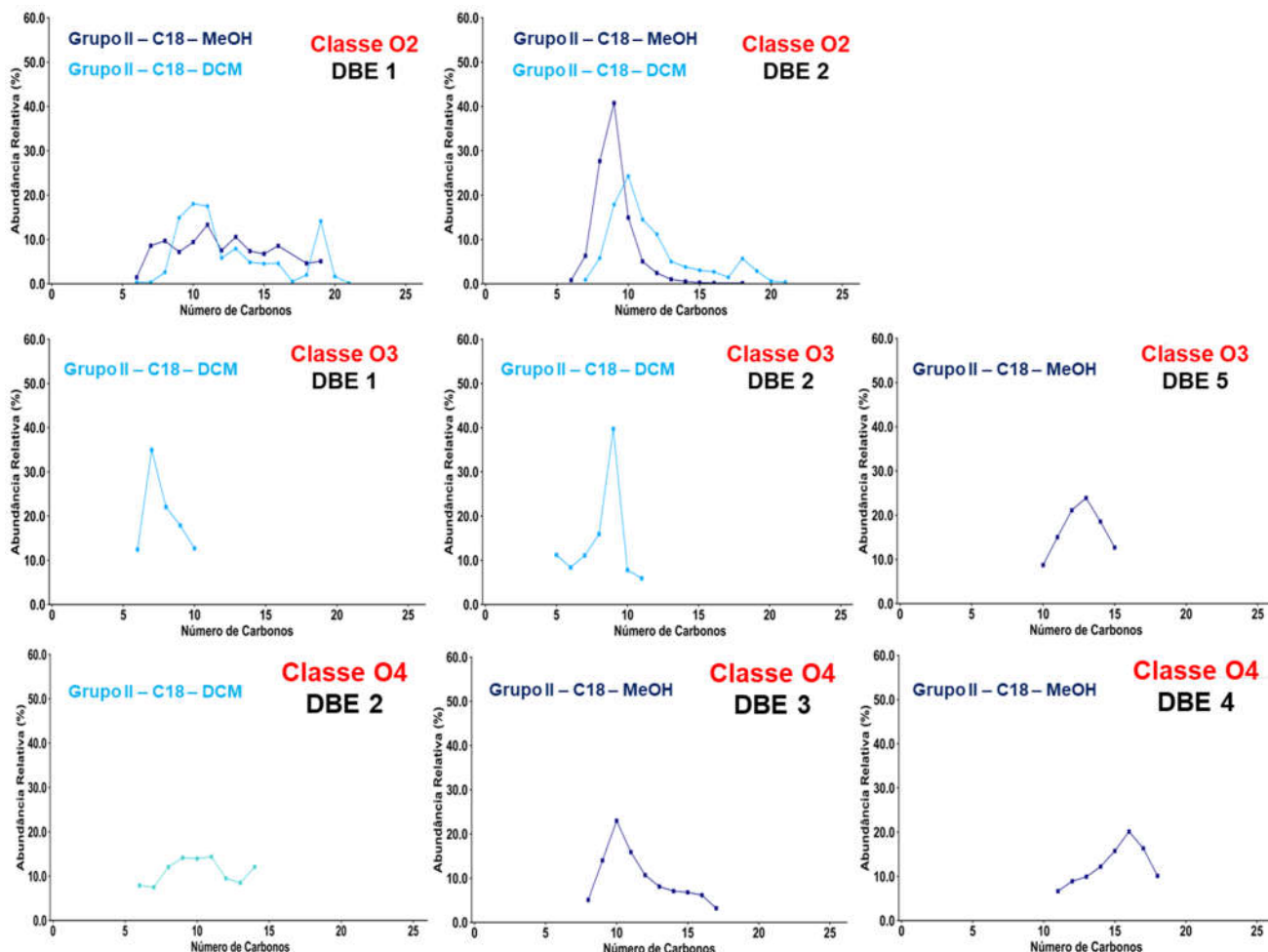


Figura 10. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária C₁₈.

A partir da análise das **Figuras 9 e 10**, é possível observar que houve a extração majoritária de compostos de DBE 1 e DBE 2 para a classe O2 e nota-se ainda que o extrato de DCM apresentou a maior intensidade para compostos de DBE 1, sendo estes os ácidos lineares, e o extrato de MeOH apresentou maior intensidade para compostos de DBE 2, os compostos naftênicos. Uma possível justificativa para esse

comportamento se dá ao analisar a polaridade dos solventes envolvidos na extração, uma vez que o DCM é um solvente moderadamente apolar, o que acarreta maior interação deste com os compostos apolares adsorvidos na fase estacionária. Por outro lado, o MeOH é um solvente polar, o que leva à maior interação deste com os compostos polares adsorvidos na fase estacionária. Nota-se também que o extrato de DCM apresentou apenas compostos de DBE 1 e DBE 2 para a classe O3 e o extrato de MeOH apresentou somente compostos de DBE 5 para a mesma classe, ou seja, os compostos aromáticos. Analisando a classe O4, percebe-se que somente compostos de DBE 2 foram encontrados no extrato de DCM, já no extrato de MeOH, observou-se compostos de DBE 3 e DBE 4. Em relação ao número de carbono, observam-se cadeias de 6 a 21 carbonos nos compostos da classe O2.

A **Figura 11** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados apresentados na **Tabela 2**.

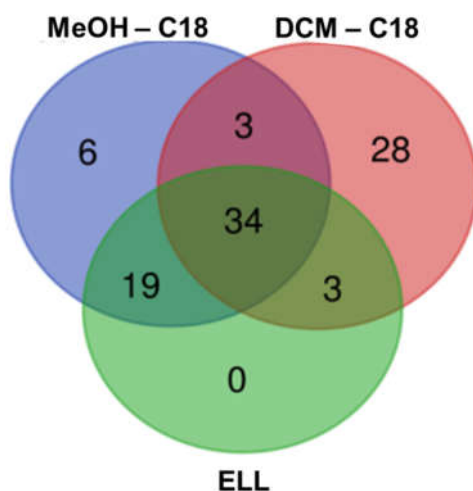


Figura 11. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos ELL e metanol e diclorometano utilizando a fase sólida C₁₈, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS apresentado no grupo II.

Pode-se observar pelo diagrama de Venn que houve a presença exclusiva de 28 espécies no extrato de DCM, sendo 17 espécies da classe O2, 4 espécies da classe O3 e 7 espécies da classe O4. Observa-se também 6 fórmulas exclusivas do extrato de

MeOH, sendo todas da classe O3. Houve a detecção de 19 espécies no extrato de MeOH e no extrato ELL, sendo dessas 19 espécies, 12 da classe O4, 5 da classe O3 e apenas 2 da classe O2. Observou-se também que foram apresentadas 34 fórmulas em ambas as extrações, o que indica que não houve seletividade por solventes para essas 34 espécies. Com base no processamento de dados, pode-se inferir que a EFS sequencial do grupo II utilizando a fase estacionária C_{18} mostrou um bom desempenho de extração, fornecendo resultados mais satisfatórios na extração de espécies da classe O2 em relação à ELL.

A **Figura 12** apresenta o espectro de massas resultante dos extratos utilizando as metodologias do grupo II com a fase sólida ENV+ em comparação com o espectro de massas obtido a partir da ELL padrão utilizando DCM, analisados por ESI(-)-Orbitrap-MS na concentração de $0,001 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

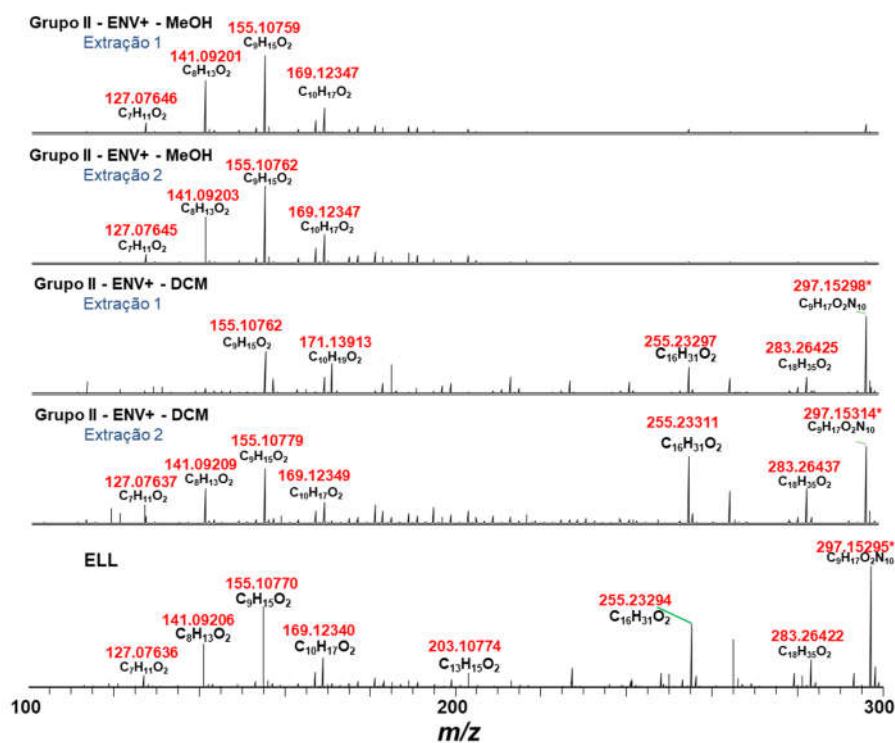


Figura 12. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS do extrato obtido pela ELL com os extratos obtidos utilizando a fase sólida ENV+ da metodologia apresentada no grupo II. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 12**, observa-se uma semelhança entre o perfil da ELL com o perfil do extrato de MeOH da primeira e da segunda

replicata, indicando a provável presença de espécies em comum, no entanto, assim como na extração utilizando a fase C₁₈ observa-se que não houve a extração de espécies acima da *m/z* 250, indicando não haver interação dessas espécies com o solvente MeOH. Observa-se nos espectros dos extratos de DCM que houve a extração de espécies na faixa de *m/z* 200-300 que não foram extraídas utilizando o solvente MeOH, podendo-se inferir que essas espécies possuem afinidade com solventes apolares, como é o caso do diclorometano, utilizando tanto na segunda etapa da EFS do grupo II, como na ELL padrão. Contudo para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo software *Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas **Figuras 13 e 14**, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe e a **Tabela 3**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4. Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse.

A **Tabela 3** apresenta o número médio de fórmulas atribuídas para as classes O2, O3 e O4 após o tratamento dos dados utilizando o *software* Composer.

Tabela 3. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações do grupo II utilizando a fase sólida ENV+ e da metodologia padrão de ELL utilizando o solvente DCM, a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS

Identificação	Número Médio de Fórmulas Atribuídas			
	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo II - ENV+ - MeOH	40 ± 1	6 ± 1	17 ± 4	63 ± 6
Grupo II - ENV+ - DCM	67 ± 6	24 ± 11	28 ± 10	119 ± 27
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

Observa-se pela **Tabela 3** que, assim como na extração utilizando C₁₈, o extrato de DCM exibiu uma maior quantidade de fórmulas atribuídas, em relação ao extrato de MeOH e à ELL. Observa-se também em análise geral, que houve maior extração de

compostos de classe O2 nos três extratos, sendo o extrato de DCM o que apresentou maior número de fórmulas atribuídas – 67 espécies atribuídas - para classe O2, classe esta que possui maior interesse de extração. Ao se comparar as duas fases estacionária observa-se um maior número de espécies da classe O2 utilizando a fase sólida ENV+ e o solvente de eluição DCM, o que pode ser justificado pela interação química dessas espécies com o solvente DCM, que é um solvente apolar, e a baixa interação dessas espécies com a fase reversa de copolímero de poliestireno-divinilbenzeno, permitindo a melhor extração dessas espécies.

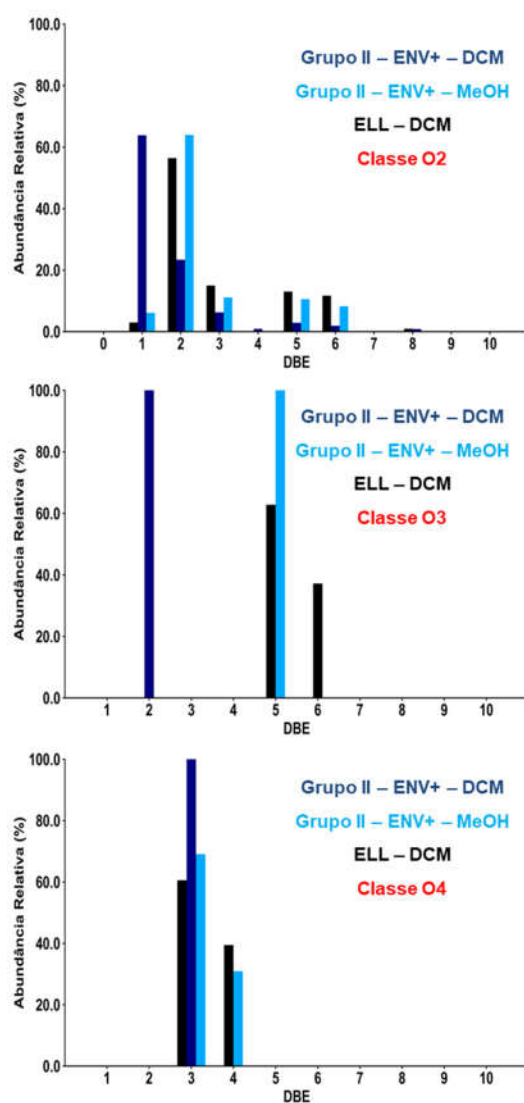


Figura 13. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de

massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária ENV+ e ELL.

A **Figura 14** apresenta o gráfico com a distribuição de número de carbonos das classes O2, O3 e O4, conforme os resultados de DBE apresentados anteriormente.

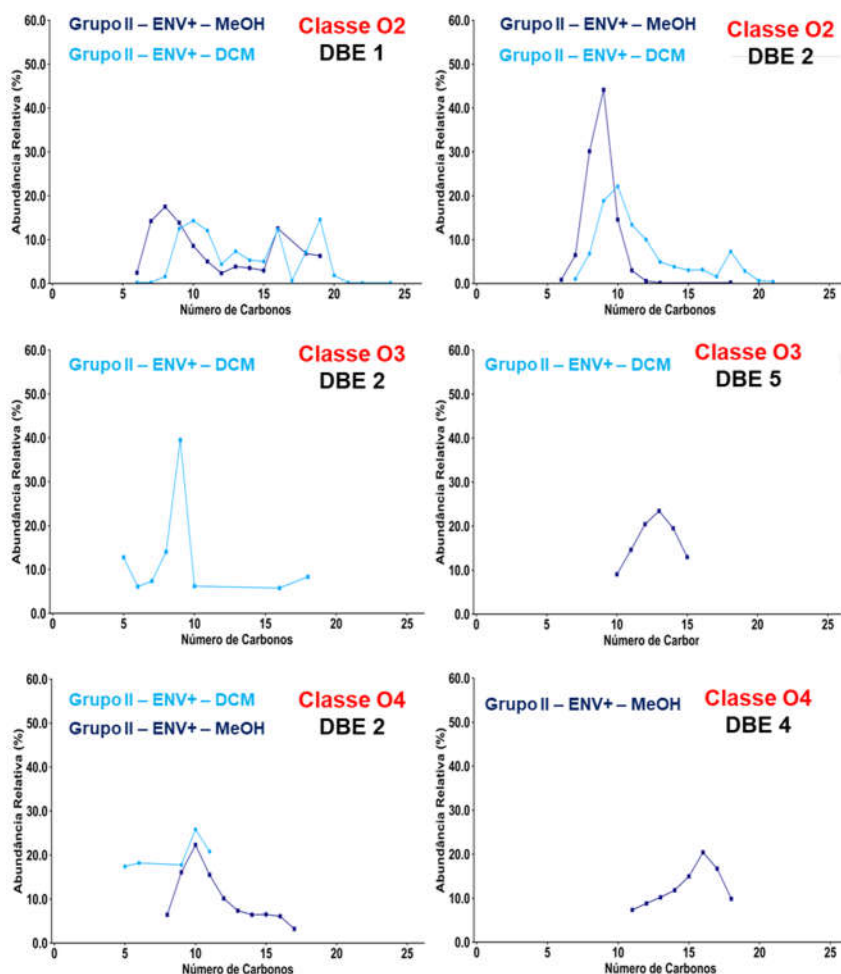


Figura 14. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo II utilizando a fase estacionária ENV+.

A partir da análise da **Figura 13**, nota-se o perfil semelhante de distribuição de DBE da classe O2 nos extratos da fase estacionária ENV+ em relação à extração apresentada anteriormente, utilizando a fase estacionária C₁₈. Assim sendo, é possível

observar que houve a extração majoritária de compostos de DBE 1 e DBE 2 para a classe O2 e que o extrato de DCM apresentou a maior intensidade para compostos de DBE 1, sendo estes os ácidos lineares, e o extrato de MeOH apresentou maior intensidade para compostos de DBE 2, os compostos naftênicos. Apesar de ser diferente, a ENV+ apresenta mecanismo de extração em fase reversa, assim como a fase estacionária C₁₈, portanto, espera-se que os resultados sejam semelhantes, uma vez que foi empregado os mesmos solventes de eluição em ambas extrações. No entanto, nota-se que os perfis de distribuição de DBE para as classes O3 e O4 apresentaram diferenças, destacando-se a classe O3, que apresentou compostos de DBE 2 apenas para o extrato de DCM, e compostos de DBE 5 apenas para o extrato de MeOH, podendo-se inferir que houve a extração de compostos naftênicos para o extrato de DCM e de compostos aromáticos para o extrato de MeOH.

Pela análise da **Figura 14** é possível observar a distribuição do número de carbono das espécies extraídas para cada classe nos valores DBE selecionados. Observa-se no gráfico da classe O2 com DBE 1 que as espécies no intervalo de 7 a 10 átomos de carbono apresentam a maior intensidade no extrato de MeOH, já as espécies no intervalo de 9 a 12 átomos de carbono apresentam maior intensidade no extrato de DCM. No geral são observadas espécies na faixa de 6 a 21 átomos de carbono para a classe O2.

A **Figura 15** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados apresentados na **Tabela 3**.

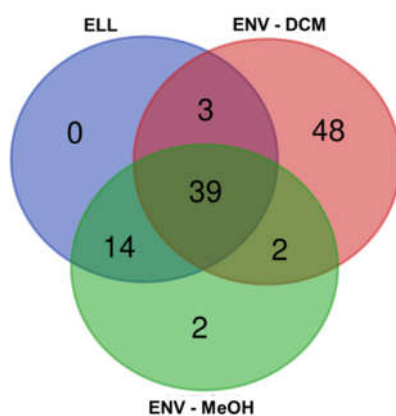


Figura 15. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos grupo II MeOH e DCM utilizando a fase sólida ENV+ e o extrato de ELL utilizando

DCM como solvente extrator, construído após o processamento dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS.

Pode-se observar pelo diagrama de Venn que houve a presença exclusiva de 48 espécies no extrato de DCM – ENV+, dessas, 28 são da classe O2, 13 são da classe O3 e 7 são da classe O4. Observa-se também 14 espécies exclusivas na intersecção do extrato de MeOH e ELL, sendo 7 da classe O4, 5 da classe O3 e apenas 2 da classe O2.

Com base no tratamento de dados, pode-se inferir que a EFS sequencial utilizando a fase sólida ENV+ apresentada no grupo II apresentou um bom desempenho de extração, mostrando resultados superiores à ELL no quesito de número de fórmulas extraídas e classe O2 preferencial.

Observa-se também que a extração utilizando o solvente DCM se mostrou mais eficiente, extraíndo um maior número de espécies, principalmente espécies da classe O2.

4.1.3 Resultados da metodologia do grupo III

Utilizando a metodologia apresentada no grupo III, a extração dos AN foi realizada utilizando-se a duas fases sólidas; a fase estacionária intitulada pelo autor de ENV (Isolute[®] ENV+ 200 mg + C₈) e Waters[™] Oasis HLB 60 mg. A eluição foi realizada sequencialmente com 10 mL de HEX, identificando o primeiro extrato, seguido por 10 mL de DCM, caracterizando o segundo extrato e por último 10 mL de IPA, formando o terceiro extrato. Os extratos foram concentrados e então analisados por ESI(-)-Orbitrap MS.

A **Figura 16** apresenta o espectro de massas resultante das análises por ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos utilizando as metodologia de extração do grupo III, com a fase sólida ENV (C8 + ENV+) em comparação com o espectro de massas obtido a partir da extração padrão ELL utilizando DCM, analisados por ESI(-)-Orbitrap-MS na concentração de 0,001 mg.mL⁻¹.

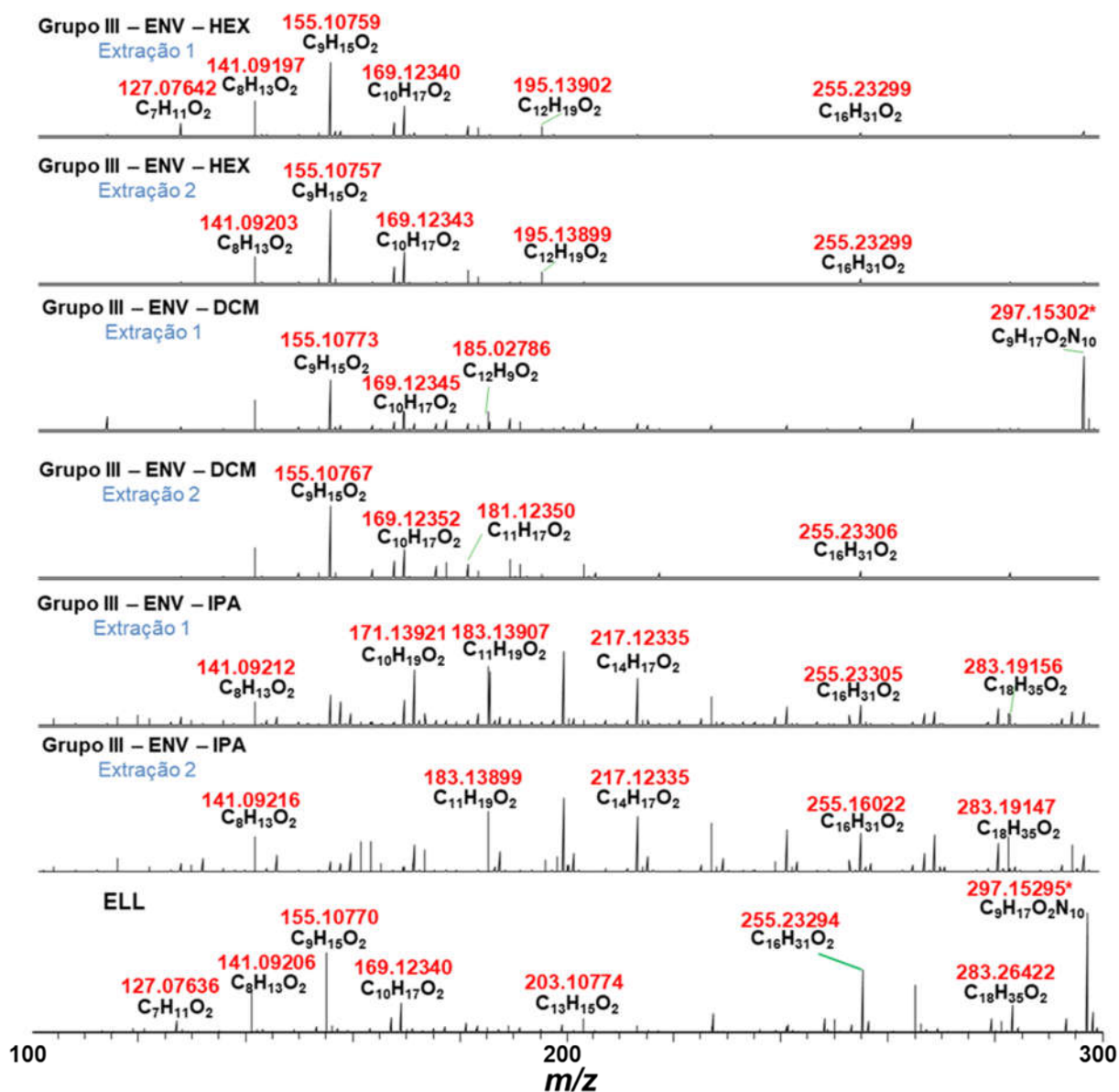


Figura 16. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo III utilizando-se a fase sólida ENV com o extrato da metodologia ELL padrão utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 16**, observa-se uma semelhança entre o perfil da ELL com os perfis dos extratos de HEX e DCM. Os espectros obtidos da fração do IPA apresentam um perfil com pouca semelhança com os perfis das

outras frações e da ELL, exibindo mais picos na faixa m/z 200-300, o que pode indicar resultados de uma extração mais efetiva de espécies da classe O4.

Contudo para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo software *Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas **Figuras 17 e 18**, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe e a **Tabela 4**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4. Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse.

A **Tabela 4** apresenta o número médio de fórmulas atribuídas para as classes O2, O3 e O4 após o tratamento dos dados utilizando o *software* Composer.

Tabela 4. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, a partir dos espectros de ESI(-)-Orbitrap-MS das extrações EFS sequencial do grupo III utilizando a fase sólida ENV e da ELL padrão utilizando o solvente extrator DCM

Identificação	Número Médio de Fórmulas Atribuídas			
	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo III - ENV - HEX	34 ± 1	-	-	34 ± 1
Grupo III - ENV - DCM	54 ± 10	17 ± 5	6 ± 6	77 ± 21
Grupo III - ENV - IPA	60 ± 2	47 ± 4	51 ± 4	158 ± 10
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

Observa-se pela **Tabela 4** que a fração IPA exibiu uma maior quantidade de fórmulas atribuídas, em relação às frações em HEX e DCM e à ELL. Destaca-se que o solvente HEX, que é mais apolar que os demais, extraiu somente espécies O2, se mostrando uma boa alternativa para extrações seletivas que visam apenas espécies desta classe.

Em contrapartida, observa-se que o extrato de IPA apresentou maior número de espécies da classe O4, indicando ser uma boa alternativa para a extração de compostos desta classe. Em análises gerais, a metodologia utilizando a fase sólida

ENV apresentada no grupo III exibiu melhores resultados de extração se comparada com a metodologia usual de ELL utilizando o solvente DCM.

Nesta metodologia, a eluição dos analitos ocorreu com o aumento gradual da polaridade da fase móvel, iniciando-se a extração com HEX, em seguida DCM e por último o IPA. Ao analisar a **Figura 17**, observa-se o gráfico da distribuição de DBE da classe O2, nota-se que para o valor de DBE 1 ocorre o aumento da intensidade das espécies conforme ocorre o aumento da polaridade da fase móvel, dessa forma, o extrato de IPA apresentou a maior intensidade de compostos de DBE 1, indicando uma possível melhor interação deste solvente com os compostos lineares adsorvidos na fase estacionária. Além disso, para o valor de DBE 2, ocorre o inverso, o aumento da intensidade conforme diminui a polaridade da fase móvel, indicando uma possível melhor interação do solvente HEX com os compostos naftênicos, que possuem DBE 2.

Ainda na classe O2, é possível observar a presença de compostos com valores de DBE 3, 5 e 6. Já no gráfico da classe O3, observa-se que os compostos com valores de DBE 1 e 2 ocorrem apenas no extrato de IPA, e compostos com valores de DBE 3 e 5 apresentam maior intensidade no extrato de DCM. Já para a classe O4, destaca-se os compostos com valores de DBE 3, os quais apresentam intensidade semelhante tanto no extrato de DCM quanto no extrato de IPA, indicando não haver seletividade para esses compostos em relação aos dois solventes extratores.

Ainda na classe O2, é possível observar a presença de compostos com valores de DBE 3, 5 e 6. Já no gráfico da classe O3, observa-se que os compostos com valores de DBE 1 e 2 ocorrem apenas no extrato de IPA, e compostos com valores de DBE 3 e 5 apresentam maior intensidade no extrato de DCM.

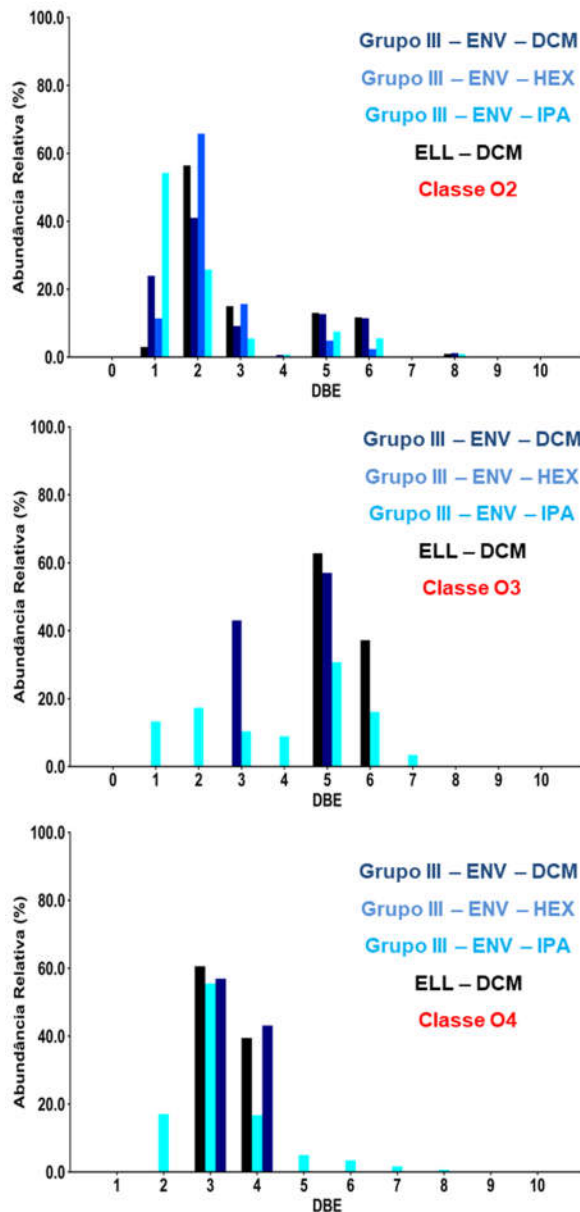


Figura 17. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacioária ENV e ELL.

Para a classe O4, destaca-se os compostos com valores de DBE 3, os quais apresentam intensidade semelhante tanto no extrato de DCM quanto no extrato de IPA, indicando não haver seletividade para esses compostos em relação aos dois solventes extratores

A **Figura 18** traz os gráficos da distribuição de número de carbono para os valores de DBE mais abundantes, das classes O2, O3 e O4. Ao analisar os gráficos da classe O2, percebe-se que para o valor de DBE 1, os compostos que apresentam maior intensidade estão na faixa de 7 a 12 carbonos, em ambos extratos. Já para o valor de DBE 2, é notável a maior intensidade para os compostos na faixa de 8 a 10 átomos de carbono em sua composição, sendo o extrato de HEX o que apresenta maior intensidade.

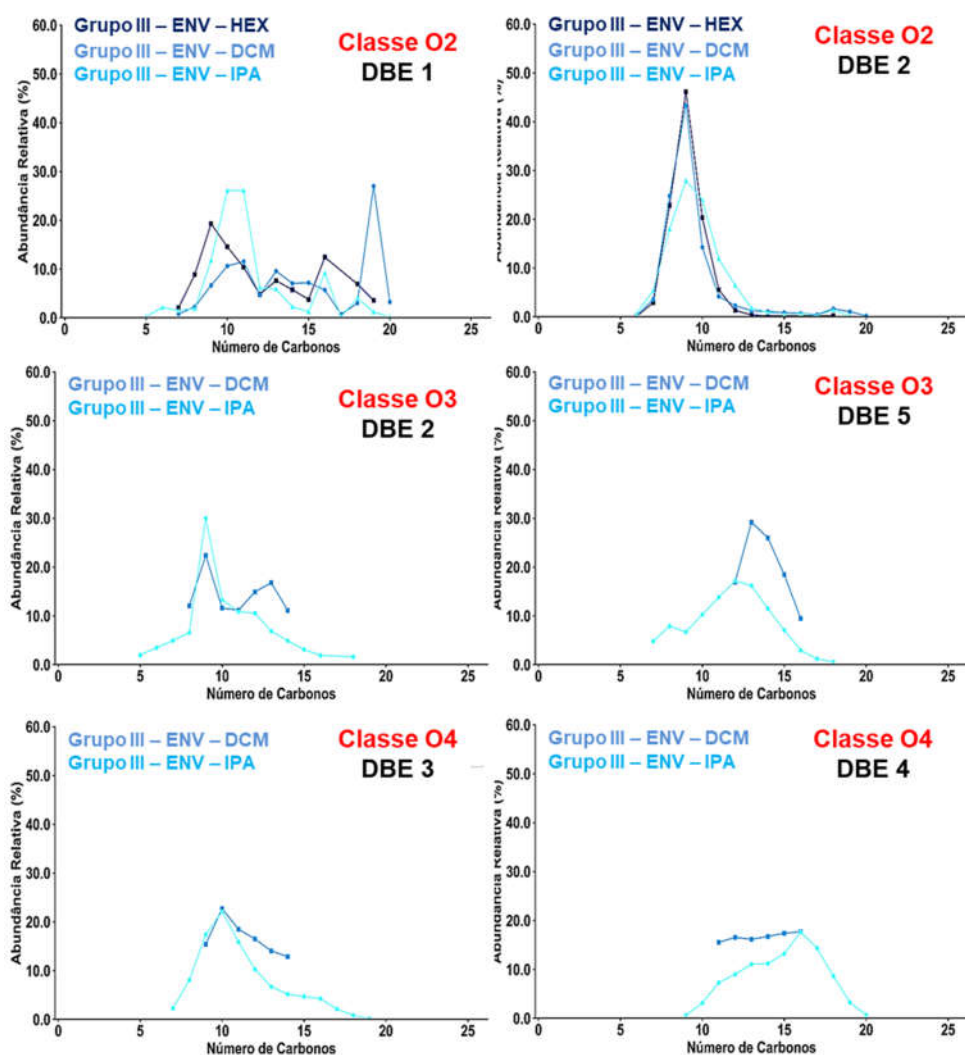


Figura 18. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária ENV.

Para os compostos da classe O3, observa-se no gráfico com valor de DBE 3, a maior intensidade de compostos na faixa de 8 a 14 carbonos para o extrato de IPA, e 8 a 10 carbonos para o extrato de DCM. Para o valor de DBE 5, ocorre maior intensidade dos compostos na faixa de 9 a 15 carbonos para o extrato de IPA, semelhante aos resultados obtidos para o valor de DBE 3. Por fim, para os compostos da classe O4, têm-se os gráficos de distribuição de carbonos para os valores de DBE 3, com compostos na faixa de 7 a 18 carbonos para o extrato de IPA, e 9 a 14 carbonos para o extrato de DCM e compostos para o valor de DBE 4, com espécies na faixa de 9 a 20 carbonos para o extrato de IPA e 11 a 16 carbonos para o extrato de DCM.

A **Figura 19** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados apresentados na **Tabela 4**.

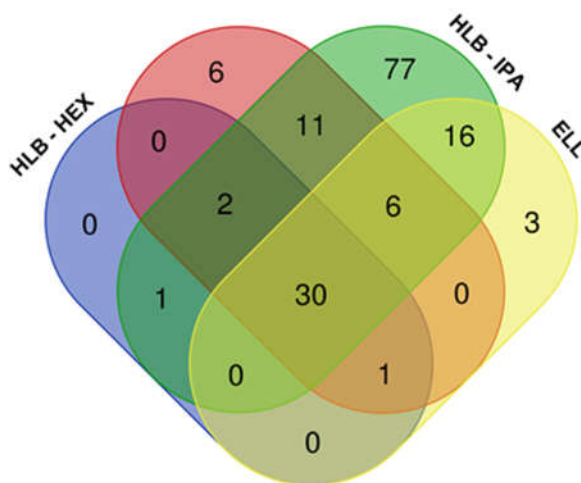


Figura 19. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos do grupo III, obtidos pelo processamento dos espectros de ESI(-)-Orbitrap-MS, utilizando a fase sólida ENV e os solventes HEX, DCM e IPA e do extrato da metodologia padrão de ELL utilizando o solvente extrator DCM.

Pode-se observar pelo diagrama de Venn que houve a presença exclusiva de 77 espécies na fração IPA, sendo 34 da classe O4, 26 da classe O3 e 17 da classe O2. Observa-se também a presença de 16 espécies na intersecção do extrato de IPA e do extrato de ELL, sendo 13 espécies da classe O4, 1 espécie da classe O3 e 2 espécie da classe O2. O extrato de DCM apresentou 7 espécies exclusivas, sendo 6 espécies

da classe O2 e apenas 1 da classe O3. Observou-se também que foram apresentadas 31 espécies em ambas as extrações. Com base no tratamento de dados, pode-se inferir que a EFS sequencial do grupo III utilizando a fase sólida ENV apresentou um bom desempenho de extração, mostrando resultados superiores à ELL no quesito de número de fórmulas de espécies atribuídas. Pode-se inferir também que o solvente IPA extraiu um número superior de espécies, sendo que a maioria extraída é pertencente à classe O2.

Para o grupo III, a segunda metodologia realizada foi com a fase estacionária HLB. A **Figura 20** apresenta os espectros de massas resultante das análises ESI(-)-MS para as frações obtidas utilizando as metodologias de extração com HLB apresentadas no grupo III em comparação com o espectro de massas obtido a partir da ELL, analisados por ESI(-)-Orbitrap-MS na concentração de 0,001 mg.mL⁻¹.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 20**, observa-se uma semelhança entre o perfil da ELL com os perfis dos extratos de HEX, destacando-se que não houve a extração por HEX das espécies acima de m/z 200. É notável a maior presença de espécies nos espectros da extração com IPA, o que indica uma boa interação das espécies adsorvidas na fase sólida com esse solvente extrator.

No entanto, para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo software *Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas **Figuras 21** e **22**, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe, e a **Tabela 5**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4. Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse.

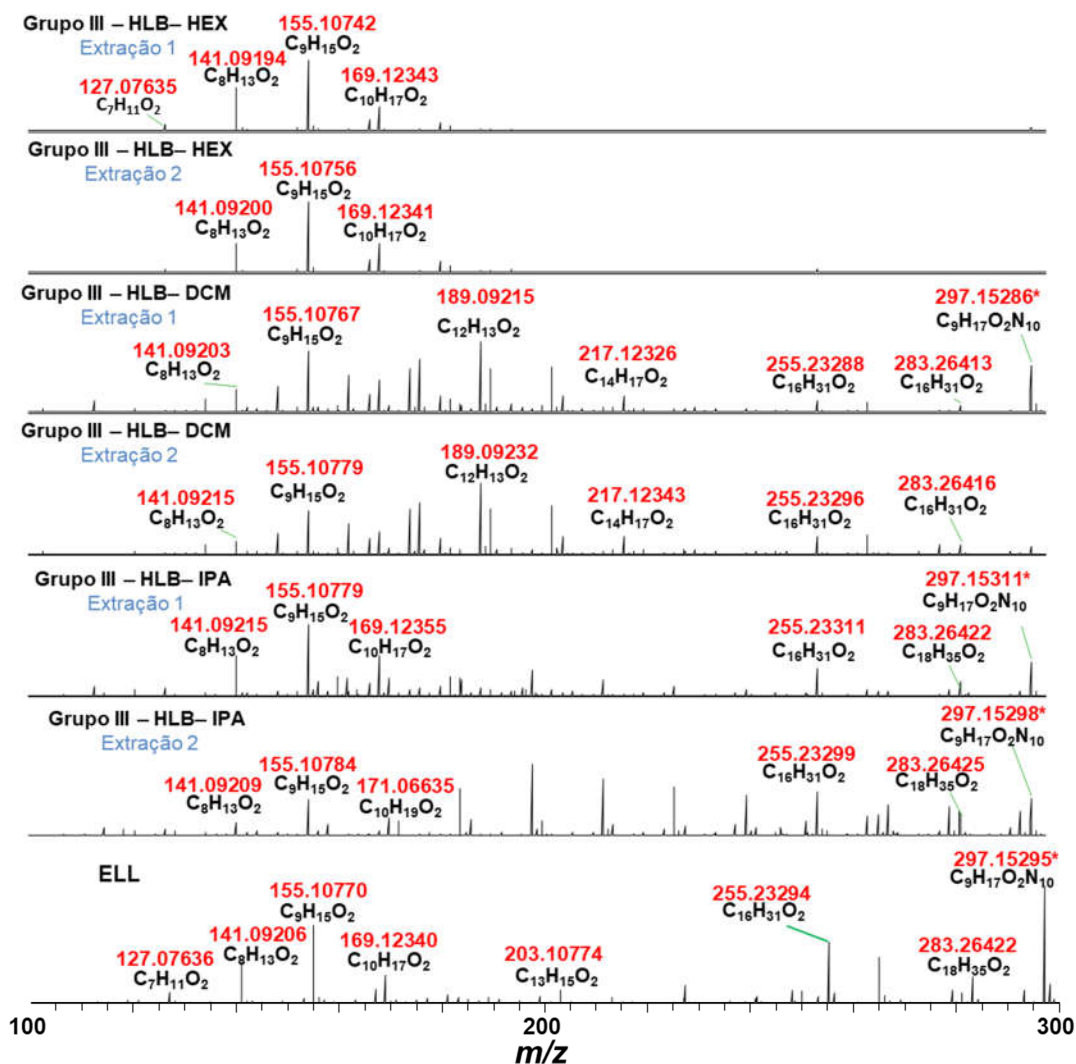


Figura 20. Comparação dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo III utilizando-se a fase sólida HLB com o extrato da metodologia padrão de ELL utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

Observa-se pela **Tabela 5** que o extrato de IPA exibiu uma maior quantidade de fórmulas atribuídas, em relação as frações HEX e DCM e à ELL. Observa-se também que houve maior extração de compostos de classe O2 nas frações DCM e IPA em relação à ELL. Além disso, a fração IPA apresentou maior número de espécies O4, indicando ser uma boa alternativa para a extração de compostos dessa espécie. Em análises gerais, a metodologia do grupo III utilizando a fase sólida HLB exibiu melhores resultados de extração se comparada com a metodologia usual de ELL, além de apresentar uma boa repetibilidade em relação à ELL.

Tabela 5. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das EFS sequencial do grupo III utilizando a fase sólida HLB e da ELL padrão utilizando o DCM

Número Médio de Fórmulas Atribuídas				
Identificação	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo III - HLB - HEX	34 ± 3	-	-	34 ± 3
Grupo III - HLB - DCM	70 ± 6	52 ± 2	45 ± 5	167 ± 12
Grupo III - HLB - IPA	50 ± 5	38 ± 5	35 ± 10	123 ± 20
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

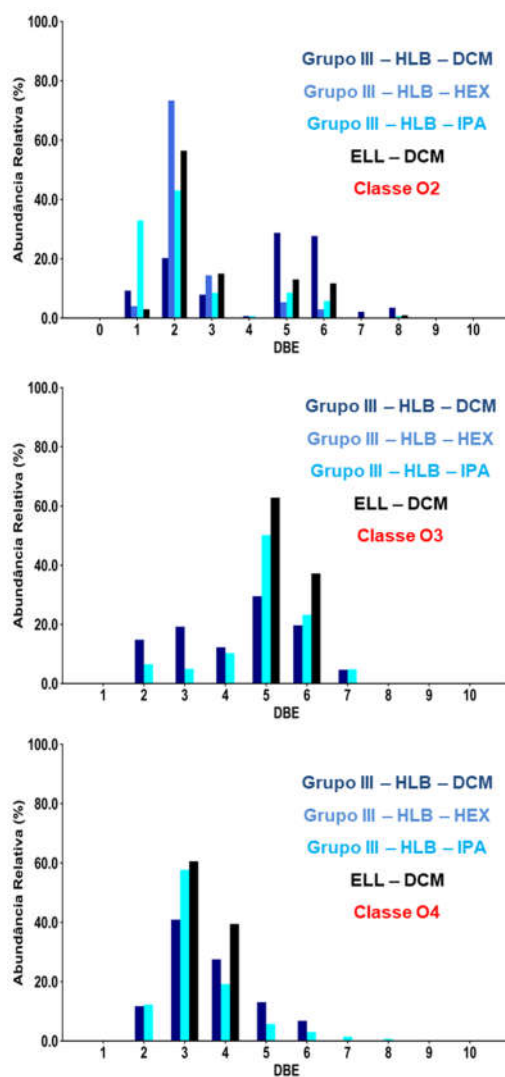


Figura 21. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de

massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária HLB e a ELL.

A extração nessa metodologia se deu pelo uso da fase estacionária HLB (balanço hidrofílico-lipofílico), composta por copolímero de *n*-vinilpirrolidona-divinilbenzeno, sua atuação se baseia em interações de Van der Waals, na qual sua zona central lipofílica interage com analitos apolares, e seus grupos hidrofílicos interagem com os compostos polares que se deseja extrair. Além disso, a etapa de eluição com aumento gradual de polaridade dos solventes pode permitir a extração tanto dos compostos apolares quanto dos compostos polares presente na amostra.

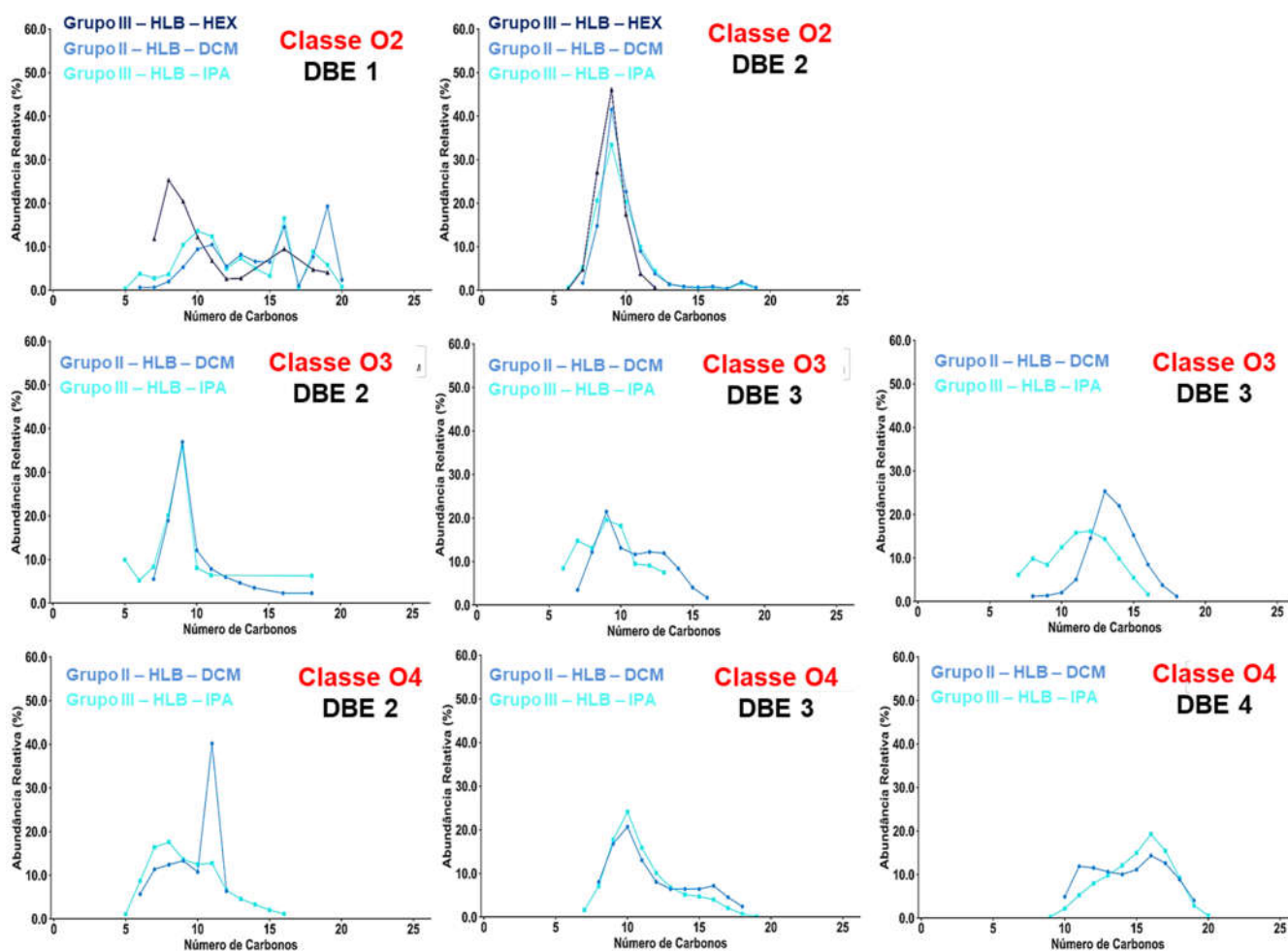


Figura 22. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos

obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo III utilizando a fase estacionária HLB.

Ao se analisar a distribuição de DBE para a classe O2 da extração com a fase estacionária HLB, apresentada na **Figura 21**, observa-se um resultado semelhante aos resultados apresentados anteriormente, na extração utilizando-se a fase estacionária ENV. Dessa forma, para o valor de DBE 1, a intensidade dos compostos aumenta conforme a polaridade do solvente extrator é aumentada, e para o valor de DBE 2, destaca-se a maior intensidade para os compostos apresentados no extrato de HEX. Além disso, os compostos de valores de DBE 5 e 6 apresentaram maior intensidade no extrato de DCM, indicando uma possível melhor interação dos compostos aromáticos com esse solvente extrator. Um fato a ser destacado na extração utilizando a fase sólida HLB, é que nas classes O3 e O4 observou-se a presença de compostos de mesmo valor de DBE para os extratos de DCM e IPA, o que não ocorreu na extração utilizando a fase estacionária ENV.

A **Figura 22** traz os gráficos da distribuição de número de carbono para os valores de DBE mais abundantes, das classes O2, O3 e O4. Ao analisar os gráficos da classe O2, percebe-se que para o valor de DBE 1, os compostos que apresentam maior intensidade estão na faixa de 7 a 10 carbonos, para o extrato de HEX e de 8 a 13 carbonos, para os extratos de DCM e IPA. Já para o valor de DBE 2, é notável a maior intensidade para os compostos na faixa de 7 a 11 átomos de carbono em sua composição, sendo o extrato de HEX o que apresenta maior intensidade, assim como na extração apresentada anteriormente, utilizando a fase estacionária ENV. Para os compostos da classe O3, observa-se no gráfico com valor de DBE 2, a maior intensidade de compostos na faixa de 6 a 10 carbonos para ambos extratos. Para o valor de DBE 3, ocorre maior intensidade dos compostos na faixa de 8 a 14 carbonos para ambos extratos. Por fim, para os compostos da classe O4, têm-se os gráficos de distribuição de carbonos para os valores de DBE 2, com compostos na faixa de 6 a 11 carbonos para ambos extratos. No gráfico de distribuição de carbono para os valores de DBE 3 e 4, é notável a semelhança do perfil de ambos os extratos, com espécies na faixa de 6 a 14 carbonos e 11 a 19 carbonos para os respectivos valores de DBE.

A **Figura 23** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados

apresentados na **Tabela 5**.

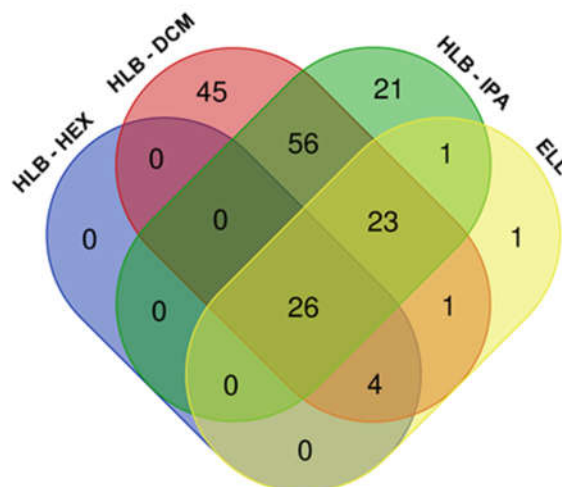


Figura 23. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas, após o processamento dos espectros de massa por ESI(-)-Orbitrap-MS, dos extratos ELL; HEX; DMC e IPA utilizando a fase sólida HLB apresentada no grupo III.

Pode-se observar pelo diagrama de Venn que houve a presença exclusiva de 21 espécies na fração IPA, sendo 10 da classe O4, 6 da classe O3 e apenas 5 da classe O2. Observa-se também 56 espécies na intersecção do extrato de DCM e IPA. O extrato de DCM apresentou 45 espécies exclusivas, sendo 18 espécies da classe O2, 16 espécies da classe O3 e apenas 11 espécies da classe O4. Pelos dados obtidos, pode-se inferir que a EFS sequencial utilizando a fase sólida HLB apresentou um bom desempenho de extração, mostrando resultados superiores à ELL no quesito de número de fórmulas extraídas, além de apresentar melhor eficiência na extração de espécies da classe O2 para a fração DCM, sendo que este solvente foi responsável pela extração do maior número de espécies.

4.1.4 Resultados da metodologia do grupo IV

Na metodologia apresentada no grupo IV, a extração dos ANs foi realizada utilizando-se duas fases sólidas; a fase sólida Strata-X® 60 mg e C₁₈ 1,0 g. A eluição foi realizada utilizando 10 mL de MeOH. Os extratos foram concentrados e analisados

por ESI(-)-Orbitrap-MS.

A **Figura 24** apresenta o espectro de massas resultante dos extratos utilizando a metodologia de extração com C₁₈ apresentadas no grupo IV. em comparação com o espectro de massas obtido a partir da extração padrão ELL utilizando DCM, analisados por ESI(-)-Orbitrap-MS na concentração de 0,001 mg.mL⁻¹.

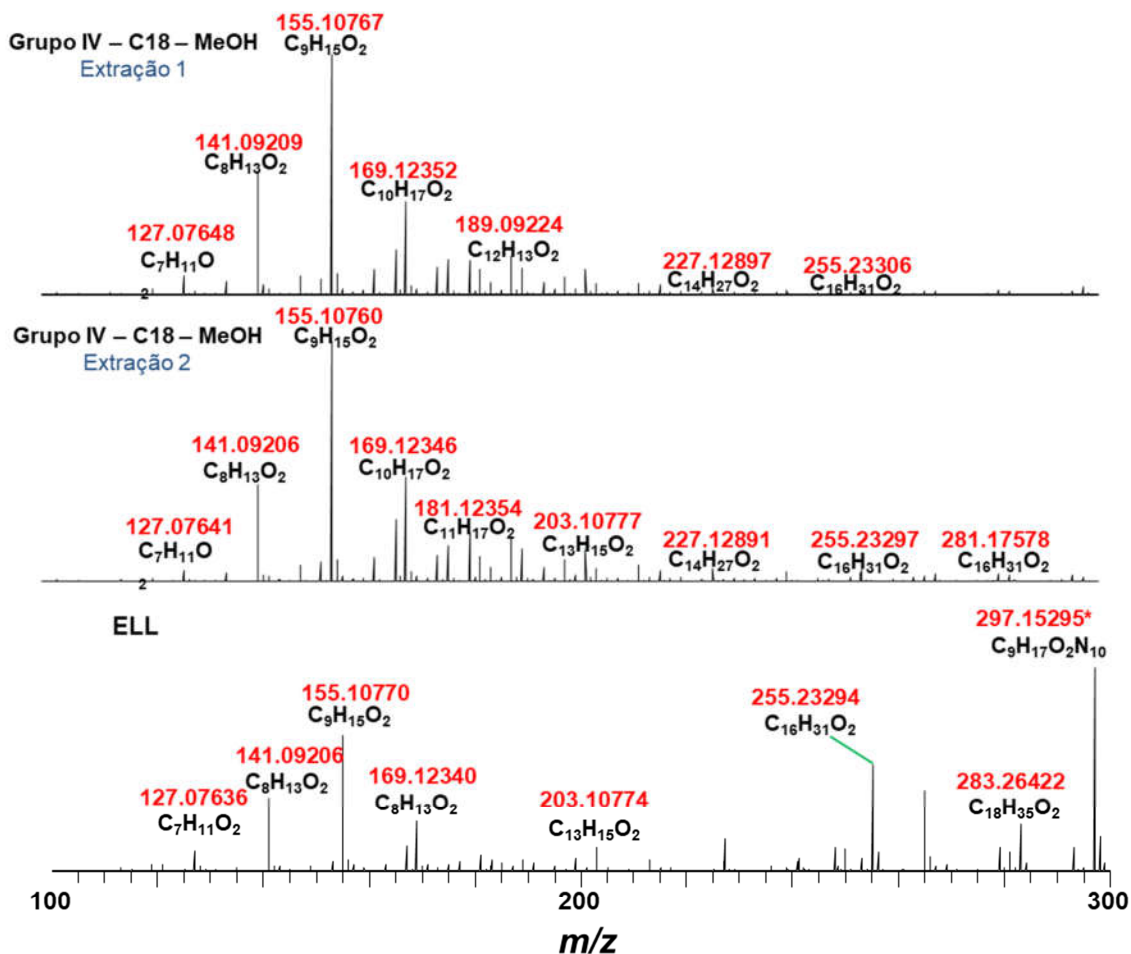


Figura 24. Comparação dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos obtidos pela extração do grupo IV utilizando a fase sólida C₁₈ com o extrato da ELL padrão utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 24**, observa-se uma semelhança entre o perfil da ELL com os perfis dos extratos de C₁₈, no entanto, o solvente MeOH não foi capaz de extrair algumas espécies após a faixa de *m/z* 250.

Entretanto, para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações

dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo *software Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas **Figuras 25** e **26**, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe e a **Tabela 6**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4. Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse.

A **Tabela 6** apresenta o número médio de fórmulas atribuídas para as classes O2, O3 e O4 após o tratamento dos dados pelo *software Composer*.

Tabela 6. Número médio de fórmulas de espécies atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas após o processamento dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, das extrações ELL e C18 da metodologia apresentada no grupo IV

Identificação	Número Médio de Fórmulas Atribuídas			
	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo IV – C ₁₈ – MeOH	48 ± 2	28 ± 2	42 ± 2	118 ± 6
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

Observa-se pela **Tabela 6** que o extrato de C₁₈ apresentou um número médio de fórmulas de espécies superior ao número atribuído para a ELL. Nota-se ainda que o número de espécies da classe O2 e classe O4 foi próximo, indicando não haver seletividade nas extrações dos compostos dessas classes para metodologia apresentada. A metodologia do grupo IV também apresentou uma boa repetibilidade, considerando-se o desvio padrão das médias das espécies das duas replicatas.

A partir da análise da **Figura 25**, é possível observar que houve a extração majoritária de compostos de DBE 2 - naftênicos - para a classe O2, com o solvente MeOH, resultado este que corrobora com os resultados anteriores apresentados na metodologia do grupo II utilizando a mesma fase estacionária. No entanto, observa-se que o MeOH não foi eficiente na extração de compostos de DBE 1, como ocorrera no extrato de DCM da metodologia do grupo II utilizando a fase estacionária C₁₈. Uma possível justificativa para esse comportamento é de que alguns dos compostos com

valor de DBE 1 – lineares – apresentam interações mais intensas com a fase estacionária, sendo possível sua eluição apenas com solventes mais apolares que o MeOH, como é o caso do DCM.

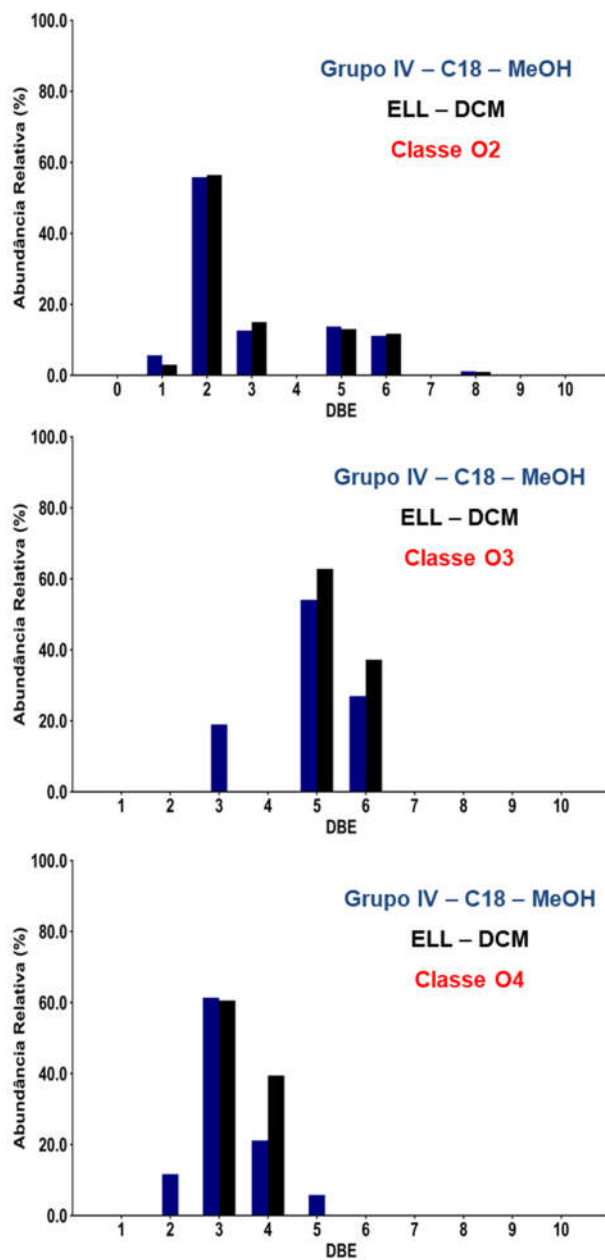


Figura 25. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária C₁₈ e a ELL.

Além disso, é possível observar a presença de compostos com valores de DBE 3, 5 e 6 para a classe O3, destacando-se o fato da ocorrência de maior intensidade para compostos de DBE 5, tal como ocorrera na extração da metodologia do grupo II utilizando a fase estacionária C₁₈ e o solvente MeOH. Por último, observa-se que para a classe O4 houve a maior intensidade de compostos com valor de DBE 3 e 4, também condizendo com os resultados apresentados anteriormente, na metodologia do grupo II.

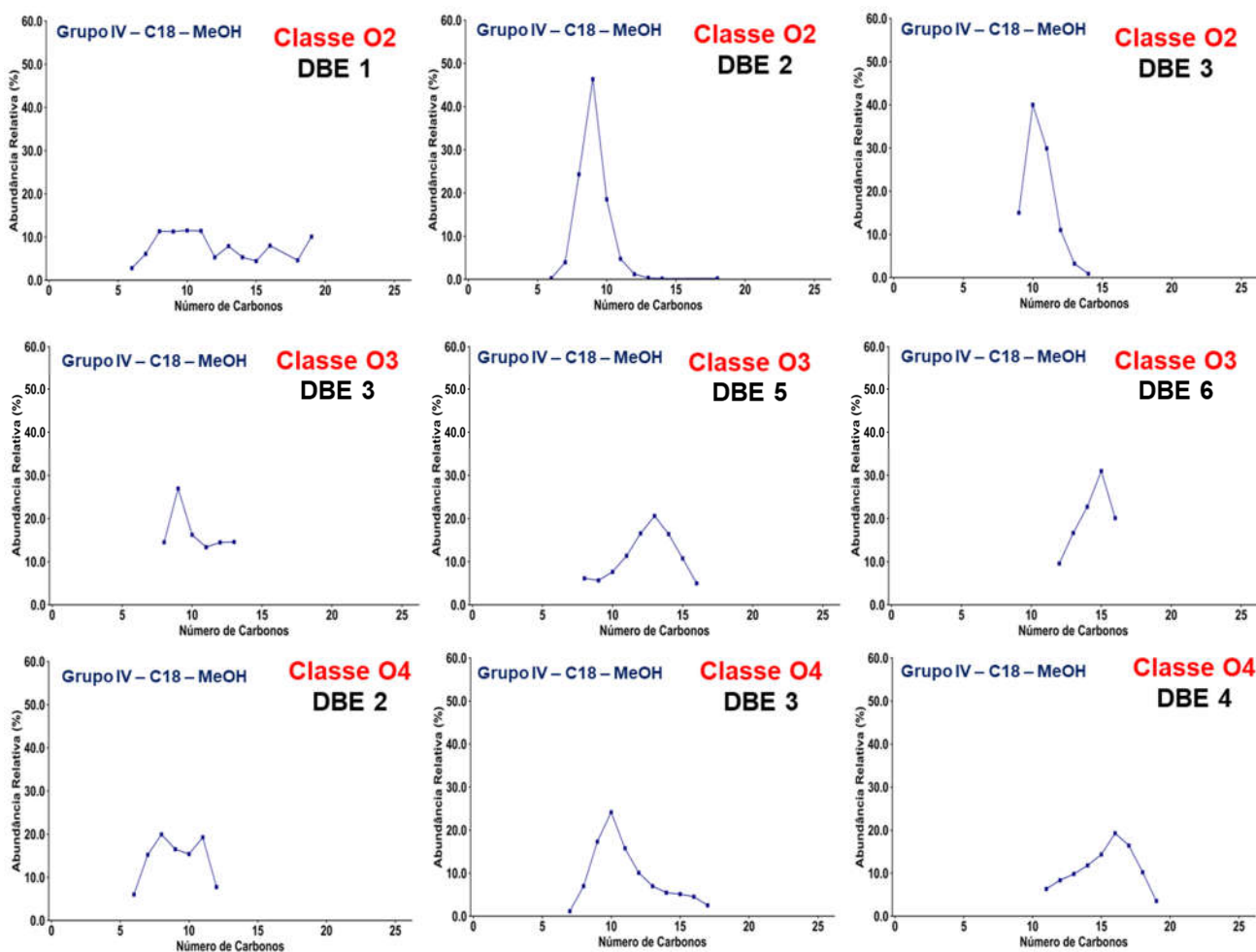


Figura 26. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária C₁₈.

Ao se analisar a **Figura 26** para a classe O2, observa-se que no valor de DBE 2,

o que apresentou a maior intensidade para a classe destacada, houve a presença mais intensa de compostos com número de carbonos na faixa de 7 a 11. Além disso, para o valor de DBE 1, observa-se intensidades próximas para os compostos na faixa de 6 a 19 carbonos. Para a classe O3 e valor de DBE 3, observa-se compostos na faixa de número de carbonos de 8 a 14, para os compostos com valores de DBE 5 a faixa de número de carbono variou de 8 a 16 carbonos e para o valor de DBE 6, a faixa de número de carbonos variou de 12 a 16 carbonos. Por último, observa-se os gráficos para a classe O4, para o valor de DBE 2, os compostos variaram em uma faixa de 6 a 12 carbonos.

Para os valores de DBE 3, a faixa de número de carbonos variou de 7 a 17 carbonos. Por fim, para o valor de DBE 4, a faixa do número de carbonos variou de 11 a 19 carbonos.

A **Figura 27** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados apresentados na **Tabela 6**.

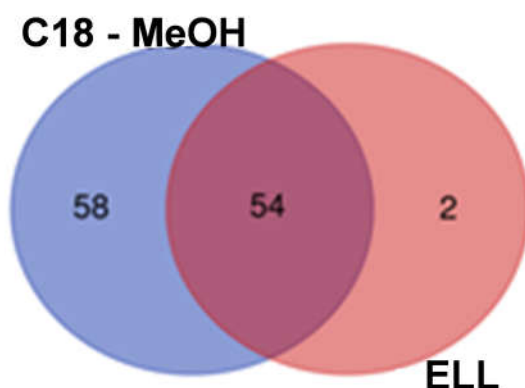


Figura 27. Diagrama de Venn construído a partir do número de fórmulas atribuídas, obtidas pelo processamento dos espectros de massa de ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos do grupo IV, utilizando a fase sólida C₁₈ e o extrato da ELL padrão com DCM.

O diagrama de Venn apresentou a presença exclusiva de 58 espécies no extrato de C18, sendo 24 espécies da classe O4, 21 espécies da classe O3 e 12 espécies da classe O2. Houve também a presença exclusiva de 2 espécies da classe O2 no extrato de ELL. Foram apresentadas 54 espécies em ambas as extrações. Com base no

tratamento de dados, pode-se inferir que a EFS utilizando a fase sólida C₁₈ apresentada no grupo IV apresentou um bom desempenho de extração em comparação com a ELL, extraindo um maior número de espécies das três classes estudadas.

A **Figura 28** apresenta o espectro de massas resultante dos extratos utilizando a metodologia de extração com Strata-X apresentadas no grupo IV em comparação com o espectro de massas obtido a partir da ELL, analisados por ESI(-)-Orbitrap-MS na concentração de 0,001 mg.mL⁻¹.

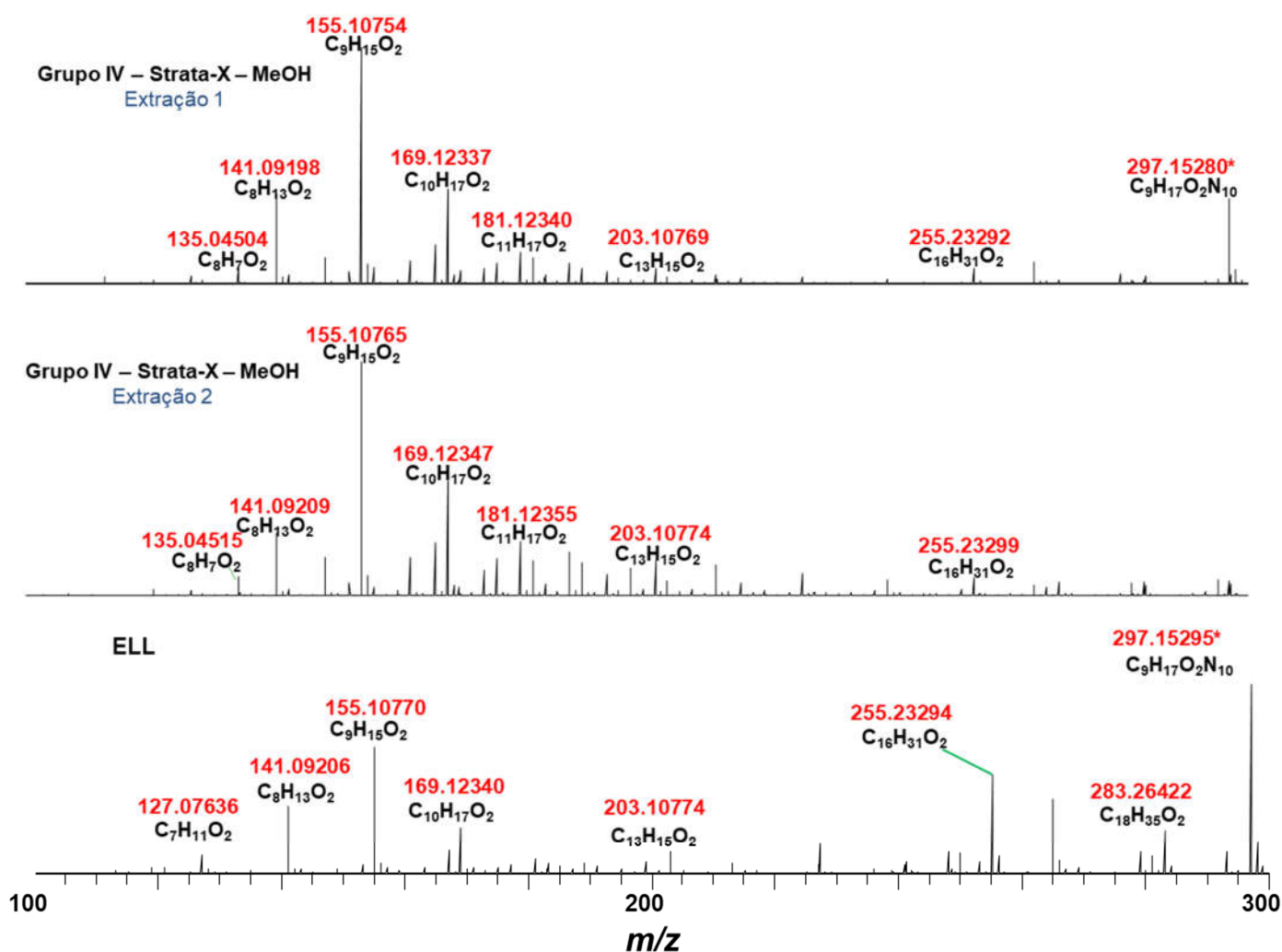


Figura 28. Comparação dos espectros de massas do extrato de ESI(-)-Orbitrap-MS obtido pela extração do grupo IV utilizando a fase sólida Strata-X e solvente MeOH com o extrato da ELL padrão utilizando o solvente DCM. Extração 1: Primeira replicata; Extração 2: Segunda replicata.

A partir dos espectros apresentados na **Figura 28**, observa-se uma pequena semelhança entre o perfil da ELL com os perfis dos extratos de Strata-X, sendo apresentada uma maior quantidade de íons no espectro das extrações do grupo IV. A **Tabela 7** apresenta o número médio de fórmulas atribuídas para as classes O2, O3 e O4 após o tratamento dos dados pelo *software Composer*.

Porém, para uma melhor análise dos resultados e das possíveis interações dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel durante a extração, os espectros foram processados pelo *software Composer*, e a partir desses resultados, construiu-se os gráficos presentes nas **Figuras 29 e 30**, as quais apresentam a distribuição de DBE por classes e o número de carbonos para cada classe e a **Tabela 6**, que apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2, O3 e O4. Ressalta-se que os espectros apresentam as informações sobre massa e fórmula molecular das espécies da classe O2, a qual se tem maior interesse.

Tabela 7. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4 das extrações ELL e Strata-X, obtidas pelo processamento do espectro de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS da metodologia apresentada no grupo IV

Identificação	Número Médio de Fórmulas Atribuídas			
	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
Grupo IV – Strata-X - MeOH	45 ± 1	20 ± 12	41 ± 17	106 ± 30
ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

Observa-se pela **Tabela 7** que o extrato de Strata-X apresentou um número médio de fórmulas próximo ao número de fórmulas atribuídas para a ELL. Além disso, observa-se altos valores de desvio padrão para a média entre as espécies atribuídas para a replicata 1 e 2, possivelmente indicando baixa repetibilidade. Ao considerar-se o custo de extração da metodologia do grupo IV utilizando cartucho Strata-X e o resultado apresentado por esta, semelhante à ELL padrão, pode-se recomendar a utilização da metodologia padrão de ELL, por ser mais simples e possuir um menor custo de aplicação.

Assim como a fase HLB, a fase estacionária Strata-X é composta por copolímero

de *n*-vinilpirrolidona-divinilbenzeno e sua atuação se baseia em interações de Van der Waals, na qual sua zona central lipofílica interage com analitos apolares, e seus grupos hidrofílicos interagem com os compostos polares que se deseja extrair. Além disso, a etapa de eluição com aumento gradual de polaridade dos solventes pode permitir a extração dos compostos apolares quanto dos compostos polares presentes na amostra. No entanto, nessa metodologia foi utilizado somente o MeOH como solvente extrator. Sabe-se que o MeOH é um solvente moderadamente polar, e sua utilização nessa extração pode não remover a totalidade dos analitos adsorvidos na fase estacionária, o que explicaria o baixo número de espécies atribuídas para o extrato.

A partir da análise da **Figura 29**, é possível observar que houve a extração majoritária de compostos de DBE 2 - naftênicos - para a classe O2, com o solvente MeOH, indicando a possível afinidade desses compostos com solvente moderadamente polar. Além disso, o gráfico de distribuição de DBE para a classe O2 da metodologia utilizando a fase estacionária Strata-X se assemelha ao resultado da metodologia apresentada anteriormente, utilizando a fase estacionária C₁₈. Nota-se que o MeOH não foi eficiente na extração de compostos de DBE 1 – lineares -, o que pode indicar a maior afinidade desses compostos com a fase estacionária. Este fato foi observado nos resultados anteriores com o solvente de extração MeOH. Uma possível solução para esta problemática seria a eluição sequencial com solvente extrator apolar, tal como DCM.

Além disso, é possível observar a presença de compostos com valores de DBE 3, 4, 5 e 6 para a classe O3, destacando-se o fato da ocorrência de maior intensidade para compostos de DBE 5, tal como ocorrera nas extrações das metodologias apresentadas anteriormente que utilizam o solvente MeOH. Por último, observa-se que para a classe O4 houve a maior intensidade de compostos com valor de DBE 3 e 4, também condizendo com os resultados apresentados anteriormente.

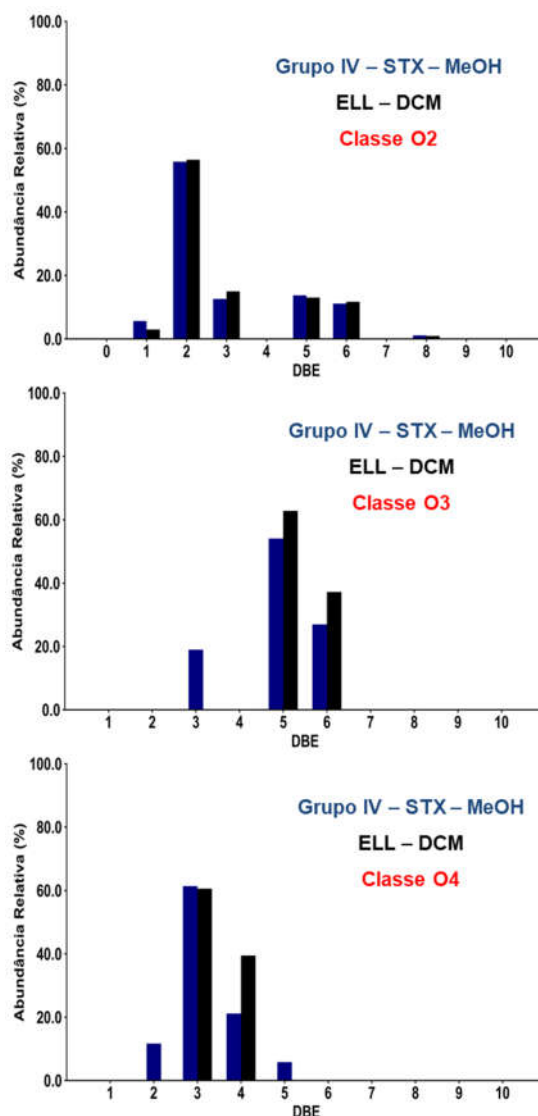


Figura 29. Distribuição de DBE por classes dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacioária Strata-X e ELL.

Ao se analisar a **Figura 29** para a classe O2, observa-se que no valor de DBE 2, o que apresentou a maior intensidade de compostos com número de carbonos na faixa de 7 a 11, indicando a provável presença de compostos de cadeias menores com possível caráter polar. Para a classe O3 e valor de DBE 4, observa-se compostos na faixa de número de carbonos de 8 a 16, para os compostos com valores de DBE 5 a faixa de número de carbono variou de 7 a 16 carbonos. Por último, observa-se os gráficos para a classe O4, para o valor de DBE 3 os compostos variaram em uma faixa

de 8 a 19 carbonos e para o valor de DBE 4 os compostos variaram em uma faixa de 10 a 20 carbonos.

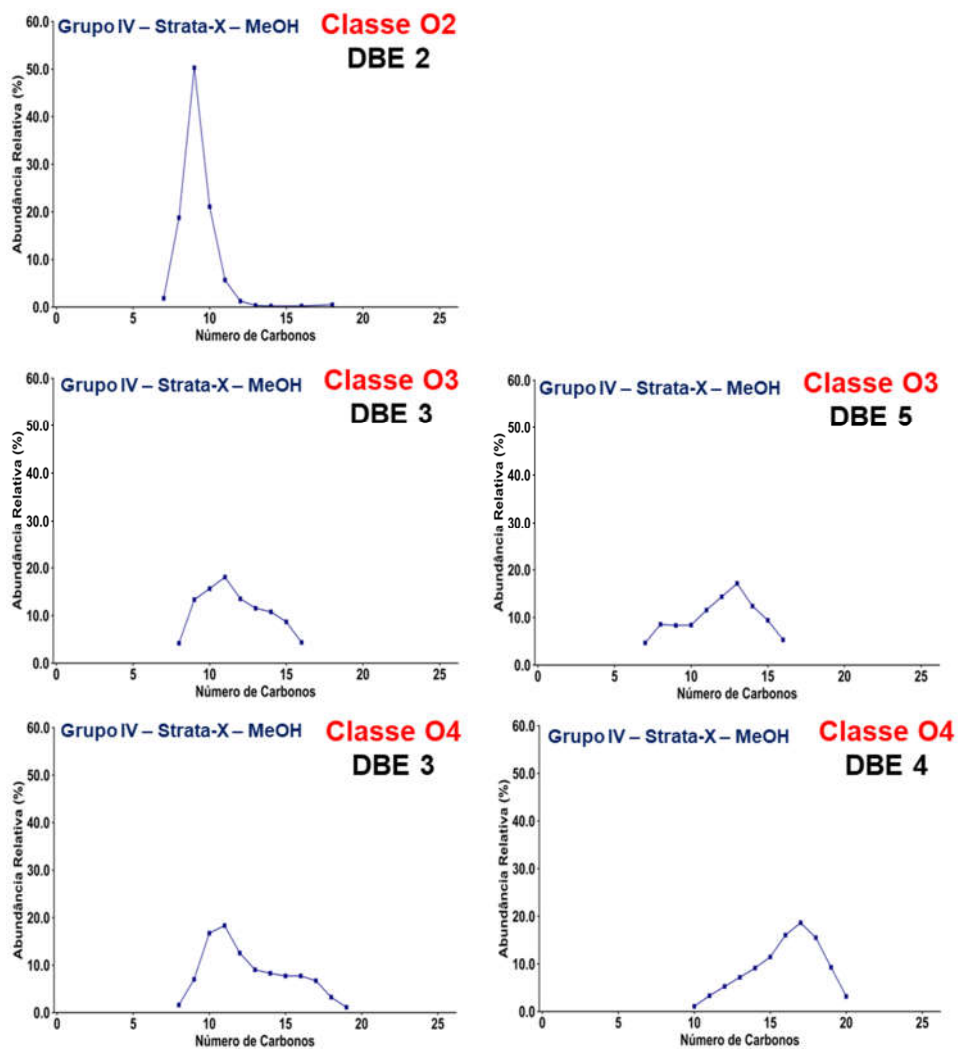


Figura 30. Gráfico do número de carbonos para DBE das classes O2, O3 e O4 dos extratos obtidos a partir dos espectros de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS da duplicata de extrações do grupo IV utilizando a fase estacionária Strata-X.

A **Figura 31** traz o diagrama de Venn contendo a inserção dos dados apresentados na **Tabela 7**.

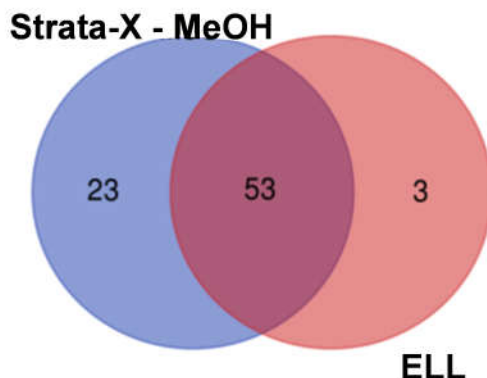


Figura 31. Diagrama de Venn construído após o processamento do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, a partir do número de fórmulas atribuídas dos extratos ELL; e fase sólida Strata-X apresentada na metodologia do grupo IV.

Pode-se observar pelo diagrama de Venn que houve a presença exclusiva de 23 espécies no extrato de Strata-X, sendo 15 espécies da classe O4, 5 espécies da classe O2 e 3 espécies da classe O3. Foram apresentadas 53 espécies em ambas as extrações e apenas 3 espécies exclusivas no extrato ELL, sendo 2 espécies da classe O2 e apenas 1 espécie da classe O4. Com base no tratamento de dados, pode-se inferir que a EFS utilizando a fase sólida Strata-X apresentada no grupo IV apresentou um desempenho de extração semelhante à ELL, ressalvada a extração de espécies da classe O4, que foi significativamente superior à ELL, as demais espécies extraídas foram semelhantes.

4.1.5 Comparação dos resultados apresentados nas metodologias

A partir dos resultados das metodologias estudadas, tem-se a possibilidade de comparar a eficiência das extrações apresentadas por cada uma. A **Tabela 8** apresenta o compilado do número de espécies extraídas e detectadas em cada metodologia, os resultados foram separados pelas respectivas frações de eluição com os diversos solventes, a fim de possibilitar a comparação das espécies que são extraídas por determinado solvente. Vale ressaltar que as extrações foram realizadas de forma sequencial, sendo informadas na tabela de acordo com a ordem de realização.

Tabela 8. Número médio de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para todas as metodologias apresentadas no trabalho

Identificação	Número Médio de Fórmulas Atribuídas			
	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
1 - Grupo I – ENV+ - ACN	45 ± 2	31 ± 5	34 ± 4	110 ± 11
2 - Grupo II – C ₁₈ – MeOH		8 ± 2	15 ± 5	72 ± 10
3 - Grupo II – C ₁₈ - DCM	54 ± 4	11 ± 1	14±7	79 ± 11
4 - Grupo II - ENV+ - MeOH	40 ± 1	6 ± 1	17 ± 4	63 ± 6
5 - Grupo II - ENV+ - DCM	67 ± 6	24 ± 11	28 ± 10	119 ± 27
6 - Grupo III - ENV - HEX	34 ± 1	-	-	34 ± 1
7 - Grupo III - ENV - DCM	54 ± 10	17 ± 5	6 ± 6	77 ± 21
8 - Grupo III - ENV - IPA	60 ± 2	47 ± 4	51 ± 4	158 ± 10
9 - Grupo III - HLB - HEX	34 ± 3	-	-	34 ± 3
10 - Grupo III - HLB - DCM	70 ± 6	52 ± 2	45±5	167 ± 12
11 - Grupo III - HLB - IPA	50 ± 5	38 ± 5	35± 10	123 ± 20
12 - Grupo IV – C ₁₈ – MeOH	48 ± 2	28 ± 2	42 ± 2	118 ± 6
13 - Grupo IV – Strata-X - MeOH	45 ± 1	20 ± 12	41 ± 17	106 ± 30
14 - ELL - DCM	37 ± 4	19 ± 12	28 ± 11	84 ± 28

Com base nos resultado da **Tabela 8**, observa-se que três metodologias apresentaram os melhores resultados para a extração de espécies da classe O2, sendo elas a metodologia do grupo II identificada em 5, as metodologias do grupo III identificadas em 8 e 10. Observa-se também, que o solvente HEX utilizado nas duas metodologias do grupo III extou somente as espécies da classe O2, possibilitando a extração seletiva dessas espécies. Em termos de número total de espécies, as metodologias do grupo III se destacaram em relação às demais, apresentando um número total de 269 ± 32 espécies para a fase sólida ENV e 324 ± 35 espécies para a fase sólida HLB, com grande destaque para a fração do extrato eluída com DCM, a qual apresentou um grande número de espécies atribuídas, em sua maioria, espécies da classe O2.

4.2 Semiquantificação dos ácidos naftênicos extraídos da matriz de água produzida brasileira

Nas discussões anteriores foram apresentados resultados referentes à caracterização de espécies de ácidos naftênicos extraídos por diferentes metodologias, que foram separadas e identificadas em quatro diferentes grupos.

Na presente discussão será apresentada a semiquantificação das espécies de ácidos naftênicos da classe O2, que foram caracterizadas anteriormente. Para tal, foi necessária a construção de uma curva analítica, utilizando-se padrão deuterado de ácido mirístico.

4.2.1 Construção e validação da metodologia semiquantitativa

Para a construção e a validação da metodologia semiquantitativa foram avaliadas algumas figuras de mérito, tais como, recuperação, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A curva foi construída em triplicata, em uma faixa de 0,5 a 5,0 mg.mL⁻¹ de padrão deuterado de ácido mirístico. Foi avaliada a relação da intensidade *versus* concentração, e os dados obtidos estão ilustrados na **Figura 32**.

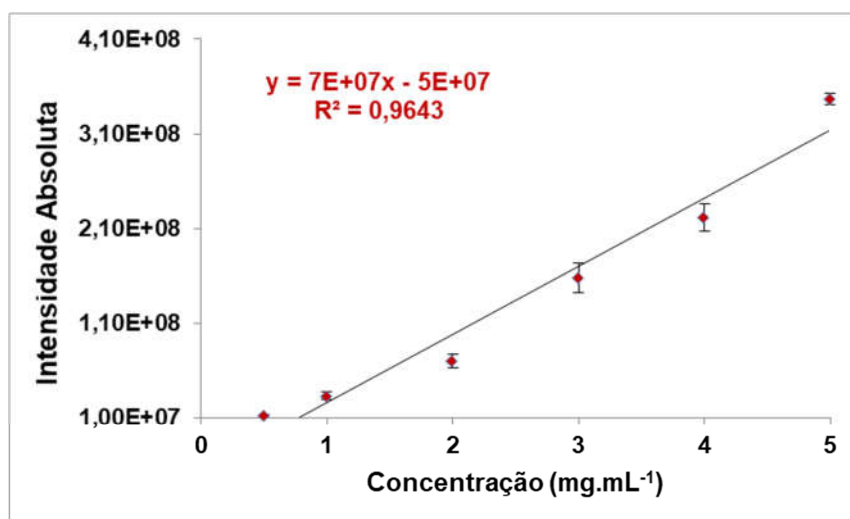


Figura 32. Curva analítica da intensidade absoluta *versus* concentração do padrão deuterado de ácido mirístico obtida por ESI(-)-Orbitrap-MS na faixa de 0,5 a 5,0 mg.mL⁻¹.

Com base na curva analítica do padrão deuterado de ácido mirístico apresentado na **Figura 32**, obteve-se a **Equação 1**. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi 0,9639, o que indica que houve linearidade entre as concentrações das soluções padrões analisadas.

$$(Eq. 1) X = \frac{Y+5,0x10^7}{7,0x10^7}$$

A validação da metodologia analítica consistiu na análise de soluções de padrão deuterado de ácido mirístico em três concentrações diferentes, sendo elas 0,75; 2,75 e 4,75 mg.mL⁻¹, realizadas em triplicatas e em três dias distintos, caracterizando as análises interdias.

A partir dessas análises, obtiveram-se os resultados apresentados na **Tabela 9**, os quais foram utilizados para a validação da metodologia de semiquantificação.

Tabela 9. Valores intradia e interdia da concentração teórica, da média de concentração observada para n = 3, do desvio padrão, do desvio padrão relativo, da recuperação e do coeficiente de variação obtidos pelas análises das soluções padrões de ácido mirístico para as concentrações 0,75; 2,75 e 4,75 mg.mL⁻¹ calculados a partir da equação da reta obtida pela curva analítica da **Figura 32** (continuação)

Concentração teórica / mg.mL ⁻¹	C (n=3)	DP	DPR / %	Re / %	CV / %
Intradia 1					
0,75	0,87	0,1375	13,75	116,4	15,75
2,75	2,57	0,0756	7,56	93,51	2,940
4,75	4,52	0,4484	44,84	95,24	9,913
Intradia 2					
0,75	0,86	0,0113	1,13	114,6	1,316
2,75	2,51	0,0515	5,15	91,42	2,048
4,75	4,92	0,2396	23,96	103,6	4,871

Tabela 9. Valores intradia e interdia da concentração teórica, da média de concentração observada para $n = 3$, do desvio padrão, do desvio padrão relativo, da recuperação e do coeficiente de variação obtidos pelas análises das soluções padrões de ácido mirístico para as concentrações 0,75; 2,75 e 4,75 mg.mL^{-1} calculados a partir da equação da reta obtida pela curva analítica da **Figura 32** (conclusão)

Concentração teórica / mg.mL^{-1}	C (n=3)	DP	DPR / %	Re / %	CV / %
Intradia 3					
0,75	0,92	0,0277	2,77	123,1	3,001
2,75	2,74	0,1656	16,56	99,57	6,047
4,75	4,61	0,0515	5,15	97,14	1,116
Interdia					
0,75	0,89	0,0338	3,38	118,0	3,819
2,75	2,61	0,1163	11,63	94,83	4,459
4,75	4,69	0,2071	20,71	98,65	4,419

Os valores de LD e LQ foram determinados a partir da análise do branco analítico por ESI(-)-Orbitrap-MS em três diferentes dias, apresentados na **Tabela 10** e calculados a partir das **Equações 2 e 3**.

Tabela 10. Valores da média de intensidade absoluta do branco (IA), desvio padrão da intensidade do branco analítico (DP), coeficiente angular da equação da curva (IC), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

IA branco	DP	IC	LD / mg.mL^{-1}	LQ / mg.mL^{-1}
$6,66 \times 10^5$	$2,25 \times 10^5$	$7,00 \times 10^7$	0,00963	0,0321

Os valores dos limites encontrados, assim como o coeficiente de determinação e os valores de recuperação, foram adequados e compatíveis com a curva analítica, o que permitiu a sua utilização para estimar e semiquantificar as espécies de ácidos naftênicos extraídas pelas metodologias de extração em fase sólida apresentadas no estudo anterior.

4.2.2 Semiquantificação e caracterização das espécies da classe O2 extraídas

A fim de estudar as metodologias de EFS para APs e compreender a diferença entre as fases estacionárias na extração desses compostos em uma mesma matriz de estudo, realizou-se a reprodução e comparação das metodologias de extração em fase sólida apresentadas na literatura. Foram reproduzidas sete diferentes metodologias apresentadas por quatro autores. Além disso, servindo como parâmetro de comparação, realizou-se a metodologia de extração líquido-líquido adaptada da metodologia 5520 B do Standard Methods, utilizando como solvente extrator DCM, atualmente utilizada nos processos de extrações de APs pelo Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM). No experimento apresentado foram avaliados os resultados obtidos pela extração da mesma matriz de AP pelas diferentes metodologias de extração.

Cada extração EFS e ELL foi realizada em duplicata, utilizando-se um volume de 25 mL de AP em pH 2,0. Tendo em vista que para a realização dos experimentos foi utilizada a mesma matriz de AP, é válida a comparação entre os métodos a partir dos espectros de massas e dos processamentos de dados resultantes das análises no espectrômetro de massas de ultra-alta resolução *Q-Exactive Orbitrap*.

Partindo dos resultados obtidos pelo processamento dos espectros de massa obtidos por ESI(-)-Orbitrap-MS foi possível proceder com a caracterização e semiquantificação dos extratos de cada metodologia.

4.2.2.1 Resultados da metodologia do grupo I

Conforme apresentado nos resultados anteriores, a partir do espectro da **Figura 3**, construiu-se a **Tabela 11**, a qual apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes à classes O2.

Tabela 11. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo I

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo I – ENV+ - ACN	45 ± 2
ELL - DCM	37 ± 4

Valendo-se da **Equação 1**, foi possível realizar a semiquantificação das espécies de ANs presentes no extrato. Os valores obtidos foram organizados de forma gráfica a fim de facilitar a compreensão e interpretação desses resultados e estão ilustrados na **Figura 33**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE.

A partir da **Figura 33**, percebe-se que houve a maior concentração das espécies nos valores de DBE 1, especificamente nos números de carbono 16 e 18, indicando as fórmulas $C_{16}H_{32}O_2$ e $C_{18}H_{36}O_2$ e DBE 2, nos números de carbono 8, 9 e 10, indicando as fórmulas $C_8H_{14}O_2$, $C_9H_{16}O_2$ e $C_{10}H_{18}O_2$. Tal comportamento se mostra de acordo com os resultados apresentados na **Figura 33**, em que as maiores intensidades observadas foram atribuídas aos compostos com valores de DBE 1 e 2.

Além disso, é possível notar que para os demais valores de DBE e número de carbono, as concentrações se mostraram semelhantes.

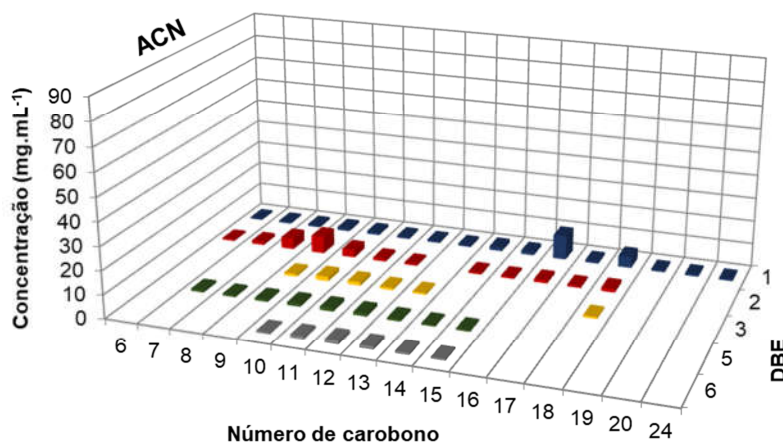


Figura 33. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono

e dos valores de DBE do extrato ACN para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo I com a fase estacionária ENV+.

4.2.2.2 Resultados da metodologia do grupo II

A partir do espectro da **Figura 8**, construiu-se a **Tabela 12**, a qual apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes à classes O2 presentes no extrato da metodologia do grupo II, utilizando a fase sólida C18.

Tabela 12. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo II com a fase estacionária C18

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo II – C ₁₈ – MeOH	40 ± 3
Grupo II – C ₁₈ - DCM	54 ± 4
ELL - DCM	37 ± 4

Com o uso da **Equação 1**, foi possível realizar a semiquantificação das espécies de ANs da classe O2 presentes nos dois extrato. Os valores obtidos foram organizados de forma gráfica a fim de facilitar a compreensão e interpretação desses resultados e estão ilustrados na **Figura 34**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE para os extratos de MeOH e DCM.

A partir da **Figura 34** é possível observar que as espécies presentes no extrato de MeOH apresentam maior concentração, fato esse que pode ser explicado devido à extração sequencial que é realizada, sendo o MeOH o primeiro solvente de eluição. Destaca-se ainda a maior concentração de compostos com DBE 2 no extrato de MeOH, especificamente os compostos com número de carbono 8, 9 e 10, indicando as fórmulas C₈H₁₄O₂, C₉H₁₆O₂ e C₁₀H₁₈O₂.

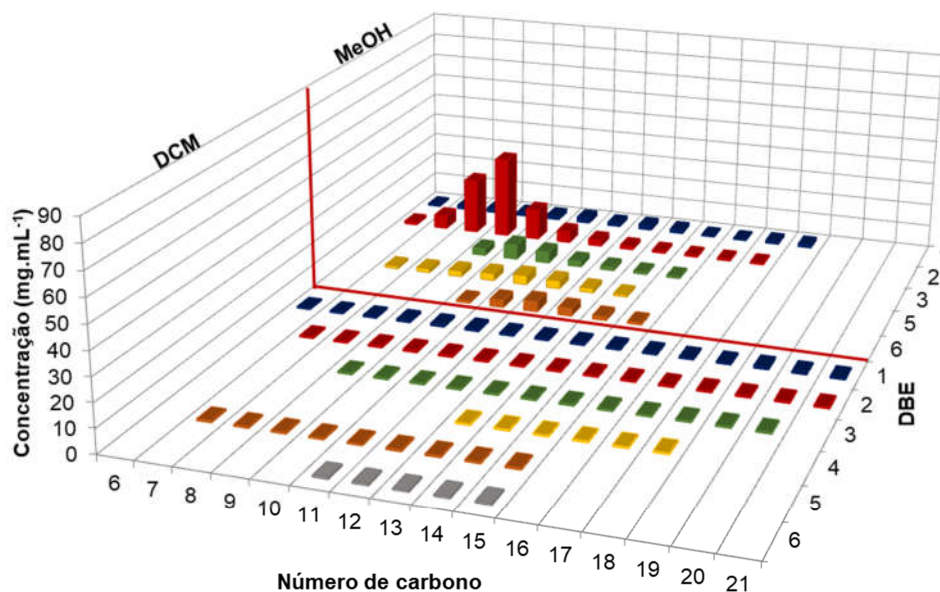


Figura 34. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de MeOH e DCM para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo II com a fase estacionária C₁₈.

Apesar de o solvente DCM ter extraído o maior número de espécies, é perceptível que essas espécies estão presentes em menor concentração, se comparadas às espécies do extrato de MeOH. Esses resultados se dão pelo fato do DCM ser usado para extração de forma sequencial, após a extração com MeOH.

Baseando-se nos dados do espectro de massas apresentados na **Figura 7**, construiu-se a **Tabela 13**, a qual apresenta o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes às classes O2 presentes no extrato da metodologia do grupo II, utilizando a fase sólida ENV+.

Tabela 13. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo II com a fase estacionária ENV+

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo II – ENV+ – MeOH	40 ± 1
Grupo II – ENV+ - DCM	67 ± 6
ELL - DCM	37 ± 4

Com auxílio da **Equação 1**, foi possível realizar a semiquantificação das espécies de ANs da classe O2 presentes nos três extrato. Os valores obtidos foram organizados de forma gráfica a fim de facilitar a compreensão e interpretação desses resultados e estão ilustrados na **Figura 35**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE para os extratos de MeOH e DCM.

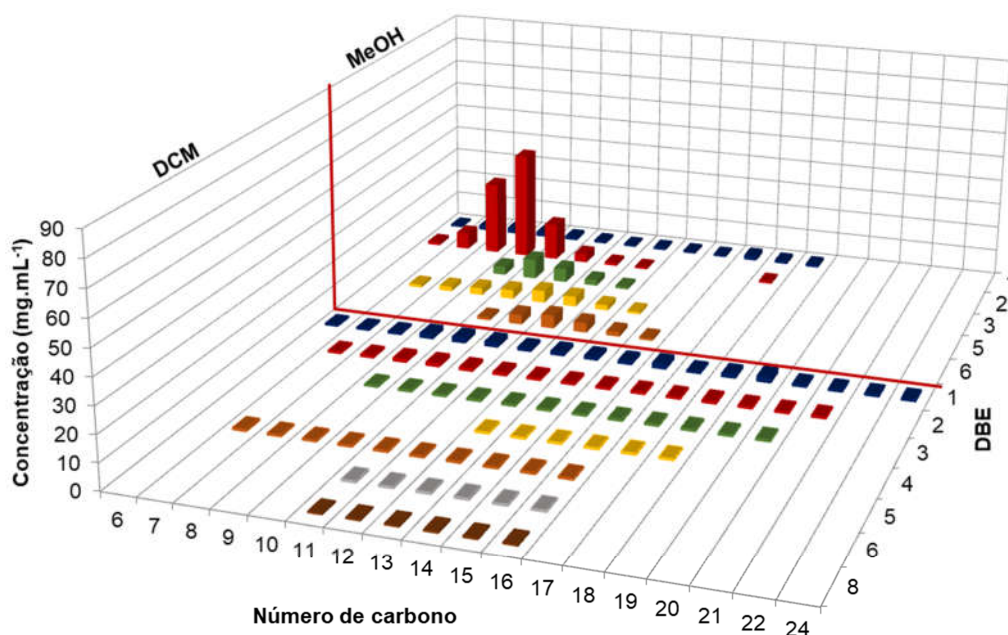


Figura 35. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de MeOH e DCM para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo II com a fase estacionária ENV+.

A partir da **Figura 35** é possível observar que assim como na metodologia utilizando a fase estacionária C₁₈, na metodologia utilizando a fase estacionária ENV+ as espécies presentes no extrato de MeOH também apresentaram maior concentração, devido ao fato de que a extração sequencial é realizada primeiramente com o solvente extrator MeOH. Destaca-se também que a maior concentração foi de compostos com DBE 2 no extrato de MeOH, assim como nos resultados apresentados anteriormente, especificamente os compostos com número de carbono 8, 9 e 10, indicando as fórmulas C₈H₁₄O₂, C₉H₁₆O₂ e C₁₀H₁₈O₂. Apesar de o solvente DCM ter extraído o maior número de espécies, é perceptível que essas espécies estão presentes em menor concentração, se comparadas às espécies do extrato de MeOH. Esses resultados se

dão pelo fato do DCM ser usado após o MeOH na metodologia de extração.

4.2.2.3 Resultados das metodologias do grupo III

A **Tabela 14**, construída a partir dos dados obtidos pelo processamento do espectro de massas da **Figura 16**, traz o número de fórmulas atribuídas para as espécies pertencentes à classes O2 presentes no extrato da metodologia do grupo III, utilizando a fase sólida ENV.

Tabela 14. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo III com a fase estacionária ENV

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo III – ENV – HEX	34 ± 1
Grupo III – ENV - DCM	54 ± 10
Grupo III – ENV - IPA	59 ± 12
ELL - DCM	37 ± 4

Com o uso da **Equação 1**, foi possível realizar a semiquantificação das espécies de ANs da classe O2 presentes nos dois extrato. Os valores obtidos foram organizados de forma gráfica a fim de facilitar a compreensão e interpretação desses resultados e estão ilustrados na **Figura 36**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE para os extratos de HEX, DCM e IPA.

Pela análise da **Figura 36**, percebe-se que para os extratos de HEX e DCM, os compostos de DBE 2 apresentaram maior concentração, destacando-se os compostos com 7, 8 e 9 carbonos, especificamente os compostos com as fórmulas $C_7H_{12}O_2$, $C_8H_{14}O_2$ e $C_9H_{16}O_2$. Já para o extrato de IPA, os compostos com DBE 1 foram os que apresentaram maior concentração, com destaque para os compostos com 9, 10 e 11 carbonos, especificamente os compostos com as fórmulas $C_9H_{18}O_2$, $C_{10}H_{20}O_2$ e $C_{11}H_{22}O_2$.

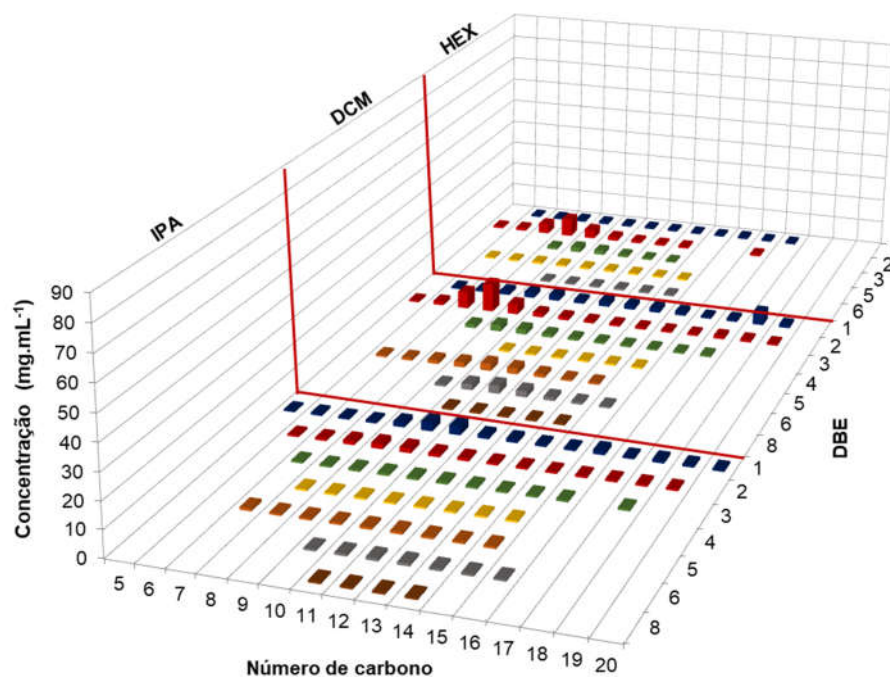


Figura 36. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de HEX, DCM e IPA para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo III com a fase estacionária ENV.

Para o grupo III, na segunda metodologia realizada com a fase estacionária HLB, a **Figura 20** traz o espectro de massas, o qual foi processado e seus dados foram utilizados para a criação da **Tabela 15**.

Tabela 15. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo III com a fase estacionária HLB

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo III – HLB – HEX	34 ± 3
Grupo III – HLB - DCM	70 ± 6
Grupo III – HLB - IPA	68 ± 2
ELL - DCM	37 ± 4

A partir da **Equação 1** foi possível realizar a semiquantificação das espécies de

ANs da classe O2 presentes nos três extrato obtidos. Os valores foram organizados de forma gráfica a fim de facilitar a compreensão e interpretação desses resultados e estão ilustrados na **Figura 37**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE para os extratos de HEX, DCM e IPA.

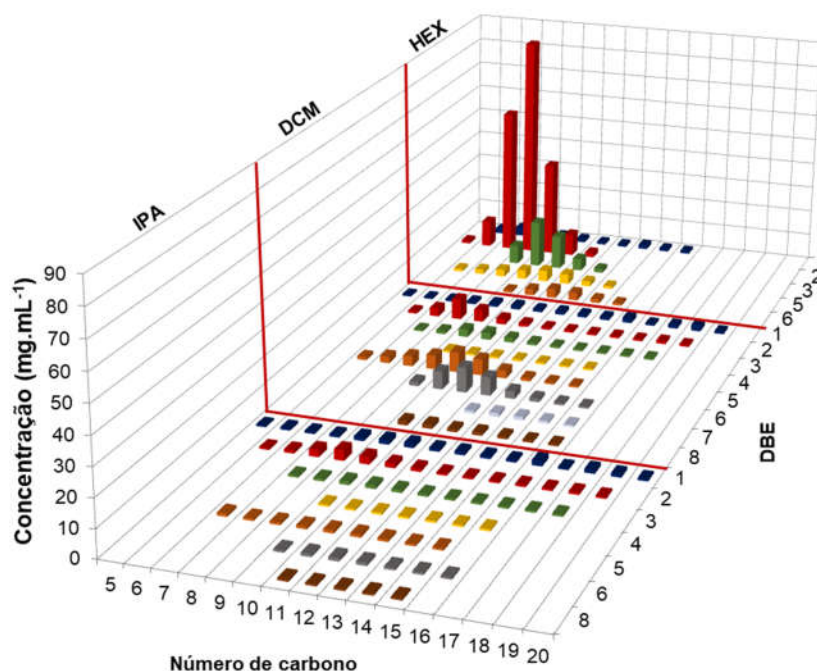


Figura 37. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE dos extratos de HEX, DCM e IPA para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo III com a fase estacionária HLB.

Pela análise da **Figura 37**, percebe-se que para o extrato de HEX, os compostos de DBE 2 apresentaram maior concentração, destacando-se os compostos com 7, 8 e 9 carbonos, especificamente os compostos com as fórmulas $C_7H_{12}O_2$, $C_8H_{14}O_2$ e $C_9H_{16}O_2$. Além disso, percebe-se uma grande diferença na concentração dos compostos do extrato de HEX, fato que pode ser justificado por este extrato se tratar da primeira eluição. Já para o extrato de DCM, os compostos com DBE 2, 5 e 6 foram os que apresentaram maior concentração. Para o extrato de IPA, percebe-se uma maior concentração em alguns compostos de DBE 2, com 8, 9 e 10 carbonos, especificamente os compostos com as fórmulas $C_9H_{16}O_2$, $C_{10}H_{18}O_2$ e $C_{11}H_{20}O_2$. Além disso, percebe-se que os compostos no extrato IPA foram os que apresentaram menor

concentração, o que é esperado, haja vista que este extrato foi o último a ser eluído.

4.2.2.4 Resultados da metodologia do grupo IV

A **Tabela 16** aborda os resultados obtidos pelo processamento do espectro de massas apresentado anteriormente na **Figura 24**, o qual traz os resultados referentes à extração da primeira metodologia do grupo IV.

Tabela 16. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo IV com a fase estacionária C18

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo IV – C ₁₈ - MeOH	48 ± 2
ELL - DCM	37 ± 4

Com o uso da **Equação 1**, foi possível realizar a semiquantificação das espécies de ANs da classe O2 presentes no extrato. Os valores obtidos foram organizados de forma gráfica a fim de facilitar a compreensão e interpretação desses resultados e estão ilustrados na **Figura 38**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE para o extrato de MeOH.

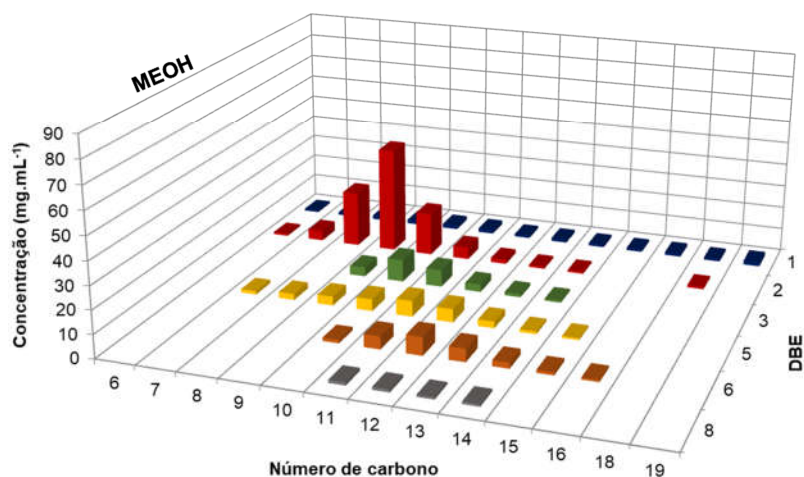


Figura 38. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono

e dos valores de DBE do extrato MeOH para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo IV com a fase estacionária C₁₈.

Analisando-se a **Figura 38**, é possível perceber que as espécies de DBE 2 apresentaram maior concentração, especificamente nos compostos 8, 9 e 10 carbonos, indicando as fórmulas C₈H₁₄O₂, C₉H₁₆O₂ e C₁₀H₁₈O₂, esses resultados corroboram com os resultados apresentados anteriormente, para metodologias que utilizam a mesma fase estacionária e a mesma fase móvel.

Além disso, observa-se os valores de DBE 3, 5 e 6 também apresentaram concentrações relativamente altas para alguns de seus compostos, especificamente os compostos com 10, 11 e 12 carbonos.

A **Tabela 17** apresenta o número de espécies da classe O2 para a segunda metodologia do grupo IV, utilizando a fase estacionária Strata-X.

Tabela 17. Número médio de fórmulas atribuídas da classe O2 das extrações ELL e EFS, a partir do espectro de massas de ESI(-)-Orbitrap-MS, usando a metodologia apresentada no grupo IV com a fase estacionária Strata-X

Identificação	Número médio de fórmulas atribuídas
Grupo IV – Strata-X - MeOH	45 ± 1
ELL - DCM	37 ± 4

Como auxílio da **Equação 1** realizou-se a semiquantificação das espécies de ANs da classe O2 presentes no extrato. Além disso, com a finalidade de facilitar a compreensão e interpretação dos dados, os valores foram organizados de forma gráfica e estão ilustrados na **Figura 39**, a qual apresenta o gráfico da distribuição da concentração *versus* o número de carbono *versus* DBE para os extratos de HEX, DCM e IPA.

Analisando-se a **Figura 39**, é possível perceber que, assim como nos resultados apresentados anteriormente, as espécies de DBE 2 foram as que apresentaram maior concentração, especificamente nos compostos 8, 9 e 10 carbonos, indicando as fórmulas C₇H₁₂O₂, C₈H₁₄O₂ e C₉H₁₆O₂. Além disso, nota-se a baixa concentração de

compostos de DBE 1, indicando não haver uma boa interação da fase móvel com esses compostos adsorvidos na fase estacionária.

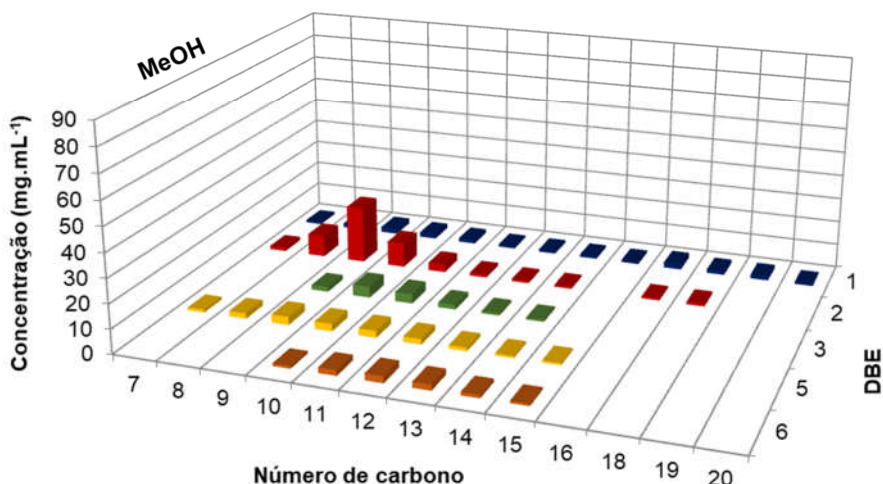


Figura 39. Distribuição da concentração das espécies ácidas em função do número de carbono e dos valores de DBE do extrato MeOH para a classe O2 utilizando a metodologia do grupo IV com a fase estacionária Strata-X.

4.2.2.5 Comparação dos resultados apresentados nas metodologias

A partir dos resultados das metodologias estudadas, tem-se a possibilidade de comparar a eficiência das extrações apresentadas por cada uma. Em uma análise geral, pode-se concluir que os compostos com valores de DBE 1 e 2 foram majoritariamente extraídos, especificamente compostos com baixo número de carbono, variando-se de 6 a 11 carbonos.

Além disso, é possível perceber que as extrações sequenciais utilizando um gradiente de polaridade na fase móvel apresentou resultados mais satisfatórios, em relação às metodologias de extrações que aplicaram somente um solvente extrator. Outro fato a ser destacado é a alta concentração de compostos de DBE 2 em praticamente todos os extratos, especificamente os compostos com fórmula molecular $C_7H_{12}O_2$, $C_8H_{14}O_2$, $C_9H_{16}O$, $C_{10}H_{18}O_2$ e $C_{11}H_{20}O_2$.

4.3 Otimização e testes de metodologias de extração em fase sólida para ácidos naftênicos

4.3.1 Testes de metodologias de EFS com padrão de ácido naftênico

A fim de se ter uma padronização das metodologias de EFS, realizou-se nessa primeira etapa de testes, extrações utilizando cinco diferentes fases sólidas, baseando-se nos resultados obtidos anteriormente para cada metodologia. No experimento apresentado, foram avaliadas três variáveis, sendo elas: o pH da amostra, o tipo de sorvente utilizado e o solvente para eluição (metanol, metanol/ácido fórmico 9:1(v/v) e diclorometano).

Dentre as fases sólidas utilizadas no experimento, duas delas foram obtidas comercialmente; Strata-X® 200 mg e Isolute® ENV+ 200 mg. As demais fases sólidas (C8; C18; APS) foram empacotadas em cartucho de vidro de 6,0 mL com 1000 mg do respectivo sorvente.

A fim de se ter controle sobre os compostos extraídos e suas concentrações, utilizou-se como amostra para extração uma solução de compostos ácidos na concentração de 10 mg.mL⁻¹, obtida comercialmente, da fabricante Sigma Aldrich, a qual foi nomeada de solução Padrão Sigma.

Tendo em vista que para a realização dos experimentos, utilizou-se a mesma matriz da solução de Padrão Sigma em pH 2,0 e pH 7,0, é válida a comparação entre os métodos a partir dos espectros de massas e dos processamentos de dados resultantes das análises no espectrômetro de massas de ultra-alta resolução Q-Exactive Orbitrap.

4.3.1.1 Extração com a fase sólida C8

Para a extração da solução Padrão Sigma utilizando o sorvente de fase reversa C8, variou-se o solvente de eluição, iniciando-se a eluição da primeira fração com metanol, e em seguida a eluição de outra fração, com metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v), a fim de garantir a total recuperação dos analitos desejáveis.

Para este estudo, realizou-se duas extrações, a primeira com a amostra de pH 7 e a segunda com a amostra de pH2. A **Figura 40** apresenta os espectros de massas resultantes dos extratos em comparação com o espectro de massas da injeção direta do Padrão Sigma.

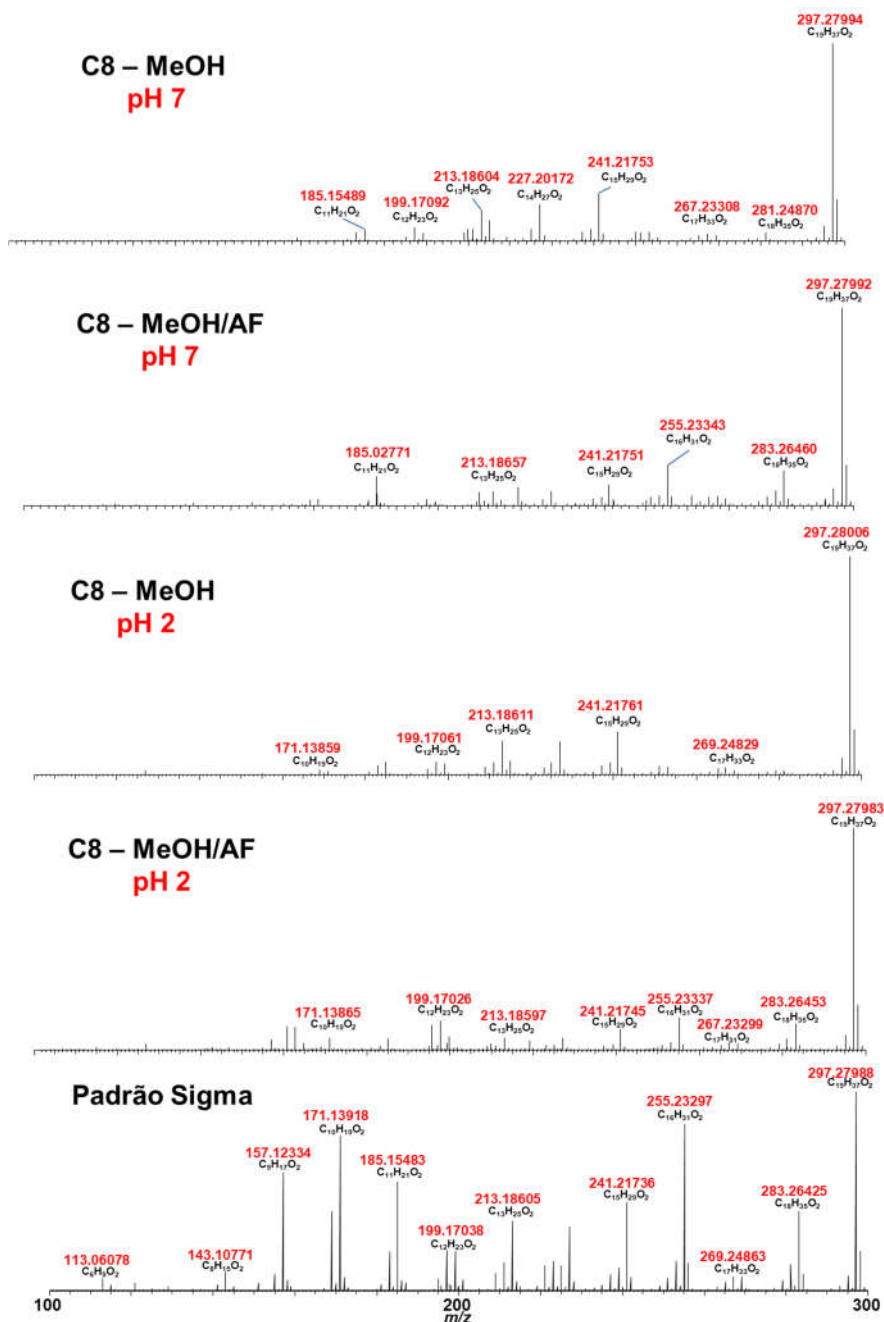


Figura 40. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com metanol, e do extrato eluído com metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v) para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida C8.

A partir dos espectros apresentando na **Figura 40**, pode-se observar que foi possível extrair algumas espécies de ANs presentes no Padrão Sigma. Observa-se também, que o metanol puro não foi suficiente para recuperação total das espécies, sendo que algumas espécies foram detectadas com intensidade absoluta elevada nos extratos eluídos com o metanol acidificado. Também observa-se um pico mais intenso que os demais com m/z 297,28, referente ao ácido nonadecanóico. Os demais sinais dos espectros dos extratos apresentam menor intensidade em comparação com o espectro do Padrão Sigma, no entanto, é possível observar a presença desses compostos nas frações extraídas.

Apesar disso, não é possível realizar uma análise profunda baseando-se apenas nos espectros de massas dos extratos. Portanto, faz-se necessário o processamento de dados e o estudo dos resultados obtidos a partir de tal processamento.

A **Tabela 18** apresenta o número de fórmulas atribuídas para a classe O2 após o tratamento dos dados pelo software Composer.

Tabela 18. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa das frações de metanol e metanol acidificado do extrato da metodologia utilizando o sorvente C8.

Identificação	Nº de fórmulas atribuídas	Recuperação relativa (%)
Pd. Sigma	55	-
C8 – MeOH – pH 2	44	80,00
C8 – MeOH/AF – pH 2	35	63,64
C8 – MeOH – pH 7	31	53,36
C8 – MeOH/AF – pH 7	36	65,46

Analisando-se os resultados apresentados na **Tabela 18** é possível concluir que em nenhuma das metodologias houve a extração completa dos compostos presentes na solução Padrão Sigma. No entanto, nota-se que em 3 extrações o índice de recuperação relativa passou de 60%, e na extração da solução em pH2 utilizando MeOH esse índice alcançou os 80% de recuperação. Ressalta-se que recuperação foi

calculada tendo como base as 55 fórmulas atribuídas para o Padrão Sigma como 100%, e então se realizou o cálculo de proporcionalidade.

A partir do número de espécies que foram atribuídas aos extratos e para auxiliar na interpretação dos dados, construiu-se o diagrama de Venn presente na **Figura 41**.

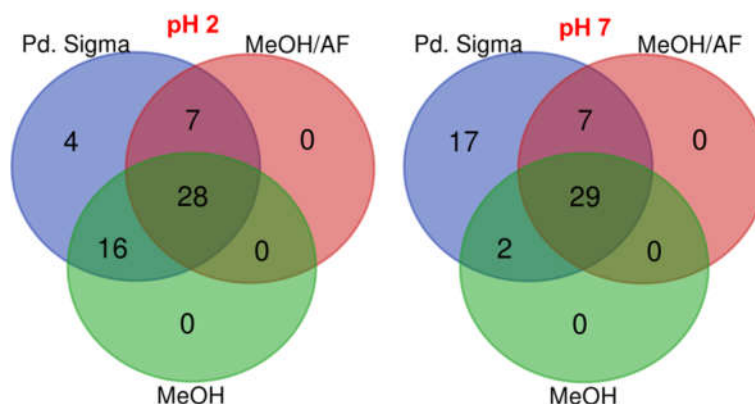


Figura 41. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando o sorvente C8 com as amostras de pH 2 e pH 7.

Analisando-se a **Figura 41**, é possível perceber que a maioria das espécies estão presentes na interseção dos três extratos, tanto nos extratos da solução de pH 2 quanto nos extratos da solução de pH 7. No entanto, observa-se que em ambas as extrações não foi possível recuperar algumas espécies que estavam presentes no Padrão Sigma, desta forma, se faz necessária a identificação de tais espécies, a fim de se traçar um perfil de possíveis interações dessas espécies com o sorvente, fato que possivelmente contribuiu para a sua retenção na fase sólida.

Dessa forma, a **Tabela 19** apresenta as espécies não identificadas nos extratos e seus valores de DBE.

Tabela 19. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida C8 (continuação)

Espécie	DBE	Presença pH	Presença pH	Presença
		2	7	Sigma
$C_6H_{10}O_2$	2	Sim	Não	Sim
$C_6H_{12}O_2$	1	Sim	Não	Sim

Tabela 19. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida C8 (conclusão)

Espécie	DBE	Presença pH	Presença pH	Presença
		2	7	Sigma
C ₇ H ₆ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₈ H ₁₄ O ₂	2	Sim	Não	Sim
C ₁₀ H ₁₆ O ₂	3	Sim	Sim	Sim
C ₁₁ H ₁₄ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₁₂ H ₁₆ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₁₃ H ₁₈ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₁₃ H ₂₀ O ₂	4	Sim	Não	Sim
C ₁₄ H ₂₀ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₁₅ H ₂₂ O ₂	5	Sim	Sim	Sim
C ₁₆ H ₂₄ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₁₇ H ₂₆ O ₂	5	Não	Sim	Sim
C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1	Sim	Sim	Sim
C ₁₈ H ₃₂ O ₂	3	Não	Não	Sim
C ₁₈ H ₂₈ O ₂	5	Não	Não	Sim
C ₂₀ H ₃₄ O ₂	4	Não	Não	Sim

A partir das análises das espécies não identificadas nos extratos, é possível perceber uma relação entre os valores de DBE e a sua retenção na fase sólida, uma vez que há ocorrência de maior retenção das espécies de DBE 5 na solução de pH 5, se tratando das espécies aromáticas e naftênicas. Além disso, é possível notar, que mesmo em menor quantidade, há também a retenção de algumas espécies com valores de DBE 1, 2, 3 e 4. Esses resultados indicam que possivelmente há pouca ou nenhuma interação dessas espécies com o solvente de eluição, nesse caso o MeOH e MeOH/AF

4.3.1.2 Extração com a fase sólida C18

Assim como na extração da metodologia anterior, a extração utilizando o sorvente C18 também foi realizada iniciando-se a eluição com metanol, e em seguida, uma segunda fração foi eluída utilizando-se metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v). A **Figura 42** apresenta a comparação dos espectros de massas do Padrão Sigma e das frações do extrato.

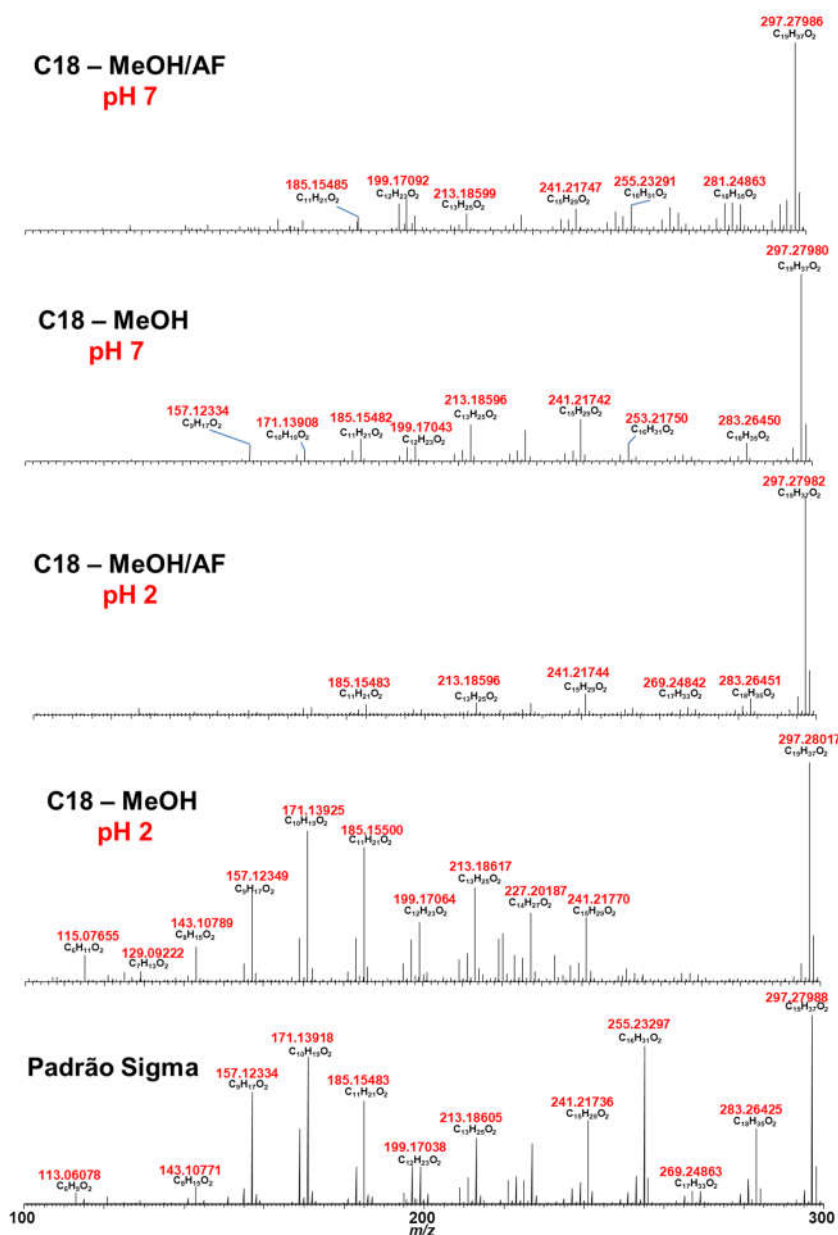


Figura 42. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão

Sigma, do extrato eluído com metanol, e do extrato eluído com metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v) para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida C18.

Analisando a **Figura 42**, observa-se nitidamente que o espectro de massas do extrato de MeOH para a solução de pH 2 foi o que apresentou a maior semelhança em relação ao Padrão Sigma, por outro lado, nota-se que o espectro de massas do extrato de MeOH/AF para a mesma solução apresentou poucos picos perceptíveis, o que pode ser explicado pelo fato dessa extração ocorrer de forma sequencial. Além disso, os espectros de massa para os dois extratos da solução de pH 7 apresentam picos com baixa intensidade, porém, semelhantes aos picos de m/z observados no Padrão Sigma.

Para uma análise mais específica é necessário o tratamento de dados, dessa forma, os espectros de massas foram processados pelo software Composer a fim de fornecer informações mais específicas.

Dessa forma, a partir do processamento de dados, foi possível construir a **Tabela 20**, a qual apresenta o número de fórmulas atribuídas para a classe O2 após o tratamento dos dados pelo software Composer.

Tabela 20. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa das frações de metanol e metanol acidificado do extrato da metodologia utilizando o sorvente C18

Identificação	Nº de fórmulas atribuídas	Recuperação relativa (%)
Pd. Sigma	55	-
C18 – MeOH – pH 2	46	83,63
C18 – MeOH/AF – pH 2	31	56,36
C18 – MeOH – pH 7	42	76,37
C18 – MeOH/AF – pH 7	39	70,91

Analisando-se os resultados apresentados na **Tabela 20** conclui-se que em nenhuma das metodologias houve a extração completa dos compostos presentes na solução Padrão Sigma. Todavia, o extrato de MeOH da solução de pH 2 apresentou 46 fórmulas atribuídas, número próximo ao encontrado no Padrão Sigma, portanto, pode-

se inferir que esse solvente tem uma boa interação com as espécies ácidas adsorvidas na fase sólida C18. Em relação ao extrato de MeOH/AF ter apresentado baixo índice de recuperação vai de acordo com o esperado, já que a extração ocorre de forma sequencial. Além disso, nota-se que houve uma recuperação relativa satisfatória para a solução de pH 7, já que em ambos extratos esse índice passou de 60%. Ressalta-se que recuperação foi calculada tendo como base as 55 fórmulas atribuídas para o Padrão Sigma como 100%, e então se realizou o cálculo de proporcionalidade.

A partir do número de espécies que foram atribuídas aos extratos e para auxiliar na interpretação dos dados, construiu-se o diagrama de Venn presente na **Figura 43**.

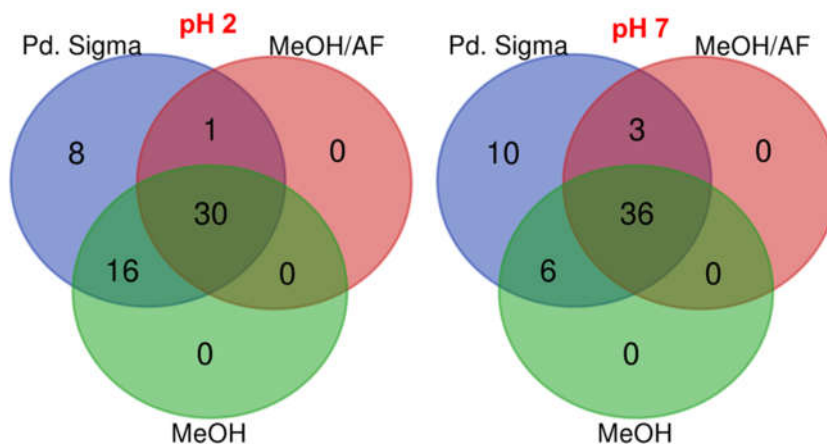


Figura 43. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando o sorvente C18 com as amostras de pH 2 e pH 7.

Assim como nos resultados anteriores, a partir da análise da **Figura 43**, é possível perceber que a maioria das espécies estão presentes na interseção dos três extratos, tanto nos extratos da solução de pH 2 quanto nos extratos da solução de pH 7. Atenta-se ainda que na interseção do extrato de MeOH com o Padrão Sigma na solução de pH 2 houve a presença de um número significativo de espécies, fato que se é esperado, visto que a extração sequencial se inicia com o solvente MeOH. Assim como ocorreu anteriormente, observa-se que em ambas as extrações não foi possível recuperar algumas espécies que estavam presentes no Padrão Sigma, então é

necessário a identificação das espécies não extraídas para tentar entender o que pode ter ocorrido.

Dessa forma, a **Tabela 21** apresenta as espécies não identificadas nos extratos e seus valores de DBE.

Tabela 21. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida C18

Espécie	DBE	Presença pH 2	Presença pH 7	Presença Sigma
$C_6H_{10}O_2$	2	Não	Não	Sim
$C_6H_{12}O_2$	1	Não	Não	Sim
$C_7H_6O_2$	5	Não	Não	Sim
$C_7H_{14}O_2$	1	Não	Sim	Sim
$C_8H_{16}O_2$	1	Sim	Não	Sim
$C_{11}H_{14}O_2$	5	Sim	Não	Sim
$C_{12}H_{16}O_2$	5	Sim	Não	Sim
$C_{16}H_{32}O_2$	1	Não	Não	Sim
$C_{16}H_{24}O_2$	5	Não	Sim	Sim
$C_{18}H_{36}O_2$	1	Não	Sim	Sim
$C_{19}H_{34}O_2$	3	Sim	Não	Sim
$C_{19}H_{36}O_2$	2	Sim	Não	Sim
$C_{20}H_{34}O_2$	4	Não	Não	Sim

Diferente dos resultados apresentados anteriormente, na extração utilizando a fase sólida C18 houve uma menor quantidade de espécies não identificadas, o que pode indicar uma melhor eficiência de extração. Além disso, percebe-se que algumas das espécies não identificadas na metodologia utilizando o sorvente C8, também não foram identificadas na metodologia utilizando o sorvente C18, o que poderia indicar que tais espécies possuem maior afinidade com a fase sólida. Outro fato que diverge dos resultados anteriores é a menor presença de compostos de valor de DBE 5, sendo que na extração utilizando C8 houve maior presença de compostos de DBE 5. A ausência

desses compostos nos extratos pode indicar que não há interação suficiente entre os compostos e os solventes de eluição nesse caso o MeOH e MeOH/AF.

4.3.1.3 Extração com a fase sólida APS

Outra metodologia abordada nesse estudo consistiu na utilização do sorvente aminopropil sílica (APS) como fase sólida. Diferente das metodologias apresentadas anteriormente, o APS é um sorvente polar, constituindo uma fase sólida polar e que atua com mecanismo de troca iônica, no experimento apresentado a eluição ocorreu com diclorometano.

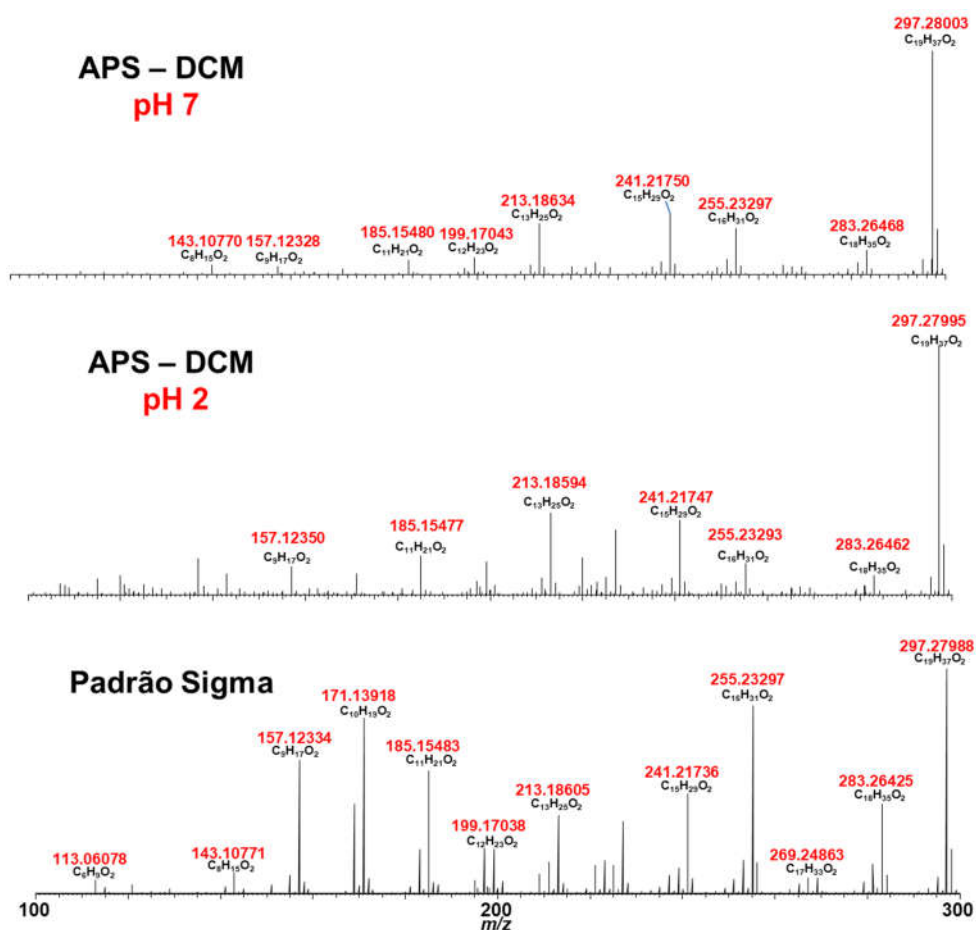


Figura 44. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com diclorometano para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida APS

A **Figura 44** apresenta os espectros de massas dos extratos obtidos utilizando a metodologia APS e o espectro de massas do Padrão Sigma. Analisando-se os espectros, observa-se uma similaridade nos perfis, indicando que houve a extração de algumas das espécies de ANs presentes no Padrão Sigma.

No entanto, para a avaliação das extrações, é necessária a análise dos dados processados. A **Tabela 22** apresenta o número de fórmulas atribuídas para o extrato de ANs e para o Padrão Sigma.

Tabela 22. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa dos extratos da metodologia utilizando o sorvente APS

Identificação	Nº de fórmulas atribuídas	Recuperação relativa (%)
Pd. Sigma	55	-
APS – DCM – pH 2	28	50,90
APS – DCM – pH 7	26	47,27

Observa-se que para a metodologia utilizando o sorvente APS, o número de fórmulas atribuídas apresentou uma inclinação negativa se comparado com os números de fórmulas atribuídas para as metodologias anteriores. Apesar da similaridade nos perfis dos espectros de massas, o número de espécies atribuídas obtidas após o processamento de dados não apresentou resultados satisfatórios.

Um dos possíveis motivos para a recuperação relativamente baixa na extração dessa metodologia é a utilização do solvente diclorometano, apesar de ser um solvente apolar, existe a possibilidade de que não tenha sido o capaz de eluir todas as espécies adsorvidas no sorvente. Outra possibilidade é a de que a água tenha eluído algumas espécies, durante o processo de lavagem para a retirada de sal. Uma terceira possibilidade para a baixa recuperação é a pouca interação dos analitos com o sorvente, existindo a possibilidade de não adsorção com o sorvente no momento da inserção da amostra no cartucho. O experimento foi repetido com a finalidade de se detectar a causa da baixa recuperação e os resultados posteriores apresentarão algumas possíveis justificativas para esse resultado insatisfatório.

4.3.1.4 Extração com a fase sólida ENV+

Uma das metodologias abordadas nos resultados anteriores e que apresentou bons índices de recuperação foi a metodologia utilizando a fase sólida ENV+, portanto, nos resultados a seguir serão apresentados alguns índices sobre a eficiência da metodologia com a solução Padrão Sigma. O sorvente da ENV+ é um copolímero de poliestireno-divinilbenzeno, portanto, o mecanismo de atuação desse cartucho se baseia em um mecanismo de fase reversa. Sabendo disso, o solvente de eluição utilizado para tal metodologia é o diclorometano.

A **Figura 45** apresenta os espectros de massas dos extratos obtidos em comparação com o espectro de massas do Padrão Sigma.

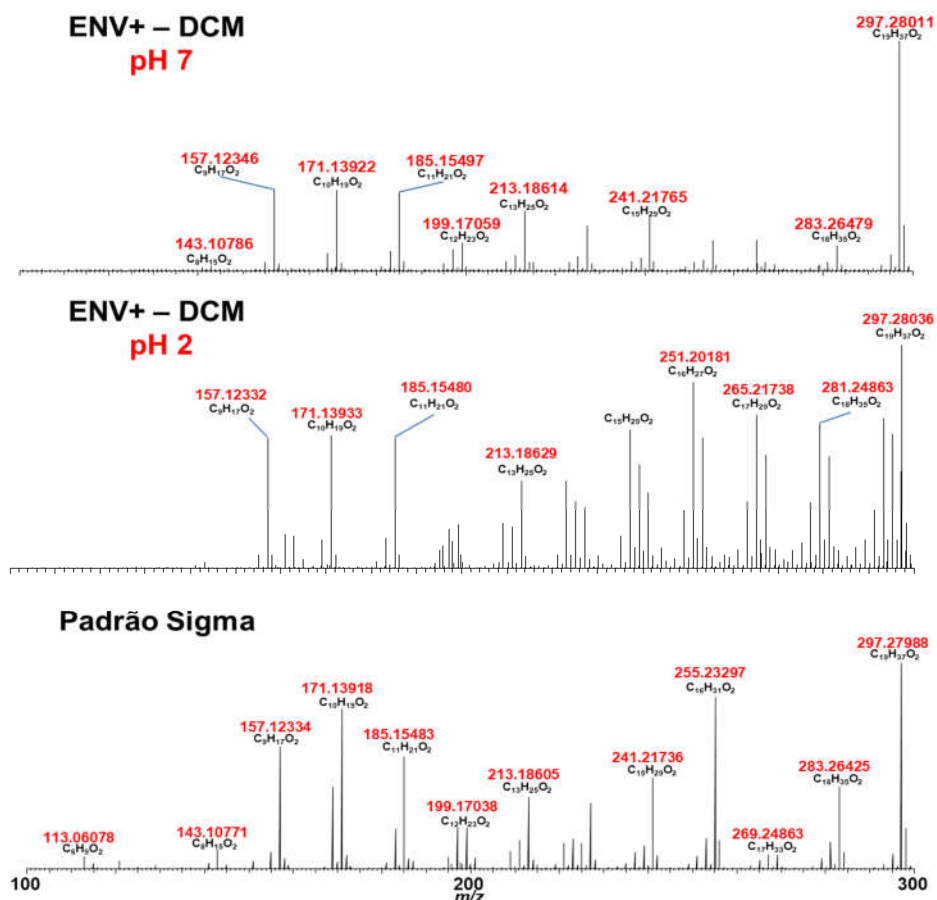


Figura 45. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com diclorometano para as extrações em pH 7 e pH 2 utilizando a fase sólida ENV+.

Analisando-se a **Figura 45** observa-se a semelhança nos padrões de vários picos de m/z do espectro do extrato e do Padrão Sigma, o que significa indicativos de uma boa extração de algumas espécies de ANs presentes no padrão.

Entretanto, para se ter uma análise a eficiência de recuperação das espécies, é necessário analisar os dados após o processamento dos espectros de massas. A **Tabela 23** traz os dados referentes ao número de fórmulas atribuídas para o extrato de ANs da metodologia ENV+.

Tabela 23. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida ENV+

Identificação	Nº de fórmulas atribuídas	Recuperação relativa (%)
Pd. Sigma	55	-
ENV+ – DCM – pH 2	48	92,72
ENV+ – DCM – pH 7	42	76,36

A partir da análise dos resultados apresentados na **Tabela 23** conclui-se que em nenhuma das metodologias houve a extração total dos compostos presentes na solução Padrão Sigma. Entretanto, o extrato da solução de pH 2 apresentou 51 fórmulas atribuídas, dentre as metodologias estudadas até agora este foi o maior número de fórmulas atribuídas, próximo ao encontrado no Padrão Sigma, portanto, pode-se inferir que essa metodologia de extração é a mais eficiente entre as metodologias estudadas até o momento. Esse fato pode indicar que o solvente tem uma boa interação com as espécies ácidas adsorvidas na fase sólida ENV+. Além disso, nota-se que também houve uma recuperação relativa satisfatória para a solução de pH 7, no qual o índice de recuperação do extrato foi superior a 70%. Os resultados obtidos nessa metodologia vão de acordo com os resultados apresentado anteriormente utilizando a fase sólida ENV+, na primeira parte do trabalho.

A partir do número de espécies que foram atribuídas aos extratos e para auxiliar na interpretação dos dados, construiu-se o diagrama de Venn presente na **Figura 46**.

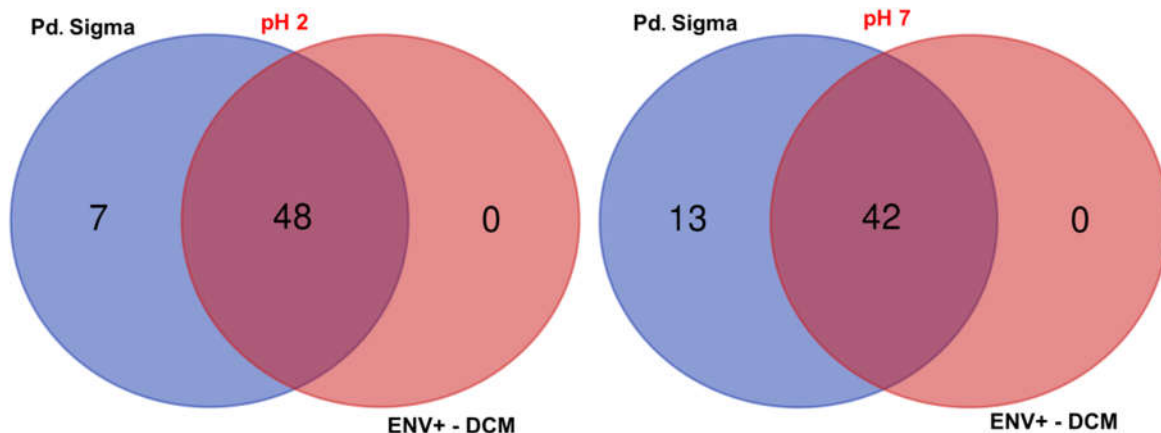


Figura 46. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida ENV+ com as amostras de pH 2 e pH 7.

A partir da análise da **Figura 46**, observa-se um resultado satisfatório para o extrato da solução de pH 2, na qual apenas 7 espécies não foram identificadas. Já para o extrato da solução de pH 7, 13 espécies não foram identificadas. Vale ressaltar que dentre as cinco metodologias de extração estudadas, a metodologia utilizando a fase sólida ENV+ e o solvente DCM extraiu o maior número de espécies da solução de pH 2.

A **Tabela 24** apresenta as espécies de ácidos que não foram identificadas nos extratos.

Tabela 24. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida ENV+ (continuação)

Espécie	DBE	Presença pH	Presença pH	Presença
		2	7	Sigma
$C_6H_{10}O_2$	2	Sim	Não	Sim
$C_6H_{12}O_2$	1	Sim	Não	Sim
$C_7H_6O_2$	5	Não	Não	Sim
$C_7H_{14}O_2$	1	Sim	Não	Sim
$C_{11}H_{14}O_2$	5	Sim	Não	Sim
$C_{12}H_{16}O_2$	5	Sim	Não	Sim

Tabela 24. Tabela contendo as fórmulas e valores de DBE das espécies não identificadas nos extratos das soluções de pH 2 e pH 7 da extração utilizando a fase sólida ENV+ (conclusão)

Espécie	DBE	Presença pH	Presença pH	Presença
		2	7	Sigma
C ₁₃ H ₂₀ O ₂	4	Não	Sim	Sim
C ₁₅ H ₂₂ O ₂	5	Não	Sim	Sim
C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1	Sim	Não	Sim
C ₁₆ H ₂₄ O ₂	5	Não	Sim	Sim
C ₁₈ H ₂₈ O ₂	5	Sim	Não	Sim
C ₁₉ H ₃₂ O ₂	4	Sim	Não	Sim

Nota-se que algumas das espécies não identificadas nesses extratos coincidem com as espécies não identificadas nos extratos anteriores, fato que pode ser considerado, uma vez que possivelmente essas espécies não estão sendo extraídas, ou estão sendo eluídas na água de lavagem. No entanto, ao se comparar os resultados obtidos nessa metodologia com os resultados apresentados para as demais metodologias anteriores, percebe-se que a metodologia atual foi a que apresentou melhores resultados em relação ao número total de espécies identificadas. Destaca-se que essa metodologia utilizando a fase sólida ENV+ e a solução de padrão em pH 2, extraiu espécies de menor número de carbono, tais como as espécies C6 e C7, que não haviam sido extraídas nas demais metodologias.

4.3.1.5 Extração utilizando a fase sólida Strata-X

A quinta metodologia consistiu na utilização do cartucho comercial Strata-X de fase reversa, composto por uma base polimérica de divinilbenzeno e n-vinilpirrolidona. Como solvente extrator, foi utilizada a mistura de metanol/ácido fórmico 9:1 (v/v).

A **Figura 47** apresenta o espectro de massas dos extratos obtidos e do Padrão Sigma. Observa-se similaridade nos picos de *m/z* apresentados nos espectros de massas dos extratos e do Padrão Sigma, indicando que houve a extração de espécies presentes no padrão, entretanto, é necessário analisar os dados após o tratamento,

para determinar a recuperação relativa e demais informações específicas.

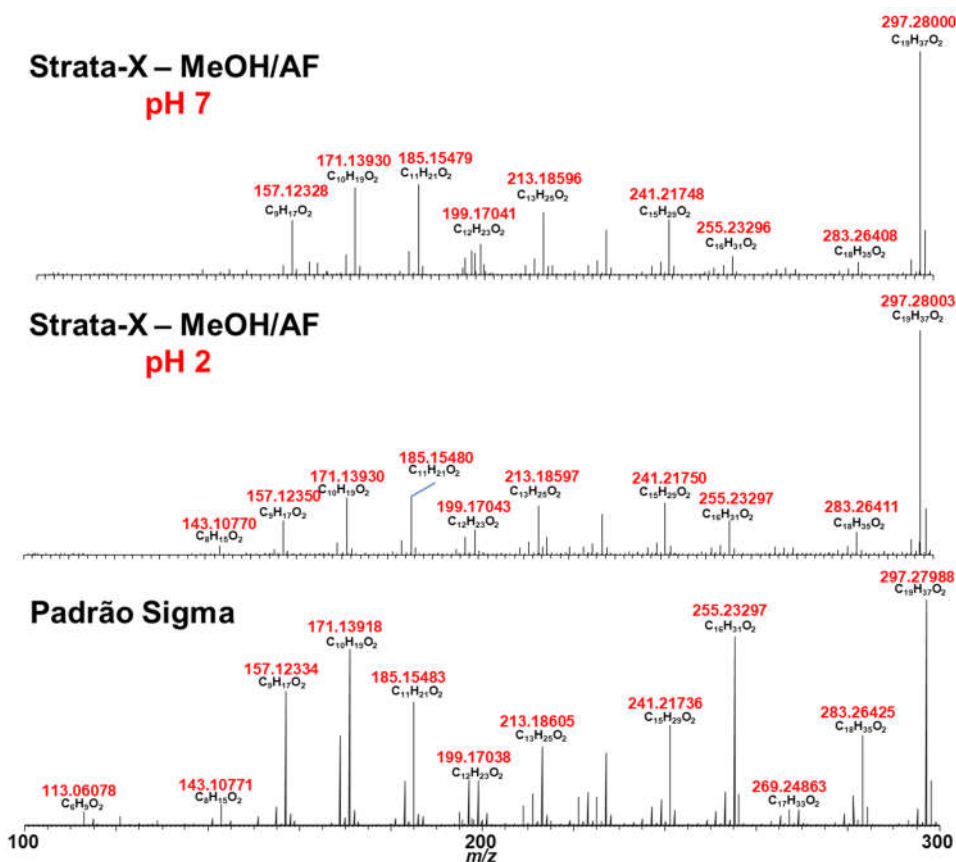


Figura 47. Comparação dos espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS do Padrão Sigma, do extrato eluído com metanol/ácido fórmico (9:1 v/v) para as extrações em pH 7 e pH 2.

A **Tabela 25** apresenta o número de fórmulas atribuídas para os extratos da metodologia Strata-X após o processamento do espectro de massas e tratamento dos dados.

Analisando-se a **Tabela 25** é possível notar que em nenhuma das metodologias houve a extração completa dos compostos presentes na solução Padrão Sigma. Também é possível notar que o extrato da solução de pH 2 apresentou mais fórmulas atribuídas que o extrato da solução de pH 7, o que corrobora com os resultados anteriores.

Tabela 25. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida Strata-X

Identificação	Nº de fórmulas atribuídas	Recuperação relativa (%)
Pd. Sigma	55	-
Strata-X – MeOH/AF – pH 2	37	67,27
Strata-X – MeOH/AF – pH 7	33	60,00

A partir dos dados obtidos pelo processamento dos espectros de massas foi possível construir o diagrama de Venn apresentado na **Figura 48**.

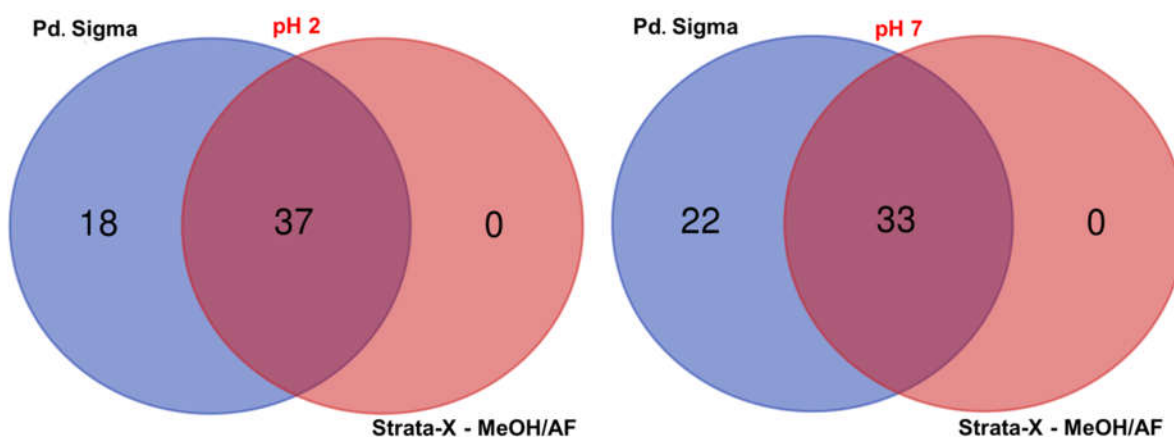


Figura 48. Diagrama de Venn do número de fórmulas atribuídas no processamento de dados dos espectros ESI(-)-Orbitrap-MS dos extratos da metodologia utilizando a fase sólida Strata-X com as amostras de pH 2 e pH 7.

Ao se analisar a **Figura 48**, é possível perceber, que assim como na metodologia utilizando a fase sólida APS, não houve uma extração eficiente, tendo em vista que das 55 espécies, 18 não foram identificadas no extrato da solução de pH 2 e 22 não foram identificadas no extrato da solução de pH 7.

Assim como mencionado anteriormente, um dos possíveis motivos para a recuperação relativamente baixa na extração dessa metodologia é a possibilidade de

que a água tenha eluído algumas espécies, durante o processo de lavagem para a retirada de sal. Outra possibilidade para a baixa recuperação é a pouca interação dos analitos com o sorvente, existindo a possibilidade de não adsorção com o sorvente no momento da inserção da amostra no cartucho.

4.3.2 Identificação de problemas nas extrações

Como mencionado anteriormente, testes foram realizados a fim de se ter conhecimento dos possíveis motivos que resultaram na baixa recuperação das metodologias utilizando as fases sólidas APS e Strata-X, apresentadas anteriormente no item 4.3.1. Dentre esses testes, o primeiro a ser realizado foi a verificação da água proveniente da lavagem para a remoção de sal. Durante as extrações anteriores, essa água era descartada e eram coletadas apenas as frações dos extratos, no entanto, foram realizadas novas extrações, seguindo as mesmas metodologias, e então coletou-se a água proveniente da lavagem dos cartuchos.

As frações contendo a água foram tratadas da mesma forma que as frações contendo os extratos, foram secadas e então redissolvidas em metanol a uma concentração de $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ e analisadas por ESI(-)-Orbitrap-MS.

A **Figura 49** apresenta os espectros de massas ESI(-)-Orbitrap-MS para as águas de lavagem da extrações utilizando as cinco metodologias supracitadas no item 4.3.1.

Analisando a **Figura 49** é possível perceber que há a presença de espécies ácidas na água de lavagem, principalmente no espectro de massas do extrato da metodologia APS, o que justifica a sua baixa recuperação em relação à eluição utilizando o solvente diclorometano. É possível perceber também que foi identificadas diversas espécies ácidas para a água de lavagem da metodologia utilizando a Strata-X, o que também explicaria a sua baixa recuperação.

Além disso, encontra-se em menor quantidade picos m/z referentes aos ácidos nos demais espectros. Além disso, observa-se que a espécie presente na m/z 255.23 referente ao ácido hexadecanóico ou ácido palmitido ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$) apresenta maior intensidade se comparado às demais espécies.

A partir dos espectros de massas é possível obter dados mais específicos, principalmente em relação ao número de espécies identificadas nos extratos, como também as suas fórmulas moleculares.

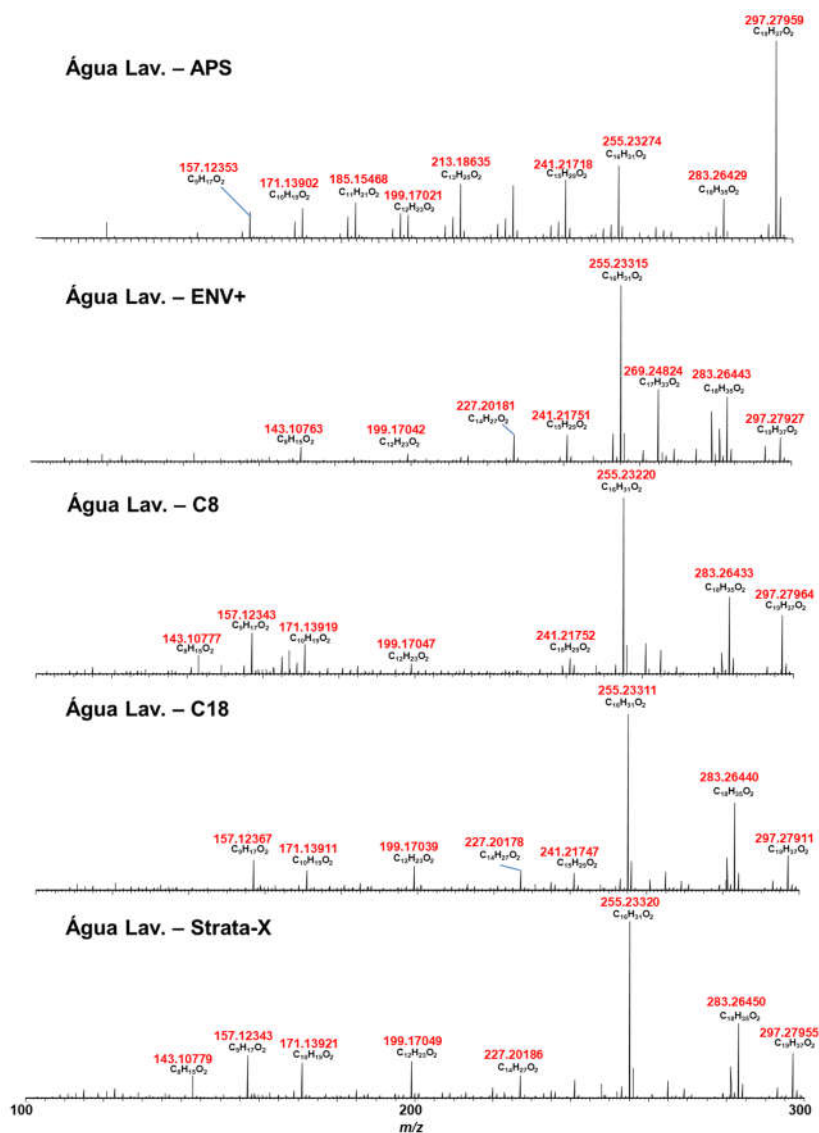


Figura 49. Espectros de massas obtidos por ESI(-)-OrbitrapMS da água de lavagem das metodologias APS, ENV+, C8, C18 e Strata-X.

A **Tabela 26** apresentam as informações relativas ao número de espécies de ácidos indentificadas em cada água de lavagem, bem como sua recuperação em relação ao número total de espécies identificadas no Padrão Sigma.

Tabela 26. Número de fórmulas atribuídas e recuperação relativa da água de lavagem das metodologias APS, ENV+, C8, C18 e Strata-X

Identificação	Nº de fórmulas atribuídas	Recuperação relativa (%)
Pd. Sigma	55	-
Água Lav. – APS	48	87,30
Água Lav. – ENV+	34	61,80
Água Lav. – C8	37	67,30
Água Lav – C18	35	63,60
Água Lav – Strata-X	42	76,60

Os resultados obtidos pela análise da água de lavagem das metodologias foram importantes para se chegar ao motivo da baixa recuperação das metodologias usando as fases sólidas APS e Strata-X. Não obstante, percebeu-se que também há a eluição de algumas espécies de ácidos nas metodologias ENV+, C8 e C18.

Baseando-se nesses resultados, optou-se por eliminar a etapa de lavagem nas metodologias de extração em fase sólida. No entanto, devido à presença de sal nas amostras, foi necessário algumas abordagens que pudessem remover esse sal. Uma dessas abordagens foi a secar todo o extrato, e após seco resuspender com diclorometano, que por ser um solvente apolar, não foi capaz de dissolver os sais presentes no extrato. Após resuspendido, a a solução de diclorometano contendo as espécies ácidas foi secada novamente, e por fim, obteve-se o extrato seco.

4.3.3 Otimização das metodologias de extração em fase sólida

Nesta última parte do trabalho, procedeu-se com a otimização das metodologias apresentadas no item 4.1 realizando-se a extração da AP de código 2020-005312-43. Para isso, alguns testes foram realizados. Um dos testes realizados foi a variação do pH de extração, conforme apresentado no item 4.3.1, onde estabeleceu-se, a partir dos resultados, que o melhor pH para a extração dos ANs era o pH 2, conforme relatado na

literatura. Além disso, indentificou-se problemas quanto à etapa de lavagem, na qual estava sendo eluídas algumas espécies de ácidos naftênicos na água de lavagem, dessa forma, optou-se por não realizar esta etapa. Por último, os resultados que serão apresentados levarão em conta os solventes de eluição, tal qual a sua quantidade utilizada nas extrações.

Para se analisar a quantidade de solvente necessário para a eluição das espécies, foram realizados dois tipos de extrações, na primeira leva de extrações utilizou-se 10 mL de cada solvente e obteve-se somente uma fração. Já para a segunda leva, utilizou-se 10 mL do solvente, caracterizando-se a primeira fração e logo em seguida, realizou-se outra eluição com 10 mL do solvente, sendo classificado como segunda fração.

Após a eluição os extratos foram secos, e como não passaram pela etapa de lavagem durante a extração, estes extratos foram resuspendidos com o solvente diclorometano, a fim de se solubilizar somente as espécies ácidas do extrato, e reter o sal proveniente da amostra de AP.

Para a obtenção dos resultados, partindo-se dos extratos preparou-se soluções na concentração de $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ e então analisou-se essas soluções, obtendo-se assim os espectros de massas referentes à cada extrato. Após o processamento dos espectros de massas, obteve-se informações referentes ao número de espécies de ácidos identificadas em cada extrato, e a partir desse número, determinou-se o volume de solvente e/ou o número de frações necessárias para a eluição das espécies ácidas.

A **Tabela 27** apresenta o número de fórmulas atribuídas para cada extrato da primeira etapa de extração, após o processamento dos espectros de massas.

Tabela 27. Número de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para as metodologias apresentadas na otimização (continuação)

Número de fórmulas atribuídas				
Identificação	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
C ₁₈ – DCM	38	-	-	38
C ₁₈ – IPA	45	31	28	104

Tabela 27. Número de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para as metodologias apresentadas na otimização (conclusão)

Número de fórmulas atribuídas				
Identificação	Classe O2	Identificação	Classe O2	Total
ENV – DCM	40	5	-	45
ENV – IPA	74	54	47	175
STX – DCM	37	-	25	62
STX – IPA	30	-	6	36
HLB – DCM	34	-	5	39
HLB – IPA	49	13	25	87

Tendo-se como base a **Tabela 27**, é possível observar informações referentes ao número de espécies identificadas para cada extrato. Primeiramente, tem-se a extração utilizando a fase sólida C18, é possível observar que na extração utilizando 10 mL de diclorometano houve a identificação de apenas 38 espécies, sendo essas espécies somente da classe O2, o que pode indicar baixa interação do solvente extrator com as espécies adsorvidas na fase. Já ao se verificar os resultados da extração utilizando 10 mL de isopropanol, percebe-se que houve a identificação de 104 espécies no extrato, sendo um número de espécie duas vezes maior do que o observado na extração com diclorometano. Sendo assim, para essa fase sólida, é preferível a utilização do solvente isopropanol, pois este foi capaz de extrair um número superior de espécies de ácidos.

O mesmo acontece na extração utilizando a fase sólida ENV (ENV+ + C8), 10 mL de diclorometano foi capaz de extrair apenas 40 espécies da classe O2 e 5 espécies da classe O3. Já para a mesma fase sólida utilizando o solvente isopropanol, identificou-se 74 espécies da classe O2, 54 espécies da classe O3 e 47 espécies da classe O4, totalizando 175 espécies identificadas no extrato. Assim como apresentado anteriormente, para essa fase sólida nessas condições de extração, é preferível a utilização do solvente isopropanol.

Para a extração utilizando a fase sólida Strata-X, observa-se o oposto do que foi

observado nas extrações apresentadas anteriormente. Nessa extração o solvente diclorometano foi o mais eficaz na extração das espécies ácidas, visto que no extrato obtido com diclorometano identificou-se 37 espécies da classe O2 e 25 espécies da classe O4, totalizando 62 espécies de ácidos. Por outro lado, no extrato obtido com o isopropanol, identificou-se 30 espécies da classe O2 e apenas 6 espécies da classe O4. Portanto, para essa fase sólida nessas condições de extração, é preferível a utilização do solvente diclorometano.

Por fim, para a extração utilizando a fase sólida HLB, observa-se o mesmo comportamento. O solvente diclorometano foi capaz de extrair 34 espécies da classe O2 e apenas 5 espécies da classe O4, totalizando 39 espécies. Já no extrato obtido pelo solvente isopropanol, identificou-se 49 espécies da classe O2, 13 espécies da classe O3 e 25 espécies da classe O4, totalizando 87 espécies identificadas. Mediante o exposto, para essa fase sólida nessas condições de extração, é preferível a utilização do solvente diclorometano.

A **Tabela 28** apresenta o número de fórmulas atribuídas para cada extrato da segunda etapa de extração, após o processamento dos espectros de massas.

Tabela 28. Número de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para as metodologias apresentadas na otimização onde F1: primeira fração F2: segunda fração (continuação)

Número de fórmulas atribuídas				
Identificação	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
C ₁₈ – DCM – F1	35	5	-	40
C ₁₈ – DCM – F2	54	32	25	111
C ₁₈ – IPA – F1	50	31	50	131
C ₁₈ – IPA – F2	-	-	-	-
ENV – DCM – F1	31	3	-	34
ENV – DCM – F2	57	50	27	134
ENV – IPA – F1	44	27	41	112

Tabela 28. Número de fórmulas atribuídas nas classes O2, O3 e O4, obtidas pelo processamento dos espectros de massas por ESI(-)-Orbitrap-MS para as metodologias apresentadas na otimização onde F1: primeira fração F2: segunda fração (conclusão)

Número de fórmulas atribuídas				
Identificação	Classe O2	Classe O3	Classe O4	Total
ENV – IPA – F2	63	39	52	154
STX – DCM – F1	44	12	33	89
STX – DCM – F2	49	24	31	104
STX – IPA – F1	42	11	21	74
STX – IPA – F2	10	-	4	14
HLB – DCM – F1	35	13	21	69
HLB – DCM – F2	47	33	31	111
HLB – IPA – F1	48	29	24	101
HLB – IPA – F2	37	14	19	70

Os resultados obtidos na segunda leva de extrações possuem informações importantes acerca das metodologias utilizadas. Primeiramente, para a metodologia de extração utilizando a fase sólida C18, é possível perceber algumas divergências em relação aos resultados apresentados anteriormente. Nota-se que na primeira fração de eluição utilizando o solvente diclorometano, o resultado apresentado foi próximo ao resultado apresentado anteriormente, no entanto, ao se analisar a segunda fração obtida, percebe-se que esta fração foi responsável pela eluição de grande parte das espécies ácidas, sendo que, foram identificados no segundo extrato 54 espécies da classe O2, 32 espécies da classe O3 e 25 espécies da classe O4. Esses resultados apresentados indicam que para uma melhor extração, é necessário um volume maior de solvente, levando em consideração que apenas 10 mL de diclorometano não foram suficientes para a eluição completa das espécies, sendo necessário mais 10 mL do mesmo solvente. Já para a extração utilizando o solvente isopropanol, a primeira fração foi responsável pela extração de 131 espécies, das quais 50 são da classe O2, 31 da classe O3 e 50 da classe O4. Além disso, vale ressaltar que na fração dois não foram identificadas espécies de ácidos, o que pode indicar que as espécies foram eluídas na

totalidade com apenas 10 mL de solvente.

Para a extração utilizando a fase sólida ENV (ENV+ + C8) os resultados também foram divergentes. Na primeira fração utilizando o solvente diclorometano, houve uma extração semelhante à apresentada anteriormente, no entanto, assim como aconteceu com a extração utilizando a fase sólida C18, a segunda fração apresentou um número elevado de espécies ácidas, sendo 57 espécies da classe O2, 50 espécies da classe O3 e 27 da classe O4, totalizando 134 espécies. Na eluição com o solvente isopropanol, a primeira fração, apesar de apresentar muitas espécies, também teve o número total de espécies menor do que na segunda fração. Este comportamento pode ser justificado inferindo-se que apenas 10 mL de solvente não tiveram a força de eluição necessária para a extração total das espécies, sendo necessário um volume maior de solvente. Além disso, o isopropanol foi capaz de extrair mais espécies do que o diclorometano, portanto, é recomendado que nessas condições de extração, utilize-se o solvente isopropanol, a fim de se obter melhores resultados.

Para a extração utilizando a fase sólida Strata-X, os resultados apresentados mantiveram-se semelhantes ao que foi apresentado anteriormente, ainda observa-se o oposto do que foi observado nas extrações utilizando as demais fases sólidas. Na primeira fração com o solvente diclorometano, houve a extração de menos espécies do que na segunda fração, o que já se esperava, tendo em conta os resultados das demais metodologias. No entanto, para a extração utilizando o solvente isopropanol, o resultado foi o oposto, sendo que na primeira fração houve a eluição de 74 espécies e no extrato da segunda fração foram identificadas apenas 14 espécies. Além disso, em números totais de espécies identificadas, o solvente diclorometano foi mais eficaz, portanto, é recomendado o uso deste solvente para essas condições de extração.

Por último, as extrações utilizando a fase sólida HLB também tiveram resultados divergentes, sendo que, na primeira fração utilizando o solvente diclorometano, houve a extração de poucas espécies, 69 no total, sendo 35 da classe O2, 13 da classe O3 e 21 da classe O4, assim como mostrado anteriormente, no entanto, foram identificadas mais espécies na segunda fração 111 no total, sendo 47 da classe O2, 33 da classe O3 e 31 da classe O4, o que já se esperava, conforme os resultados anteriores. Para a eluição utilizando o solvente isopropanol, foram identificadas no extrato da primeira

fração 101 espécies, já na segunda fração, 70 espécies. Ao se analisar de acordo com o número total de espécies, o solvente diclorometano foi mais eficiente na extração quando se verificam as duas frações, portanto, para a extração nessas condições, é recomendado o uso de diclorometano.

5. Conclusão

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho, pôde-se apontar que as metodologias apresentadas no grupo III foram mais eficientes na extração de ANs da amostra de AP estudada, tendo-se em vista que a totalidade das espécies identificadas nos extratos das metodologias utilizando a fase sólida ENV e HLB foram respectivamente 269 e 324 espécies das classes O2, O3 e O4. Destaca-se ainda, que as duas metodologias apresentadas nesse grupo, extraíram um número significativo de compostos da classe O3 e O4 no extrato de IPA. Para a classe O2 extraiu-se preferencialmente compostos de DBE 1 no extrato de IPA e compostos de DBE 2 no extrato de HEX, em ambas fases estacionárias. Além disso, observou-se nessas duas metodologias do grupo III a extração seletiva de compostos da classe O2, utilizando o solvente HEX.

A semiquantificação das espécies identificadas nas extrações da primeira parte do trabalho mostra que de fato há maiores concentrações de algumas espécies em relação às outras quando se utiliza determinado solvente, fato que pode ser justificado baseando-se na interação do solvente específico com a espécie em questão. Analisando-se as metodologias que utilizam metanol e diclorometano como solvente de eluição, é possível notar que o solvente metanol extrai preferencialmente compostos com valores de DBE 2, enquanto o solvente diclorometano extrai preferencialmente compostos com valores de DBE 1. Além disso, os extratos eluídos com hexano apresentaram altas concentrações de espécies de DBE 2, indicando uma preferência dessas espécies por este solvente.

Em uma análise geral, pode-se concluir que os compostos com valores de DBE 1 e 2 foram majoritariamente extraídos, especificamente compostos com baixo número de carbono, variando-se de 6 a 11 carbonos.

Além disso, é possível perceber que as extrações sequenciais utilizando um gradiente de polaridade na fase móvel apresentaram resultados mais satisfatórios, em relação às metodologias de extrações que aplicaram somente um solvente extrator. Outro fato a ser destacado é a alta concentração de compostos de DBE 2 em praticamente todos os extratos, especificamente os compostos com fórmula molecular

$C_7H_{12}O_2$, $C_8H_{14}O_2$, $C_9H_{16}O$, $C_{10}H_{18}O_2$ e $C_{11}H_{20}O_2$.

Nos experimentos de testes de metodologias, algumas das fases sólidas apresentaram baixa recuperação das espécies extraídas, fato que chamou atenção. Após alguns experimentos de EFS ficou constatado que as espécies ácidas foram identificadas na água de lavagem, utilizada na etapa de retirada de sal do cartucho. Mediante a identificação desses problemas, decidiu-se interromper essa etapa de lavagem, a fim de preservar o maior número de espécies ácidas a serem eluídas pelo solvente orgânico. Além disso, os resultados das extrações utilizando-se a solução Padrão Sigma no pH 2 apresentaram resultados mais satisfatórios que as mesmas extrações utilizando a solução em pH 7, portanto, optou-se por continuar as seguintes extrações em pH 2.

Por fim, realizaram-se testes relativos ao solvente de eluição e à quantidade a ser utilizada. Esses testes forneceram informações importantes acerca dos volumes que devem ser utilizados na extração com o objetivo de proporcionar maiores recuperações. Em todas as quatro metodologias estudadas, ENV, C18, HLB e Strata-X, foi preferível a utilização de 20 mL de solvente extrator, divididos em duas frações de 10 mL. Além disso, é possível notar que algumas fases sólidas performaram melhores que outras, dessa forma classificam-se as fases sólidas conforme a eficiência demonstrada nesses testes. Assim sendo, a fase sólida ENV com o solvente isopropanol foi a que apresentou melhores resultados de extração, seguida pela fase sólida Strata-X com o solvente diclorometano, HLB com o solvente diclorometano, e por último a fase sólida C18 com o solvente diclorometano.

6. Referências bibliográficas

ALLEN, E. W. **Process Water Treatment in Canada's Oil Sands Industry: I. Target Pollutants and Treatment Objectives.** J. Environ. Eng. Sci. Vol. 7, 2008.

ALHARBI, H. A.; MORANDI, G. D.; JONES, P. D.; WISEMAN, S. B.; GIESY, J. P.; **Comparison of the Effects of Extraction Techniques on Mass Spectrometry Profiles of Dissolved Organic Compounds in Oil Sand Process-Affected Water.** Energy Fuels, 33, 7001-7008, 2019.

AMINI, S.; MOWLA, D.; GOLKAR, M.; ESMAELZADEH, F. **Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS).** Chemical Engineering Research and Design, 90, 2186-2195, 2012.

ANDRADE, V. T.; ANDRADE, B. G.; COSTA, B. R. S.; PEREIRA, O. A.; DEZOTTI, M. **Toxicity assessment of oil field produced water treated by evaporative processes to produce water to irrigation.** Water Science and Technology. v. 62, p. 693-700, 2010.

BATAINEH, M., SCOTT, A.C., FEDORAK, P.M. and MARTIN, J.W. **Capillary HPLC/QTOF-MS for Characterizing Complex Naphthenic Acid Mixtures and Their Microbial Transformation.** Analytical Chemistry 78: 8354-8361, 2006.

BERTHEUSSEN, A., SIMON, S., SJÖBLOM, J. **Equilibrium Partitioning of Naphthenic Acid Mixture, Part 1; Commercial Naphthenic Acid Mixture.** Energy Fuels, 32, 7, 7519–7538, 2018.

BORGES, J. H.; MIQUEL, T. M. B.; DELGADO, M. A. R.; CIFUENTES, A. **Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry** J Chromatogr A, 1153(1-2):214-26, 2007

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), **Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, 2003.

CLEMENTE, S. J.; FEDORAK, P. M.; **Chemosphere** 60, 585, 2005.

CURBELO, F.D.S.; **Estudo da Remoção de Óleo em Águas Produzidas na Indústria de Petróleo, por Adsorção em Coluna Utilizando a Vermiculita Expandida e Hidrofobizada**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Programa de pós-graduação em engenharia química. UFRN. Natal/RN, 2002.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. **Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation**. Annual Review of Analytical Chemistry, v. 8, p. 61-80, 2015.

GREWER, D. M.; YOUNG, R. F.; WHINTTAL, R. M.; FEDORAK, P. M.; **Naphthenic acids and other acid-extractables in water samples from Alberta: What is being measured?** Science of the Total Environment, 12183, 2010.

GROSS, J. H.; **Mass Spectrometry A Textbook**. Spring, 2004

GRUBER, L. D. A.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E. B.; JACQUES, R. A. **ÁCIDOS NAFTÊNICOS NO PETRÓLEO**. Quim. Nova, v. 35, n. 7, p. 1423-1433, 2012.

HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; MCMARTIN, D. W.; WINKLER, M.; **Determination of Dissolved Naphthenic Acids in Natural Waters by Using Negative-Ion Electrospray Mass Spectrometry**. Journal of AOAC International, 85, 1, 2002.

HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; BARROW, M. P.; DERRICK, P. J.; **Analytical Chemistry**, 79, 6222, 2007.

HUGHEY, C. A.; HENDRICKSON, C. L.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. **Kendrick mass defect spectrum: a compact visual analysis for ultrahigh-resolution broadband mass spectra.** *Analytical Chemistry*, v. 73, n. 19, p. 4676-4681, 2001.

JARDIM, I. C. S. F. **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas,** *Scientia Chromatographica*, vol. 2 n.1 13-25, 2010.

JIVRAJ, M.N., MACKINNON, M. and FUNG, B. **Naphthenic Acids Extraction and Quantitative Analyses with FT-IR Spectroscopy.** *Syncrude Analytical Methods Manual*. 4th ed. Syncrude Canada Ltd., Research Department, Edmonton, Alberta, 1995

LAI, J. W. S., PINTO, L. J., KIEHLMANN, E., BENDELL-YOUNG, L. I., MARGO M. MOORE, M. M. **Factors That Affect The Degradation of Naphthenic Acids In Oil Sands Wasterwater by Indigenous Microbial Communities.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15, No. 9, pp. 1482–1491, 1996.

LANÇAS, F.M. **Extração em Fase Sólida (SPE).** Rima, São Carlos, 2004.

LI, D.-X.; GAN, L.; BRONJA, A.; SCHMITZ, O. J. **Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-APIMS): Review.** *Analytica Chimica Acta*, v. 891, p. 43-61, 2015.

LO, C.C., BROWNLEE, B.G., and BUNCE, N.J. **Mass Spectrometric and Toxicological Assays of Athabasca Oil Sands Naphthenic Acids.** *Water Research* 40: 655-664, 2006.

LOBODIN, V. V.; JUYAL, P.; MCKENNA, A. M.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. **Tetramethylammonium Hydroxide as a Reagent for Complex Mixture Analysis by Negative Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry.** *Anal.*

Chem. V. 85, n. 16, p. 7803–7808, 2013.

MOTTA, A.R.P.; **Tratamento de Água Produzida de Petróleo para Remoção de Óleo por Processos de Separação por Membranas: revisão.** Revisão de literatura. Eng Sanit Ambient, v.18, n.1, 2013.

NOVÁKOVÁ, L., VLCKOVÁ, H. **Analytical Chemistry Acta**, 656, 8, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.. **Introdução à Espectroscopia.** Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2010
QUEIROZ, S.C.N. COLLINS, C.H. JARDIM, I.C.S.F. **Química Nova**, 24, no 1, 68, 2001.

REYNOLDS, R. R. **Produced Water and Associated Issues.** Oklahoma Geological Survey Open-file Report, 2003.

ROGERS, V.V., LIBER, K. and MACKINNON, M.D. **Isolation and Characterization of Naphthenic Acids from Athabasca Oil Sands Tailings Pond Water.** Chemosphere 48: 519-527, 2002.

RUDZINSKI, W.E., OEHLERS, L., ZHANG, Y. **Tandem mass spectrometric characterization of commercial naphthenic acids and a Maya crude oil.** Energy Fuels 16, 1178–1185, 2002.

SAMANIPOUR, S.; HOOSHYARI, M.; BAZ-LOMBA, J. A.; REID, M. J.; CASALE, M.; THOMAS, K. V. **The Effect of Extraction Methodology on the Recovery and Distribution of Naphthenic Acids of oilfield Produced Water.** Science of The Total Environment. 29167, 2018.

STROMGREN, T.; SORSTROM, S. E.; SCHOU, L.; KAARSTAD, I.; AUNAAS, T.; BRAKSTAD, O. G.; JOHANSEN, O. **Acute toxic effects of produced water in**

relation to chemical composition and dispersion. Marine Environmental Research. 40, 147-169, 1995.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**, 2th ed., Interciência: Rio de Janeiro, 2001.

THOMAS, K. V.; LANGFORD, K.; PETERSEN, K.; SMITH, A. J.; TOLLEFSEN, K. E.; **Effect-Directed Identification of Naphthenic Acids As Important in Vitro Xeno-Estrogens and Anti-Androgens in North Sea Offshore Produced Water Discharges.** Environ. Sci. Technol. 43, 8066–8071, 2009.

TONHI, E. COLLINS, K. E, JARDIM, I. C. S. F., COLLINS, C. H. **Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados**, UNICAMP, Campinas/SP, 2002.

ZHAO, B. CURRIE, R. MIAN, H. **Catalogue of Analytical Methods For Naphtenic Acids Related to Oil Sands Operation**, NAIT, 2012.

ŻWIR-FERENC, A., BIZIUK, M. **Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications**, Polish J. of Environ. Stud. Vol. 15, No. 5, 677-690, 2006.

Guide to Sample Preparation. Supplement to LCGC. Outubro de 2008.