



EDUARDO MORGADO SCHMIDT

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR FT-ICR E ORBITRAP: QUÍMICA
FORENSE, ANÁLISE DE PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS**

CAMPINAS
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

EDUARDO MORGADO SCHMIDT

**ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR FT-ICR E ORBITRAP: QUÍMICA
FORENSE, ANÁLISE DE PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS**

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

COORIENTADOR: PROFA. DRA. ALEXANDRA CHRISTINE HELENA
FRANKLAND SAWAYA.

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO
DE QUÍMICA DA UNICAMP, ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ANALÍTICA, PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR EDUARDO
MORGADO SCHMIDT, E ORIENTADA PELO PROF.DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

Assinatura do Orientador

Campinas

2015

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

Schmidt, Eduardo Morgado, 1984-
Sch52e Espectrometria de massas por FT-ICR e Orbitrap: química forense, análise de petróleo e seus derivados / Eduardo Morgado Schmidt. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Coorientador: Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Espectrometria de massas. 2. Química legal. 3. Petróleo. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mass spectrometry by FT-ICR and Orbitrap: forensic chemistry, analysis of crude oil and its derivatives

Palavras-chave em inglês:

Mass spectrometry

Legal chemistry

Crude oil

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]

Humberto Márcio Santos Milagre

Jorge Jardim Zacca

Alessandra Sussulini

Sebastião Ferreira Fonseca

Data de defesa: 24-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (Orientador)

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre (IQ-UNESP - Araraquara)

Dr. Jorge Jardim Zacca (DPF-Instituto Nacional de Criminalística)

Prof. Dr. Sebastião Ferreira Fonseca (IQ-UNICAMP)

Profa. Dra. Alessandra Sussulini (IQ-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de
Doutorado defendida pelo aluno **EDUARDO MORGADO
SCHMIDT**, aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de
fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

(Presidente da Banca)

Quando fores convidado às bodas, não te sentes no primeiro lugar, pois pode ser que seja convidada outra pessoa de mais consideração do que tu, e vindo o que te convidou, te diga: Cede o lugar a este. Terias então a confusão de dever ocupar o último lugar.

Mas, quando fores convidado, vai tomar o último lugar, para que, quando vier o que te convidou, te diga: Amigo, passa mais para cima.

Então serás honrado na presença de todos os convivas. Porque todo aquele que se exaltar será humilhado, e todo aquele que se humilhar será exaltado.

Lucas 14:8-11

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

De modo cronológico, agradeço à minha mãe (*Cândida Morgado*) pelos ensinamentos de vida em nossas muitas jornadas entre muitos mundos reais ou não, sempre especial. Ao meu pai (*Carlos Rogério Conrado Schmidt*), ao empréstimo de R\$ 4.000,00 gerados por meio da lavoura de trigo para iniciar o doutorado na UNICAMP, à minha parceira *Heloísa Morgado Schmidt* e ao fiel e companheiro *Godofredo Pepelegal* que está me aguardando durante esses 5 anos. Deixo aqui meu questionamento sobre Deus, não se ele existe, posto que é pleno, questiono se ele é apenas justo, mas não bom, pois não disponibilizou tempo de que eu quitasse minha dívida com o homem mais importante, meu pai, e ainda o levou! E o motivo de permitir tantas vezes minha mãe viver entre muitas moradas... Talvez apenas justo;

Para o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, compondo desde a querida dona *Cida*, amigos até o Prof. Dr. *Marcos Nogueira Eberlin*... Só posso afirmar que faz parte do meu eu como pessoa e como cientista para todo sempre!

Aos VIP,s (Vim do Interior do Paraná, sim) e à república VIP. Fica o destaque aos 3 anos que sobrevivemos e vivemos muito... e um pedido:
Que todos, se possível, vivam em república uma vez na vida!

À ANALÍTICA (*Luiz Bravo* e amigos) pela coragem e confiança da contratação como Químico de Aplicação com dois anos de doutorado;

Às minhas bancas de Monografia (Bacharel e Licenciatura), Dissertação e agora Tese;

Dentre as possibilidades... As viagens aos mais diferentes cantos do Brasil e do mundo conhecidos e reconhecidos, sempre com a maior intensidade possível;

À Bruna Kauely de Campos, minha noiva... Junto a você minha definição de Amor, sendo o que realmente se sente e não se define ou explica. Meu porto seguro;

Ao senhor ICR tão experiente e ao jovem Orbitrap tão inovador, pois com eles meu doutorado se tornou meu trabalho e meu trabalho o meu doutorado;

Às minhas famílias ao MS em meu nome, *Eduardo Morgado Schmidt*;

E a Deus por existir.

X

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA E TITULAÇÃO

- 2010-2015** **Doutorado em Ciências com ênfase em Química Analítica** pela Universidade Estadual de Campinas, SP.
Título: ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR FT-ICR E ORBITRAP: QUÍMICA FORENSE, ANÁLISE DE PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS
Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin
Bolsista: 1º ano – CAPES; 2º ano – Petrobras; 3º e 4º ano – Contratado (Químico de Aplicação) Nova Analítica Importações e Exportações LTDA.
- 2008-2010** **Mestrado em Química Aplicada** pela Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.
Área de Concentração: Metodologias Analíticas e Aplicações.
Título: Análise da composição em compostos fenólicos e mineral da própolis de Prudentópolis: análise multivariada.
Orientadora: Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres
Bolsista: CAPES
- 2003-2007** **Bacharelado e Licenciatura em Química** pela Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.
Título da Monografia: Determinação de fenólicos e flavonoides totais em própolis de Prudentópolis.
Iniciação Científica: Quantificação de flavonoides em amostras de própolis da região de Prudentópolis.

Bolsista: CNPq

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2012-Atual Nova Analítica Importação e Exportação LTDA, Analítica, Brasil.

Vínculo: Químico de Aplicação do setor de pós-vendas de espectrômetros de massas.

2009-2010 Faculdade Guairacá, Guarapuava-PR.

Vínculo: Docente colaborador

2008-2009 Faculdade Guairacá, Guarapuava-PR.

Vínculo: Técnico de laboratório

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Franco, Marcos F.; Regino, Karen G.; Lehmann, Eraldo L.; Arruda, Marco A. Z.; de Carvalho, W. Fortunato; Borges, Rodrigo; de Souza, Wanderlay; Eberlin, Marcos N.; Correa, Deleon N. *Direct and non-destructive proof of authenticity for the 2nd generation of Brazilian real banknotes via easy ambient sonic spray ionization mass spectrometry*. Science & Justice, v. xx, p. xx, **2014**. (in press)
2. **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Santos, Cerize da S.; Stock, Daniele; Finger, Daiane; Baader, Wilhelm J.; Caetano, Isis K.; Quináia, Sueli P.; Sawaya, Alexandra C. H. F.; Eberlin, Marcos N.; Torres, Yohandra R. *Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts*. Journal of Apicultural Research, v. 53, p. 91-100, **2014**.
3. **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Stock, Daniele; Chada, Fabio J. G.; Finger, Daiane; Sawaya, Alexandra, C. H. F.; Eberlin, Marcos N.; Felsner, Maria L.; Quináia, Sueli P.; Monteiro, Marta C.; Torres, Yohandra R.; *A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis*. Biomedical Reserch International. v. 2014, p. 1-10, **2014**.

4. López, Begoña G.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Eberlin, Marcos N.; Sawaya, Alexandra C. H. F. *Phytochemical markers of different types of red propolis*. Food Chemistry, v. 146, p. 174-180, **2014**.
5. Lena, Flamys, N. S.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Messias, Cláudio L.; Eberlin, Marcos N.; Sawaya, Alexandra C. H. F. *Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical Methods, v. 01, p. 1, **2014**.
6. Garcia, Jerusa S.; Vaz, Boniek G.; Corilo, Yuri E.; Ramires, Christina F.; Saraiva, Sérgio A.; Sanvido, Gustavo B.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Maia, Denison R. J.; Cocco, Ricardo G.; Zacca, Jorge J.; Eberlin, Marcos N. *Whisky analysis by electrospray ionization-Fourier transform mass spectrometry*. Food Research International, v. 51, p. 98-106, **2013**.
7. Garrett, Rafael; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Pereira, Luiz F. P.; Kitzberger, Cíntia S.G.; Scholz, Maria B. S.; Eberlin, Marcos N.; Rezende, Claudia M. *Discrimination of arabica coffee cultivars by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and chemometrics*. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie / Food Science Technology, v. 50, p. 496-502, **2013**.
8. Pereira, Rosana C. L.; Simas, Rosineide C.; Corilo, Yuri E.; Vaz, Boniek G.; Klitzke, Clecio F.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Pudenzi, Marcos A.; Silva, Raissa M. C. F.; Moraes, Erica T.; Bastos, Wagner L.; Eberlin, Marcos N.; Nascimento, Heliara D. L. *Precision in Petroleomics via Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*. Energy & Fuels (Print), v. 27, p. 7208-7216, **2013**.
9. Schwab, Nicolas V.; Porcari, Andreia M.; Coelho, Mirela B.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Jara, Jose L.; Visentainer, Jesui V.; Eberlin, Marcos N. *Easy dual-mode ambient mass spectrometry with Venturi self-pumping, canned*

- air, disposable parts and voltage-free sonic-spray ionization.* Analyst, v. 137, p. 2537, 2012.
10. Simas, Rosineide C.; Pereira, Rosana C. L.; Klitzke, Clecio F.; Corilo, Yuri E.; Boniek G. Vaz; Pudenzi, M. A.; **SCHMIDT, EDUARDO. M.**; Nascimento, Heliara D. L.; Moraes, Erica T.; Bastos, Wagner L.; Eberlin, M. N. *Petroleômica: Caracterização rápida e abrangente de petróleo bruto e derivados via espectrometria de massas FT MS de altíssima resolução e exatidão.* Boletim de Geociências da Petrobras (Online), v. 20, p. 211-227, 2012. Carvalho, Adriana A.; Finger, Daiane; Machado, Christiane S.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; da Costa, Patricia M.; Alves, Ana P. N. N.; Morais, Thamires M. F.; de Queiroz, Maria G. R.; Quináia, Sueli P.; da Rosa, Marcos R. *In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis.* Food Chemistry, v. 126, p. 1239-1245, 2011.
12. Oliveira, Felipe F. D.; dos Santos, Marcelo R.; Lalli, Priscila M.; **SCHMIDT, EDUARDO M.**; Bakuzis, Peter; Lapis, Alexandre A. M.; Monteiro, Adriano L.; Eberlin, Marcos N.; Neto, Brenno A. D. *Charge-Tagged Acetate Ligands As Mass Spectrometry Probes for Metal Complexes Investigations: Applications in Suzuki and Heck Phosphine-Free Reactions.* Journal of Organic Chemistry, v. 76, p. 10140-10147, 2011.
13. Buriol, Lilian; **SCHMIDT, EDUARDO. M.**; Finger, Daiane; dos Santos, Julio M. T.; da Rosa, Marcos R.; Quináia, Sueli Péricio; Torres, Yohandra. R.; Santa, H. S. D.; Pessoa, Claudia; de Moraes, Manuel O.; Lotufo, Letícia V.; Ferreira, P. M ; Sawaya, Alexandra C. H. F.; Eberlin, Marcos N. *Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico.* Química Nova (Impresso), v. 32, p. 296-302, 2009.

CAPÍTULO DE LIVRO

1. SCHMIDT, EDUARDO. M.; Sawaya, Alexandra C. H. F. *Seasonal Variation in the Composition and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Propolis. Beneficial Effects of Propolis on Human Health and Chronic Diseases.* New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, v.1, Cap. 3, ISBN: 978-1-62081-456-7.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO (apenas os mais relevantes)

1. SCHMIDT, EDUARDO M.; Pudenzi,M. A.; Santos, J. M.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Eberlin, M. N. *Direct Analysis of crude oil using Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000.* In: 62nd Conference on mass spectrometry and allied topics, 2014, Baltimore, EUA. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014. v. 25. p. 1-264. (**Oral**)
2. SCHMIDT, EDUARDO M. ; Schwab, N. W.; Correa, D. N.; Santos, J. M.; Pudenzi, M. A.; Eberlin, M. N. *Application of the PETROLEOMIC BY FT-ICR MS: monitoring crude oil and derivatives.* 2013. Siena, Italia. 1st International Mass Spectrometry School IMSS (**Oral**)
3. SCHMIDT, EDUARDO. M. ; Schwab, N. W.; Correa, D. N.; Santos, J. M.; Pudenzi, M. A.; Eberlin, M. N. *Petroleomics by analyzers 'TRAPs' MS: What is Your Question and What Level of Answers are Necessary?.* 2013. Campinas - SP. 4º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS. (**pôster**)
4. SCHMIDT, EDUARDO. M. ; Eberlin, M. N. *Use of culture media fingerprinting by LTQ FT Ultra MS to predict human embryonic implantation potential.* 2012.

Kyoto, Japão. 19th International Mass Spectrometry Conference IMSC.
(pôster)

5. **SCHMIDT, EDUARDO. M.**; Vaz, B. G.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Neto, E. V. S.; de Moraes, E. T.; Cerqueira, J. R.; Simas, R. C.; do Nascimento, H. D. L.; Pudenzi, M. A.; Eberlin, M. N., *Petroleomics by ESI FT-ICR MS: Monitoring of the Thermal Evolution of Petroleum*, - ALAGO, 2012, Santa Marta, Colombia. Congresso Latino Americano de Geoquímica Orgânica. **(Oral)**
6. **SCHMIDT, EDUARDO. M.** ; Schwab, N. W.; Correa, D. N.; Santos, J. M.; Pudenzi, M. A.; Eberlin, M. N. *Mineral, semi-synthetic and synthetic Motor oil Fingerprinting by Ultrahigh Resolution by ESI-FT-ICR MS*. 2012. Vancouver, BC, Canada 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. **(Poster)**
7. **SCHMIDT, EDUARDO. M.**; Vaz, B. G.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Neto, E. V. S.; de Moraes, E. T.; Cerqueira, J. R.; Simas, R. C.; do Nascimento, H. D.; Pudenzi, M. A.; Eberlin, M. N. *Petroleomics by ESI FT-ICR MS: Monitoring of the Thermal Evolution of Petroleum*. In: Petro Phase 2011, 2011, Londres. Petroleomics. Imperial College London;: IOP Institute of Physics, 2011. **(Poster)**

Resumo

ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR FT-ICR E ORBITRAP: QUÍMICA FORENSE, ANÁLISE DE PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que atualmente permite desde a análise de um único íon molecular até o perfil da distribuição de íons em amostras complexas. Isto é possível por meio da análise direta com diferentes fontes de ionização e também devido ao desenvolvimento de analisadores de massas de altíssima resolução, tais como o FT-ICR e FT-*Orbitrap*. Para amostras complexas, como o petróleo, a fonte de ionização mais adequada para análise dos compostos polares é o Eletrospray (ESI), devido à sua estabilidade e consequentemente reproduzibilidade. Uma alternativa foi testada com a fonte de ionização *Spartan V-EASI*, no entanto, as respostas obtidas não foram satisfatórias. O analisador de massas FT-ICR foi utilizado para análise direta de petróleo bruto e permitiu monitorar e investigar o petróleo e seus derivados adicionando novas informações, desde a exploração até o refino, bem como em um aspecto forense como em derrame de petróleo bruto e investigação de diferentes óleos de motor. Nesse trabalho avaliou-se pela primeira vez o analisador *MegaOrbitrap* (ainda em fase experimental) para análise de petróleo bruto, que se mostrou tão eficiente quanto o já consagrado FT-ICR 7 tesla. Deixando a parte amostras complexas e retornando para a análise de um único íon, em uma abordagem forense, essa técnica permitiu a caracterização da composição de corantes utilizados na impressão de notas de Real genuínas e falsas, e ainda, de corantes utilizados para marcar notas de Real furtadas de caixas eletrônicos quando estes são violados. Sendo assim, esta tese mostra resultados obtidos da análise de petróleo bruto por ambos os analisadores de massas citados, fato esse inédito na literatura, e também resultados de análises forenses de petróleo, notas de Real falsificadas e ainda com indício de furto por meio de corantes e resíduos de explosivos.

Abstract

MASS SPECTROMETRY BY FT-ICR AND ORBITRAP: FORENSIC CHEMISTRY, ANALYSIS OF CRUDE OIL AND ITS DERIVATIVES

Mass spectrometry is an analytical technique that currently allows from the analysis of a single molecular ion to a profile of the distribution of ions in complex samples. This has been possible through direct analysis with different sources of ionization and also the development of ultra-high resolution mass analyzers such as the FT-ICR and FT-Orbitrap. For complex samples such as oil, the most appropriate source of ionization is the electrospray (ESI) due to its stability and consequently reproducibility. Even though an alternative has been tested with the Spartan EASI-V ionization source, the responses obtained were not satisfactory. The mass analyzer FT-ICR is already being used for direct analysis of crude oil and allows monitoring and investigating crude oil and its derivatives. These new data about polar compounds may be useful to add information starting from the crude oil exploration until refining. Additionally, it may also be useful in forensic analysis such as in crude oil spills and in the investigation of the compliance of different motor oils (mineral, semi-synthetic and synthetic) with their labels. In this study we have evaluated for the first time the MegaOrbitrap analyzer (still under development) for crude oil analysis, which has proved to be as effective, if not better than, the widely used FT-ICR 7 tesla. Dealing with the analysis of a single ion in a forensic aspect, this technique allows the characterization of the dye composition used in the actual printing of genuine and counterfeit banknotes, and further, the dyes used to mark Real banknotes stolen from ATMs after they have exploded. Thus, this thesis shows results obtained from crude oil analysis performed by both mass analyzers mentioned, a fact unprecedented in the literature, and also forensic analysis results of oil, derivatives, Brazilian fake banknotes and banknotes with theft indicators explosive markers.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXV
LISTA DE TABELAS	XXVII
LISTA DE FIGURAS	XXIX
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: conceitos gerais.....	5
2.1 Técnicas de Ionização	8
2.1.1 Ionização à pressão atmosférica por ESI MS	8
2.1.2 Ionização em condições ambiente por EASI MS	10
2.1.3 Ionização em condições ambiente por V-EASI MS	12
2.2 Analisadores de massas	14
2.2.1 Analisador de massas quadrupolo (Q).....	15
2.2.2 Analisador de massas ICR	16
2.2.3 Analisador de massas Standard Orbitrap.....	18
3 JUSTIFICATIVA	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
➤ Capítulo I	31
5 INTRODUÇÃO.....	33
6 OBJETIVOS.....	37
6.1 Objetivos específicos	37
7 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
7.1 Amostras	37
7.2 Reagentes	39
7.3 Equipamentos e condições experimentais	40

7.3.1	EASI Q	40
7.3.2	EASI ICR.....	40
7.3.3	ESI Orbitrap.....	41
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
8.1	Análise forense de notas falsificadas e autênticas	42
8.2	Análise forense de corantes em notas roubadas.....	51
9	CONCLUSÃO.....	58
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
➤	Capítulo II	65
11	INTRODUÇÃO.....	67
11.1	Compostos com enxofre (S).....	70
11.2	Compostos nitrogenados (N).....	72
11.3	Compostos oxigenados (O)	74
11.4	Análise de petróleo por espectrometria de massas com infusão direta e suas variáveis.....	76
12	OBJETIVOS.....	78
12.1	Objetivos específicos:	78
13	MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
13.1	Amostras e preparo das amostras	78
13.2	Equipamentos	79
13.3	Condições Experimentais	80
13.3.1	Técnicas de ionização acopladas ao analisador ICR:	80
13.3.2	Técnicas de ionização acopladas aos analisadores <i>Orbitrap</i> e <i>MegaOrbitrap</i> :	
	81	
13.4	Processamento de dados	81
14	RESULTADOS E DISCUSSÃO	83

14.1	Avaliação das Fontes de Ionização	83
14.1.1	Avaliação da fonte de ionização V-EASI Spartan (+) FT-ICR MS (V-EASI S (+)) FT-ICR MS	91
14.2	Aplicação da ESI FT-ICR MS em análises forenses envolvendo petróleo e derivados.....	96
14.2.1	Derrame de petróleo	96
14.2.2	Estudo forense de caracterização e identificação de óleos de motor mineral, semi-sintético e sintético	104
14.3	Estudo dos analisadores de massas na investigação de amostras de petróleo bruto: um comparativo entre o ICR, <i>STANDARD ORBITRAP</i> e o <i>MEGAORBITRAP</i> ..	108
14.4	Avaliação das figuras de mérito para os analisadores <i>Std. Orbitrap</i> , ICR e <i>MegaOrbitrap</i>	118
14.4.1	Sinal / ruído	118
14.4.2	Intervalo dinâmico.....	120
14.4.3	Erro espectral.....	122
14.4.4	Velocidade de varredura.....	125
14.4.5	Exatidão de massa	126
14.4.6	Resolução e/ou Poder de resolução	127
15	CONCLUSÃO.....	132
16	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
17	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	136
➤	Anexos	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AGC	do inglês, <i>Automatic Gain Control</i>
APCI	do inglês, <i>Atmospheric Pressure Chemical-Ionization</i>
APPI	do inglês, <i>Atmospheric Pressure Photo-Ionization</i>
ATD	do inglês, <i>Anti Thehf Devices</i>
CI	do inglês, <i>Chemical Ionization</i>
DART	do inglês, <i>Direct Analysis in Real Time</i>
DBE	do inglês, <i>Double Bond equivalent</i>
DESI	do inglês, <i>Desorption Electrospray Ionization</i>
DESSI	do inglês, <i>Desorption Sonic Spray Ionization</i>
DC	do inglês, <i>Direct Current</i>
DR	do inglês, <i>Dynamic range</i>
EASI	do inglês, <i>Easy Ambient Sonic Spray Ionization</i>
EI	do inglês, <i>Electron Ionization</i>
ESI	do inglês, <i>Electrospray Ionization</i>
FT	do inglês, <i>Fourier Transform</i>
HCA	do inglês, <i>Hierarchical component analysis</i>
ICR	do inglês, <i>Ion Cyclotron Ressonance</i>
IT	do inglês, <i>Ion Trap</i>
LD	do inglês, <i>Laser Desorption</i>
MAAQ	do inglês, <i>1-methylaminoanthraquinone</i>
MALDI	do inglês, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MS	do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>
PCA	do inglês, <i>Principal components analysis</i>
Q	Quadrupolo
RF	Radiofrequênciia
TOF	do inglês, <i>time of flight</i>
V-EASI	do inglês, <i>Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Conjunto de amostras referente ao caso forense de notas falsas.....	38
Tabela 2 Conjunto de amostras referente ao caso forense de notas tingidas.....	39
Tabela 3 Espectro adquirido para notas genuínas de R\$ 100 por EASI(+) FT-ICR MS (Figura 16 a e b).	47
Tabela 4 Principais íons nos espectros obtidos por EASI(+) FT-ICR MS para uma nota de R\$ 100 suspeita de falsificação (Fig. 16 c e d).	49
Tabela 5 Dados obtidos por ESI(+) MS/MS de espectros da Figura 20 adquiridos com a injeção direta do dispositivo antifurto.	56
Tabela 6 Avaliação das fontes de ionização ESI e V-EASI S para petroleômica....	95
Tabela 7 Amostras utilizadas no estudo de derrame de petróleo.	96
Tabela 8 Comparativo dos compostos detectados e atribuídos através dos analisadores <i>Std. Orbitrap</i> , ICR e <i>MegaOrbitrap</i>	115
Tabela 9 Poder de resolução mínima para resolver íons com diferença de massas de C ₃ e SH ₄ em distintas <i>m/z</i>	129
Tabela 10 Comparativo das figuras de mérito dos analisadores <i>Std. Orbitrap</i> , ICR e <i>MegaOrbitrap</i>	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.....	6
Figura 2 Esquema do aumento da resolução em analisadores de massas no tempo desde a baixa resolução (região A) até a altíssima resolução (região B).....	7
Figura 3 Ilustração esquemática de uma fonte de ionização por "Electrospray" Adaptado de: http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayIonisation.php	10
Figura 4 Ilustração esquemática de uma fonte de ionização sonic-spray “EASI” (adaptado de Haddad <i>et al.</i> , 2006).	11
Figura 5 Esquema da fonte portátil de <i>Spartan V-EASI</i> (adaptado de Schwab <i>et al.</i> , 2012).	13
Figura 6 Esquema do analisador Quadrupolo, (Q) (Adaptado de http://www.tissuegroup.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html).....	15
Figura 7 Representação esquemática de FT-ICR MS mostrando o aprisionamento dos íons, detecção e geração de sinal de uma cela de ICR (Modificado de http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/fticr-massspec.html).	17
Figura 8 Representação esquemática do analisador Orbitrap MS, demonstrando as três órbitas envolvidas, frequência de rotação ω_ϕ , frequência de oscilação radial ω_r , e frequência de oscilação axial ω_z (Makarov <i>et al.</i> , 2009).	19
Figura 9 Representação esquemática de um C-Trap e do analisador Orbitrap MS, demonstrando a focalização dos íons e aprisionamento, respectivamente (Modificado de Makarov <i>et al.</i> , 2013).	21
Figura 10 Representação esquemática do analisador (a) <i>Orbitrap Standard</i> e (b) <i>High-Field</i> , demonstrando suas dimensões (Modificado de Makarov <i>et al.</i> , 2009)..	22
Figura 11 Representação da variação da resolução para os analisadores Std. Orbitrap, HF Orbitrap 5kV, 7T FT-ICR e 15T FT-ICR (a), e um espectro da solução de calibração Calmix demonstrando resolução experimental (b) (Modificado de Makarov <i>et al.</i> , 2009).	23

Figura 12 Representação esquemática do analisador Orbitrap Standard e High-Field Orbitrap (MegaOrbitrap), demonstrando suas dimensões (Modificado de Denisov <i>et al.</i> , 2012)	24
Figura 13 Três notas de Real representando casos forenses com diferentes materiais em sua superfície, (A) corante antifurto de cor rosa, (B) nota com suspeita de lavagem com solvente orgânico e (C) resíduo de explosivo utilizado na tentativa de furto ao caixa eletrônico.....	35
Figura 14 Ilustrativo do <i>fingerprint</i> obtido por EASI(+) MS de notas de Real com valores nominais de: (a) R\$ 100, (b) R\$ 50, (c) R\$ 20 e (d) R\$ 10.....	42
Figura 15 Perfil químico por EASI(+) MS de notas com suspeita de falsificação (a) R\$ 100 e (b) R\$ 50 e notas falsas caseiras preparadas pela impressão de cópias utilizando (c) impressora <i>LaserJet</i> e (d) jato de tinta.....	44
Figura 16 Altíssima resolução e exatidão por EASI(+) FT-ICR MS do perfil químico de: (a) notas autênticas de R\$ 100 de banco em uma faixa de <i>m/z</i> 100-1000, (b) um intervalo de <i>m/z</i> 350-600, (c) notas de R\$ 100 da segunda geração apreendidas com suspeita de falsificação em uma faixa de <i>m/z</i> 100-1000 e (d) ampliação em um intervalo de <i>m/z</i> 600-620.	46
Figura 17 Estrutura química do Surfynol® 4XX, (Surfynol® 104 com fórmula molecular C ₁₄ H ₂₆ O ₂) (Datenblatt, 2011).....	51
Figura 18 Perfis químicos obtidos por EASI(+) MS para A) notas padrões de R\$ 50, intactas B) Notas de R\$ 50 provenientes de explosão de caixa eletrônico apresentando aparente dispositivo antifurto em suas superfícies; C) Notas de R\$ 50 suspeitas de explosão do caixa eletrônico apresentando características de tentativas de limpeza possível utilização de solventes orgânicos; D) Notas de R\$ 50 com substância escura impregnada em sua superfície, apresentando características de resíduo de explosivo.....	52
Figura 19 Espectro de massas obtido por ESI(+) FT-Orbitrap do íon isotopólogo padrão [M + 1] e [M + 2] ¹³ C para o íon de <i>m/z</i> 443 relacionado com a contaminação do dispositivo antifurto observada na Figura 1: (A) experimental <i>m/z</i> 443 adquirido padrão isotopólogo [M + 1] e [M + 2] ¹³ C e (B) C ₂₈ H ₃₁ O ₃ N ₂ padrão isotopólogo teórico [M + 1] [M + 2] ¹³ C.	54

Figura 20 Espectro de massas por (A) ESI(+) MS/MS (HCD) FT-Orbitrap para a caracterização do íon m/z 443 relacionado com o dispositivo antifurto e (B) possíveis estruturas para os fragmentos formados a partir do íon m/z 443.....	55
Figura 21 Composição média típica do petróleo com as correspondentes percentagens de cada tipo de compostos, sendo ~70 % de hidrocarbonetos, ~30 % de aromáticos, ~15% de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e ~5 % de compostos polares.	69
Figura 22 Exemplos de S-compostos encontrados em petróleo.	71
Figura 23 Exemplos de N-compostos encontrados em petróleo.	72
Figura 24 Exemplos de tipos e nomes de carbazóis encontrados no petróleo.	73
Figura 25 Exemplos de tipo e nomes dos O-compostos encontrados em petróleo.	74
Figura 26 Ionização em solução (A) protonação da piridina, (B) desprotonação do carbazol.	84
Figura 27(A) Ilustração espectro de ESI(+) FT-ICR MS m/z 200 a 1000 e (B) espectro de ESI(-) FT-ICR MS m/z 200 a 850, com poder de resolução de 400.000 em m/z 400, 100 <i>microscans</i> , para amostra (M-ThoMSon) de petróleo.	84
Figura 28 Ampliação do espectro de ESI(+) FT-ICR MS para amostra (M-ThoMSon) de petróleo. O incremento de 14 equivale a adição de CH_2 , indicativo de uma série homóloga para mesmo DBE (equivalente de dupla ligação).....	85
Figura 29 Ampliação do espectro de ESI(+) FT-ICR MS da amostra (M-ThoMSon) de petróleo. A variação de 2 (H_2) indica mudança de DBE (Equivalente de duplas ligações).	86
Figura 30 (A) Ilustração da expansão de 3 Dalton com a representação das figuras de mérito em espectrometria de massas, dado experimental e em (B) espectro teórico para o mesmo composto.	87
Figura 31 (A) Distribuição das classes N e N_2 , (B) e (C) número de carbono versus DBE das classes N e N_2 da amostra M-ThoMSon analisada por ESI(+) FT-ICR MS.	88

Figura 32 (A) Distribuição das classes e número de carbono vs DBE das classes (B) N, (C) NO, (D) NO ₂ , (E) O e (F) O ₂ da amostra M-ThoMSon analisada por ESI(-) FT-ICR MS.....	89
Figura 33 Espectros de V-EASI S (+) FT-ICR MS para amostra de petróleo referência (M-ThoMSon), com poder de resolução 400.000 em m/z 400 e acúmulo de 100 espectros.....	91
Figura 34 Ampliação do espectro de V-EASI S (+) FT-ICR MS para amostra (M- ThoMSon). O incremento de 14 equivale à adição de CH ₂ , indicativo de uma série homóloga para mesmo DBE (equivalente de dupla ligação).	92
Figura 35 Ampliação do espectro de V-EASI S (+) FT-ICR MS da amostra de petróleo (M-ThoMSon). Observa-se o padrão isotópico ¹³ C e ainda tem-se no espectro inferior o espectro teórico confirmando a intensidade deste padrão.....	93
Figura 36 (A) Exemplo dos espectros de massas de má qualidade obtidos por V- EASI S (+) FT-ICR MS amostra (M-ThoMSon) , resolução 400.000 em m/z 400, 100 espectros para amostras de petróleo, (B) Classe N atribuída e (C) DBE x Carbono.....	94
Figura 37 Amostras coletadas nos pinguins: R raspagem da pele e P de penas... <td>96</td>	96
Figura 38 Perfil químico e as classes atribuidas das amostras (A) Zeus-ThoMSon e (B) Zeus-PF, obtidas por meio da técnica ESI(-) FT-ICR MS, e suas respectivas classes atribuidas.....	98
Figura 39 Perfil químico e as classes dos compostos polares das amostras de petróleo Zeus-ThoMSon e das três amostras de petróleo das embarcações Zeus- PF, Roncador e Golfinho e suas respectivas classes atribuidas à baixo.....	99
Figura 40 PCA e HCA, respectivamente, dos resultados obtidos por ESI-MS da amostra de Zeus-ThoMSon e das amostras das embarcações Zeus-PF, Golfinho e Roncador.....	101
Figura 41 Perfil químico das amostras de pinguins N1, N2 e N3 e suas representações das classes atribuídas, N e O ₂	102
Figura 42 PCA e HCA, respectivamente, dos resultados obtidos por ESI-MS das amostras Zeus-ThoMSon e das amostras das embarcações Zeus-PF, Golfinho e Roncador.....	103

Figura 43 Espectros de massas ESI(+) FT-ICR para amostras de (A) óleo mineral, classe N e maior DBE, (B) semissintético, classes N e NS e menor DBE.	105
Figura 44 Espectros de massas ESI(+) FT-ICR MS para amostras de (A) óleo de motor sintético autêntico e (B) óleo de motor sintético falso.	106
Figura 45 Espectros de massas ESI(-) FT-ICR MS para amostras de (A) óleo de motor mineral, (B) óleo de motor semi-sintético e (C) óleo de motor sintético.....	107
Figura 46 Figuras de mérito para os analisadores de massas em termos de intensidade e razão massa sobre carga (Schmidt et al.; 2014)	108
Figura 47 (A) Espectro de massas obtido com o analisador ICR em modo positivo da amostra JC. Observar o decaimento da resolução com o aumento da m/z . No destaque, uma ilustração da cela do ICR. (B) indicação da distribuição da DBE x números de carbonos nesses compostos e (C) Classe N.....	109
Figura 48 (A) Espectro de massas obtido com o analisador Orbitrap da amostra JC, apresentando o decaimento da resolução com o aumento da m/z . Em destaque a ilustração do analisador orbitrap, (B) Classe das piridinas e (C) indicação da distribuição da DBE e os números de carbonos nos compostos....	111
Figura 49 (A) Espectro de massa obtido com o analisador MegaOrbitrap da amostra JC e o decaimento da resolução com o aumento da m/z , (B) Classe das piridinas e (C) Distribuição da DBE em função dos números de carbonos nesses compostos.....	113
Figura 50 Expansão dos espectros obtidos com os espectrômetros de massas (ilustração): <i>Std. Orbitrap</i> (A), <i>ICR</i> (B) e <i>MegaOrbitrap</i> (C), respectivamente.	114
Figura 51 Gráfico das classes atribuídas e suas intensidades relativas no modo positivo de ionização para petróleo bruto por ESI(+) FT MS.	116
Figura 52 Gráfico das classes atribuídas e suas intensidades relativas no modo negativo de ionização para petróleo bruto por ESI(-) FT MS.....	117
Figura 53 Relação sinal-ruído (S/N) com desvio padrão ($n = 3$), obtido a partir da análise de uma amostra de óleo cru típico (A) <i>Std.Orbitrap</i> , (B) <i>ICR</i> , e (C) <i>MegaOrbitrap</i>	119
Figura 54 Cálculo do intervalo dinâmico para as análises de amostras de petróleo bruto utilizando os analisadores (A) <i>Std. Orbitrap</i> , (B) <i>ICR</i> e (C) <i>MegaOrbitap</i> . .	121

Figura 55 Erro espectral teórico (SET) para C ₂₆ H ₄₀ N e seu isótopologo C ₂₅ ¹³ CH ₄₀ N.	123
Figura 56 Erro espectral (SE) para C ₂₆ H ₄₀ N e seu isótopo C ₂₅ ¹³ CH ₄₀ N obtido a partir da análise de uma amostra de óleo bruto por <i>Std. Orbitrap</i> , ICR, e <i>MegaOrbitrap</i>	124
Figura 57 Transientes obtidos para cada analisador, organizado na mesma escala de tempo em milissegundos. Eles referem-se ao analisador (A) <i>Std. Orbitrap</i> (B) ICR (C) <i>MegaOrbitrap</i>	125
Figura 58 Espectros no mesmo range de massa, relatando as diferenças e semelhanças de exatidão de massa detectadas entre os espectrômetros avaliados (A) <i>Std. Orbitrap</i> , (B) ICR e (C) <i>MegaOrbitrap</i> , respectivamente.	126
Figura 59 Ilustração do calculo da Resolução e do Poder de Resolução para um espectro de massas. Este último é normalmente utilizado tanto pelo analisador ICR quanto com o analisador <i>MegaOrbitrap</i>	128
Figura 60 Poder de resolução obtido para análises de petróleo bruto com os analisadores <i>Std. Orbitrap</i> , ICR e <i>MegaOrbitrap</i> , usando ESI(+).	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espectrometria de massas (MS, do inglês – *Mass Spectrometry*), sempre esteve relacionada com descobertas fundamentais na ciência. Iniciando com grande impacto com a descoberta do elétron, passando pela elucidação dos isótopos, culminando no enriquecimento de urânio, até desenvolvimentos recentes e marcantes como as ciências ômicas, que iniciaram com a caracterização de macromoléculas, como as proteínas e, atualmente, estendem-se a diversas áreas. Por exemplo, ajudando a responder questões no campo criminal, sendo empregada para solucionar crimes ou atos civis em análises forenses. Dessa forma, a MS vem sendo utilizada como uma ferramenta científica de grande abrangência (Borman *et al.*, 2003).

As técnicas desenvolvidas em MS nas últimas duas décadas podem ser consideradas representantes de uma revolução em termos de análise química, tornando-as de grande peso para dar respostas assertivas em muitas áreas da ciência. Nesta tese, serão apresentadas aplicações em petroleômica e na área forense, mostrando as várias vertentes que a MS proporciona e também avaliando dois analisadores de massas de altíssima resolução.

Na área criminal, a verificação da autenticidade de documentos suspeitos é um campo de estudo muito importante em química forense. No Brasil, em uma tentativa de dificultar a ação dos falsificadores, o Banco Central lançou em 2010 a segunda geração de moeda Real, que apresenta itens de segurança com gráficos sofisticados como calcografia, registro coincidente, fibras de segurança, etc. Impõendo obstáculos mais fortes para a falsificação. No entanto, apesar dos esforços para combater a falsificação da moeda, a segunda geração de notas de Real já foi falsificada, principalmente os valores nominais de R\$ 100 e R\$ 50. As estatísticas oficiais mostram que uma média de 450 mil notas falsas são apreendidas por ano e que essa taxa é crescente (Schmidt *et al.*, 2014).

Este crime também leva a um grande prejuízo financeiro em todo o mundo, já que os falsificadores estão usando tecnologias cada vez mais avançadas de impressão e cópia por métodos que incluem imagem de captura de meios eletrônicos (*scanners*), de processamento (*software*) e impressão (*laserjet*, jato de tinta, *off-set*) ou fotocópia direta. Estes métodos podem levar à produção de notas com alta qualidade de falsificação, tornando difícil a diferenciação de notas genuínas por inspeção visual (Schmidt *et al.*, 2014).

Além da falsificação de notas da moeda brasileira, muitas vezes as verdadeiras são furtadas de bancos ou caixas eletrônicos (Alberici, *et al.*, 2010). A ação da polícia para tentar impedir, dificultar e identificar a ação dos bandidos, foi adicionar um sistema de segurança composto de um pigmento nos caixas eletrônicos. Dessa maneira, assim que os caixas eletrônicos são violados, o pigmento mancha as notas com uma coloração vermelho-rosa. Um dos estudos da MS na área de ciência forense tem sido, justamente, identificar notas roubadas que foram tingidas com tais corantes utilizados nos sistemas de segurança dos caixas eletrônicos e, também, avaliar se notas apreendidas sem a confirmação visual do tingimento, passaram por algum tipo de procedimento de limpeza com solvente (Schmidt *et al.*, 2014).

Uma das técnicas utilizadas nesse tipo de investigação é a fonte de ionização ambiente EASI (do inglês, *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization*), que permite a análise molecular não destrutiva da amostra, recentemente desenvolvida. Esta técnica permite a dessorção, ionização, e caracterização de analitos voláteis e não-voláteis por espectrometria de massas, diretamente de suas superfícies naturais e em um ambiente aberto, com pouco ou nenhum preparo de amostra (Alberici *et al.*, 2010).

No que diz respeito às áreas de estudos sobre o petróleo, muito se discute a respeito da sua formação. Atualmente, a teoria da origem orgânica é a mais aceita e as características dos óleos estão diretamente ligadas aos ambientes deposicionais da matéria orgânica que os deram origem (Tissot *et al.*, 1984).

INTRODUÇÃO GERAL

Neste contexto, a MS tem sido fundamental na busca por respostas para tais discussões (Simas *et al.*, 2012).

O petróleo bruto apresenta a composição química mais complexa entre as misturas de compostos orgânicos. De acordo com a teoria orgânica, o petróleo é formado a partir da matéria orgânica depositada em bacias sedimentares ao longo do tempo geológico. O termo “matéria orgânica” se refere às moléculas orgânicas na forma de monômeros ou polímeros derivados direta ou indiretamente de organismos vivos. Uma série de reações e/ou transformações físico-químicas podem ocorrer, tais como diagênese, catagênese e metagênese, transformando a matéria orgânica em petróleo, gás e outros resíduos carbônicos. O petróleo e seus derivados podem então servir como fonte de combustível e energia (Vaz, 2011).

A petroleômica é uma área recente e em crescente desenvolvimento que propõe estudar com maior abrangência possível os componentes do petróleo e como esses componentes afetam as suas propriedades e reatividade. Como objetivo principal, a petroleômica procura correlacionar as propriedades do petróleo com sua composição fornecendo respostas, por exemplo, às questões de origem, maturação e evolução térmica, que a indústria petroleira enfrenta diariamente, assegurando, assim, o controle de qualidade dos seus derivados como, por exemplo, combustíveis. Adicionalmente, visa gerar subsídios para as questões forenses que envolvam esta ciência (Pereira *et al.*, 2013).

Devido à complexidade das análises envolvendo petróleo, são necessárias técnicas e procedimentos analíticos que permitam medidas qualitativas e quantitativas detalhadas e confiáveis, a fim de se obter o máximo de informação sobre os componentes e a distribuição do número de carbonos, tanto para o petróleo como seus derivados. Estas informações são de extrema importância tanto para o gerenciamento dos processos de refino, como para determinar o valor econômico do petróleo.

Dentre os vários métodos analíticos utilizados para caracterização do petróleo, podemos destacar a cromatografia, a ressonância magnética nuclear e a MS. Dentre estas, a MS se tornou a técnica analítica mais utilizada para análise

INTRODUÇÃO GERAL

dessa mistura nos últimos anos. Porém, a complexidade do petróleo excedia os limites em termos de resolução e exatidão dos espectrômetros de massas disponíveis no mercado há cerca de 10-20 anos, limitando a análise direta de óleos crus. No entanto, com o desenvolvimento de analisadores de massas de altíssima resolução, tais como: a armadilha de *Penning* baseada na ressonância ciclotrônica de íons com tratamento dos dados pela transformada de Fourier (FT-ICR MS, do inglês, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) e a Armadilha de *Kingdon* com o uso da transformada de Fourier (conhecido como *Orbitrap*), juntamente com a fonte de ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês, *Electrospray Ionization*) e ainda outras fontes à pressão atmosférica e ionização ambiente, essa limitação foi minimizada, permitindo a análise direta de óleos crus com mais de 20.000 composições elementares distintas atribuídas (Rodgers *et al.*, 2005).

A evolução das técnicas analíticas é fruto da necessidade de versatilidade para os diversos tipos de análises químicas. Novas técnicas são desenvolvidas com o intuito de facilitar cada vez mais a análise, o preparo de amostras e a interpretação de dados. Nesse contexto, a estratégia de estudo para o desenvolvimento desse trabalho foi utilizar os espectrômetros de massas com analisadores de altíssima resolução como o ICR e *Orbitrap* para a caracterização molecular da tinta utilizada para a produção de notas de Real falsas e autênticas, bem como a caracterização do corante Rodamina B utilizado para identificação de notas furtadas de caixas eletrônicos com explosivos. Também se investigou, por meio dos mesmos analisadores, a análise de amostras complexas como o petróleo, e ainda, avaliou-se as melhores condições e fontes de ionização para tal.

2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: conceitos gerais

A espectrometria de massas (MS) se destaca dentre as técnicas analíticas instrumentais devido a sua abrangência e aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas, tecnológicas e forenses. Este destaque se deve aos avanços em instrumentação, principalmente no desenvolvimento de novos analisadores de massas e novas técnicas de ionização.

A técnica de MS permite discriminar de acordo com a razão entre massa e carga (m/z) de cada espécie analisada. A m/z é um número adimensional, ela é atribuída a um íon, ou seja, a razão m/z não é uma unidade e sim uma qualidade atribuída ao íon (Marshall, 1985). Assim, o que é medido em espectrometria de massas é a m/z e não a massa de um íon em Da (Daltons). Tem-se que apenas para íons monocarregados a m/z reflete a massa unitária do íon.

A Figura 1 ilustra o esquema de um espectrômetro de massas, destacando a sua diversidade em sistemas de ionização e analisadores de massas. Em geral, a análise por MS comprehende cinco etapas: (1) a introdução da amostra, (2) a ionização das moléculas ou acúmulo dos íons, (3) a passagem de um íon por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a m/z ou a permanência de um “pacote” de íons no interior de um analisador de massas, (4) o detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica ou um sensor que percebe a órbita dos íons e (5) o processador que converte a magnitude do sinal elétrico em função da m/z ou a transformada de Fourier que desdobra frequências em dados proporcionando o espectro de massas correspondente.

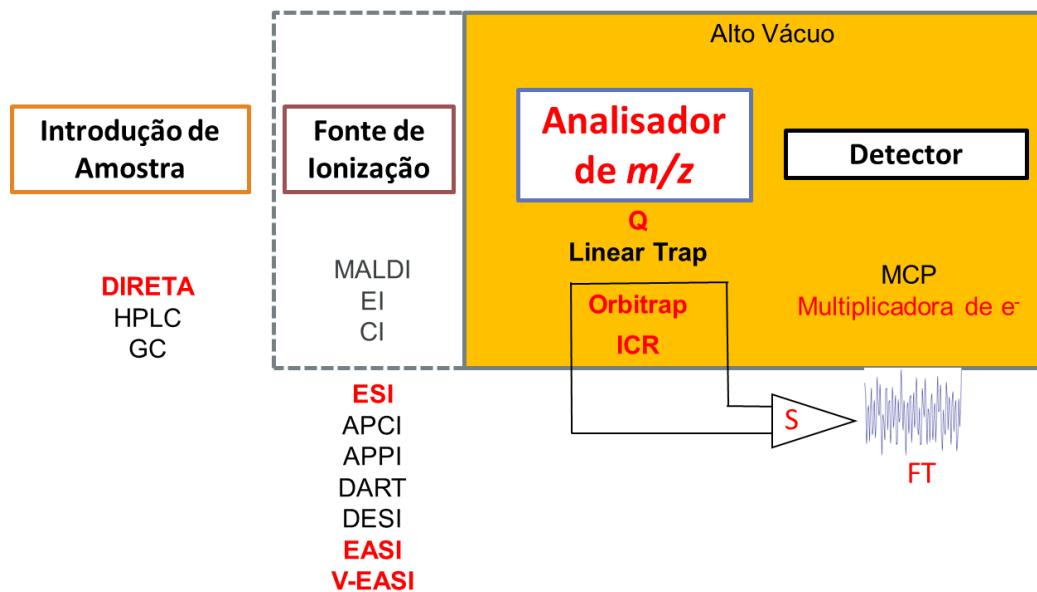


Figura 1 Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

Vários métodos para gerar íons foram desenvolvidos ao longo da história da MS, aplicáveis a diversas moléculas, desde moléculas apolares e voláteis como a ionização por elétrons (EI, do inglês - *Electron Ionization*) e a ionização química (CI, do inglês - *Chemical Ionization*) até moléculas polares e de elevada massa/carga, como a ionização por *eletrospray* (ESI, do inglês – *Electrospray Ionization*), que transfere íons em solução para fase gasosa. As técnicas de ionização ambiente como a EASI (do inglês – *easy ambient sonic spray ionization*), que não utilizam potenciais elétricos tornaram a introdução das amostras em spectrometria de massas mais simples e prática, pois analisa os íons mais próximos do seu estado *in natura*.

Além das fontes de ionização, a Figura 1 mostra que todos os analisadores de massas e os sistemas de detecção são mantidos sob alto vácuo, o que não se aplica necessariamente aos sistemas de ionização, pois alguns deles estão à pressão atmosférica, fato que revolucionou a espectrometria de massas, pois, assim, aumentou a possibilidade de analisar diferentes amostras em solução.

A discriminação dos íons através dos analisadores de massas pode ser realizada de dois modos, através da análise no espaço, onde os íons percorrem o

INTRODUÇÃO GERAL

analisador, ou através da análise no tempo, onde os íons permanecem armazenados. Esse evento dependerá do tipo de analisador de massas.

Embora os analisadores de massas sejam diferenciados pelo modo de trabalho, um fator comum a eles é a resolução. A Figura 2 ilustra a diferença de resolução entre dois analisadores de massas. O analisador de massas de resolução unitária determina a massa nominal (Figura 2A), assim o íon de m/z 292 com resolução unitária pode se referir à fórmula molecular $C_8H_{11}O_3N_5CIS$ ou $C_{10}H_{15}O_5NPS$. Já um analisador de alta resolução tem a capacidade de resolver cada íon e determinar a sua massa exata (Figura 2B), podendo atribuir-se fórmulas moleculares para cada sinal resolvido de acordo com o seu defeito de massa 292.02656 ($C_8H_{11}O_3N_5CIS$) e 292.04031 ($C_{10}H_{15}O_5NPS$). Desta maneira, a resolução pode ser definida como a capacidade do analisador em discriminar relações m/z adjacentes e ou resolver um único íon. Os analisadores de massas comerciais possuem resolução que vão de 1.000 (resolução unitária), até 100.000 (alta resolução), de 100.000 até 1.000.000 (altíssima resolução), mas podendo chegar a 10.000.000 (Denisov *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2014).

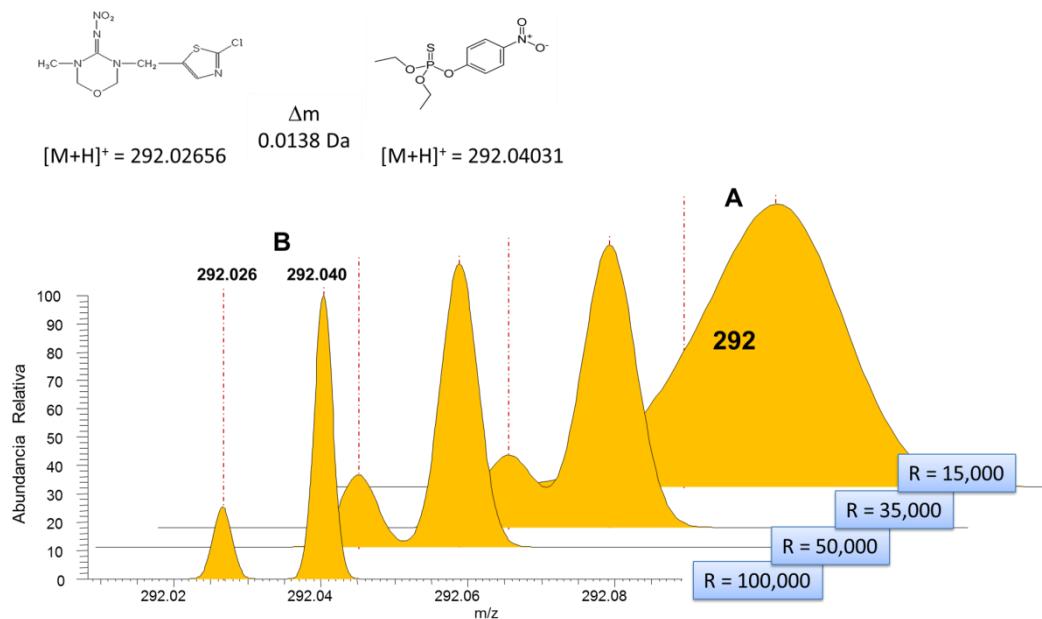


Figura 2 Esquema do aumento da resolução em analisadores de massas no tempo desde a baixa resolução (região A) até a altíssima resolução (região B).

Dentre os analisadores de massas, o mais comum é o monoquadrupolar. Esse tipo de analisador tem como característica a análise no espaço e possui resolução unitária. Outros analisadores de massas que podem ser citados são os analisadores de aprisionamento de íons no tempo, tais como: *ion trap* (IT), a ressonância ciclotrônica de íons (ICR) e o mais novo dentre eles, o *Orbitrap*. A diferença de resolução e exatidão de massas entre os analisadores de massas está ligado principalmente à sua eletrônica e ao princípio físico utilizado na discriminação das *m/z* medidas e calibrações obtidas através de padrões.

Em conjunto com a resolução, tem-se a exatidão de massas que é obtida através da calibração do analisador. Ela é determinada pelo erro calculado em partes-por-milhão (ppm) do desvio da medida experimental em relação ao valor da massa/carga teórica, indicando quão próximo o valor experimental está do valor exato. A alta exatidão de massa oscila entre valores de 0,1 a 5 ppm de erro. Se menor é o erro, maior é a probabilidade da fórmula molecular mínima atribuída ser exata.

2.1 Técnicas de Ionização

Outro ponto importante a se destacar para o sucesso da espectrometria de massas é em relação aos inovadores avanços na tecnologia das fontes de ionização. Dada a grande diversidade de modelos, serão detalhadas apenas as fontes que foram utilizadas na realização dos experimentos propostos para este trabalho.

2.1.1 Ionização à pressão atmosférica por ESI MS

A ionização por *electrospray* (ESI) passou por duas fases distintas de investigação e desenvolvimento. A primeira decorreu antes de 1970, com Malcolm

INTRODUÇÃO GERAL

Dole, que focou nos aspectos fundamentais do processo de produção de carga das moléculas. A segunda fase é atribuída ao químico pioneiro John Bennett Fenn, em 1984. Após a contribuição de Fenn a técnica sofreu grandes melhorias com o desenvolvimento de fontes comerciais baseadas no princípio de acumulação de cargas elétricas (Fenn *et al.*, 1989).

Em ESI os três processos que ocorrem são: oxidação/redução, protonação/desprotonação e a formação de adutos por coordenação de cátions e ânions como Na^+ , K^+ e Cl^- , dentre outros. Os íons formados, portanto, dependem do balanço entre esses três processos, produzindo assim íons moleculares M^+/M^- , moléculas protonadas $[\text{M}+\text{H}]^+$ ou desprotonadas $[\text{M}-\text{H}]^-$ e os adutos $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}-\text{Cl}]^-$, dentre outros. Entretanto, na maioria dos casos, a ionização ocorre por protonação/desprotonação, sendo observado um único sinal por analito o que é uma grande vantagem desta técnica. A ionização por ESI é realizada à pressão atmosférica, as moléculas em solução são inseridas através de um capilar, ao qual é aplicado um potencial elétrico (1-5 kV). Três características fazem com que ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização: capacidade de produzir íons multiplamente carregados; as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que torna possível o acoplamento com muitas técnicas de separação e a última peculiaridade está no fato de ser uma técnica de ionização suave, o que permite a análise da molécula intacta (sem ou com pouca fragmentação), mantendo inclusive as interações não covalentes. Outro destaque é a análise de moléculas não voláteis e de alta massa molecular. Essas características foram fundamentais para o desenvolvimento dos estudos ômicos. A Figura 3 apresenta um esquema típico de uma fonte ESI.

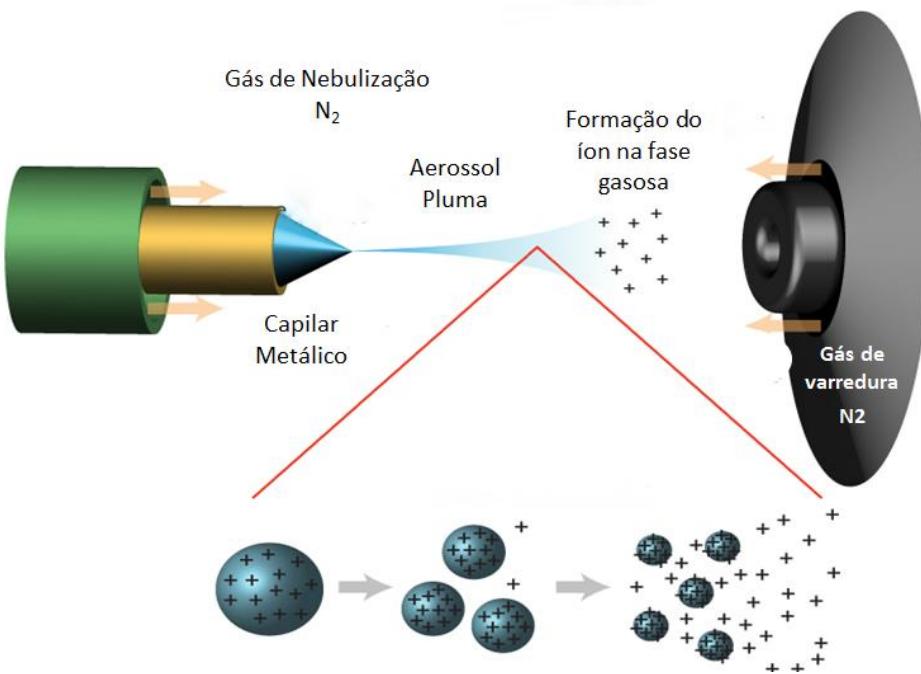


Figura 3 Ilustração esquemática de uma fonte de ionização por "Electrospray" Adaptado de:<http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php>

Na fonte de ionização ESI, o spray é produzido aplicando um potencial elétrico que induz o acúmulo de cargas na superfície do líquido ao final do capilar, onde serão formadas gotas altamente carregadas positiva ou negativamente. Um gás injetado coaxialmente permite a dispersão das mesmas e a formação do spray em um espaço limitado. Essas gotas atravessam uma corrente de gás quente (gás de dessolvatação), sendo o mais comum é o nitrogênio, ou passam por um capilar aquecido para remover as últimas moléculas de solvente (Pereira *et al.*, 2013).

2.1.2 Ionização em condições ambiente por EASI MS

A técnica de ionização ambiente por spray sônico (EASI) aplicada para dessorção de íons foi desenvolvida no Brasil por Eberlin e colaboradores, sendo primeiramente denominada como ionização/dessorção por spray sônico, do inglês *Desorption Sonic Spray Ionization* (DESSI) (Haddad *et al.*, 2006). Nesta técnica, o

mecanismo de ionização é baseado na ionização por spray sônico do inglês: *Sonic Spray Ionization* (SSI) que não utiliza radiação, voltagem ou mesmo temperatura, como na maioria das técnicas de ionização conhecidas (Haddad *et al.*, 2008).

O modelo que melhor explica o fenômeno de ionização por EASI está baseado na possibilidade de gotas carregadas, com desequilíbrio entre as cargas positivas e negativas, serem formadas no spray sônico como representa a Figura 4.

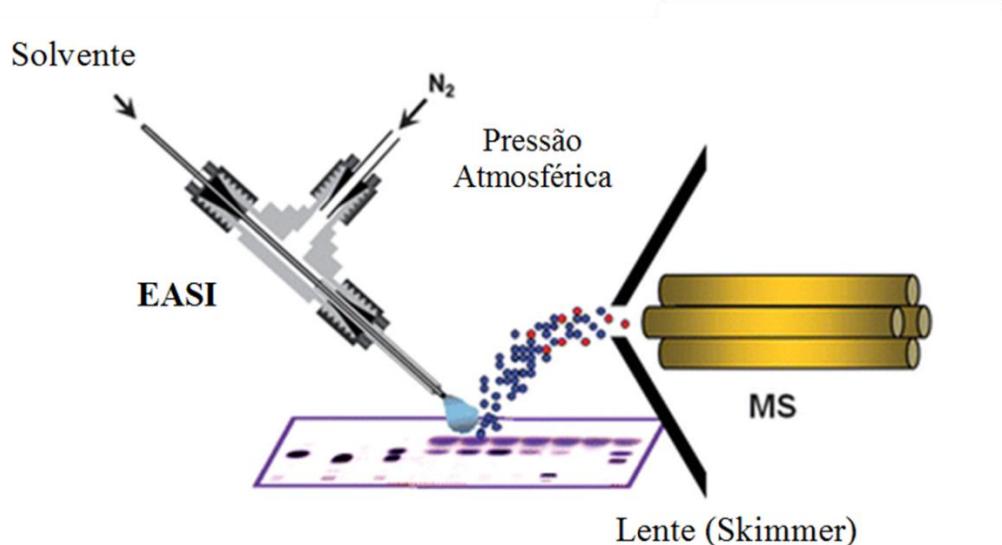


Figura 4 Ilustração esquemática de uma fonte de ionização sonic-spray “EASI” (adaptado de Haddad *et al.*, 2006).

A Figura 4 representa a infusão de um solvente polar por meio de um capilar de sílica fundida (d.i. 100 μm) com vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$ junto com vazão do gás de arraste ($\sim 3 \text{ L min}^{-1}$), promovendo um cisalhamento intenso com a liberação no spray de microgotículas. Porém, as microgotículas têm dificuldade de estabilizar carga e, assim, apresentam baixa densidade de cargas com a probabilidade estatística de ocorrer um desequilíbrio tanto a favor das cargas positivas quanto das cargas negativas. Em um ângulo de 45° , o solvente é bombeado e são geradas as microgotículas que dessorvem moléculas ao entrar em contato com a amostra do analito, que estão na superfície de um material inerte. Seguido da dessorção, o processo é semelhante à ESI, assim, conforme a

gota perde solvente, a densidade de cargas aumenta até um ponto que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e os íons são ejetados da gota. Depois de formados, os íons agora dessolvatados e na fase gasosa alcançam o tubo de transferência. Nesse tubo, um campo elétrico na entrada do cone é responsável por atrair os íons formados, guiando-os ao analisador de massas (Corilo *et al.*, 2010; Haddad *et al.*, 2008).

2.1.3 Ionização em condições ambiente por V-EASI MS

O desenvolvimento de uma fonte portátil para ionização ambiente de moléculas por espectrometria de massas como a V-EASI permitiu análises rápidas e diretas em diversas matrizes (Santos *et al.*, 2011). No entanto, alguns fatores tornam a técnica inviável para análises em campo, como a instrumentação complexa, o uso de cilindros de nitrogênio, bombas injetoras e fontes elétricas de alta tensão. Com a intenção de eliminar estes problemas, outro protótipo foi desenvolvido, chamado de Spartan V-EASI (Schwab *et al.*, 2012) que conta com uso de peças comerciais ou usualmente encontradas em laboratórios químicos. A fonte criada elimina a necessidade do uso de cilindros de gás e bombas injetoras, tornando o sistema totalmente portátil e de baixo custo. O dispositivo foi testado na análise de diversas classes de compostos orgânicos, demonstrando funcionalidade e potencial aplicação para espectrômetros de massas portáteis (Schwab *et al.*, 2012).

Ambas as fontes descritas (V-EASI e Spartan V-EASI) são baseadas nos efeitos Venturi e *Sonic-spray Ionization*, que possibilita o auto-bombeamento da amostra/solvente, sobre um fluxo de ar comprimido através de uma lata de aerossol, sem a necessidade da aplicação de alta voltagem e aquecimento (Schwab *et al.*, 2012). Descoberto pelo italiano Giovanni Battista Venturi, o efeito Venturi ocorre quando um fluido de alta velocidade se desloca através de uma seção de tubo restrito, provocando uma redução da pressão do fluido, favorecendo o efeito de auto-bombeamento (Alberici *et al.*, 2010). Na Figura 5,

pode ser visualizado um esquema da fonte portátil de V-EASI construída a partir de peças simples e facilmente encontradas no comércio e laboratórios.

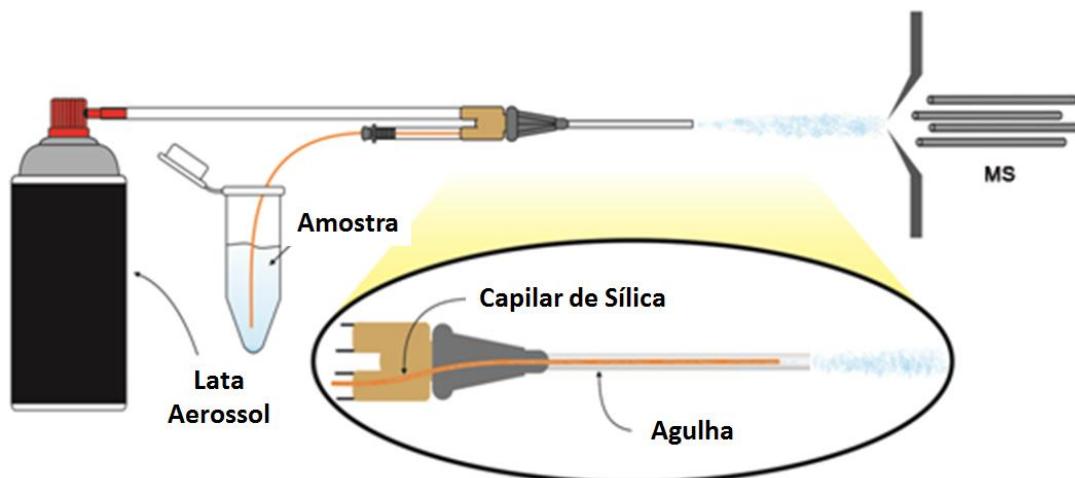


Figura 5 Esquema da fonte portátil de *Spartan V-EASI* (adaptado de Schwab *et. al.*, 2012).

A fonte é montada a partir de um cateter cirúrgico de duas vias que funciona como conector tipo T, uma lata de aerossol de ar comprimido (Implastec Co.) – que substitui reguladores de gás e cilindro de nitrogênio conectado em um dos canais do cateter; um capilar de sílica fundida com 30 cm de comprimento (diâmetro interno de 100 µm e diâmetro externo de 373 µm) ligado entre as extremidades de um dos canais do cateter. Nesta situação descrita, o capilar de sílica percorre todo o cateter e, posteriormente, fica posicionado dentro de uma agulha hipodérmica (de 3 a 4 mm da extremidade da agulha) colocada na outra extremidade do cateter. Este arranjo possibilita o auto-bombeamento da amostra de forma adequada partindo de um recipiente de plástico ou vidro (vials inertes ao tolueno utilizado na diluição de petróleo), através do efeito de *sonic spray*. Um tubo de engate rápido e uma anilha são usados para selagem do sistema.

Este tipo de ionização pode ser utilizado na análise de amostras líquidas, onde a ponta livre do capilar de sílica é mergulhada na solução de interesse e posicionada cerca de 5 cm perpendicular à entrada do espectrômetro de massas. Apesar da simplicidade do dispositivo, ele é capaz de gerar um fluxo constante e

um eficiente *spray*. O fluxo gerado pelo gás é dependente da força aplicada manualmente ao pressionar a tampa da lata. No entanto, quando pressionado até o fim, produz-se uma vazão constante de $4,0 \text{ L min}^{-1}$, que pode ser mantida por dois minutos com intervalos de 5 minutos entre as análises. Após períodos superiores a 2 min, ocorre um resfriamento excessivo da lata, afetando, então, a vazão de gás. Entretanto, normalmente apenas alguns segundos de pulverização são suficientes para produzir um espectro de massas apropriado por V-EASI. Uma estimativa mostrou que uma lata de aerossol de ar comprimido gera até 40 minutos de aquisição de dados no espectrômetro (Schwab *et al.*, 2012). Vale ressaltar que a lata de aerossol normalmente utilizada é composta por um propelente a base de hidrofluorcarbonos, que não interferem quimicamente nas análises.

2.2 Analisadores de massas

Existem diferentes estratégias para se discriminar os íons gerados na fonte de ionização, dependendo do analisador de massas disponível. Estão disponíveis no mercado analisadores como o *ion trap linear*, no qual os íons são confinados radialmente em um campo de radiofrequência bidimensional (2D) e axialmente pela barreira potencial gerada pela aplicação de maior tensão nas extremidades do analisador. O *ion trap linear* pode também ser utilizado para isolar íons de relação m/z e não somente para armazenar. O armazenamento de íons no *ion trap linear* é suficientemente maior que em analisadores *ion trap tridimensional* (3D). *Ion trap* 3D difere de todos os outros espectrômetros de massas por operar em altas pressões (10^{-1} Pa). Essa pressão é mantida por um fluxo de gás hélio ou argônio, o qual esfria os íons por colisão, reduzindo, assim, suas energias de vibração e rotação, de modo que o amortecimento dos movimentos dos íons estende a m/z , permitindo um armazenamento e resolução adequada (Stafford *et al.*, 1984).

Outros que podem ser citados são os analisadores por tempo de vôo (TOF) (Klitzke *et al.*, 2012), que ainda são muito utilizados para análise de proteínas quando não se dispõe de um analisador de altíssima resolução, como ressonância ciclotrônica de íons (ICR) ou *Orbitrap* – desenvolvido recentemente. Cada analisador possui diferenças de resolução e exatidão de acordo com sua eletrônica e princípio físico utilizado para discriminar as *m/z* determinadas (Makarov *et al.*, 2006).

O analisador de massas quadrupolo que atua como um filtro de massas no espaço, e os analisadores de massas de alta resolução do tipo TRAP, que analisam íons no tempo, como ICR e *Orbitrap* serão discutidos, pois estes foram base de estudo deste trabalho.

2.2.1 Analisador de massas quadrupolo (Q)

A escolha dentre diferentes estratégias é fundamental para se discriminar íons dependendo do analisador de massas utilizado. O mais comum é o analisador quadrupolar (Q), onde os íons são separados por sua estabilidade de trajetória em um campo criado por oscilações elétricas aplicadas nas hastes metálicas, como ilustrado na Figura 6.

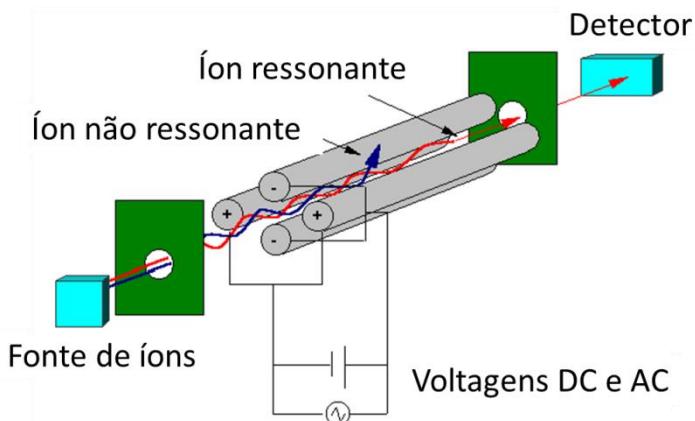


Figura 6 Esquema do analisador Quadrupolo, (Q) (Adaptado de <http://www.tissuegroup.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>).

Observa-se que este analisador é formado por quatro hastes metálicas paralelas entre si, nas quais uma corrente elétrica do tipo contínua, semelhante a corrente gerada em uma pilha, conhecida como *direct current* (DC) e para conduzir os íons um potencial de rádio frequência (RF) é aplicado. A RF e DC são aplicadas alternadamente. Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados no centro da região entre as quatro hastes e atravessam axialmente o quadrupolo. Suas trajetórias serão dependentes do campo elétrico produzido onde apenas íons de uma *m/z* específica terão uma trajetória estável e chegarão ao *detector*, normalmente uma multiplicadora de *elétrons* (Hoffman e Stroobant 2007; Miller *et al.*, 1986)

2.2.2 Analisador de massas ICR

A aplicação da transformada de Fourier no desenvolvimento do FT-ICR MS no início da década de 1970 tornou possível a obtenção de espectros com altíssima resolução (poder de resolução maior que 100.000) de maneira mais rápida (Marshall, 1985). A determinação da razão massa-carga (*m/z*) no analisador de ICR é baseada no movimento ciclotrônico dos íons (Marshall, 1998). Esse movimento é devido ao deslocamento de um íon presente em um campo magnético uniforme, *B*; determinado em teslas (T), (1 tesla = 1 kg . segundo⁻² . ampere⁻¹), o qual está sujeito a uma força, dada pela Equação 1:

$$F = z.v \times B \quad \text{Equação 1}$$

Onde *z* e *v* correspondem à carga do íon e à velocidade, respectivamente. A carga do íon *z* é uma denotação química, enquanto que *v* é uma denotação física. O campo magnético faz com que os íons tenham uma trajetória circular com raio (*r*), ou seja, um movimento ciclotrônico. A Equação 2 mostra uma relação

inversa entre o raio e o campo magnético, indicando que campos magnéticos altos criam raios iônicos pequenos.

$$r = \frac{mv}{zB} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação, m e r correspondem à massa e o raio da trajetória do íon, respectivamente. Já a Equação 3 é conhecida como a equação ciclotrônica, na qual a freqüência ciclotrônica, denotada por ω_c , é descrita como:

$$\omega_c = \frac{zB}{m} \quad \text{Equação 3}$$

Na Equação 3, todos os íons com mesma m/z terão a mesma freqüência ciclotrônica independentemente de suas velocidades. A altíssima resolução é consequência da quantidade de ciclos que um determinado íon percorre ao ser excitado na presença de um campo magnético, representado esquematicamente na Figura 7.

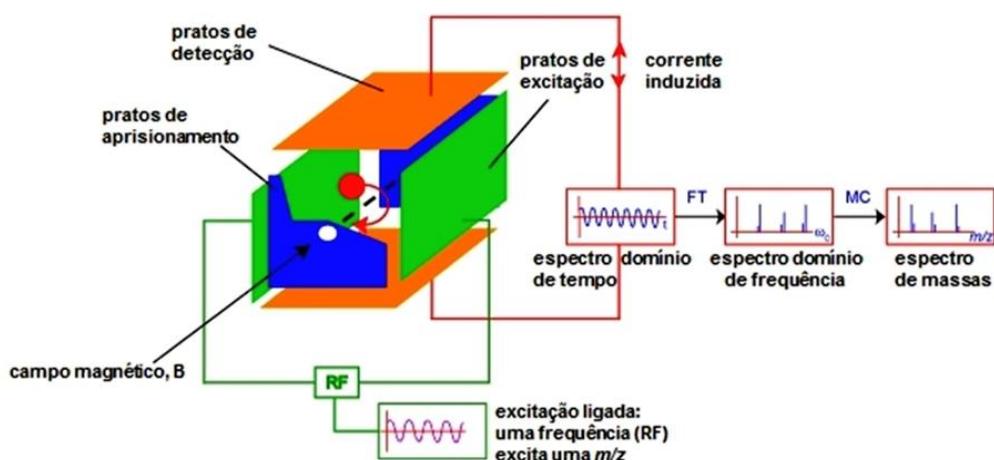


Figura 7 Representação esquemática de FT-ICR MS mostrando o aprisionamento dos íons, detecção e geração de sinal de uma cela de ICR (Modificado de <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/fticr-massspec.html>).

Outra característica dos analisadores ICR é que requerem aproximadamente 3 s para a aquisição de um espectro na resolução usual para análise de petróleo. Entretanto, como as técnicas de ionização mais utilizadas produzem íons constantemente, é vantajoso que os íons sejam acumulados externamente ao analisador e, então, injetados assim que o ciclo de aquisição de dados esteja completo (Belov *et al.*, 2001).

Depois de obter os espectros de massas, a interpretação dos mesmos apresenta alguns desafios analíticos. Um espectro de uma amostra complexa pode conter milhares de sinais com várias *m/z* por massa nominal com grandes diferenças na ionização dos componentes presentes, significando que nem todos poderão estar quantitativamente representados, tornando a análise e interpretação dos dados um desafio. Muitos avanços e estudos têm sido feitos utilizando as diferentes fontes de ionização disponíveis, mas poucos estudos foram efetuados focando nas diferenças que possam existir entre análises com diversas fontes de ionização e analisadores, bem como fatores que podem contribuir para diminuir estas diferenças.

Há a necessidade, do uso de programas específicos para visualização e interpretação dos dados que, aliados à capacidade de altíssima resolução e exatidão de massas de um FT MS, facilitam a identificação de moléculas orgânicas dentro destes espectros complexos (Corilo *et al.*, 2010; Schmitt-Kopplin *et al.*, 2008).

2.2.3 Analisador de massas Standard Orbitrap

O *Orbitrap* foi apresentado pela primeira vez como uma curiosidade científica em uma conferência da Sociedade Americana de Espectrometria de Massas (ASMS) em 1999 (Makarov, 2000). Pouco tempo depois, foi lançado ao mercado no ano de 2005, atuando como um analisador de alta resolução, exato e

compacto no espectrômetro do tipo LTQ *Orbitrap*. Desde então, muitos instrumentos baseados nesta tecnologia foram produzidos e se tornou uma realidade em laboratórios analíticos de todo mundo (Makarov *et al.*, 2006).

O *Orbitrap* herdou algumas características de seus parentes mais velhos como o FT-ICR, onde o princípio de detecção é a partir da órbita dos íons armazenados utilizando a transformada de Fourier. Porém, a tecnologia *Orbitrap* e suas ferramentas também evoluíram, com o passar do tempo. As principais ferramentas e melhorias estão descritas a seguir.

O analisador de massas *Orbitrap* é composto por um eletrodo externo em forma de barril com um raio máximo R_2 e um eletrodo fusiforme central ao longo do eixo de raio R_1 . Nesse aparato, o eletrodo externo é mantido neutro e o eletrodo central mantido com uma corrente direta fixa, o esquema do analisador é representado na Figura 8. Neste analisador, quando se diminui a distância entre o eletrodo interior e o exterior, juntamente com uma elevada frequência de oscilação entre os íons, tem-se como resultado um maior poder de resolução por tempo fixo de aquisição (Makarov, 2009).

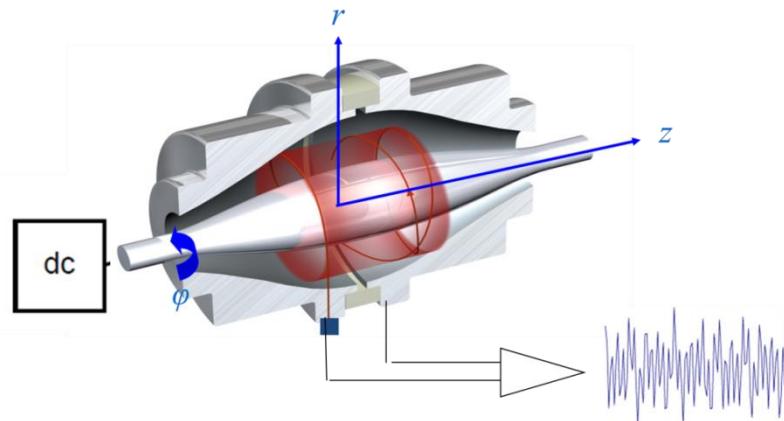


Figura 8 Representação esquemática do analisador Orbitrap MS, demonstrando as três órbitas envolvidas, frequência de rotação ω_ϕ , frequência de oscilação radial ω_r , e frequência de oscilação axial ω_z (Makarov *et al.*, 2009).

O *Orbitrap* tem como base a análise no tempo onde os íons são confinados eletrostaticamente em torno de um eletrodo central com oscilações harmônicas, utilizando apenas corrente direta (DC) (3,5 kV) e dispensando o uso de

radiofrequência (RF) ou campo magnético. A frequência ω dessas oscilações axiais harmônicas ao longo do eixo Z depende apenas da m/z e da constante instrumental k, descrita na Equação 4.

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$
 Equação 4

Os íons devem entrar no analisador de massas *Orbitrap* de forma bastante rápida, em forma de um funil. Esse princípio é conhecido como *squeezing*, o sinal gerado pelos íons analisados é tratado por transformada de Fourier Rápida (FFT - do inglês, *Fast Fourier Transformation*).

2.2.3.1 C-Trap (*Trap Central*)

Na transmissão desde a fonte até o analisador *Orbitrap*, os íons armazenados são “resfriados” com gás nitrogênio e posteriormente ejetados através de variação de RF multipolar no interior de um *trap* curvo denominado *C-Trap* (Figura 9).

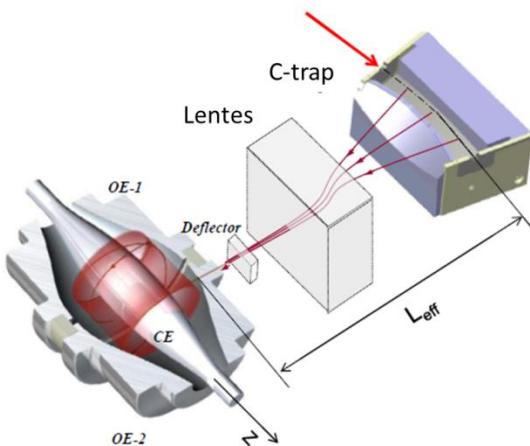


Figura 9 Representação esquemática de um C-Trap e do analisador Orbitrap MS, demonstrando a focalização dos íons e aprisionamento, respectivamente (Modificado de Makarov *et al.*, 2013).

Ao entrar no *C-Trap*, os íons perdem sua energia cinética em colisões com gás nitrogênio e são armazenados no seu centro. Em seguida, esses íons são ejetados em sentido ao centro de curvatura, utilizando variações de RF para condução dos íons. Por fim, uma elevada tensão é aplicada na *Z-lens* para gerar o fenômeno conhecido como “squeeze”, ou seja, afunilamento dos íons, para que estes entrem na forma de lâminas no analisador *Orbitrap*. A população de íons no interior do *C-trap* é controlada automaticamente por uma multiplicadora de elétrons que detecta os íons e determina o máximo de íons que devem ser armazenados. Este evento, conhecido como ganho automático de íons (do inglês *Automatic Gain Control - AGC*), é de elevada importância durante a transferência, análise e detecção (Hu *et al.*, 2005).

2.2.3.2 *Orbitrap e suas variações*

Todos os analisadores de massas que empregam análise no tempo, tais como os *traps*, são conhecidos por se beneficiar do aumento da força de campos elétricos e magnéticos aplicados sobre os mesmos. Os maiores campos beneficiam o intervalo dinâmico, reproduzibilidade, poder de resolução, tolerância

ao efeito de repulsão entre cargas, etc. Estes benefícios são os principais objetivos na busca de cada vez mais elevados campos na ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR). Melhorias semelhantes às da família FT poderiam ser naturalmente esperadas no analisador de massas *Orbitrap*, entretanto, a natureza puramente eletrostática aplicada nos analisadores do tipo *Orbitrap* determinou estratégias diferentes para sua evolução.

No FT-ICR, a intensidade do campo magnético pode ser elevada apenas aplicando-se magnetos maiores e mais poderosos, enquanto que em um *trap* eletrostático como o *Orbitrap* podem ser aplicadas maiores tensões no eletrodo central e também modificar a geometria do analisador, como exibido na Figura 10.

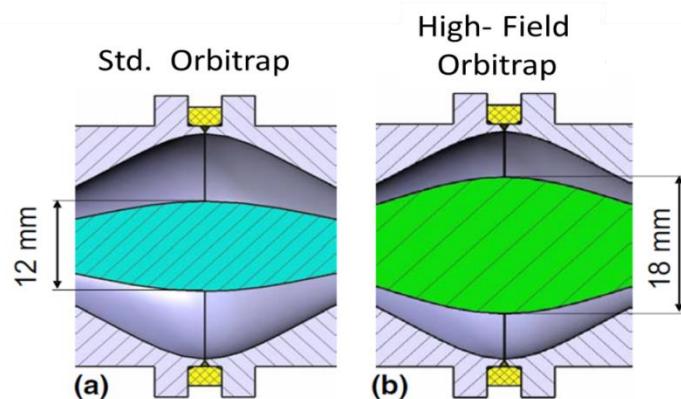


Figura 10 Representação esquemática do analisador (a) *Orbitrap Standard* e (b) *High-Field Orbitrap*, demonstrando suas dimensões (Modificado de Makarov *et al.*, 2009).

Com isso, variações em R1, R2 e na voltagem do eletrodo central podem afetar de maneira positiva ou negativa as especificações deste analisador. Desta maneira, fixando R2 e aumentando R1 em 30%, além de elevar de 3,5 para 5 kV a voltagem no eletrodo central, foi possível a obtenção do High Field Orbitrap (Figura 10b) (Makarov *et al.*, 2009). Com essas variações, foi possível elevar o poder de resolução em aproximadamente 50% na faixa de *m/z* entre 200 e 2000 (Figura 11).

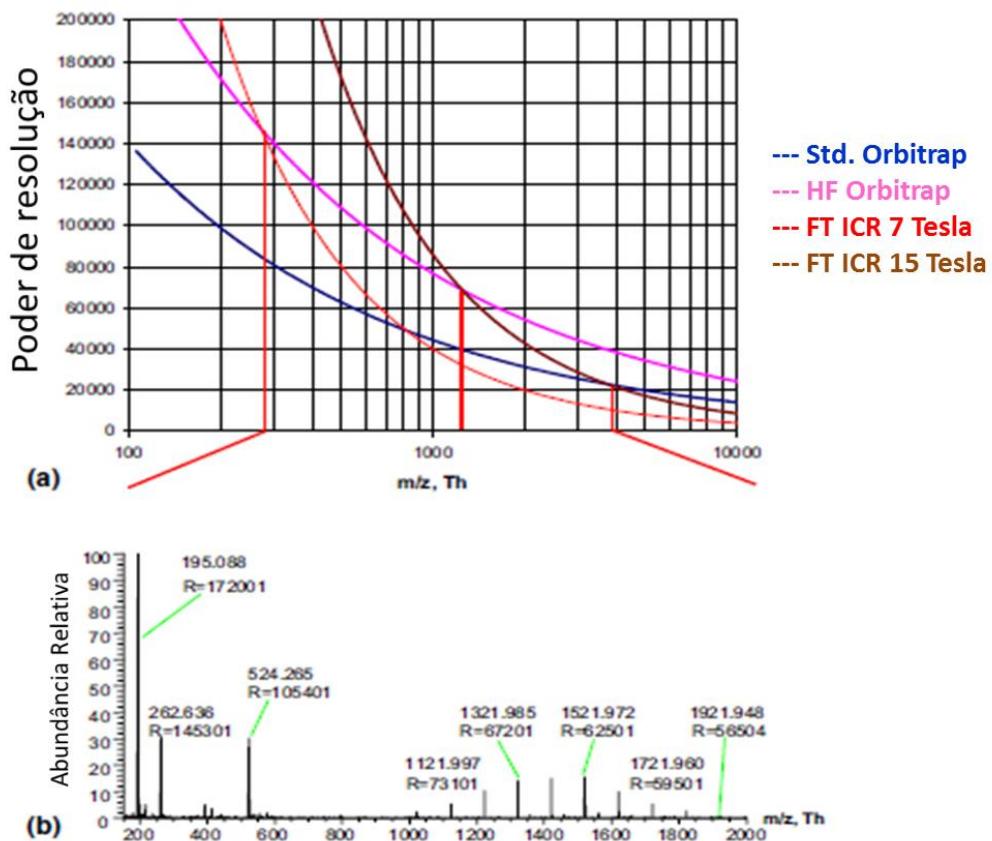


Figura 11 Representação da variação da resolução para os analisadores Std. Orbitrap, HF Orbitrap 5kV, 7T FT-ICR e 15T FT-ICR (a), e um espectro da solução de calibração Calmix demonstrando resolução experimental (b) (Modificado de Makarov *et al.*, 2009).

O analisador *High Field Orbitrap* demostrou ser superior ao *Standard Orbitrap* em resolução. Através de cuidadoso equilíbrio entre voltagens, cunhagem e parâmetros de operação, o *High Field Orbitrap* foi capaz de proporcionar um poder de resolução de 105.401 em razão m/z 524 e 172.000 em razão m/z 195 para peptídeo e cafeína, respectivamente, indicando que tanto a análise de grandes moléculas quanto de pequenas moléculas podem ser beneficiadas com esta alteração estrutural. Foi também observado que as mudanças no analisador *High Field Orbitrap* tendem a não influenciar no armazenamento dos íons no seu interior e, consequentemente, não afetam as interações entre as cargas dos íons. Tipicamente, na espectrometria de massas com o analisador *Orbitrap* é esperada

obtenção de resolução não superior a faixa entre 100.000 e 280.000 dentro de tempos de detecção de 1-2 s. Com as recentes inovações na tecnologia *Orbitrap*, tais como as menores dimensões do analisador e os avanços no método de processamento da transformada de Fourier (*enhanced Fourier Transform - eFT*) (Lange *et al.*, 2011), foi possível acelerar a taxa de aquisição em cerca de 3,6 vezes. Além disso, obteve-se transientes mais longos possibilitando resoluções mais elevadas. Estes avanços, combinados com a cunhagem e/ou usinagens do analisador refinada, permitiram o desenvolvimento do analisador *MegaOrbitrap* (Figura 12), com o qual é possível atingir 1.000.000 de resolução na *m/z* 300.

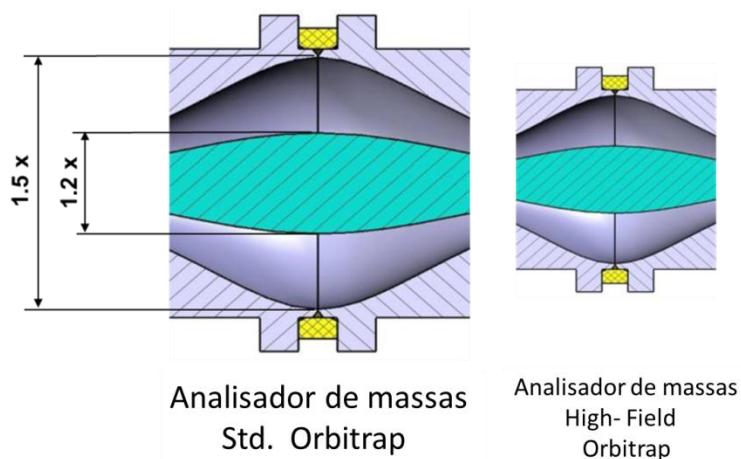


Figura 12 Representação esquemática do analisador Orbitrap Standard e High-Field Orbitrap (MegaOrbitrap), demonstrando suas dimensões (Modificado de Denisov *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a proposta de trabalho para o novo analisador de massas (*High-Field Orbitrap*) é a realização de análises de amostras complexas como proteínas intactas multicarregadas e petróleo bruto. Apesar de estudos com frações de petróleo já terem sido realizados, vale ressaltar que a análise de petróleo bruto com o analisador de massas *MegaOrbitrap* (ainda em fase de desenvolvimento) é inédita e será apresentada nesta tese (Schmidt *et al.*, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A presente tese teve como impulso abordar aspectos inovadores ao utilizar analisadores de massas de altíssima resolução como o ICR e Orbitrap nas áreas de química forense e petroleômica, as quais estão apresentadas neste trabalho em dois capítulos.

Na análise forense, investigou-se os íons moleculares em nota de Real falsa e autêntica, e também casos de notas tingidas ao serem furtadas de caixas eletrônicos violados (capítulo 1).

É sabido que o analisador de massas ICR é capaz de analisar petróleo bruto, no entanto, dados a respeito do desempenho de tais amostras com o analisador *Orbitrap* ainda são escassos e insatisfatórios. Uma comparação entre os analisadores de massas por FT-MS pode ser realizada em termos de figuras de mérito. Nesse contexto, se faz necessário avaliar a necessidade de analisadores de altíssima resolução na confiabilidade dos resultados obtidos para análises forenses realizadas com íons moleculares ou com um perfil químico desses íons (capítulo 2).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberici, R.M.; Simas, R.C.; Sanvido, G.B.; Romão, W.; Lalli, P.M.; Benassi, M.; et al. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 398, 265-94. **2010**.
- BCB - Brazilian Central Bank website. Counterfeit banknote statistics. Accessed in November, 15, **2013**: <<http://www.bcb.gov.br/?mecirestatisticas>>.
- Belov, M. E.; Nikolaev, E. N.; Anderson, G. A.; Udseth, H. R.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Masselon, C. D.; Gorshkov, M. V.; Smith, R. D. Design and Performance of a ESI Interface for Selective External Ion Accumulation Coupled to a Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometer. Analytical Chemistry, 73, 253-261. **2001**.
- Borman, S.; Russel H.; Siuzdak G.; A Mass Spec Timeline, TODAY'S CHEMIST AT WORK, ACS. **2003**.
- Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Nascimento, H. D. L.; Klitzke, C. F.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Neto, E. V. S.; Rodgers R. P. and Eberlin, M. N. Petroleumics by EASI (\pm) FT-ICR MS. Analytical Chemistry, 82, 3990–3996. **2010**.
- Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Simas, R. C.; Nascimento, H. D. L.; Klitzke, C. F.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W. L.; Neto, E. V. S.; Eberlin, M. N. Petro Mass Spec: Simplifying Petroleomic Data Analysis via Software Processing Data. 58th ASMS on Mass Spectrometry & Allied Topics, Salt Lake City –USA. **2010**.
- Denisov, E.; Damoc, E.; Lange, O.; Makarov, A. Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. International Journal of Mass Spectrometry, 80, 325, **2012**.
- Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science, 246, 64–71. **1989**.
- Haddad, R.; Sparrapan, R. and Eberlin, M. N. Rapid Communication Mass Spectrometry. 20, 2901. **2006**.

- Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho T. and Eberlin, M. N. Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solution Constituents. *Analytical Chemistry*, 80, 898–903. **2008**.
- Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: principles and applications*. 3. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, **2007**.
- Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 430–443. **2005**.
- Lange, O.; Damoc, E.; Wieghaus, A.; Makarov, A. Enhanced Fourier Transform for Orbitrap Mass Spectrometry, in: Proc. 59th Conference American Society Mass Spectrometry, Denver, June 5–9, **2011**.
- Kim, T.; Kim, S.; Lee, K. Analysis of furan in heat-processed foods consumed in Korea using solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 123, 1328-1333. **2010**.
- Klitzke, C.F.; Corilo, Y. E.; Siek, K.; Binkley, J.; Patrick, J.; Eberlin, M. N. Petroleomics by ultrahigh-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Energy & Fuels*, 26, 5787-94. **2012**.
- Makarov, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, 72, 1156–1162. **2000**.
- Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 78, 2113–2120. **2006**.
- Makarov, A. Theory and practice of the Orbitrap Mass Analyzer, in: R.E. March, J.F.J. Todd (Eds.), *Practical Aspects of Trapped Ion Mass Spectrometry: Theory and Instrumentation*, CRC Press (Taylor & Francis). **2009**.
- Marshall, A. G.; Fourier-Transform ion-cyclotron resonance mass-spectrometry. *Accounts of Chemical Research*, 18, 316-322. **1985**.
- Miller, P. E.; Denton, M. B. The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *Journal of Chemical Education*, 63, 617-623, **1986**.
- Pereira, R. C. L.; Simas, R. C.; Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Klitzke, C. F.; Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Silva, R.; Moraes, E. T.; Bastos, W.; Eberlin, M. N.; Nascimento, H. D. L. Precision in Petroleomics via Ultrahigh Resolution Electrospray Ionization

INTRODUÇÃO GERAL

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. Energy & Fuels. 27, 7208-7216. **2013.**

Rodgers, R. P.; Schaub, T. M.; Marshall, A. M. PETROLEOMICS: MS Returns to Its Roots. Analytical Chemistry, DOI: 10.1021/ac053302y. **2005.**

Romão, W. Novas Aplicações de Espectrometria de Massas em Química Forense. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. **2010.**

Santos, V. G.; Regiani, T.; Dias, F. F. G.; Romao, W.; Jara, J. L. P.; Klitzke, C. F.; Coelho F. and Eberlin, M. N. Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization. Analytical Chemistry, 83, 1375–1380. **2011.**

Schmidt, E. M.; Franco, M. F.; Regino, K. G.; Lehmann, E. L.; Arruda, M. A. Z.; Rocha, W. F. C.; Borges, R.; Souza, W.; Eberlin, M. N.; Correa, D. N. Direct and Non-destructive Proof of Authenticity for the 2nd Generation of Brazilian Real Banknotes via Easy Ambient Sonic Spray Ionization Mass Spectrometry. Science & Justice, DOI:10.1016/j.scijus.2014.08.001. **2014.**

Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Santos, J. M.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Eberlin, M. N. Direct Analysis of crude oil using Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. In: 62nd Conference on mass spectrometry and allied topics, Baltimore, EUA. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 25, 1-264. **2014.**

Schmitt-Kopplin, P.; Englmann, M.; Rossello-Mora, R.; Schiewek, R.; Brockmann, K. J.; Benter, T.; Schmitz, O. J. Combinig chip-ESI with APLI (cESILI) as a multimode source for analysis of complex mixtures with ultrahigh-resolution mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 2803-2809. **2008.**

Schwab, N. V.; Porcari, A.; Coelho, M. B.; Schmidt, E. M.; Jara, J. L.; Visentainer, J. V.; Eberlin, M. N.; Easy dual-mode ambient mass spectrometry with Venturi self-pumping, canned air, disposable parts and voltage-free sonic-spray ionization. Analyst. 137. 2537. **2012.**

Simas, R. C.; Pereira, R. C. L.; Klitzke, C. F.; Eberlin, Y. C.; Vaz, B. G.; Pudenzi, M. A.; Schmidt, E. M.; do Nascimento, H. D. L.; de Moraes, H. T.; Bastos, W. L.; Eberlin, M. N.; Petroleômica: caracterização rápida e abrangente de petróleo bruto e derivados via espectrometria de massas FT MS de altíssima resolução e exatidão. Petrobras, Rio de Janeiro, 20, 211, **2012.**

INTRODUÇÃO GERAL

Stafford G. C; Kelley, P. E.; Syka, J. P. E.; Reynolds, W. E. Ion Trap Technology.
International Journal Mass Spectrometry, 60, 85-98. **1984.**

Tissot, B. P.; Welte, D. H. Petroleum Formation and Occurrence. 2ed. Berlin. **1984.**

Vaz, B. G. Petroleômica por FT-ICR MS: Desvendando a composição de polares do petróleo e derivados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. **2011.**

CAPÍTULO I

➤ Capítulo I

Estudo forense pela análise de íons
moleculares utilizando os analisadores de
massas Quadrupolo, ICR e *Orbitrap*

CAPÍTULO I

5 INTRODUÇÃO

Na ciência forense, muitas vezes, não basta o perito criminal saber que um documento é falso, mas sim, provar que este está irregular, aí tem-se a metodologia científica como ferramenta. No Brasil, em uma tentativa de dificultar a ação dos falsificadores, o Banco Central lançou em 2010 a segunda geração da moeda, notas Brasileiras de Real (R\$), que conta com itens de segurança com recursos gráficos sofisticados, impondo obstáculos mais fortes para a falsificação. No entanto, apesar dos esforços do Banco Central do Brasil, a segunda geração de notas de Real já foi falsificada, principalmente nos valores nominais de R\$ 100 e R\$ 50 (BCB, 2013). Este tipo de crime também gera um grande prejuízo financeiro em muitos países do mundo, pois novos itens de segurança são rapidamente imitados. Os falsificadores estão usando tecnologias cada vez mais avançadas de impressão e cópia, aplicando métodos de reprodução principalmente computacionais, que incluem a captura de imagem em mídia eletrônica (*scanners*), processamento (*software*) e impressão (*laserjet*, *inkjet*, *offset*) ou simplesmente fotocópia. Estes métodos podem levar à produção de notas falsas de alta qualidade, que podem ser difíceis de diferenciar de notas verdadeiras por inspeção visual, análise de microscopia ou mesmo análise espectroscópica (Schmidt et al., 2014).

Devido à diversidade de métodos de falsificação, a sua crescente difusão, sofisticação e ao conhecimento que o falsificador tem dos itens de segurança empregados, tornou-se crucial o desenvolvimento e implementação de métodos rápidos, minimamente destrutivos e inequívocos para a triagem de falsificação a nível molecular. Na ciência forense, especificamente no campo do exame de documentos, as análises de falsificação de notas têm sido realizadas em muitos países, aplicando diversas técnicas e métodos analíticos. Recentemente, fluorescência de raios X (Rusanov et al., 2009), espectroscopia no infravermelho (Vila et al., 2006) e espectroscopia Raman (Bozicevic, 2012), têm constituído um conjunto de interessantes técnicas analíticas forenses não-destrutivas. No entanto,

os dados adquiridos com métodos espectroscópicos para diferenciar as notas autênticas das falsas, normalmente, requerer ferramentas quimiométricas para o seu processamento (Almeida *et al.*, 2013). Existem ainda relatos da utilização de cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC-MS) para caracterizar a composição da tinta das notas (Bones *et al.*, 2007; Ebejer *et al.*, 2005; Mizrachi *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1996), mas os processos de pré-tratamento necessários para GC-MS e LC-MS são geralmente demorados e podem resultar em danos irreparáveis para as notas, o que não é útil para a preservação de amostras forenses (Ifa *et al.*, 2009). Métodos de espectrometria de massas com fonte de ionização com laser, tais como a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por dessorção a laser assistida por nanopartículas (NALDI) podem ser utilizadas para minimizar a destruição de notas. Porém, estas técnicas são operadas sob vácuo e são adequadas apenas para a detecção de compostos não voláteis, e limitações espaciais das fontes de íons podem exigir que as notas sejam cortadas ou dobradas para serem analisadas (Tang *et al.*, 2011).

Outra questão forense está relacionada ao crescimento de furtos a bancos e caixas eletrônicos com uso de explosivos, o que é considerado crime grave no Brasil. Tintas de segurança antirroubo ou antifurto são utilizadas como pacotes de segurança através de um corante comumente usado para impedir assaltos a bancos. Durante um assalto, sistemas de segurança bancários são ativados por um sinal que provoca uma nuvem de partículas de corante que se depositam nas notas e em qualquer outro objeto presente na cena, como roupas, sapatos, e outros objetos dos criminosos. Os exames laboratoriais podem determinar a presença do corante sobre estes objetos e vincular o suspeito com o roubo. Especificamente em relação às notas, estas ficam tingidas e tornam-se inúteis e intransferíveis depois de serem retiradas ilegalmente do banco, como mostra a Figura 13. Em alguns casos, falsificações podem ser realizadas utilizando procedimentos de branqueamento das notas tingidas. No entanto, métodos analíticos instrumentais como a espectrometria de massas, permitem rastrear esse crime.



Figura 13 Três notas de Real representando casos forenses com diferentes materiais em sua superfície, (A) corante antifurto de cor rosa, (B) nota com suspeita de lavagem com solvente orgânico e (C) resíduo de explosivo utilizado na tentativa de furto ao caixa eletrônico.

Uma pesquisa anterior para a extração e identificação dos corantes de segurança de notas concentrou-se na moeda de papel manchada de corante utilizada nos EUA (Sainden *et al.*, 1996). O mais comum dispositivo antifurto (ATD, do inglês – *anti theft devices*) utilizado para impedir ou qualificar assaltos a bancos consiste em um marcador de corante vermelho, o 1-metilaminoantraquinona (MAAQ, do inglês – *1-methylaminoanthraquinone*) (Wilson, et. al., 1949). Técnicas de espectrometria de massas foram utilizadas para a caracterização desse marcador, tais como a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, do inglês – *Gas chromatography – mass spectrometry*) (James *et al.*, 2006; Marise *et al.*, 2011; Martz *et al.*, 1983) e a espectrometria de massas em modo tandem (MS/MS) (Verweij *et al.*, 1993). Outro exemplo de corante vermelho identificado por MS utilizando a fonte de ionização por dessorção a laser (LD-MS,

do inglês – *Laser Desorption Mass Spectrometry*) pertence à família das rodaminas (Balko, 2003).

Recentemente, uma série de técnicas de dessorção/ionização para análise direta por espectrometria de massas ambiente foi desenvolvida e revolucionaram a análise forense promovendo a preservação da amostra sem nenhum preparo (Alberici *et al.*, 2010; Ifa *et al.*, 2010). A espectrometria de massas ambiente teve por precursores a ionização com dessorção por eletrospray (DESI, do inglês – *Desorption Electrospray Ionization*) (Tak, 2004) e a análise direta em tempo real (DART, do inglês – *Direct Analysis in Real Time*) (Cody, 2005).

Outro avanço em MS conta com o desenvolvimento do analisador de massa *Orbitrap* em 2000 (Makarov *et al.*, 2000). Em apenas alguns anos, a sua importância nas ciências ômicas (Mishalski *et al.*, 2011; Olsen *et al.*, 2005; Wiśniewski *et al.*, 2009) e nas aplicações forenses (Strano-Rossi *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2014) tem crescido devido a vantagens como sua altíssima resolução e exatidão de massas sem utilização de campos magnéticos. O advento do *C-trap* permitiu qualquer dispositivo capaz de transmitir a seleção de íons precursores, bem como qualquer técnica de fragmentação, possa ter interface com o *Orbitrap*. A adição de uma cela de colisão após o *C-trap*, na linha *Orbitrap*, abriu um caminho para a utilização de colisões de alta energia (com energias superiores aos realizáveis no íon *trap* linear, CID), tem-se então a dissociação com maior de energia de colisão (HCD). Estas vantagens transformaram o *Orbitrap* em um forte concorrente do analisador ICR em análise prática de rotina para investigações forenses (Xu *et al.*, 2014).

Nesta primeira parte do trabalho, buscou-se obter um perfil molecular para notas de real falsas e autênticas, por meio da análise direta por EASI MS utilizando o analisador quadrupolo. Posteriormente, a caracterização e confirmação foram realizadas por meio de EASI MS com analisador de altíssima resolução e exatidão ICR. Ainda em um aspecto forense, utilizou-se EASI MS para identificar dispositivo antifurto diretamente em superfície de notas de Real de banco com suspeita de roubo de caixa eletrônico e ESI HRMS com o analisador

Orbitrap foi aplicada na caracterização inequívoca do corante utilizado no dispositivo antifurto.

6 OBJETIVOS

Desenvolver e otimizar novas metodologias analíticas aplicáveis à ciência forense no que diz respeito a furtos e falsificações de notas brasileiras, por meio da espectrometria de massas utilizando fontes de íons a pressão atmosférica e ambientes, sendo estas acopladas aos analisadores de massas de altíssima resolução ICR e *Orbitrap*, com perfil inicial obtido pelo quadrupolo.

6.1 Objetivos específicos

- Investigação forense por EASI Q MS e EASI FT-ICR MS em notas de Real falsas e autênticas.
- Investigação forense por EASI Q MS e ESI FT-Orbitrap MS, na detecção e caracterização de corantes em notas de Real furtadas de caixas eletrônicos.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Amostras

Para as investigações entre notas de Real falsas e autênticas foram utilizados dois grupos de amostras. O primeiro grupo (G1) foi composto por quatro conjuntos de notas obtidas em um banco local (autênticas). Cada conjunto apresentou valores nominais de R\$ 100, R\$ 50, R\$ 20 e R\$ 10. O segundo grupo

(G2) foi composto por dois conjuntos de amostras de notas falsas, com valores nominais de R\$ 100 e R\$ 50. O primeiro conjunto de notas falsas (G2A) foi apreendido pela polícia científica do Estado de São Paulo e é composto por três notas com o valor nominal de R\$ 100 e três notas com o valor nominal de R\$ 50. O segundo conjunto de notas falsas (G2B) foi preparado através da impressão de notas falsas em papel alcalino branco, utilizando impressoras LaserJet e jato de tinta, obtendo um total de três notas com o valor nominal de R\$ 100 e três notas com o valor nominal de R\$ 50. Um resumo das amostras é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Conjunto de amostras referente ao caso forense de notas falsas.

Grupo de Amostra	Tipos de notas amostradas	Características (origem)
G1	R\$ 100, R\$ 50, R\$ 20 e R\$ 10	Autêntica (Banco local)
G2A	R\$ 100, R\$ 50	Falsa (Polícia Científica)
G2B	R\$ 100, R\$ 50	*Falsa (Impressão com LaserJet e Jato de tinta)

n=3, *OB: As notas falsas foram destruídas após as investigações

Foram estudados também três casos forenses de contaminação de notas furtadas que apresentavam corante. No primeiro caso (C1), três notas de valor nominal de R\$ 50, com suspeita de contaminação com dispositivo antifurto foram investigadas (Figura 13A). No segundo caso, investigou-se uma possível lavagem das notas de R\$ 50 com solventes orgânicos (C2) (Figura 13B) e no terceiro caso, avaliou-se possíveis resíduos de explosivos nas notas de R\$ 50 utilizados no ato do furto (C3) (Figura 13C); um resumo das amostras é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 Conjunto de amostras referente ao caso forense de notas tingidas.

Grupo de Amostra	Tipos de notas amostradas	Características (origem)
C1	R\$ 50	Com corante (Polícia Científica)
C2	R\$ 50	Lavagem com solvente (Polícia Científica)
C3	R\$ 50	Resíduos de explosivos (Polícia Científica)

n=3

Vale ressaltar que as notas falsas e as notas apreendidas, foram obtidas pela parceria entre o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e a Superintendência da Polícia Científica do Estado de São Paulo, Brasil, por meio dos peritos criminais Dr. Octávio Eduardo de Brito Alvarenga e o Mestre Deleon Nascimento Correa.

7.2 Reagentes

Como solvente foi utilizado metanol, grau HPLC, fabricado por Burdick & Jackson (Muskegon, MI, EUA) e ácido fórmico P.A com o número de referência: 251364 Sigma Aldrich. O padrão de corante utilizado foi Rodamina B 97%, Número de CAS 509-34-2, Sigma Aldrich.

7.3 Equipamentos e condições experimentais

7.3.1 EASI Q

Os experimentos foram conduzidos em um espectrômetro de massas equipado com analisador monoquadrupolo (LC-MS 2010 EV, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) e com fonte de ionização ambiente (EASI). Metanol acidificado (0,1%, (v/v)de ácido fórmico), na vazão de $20 \mu\text{L min}^{-1}$ e N_2 a 100 psi foram usados para formar o spray sônico. A aquisição dos dados foi realizada no modo positivo de ionização, EASI(+) MS. O valor do potencial no skimmer foi de 60 V, o ângulo de entrada do capilar em relação à superfície da amostra foi de 45° . Amostras dos grupos de notas G1, G2A e G2B (autêntica, conjunto impresso e apreendida, respectivamente) foram diretamente analisada por EASI(+) MS, sem a necessidade de qualquer tratamento. A aquisição dos dados foi feita a partir de três pontos aleatórios na superfície das amostras.

7.3.2 EASI ICR

Para confirmação da fórmula molecular dos compostos detectados na superfície das notas de Real com suspeitas de falsificação apreendidas e verificação da versatilidade da fonte EASI operando em modo de ionização positivo, as mesmas análises foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas de altíssima resolução e precisão FT-ICR (LTQ FT-Ultra, ThermoScientific, Bremen, Alemanha).

A calibração externa foi realizada utilizando uma solução contendo cafeína, MRFA e Ultramark (AlfaAesar, Ward Hill, MA, EUA). Os dados foram adquiridos no modo de varredura em uma faixa de m/z 100-1000. As análises foram realizadas no modo positivo de ionização com um poder de resolução de 100.000 FWHM à m/z 400. Os espectros de massas foram acumulados em 100 microscans,

centrados e alinhados usando o software Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific). As fórmulas moleculares mínimas dos compostos foram atribuídas com base nos valores medidos de m/z . A fonte EASI acoplada ao sistema FT-ICR MS seguiu as mesmas especificações anteriormente utilizadas nas análises com o analisador de massas monoquadrupolar.

7.3.3 ESI Orbitrap

A análise foi realizada utilizando ESI acoplada ao espectrômetro de massas Q-Exactive Orbitrap com transformada de Fourier (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). Foi utilizada uma extração por arraste com solvente orgânico (Metanol) dos contaminantes da superfície das notas de Real, ou seja, o corante foi solubilizado com solvente e transferido para um *vial* de vidro. Foram utilizadas as seguintes condições: voltagem do capilar 4,0 kV, temperatura do *tube transfer* de 280 °C e o potencial da *S-Lens* de 50%. A calibração externa foi realizada utilizando uma solução contendo cafeína, MRFA e Ultramark (AlfaAesar, Ward Hill, MA, EUA). Os dados foram adquiridos no modo de varredura em uma faixa de m/z 100-1000. As análises foram realizadas no modo positivo de ionização com um poder de resolução de 140.000 FWHM a m/z 200. Para caracterização do corante foi realizada a fragmentação de alta energia (HCD), com tensão normalizada para 60 eV. A aquisição dos dados e processamento foi realizado através do software Xcalibur, como descrito anteriormente para FT-ICR MS.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Análise forense de notas falsificadas e autênticas

Inicialmente, os perfis químicos (*fingerprint*) das notas da segunda geração de real autêntica (R\$) foram avaliados em diferentes notas (R\$ 100, R\$ 50, R\$ 20 e R\$ 10) por EASI(+) MS, conforme apresentado na Figura 14.

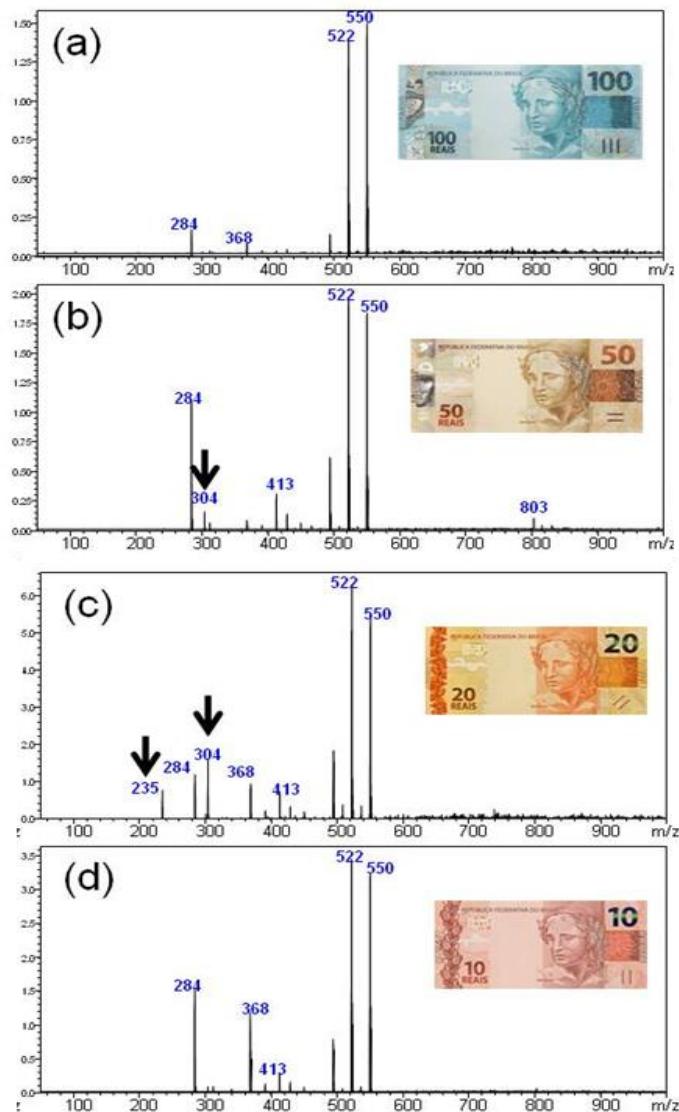


Figura 14 Ilustrativo do *fingerprint* obtido por EASI(+) MS de notas de Real com valores nominais de: (a) R\$ 100, (b) R\$ 50, (c) R\$ 20 e (d) R\$ 10.

De acordo com a Figura 14, pode-se observar que usando o tipo mais comum dos espectrômetros de massas, um monoquadrupolo, no modo de varredura mais simples (*Full scan*) pode-se obter o perfil de três pontos diferentes sobre a superfície das notas em triplicata. Em todos os pontos e em todas as notas de real, perfis químicos semelhantes foram obtidos ao longo de toda a superfície impressa. Portanto, independentemente do valor nominal das notas, EASI(+) MS mostram espectros de massas característicos, indicando a presença de moléculas específicas, o que confere uma assinatura química, ou seja, um *fingerprint* das notas estudadas.

As amostras da segunda geração também apresentam perfis por EASI(+) MS, onde os íons mais abundantes no espectro de massas são representados por íons denominados como íons de fundo, ou seja, ruído químico e íons menos abundantes que podem estar diretamente relacionados à composição química da superfície das notas. Esta é a marca característica das notas de Real autênticas, mostrando que a maioria dos pigmentos e outros produtos químicos utilizados no processamento são fortemente adsorvidos no papel da nota autêntica.

Eberlin e colaboradores (Eberlin *et al.*, 2010) identificaram que alguns íons detectados nas notas são oriundos de plastificantes como bis-(2-etylhexil)-ftalato, detectados no modo positivo, protonado $[M + H]^+$ e “sodiado” $[M + Na]^+$ representados pelos íons m/z 391 e m/z 413, respectivamente. O íon de razão m/z 284 foi identificado como uma amina alifática de fórmula molecular $C_{19}H_{41}N$, já o íon m/z 494 foi atribuído ao sal de amônio hexadecil dimetil ($C_{16}H_{31}2N^+(CH_3)_2$), enquanto os íons de m/z 522 e 550 são íons detectados no solvente, possivelmente provenientes de detergentes comuns utilizados na limpeza de vidrarias de laboratório (Keller *et al.*, 2008). Nota-se que os íons de m/z 304 e m/z 235, foram observados somente nas notas de R\$ 20 e R\$ 50, ilustrado pelos espectros na Figura 14 (c), correspondem a cocaína e lidocaína protonadas, respectivamente. Estes íons são comuns em notas de Real, mais frequentemente encontrados em notas autênticas submetidas à utilização contínua e em grande

circulação durante vários meses (Ifa *et al.*, 2008). Os espectros de massas para as notas autênticas de todos os valores nominais e em todos os pontos analisados nas suas superfícies eram representantes de um conjunto similar de íons. A contagem de íons totais, em geral, foi baixa para as notas autênticas, e a maioria dos íons na região de menor razão m/z foi constante nos espectros para todas as amostras.

A Figura 15 apresenta perfis químicos representativos por EASI(+) MS de notas suspeitas de falsificação apreendidas de valor nominal de R\$ 100 e R\$ 50.

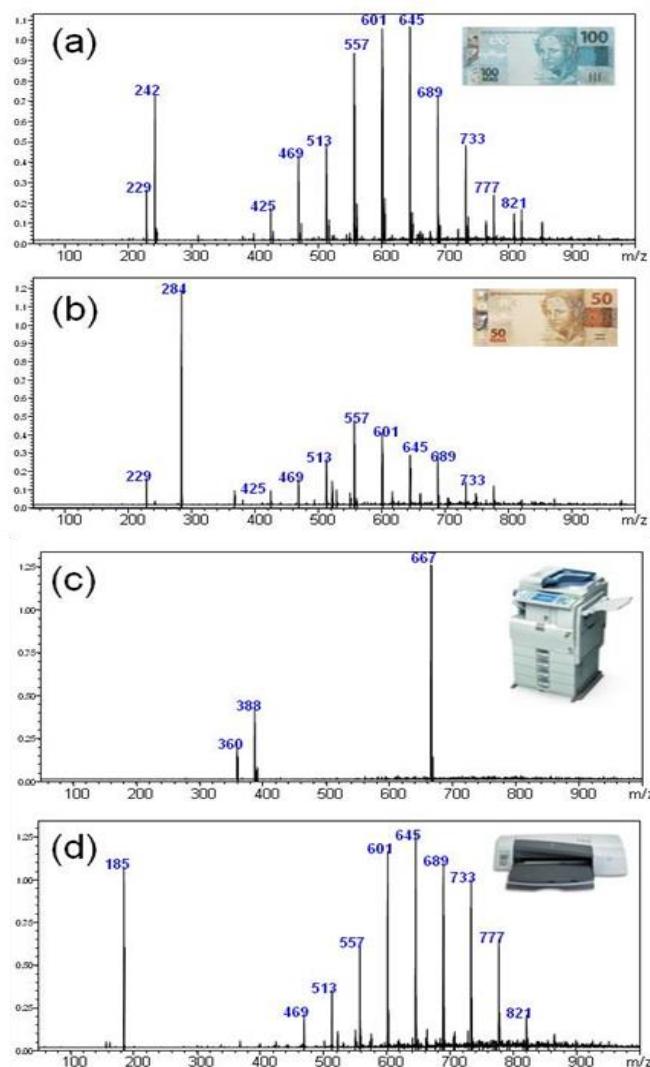


Figura 15 Perfil químico por EASI(+) MS de notas com suspeita de falsificação (a) R\$ 100 e (b) R\$ 50 e notas falsas caseiras preparadas pela impressão de cópias utilizando (c) impressora *LaserJet* e (d) jato de tinta.

Por intermédio das Figuras 15a e 15b, observa-se que os *fingerprints* das notas apreendidas, de valores nominais R\$ 100 e R\$ 50, são característicos, apresentando íons abundantes com uma distribuição polimérica separada por 44 unidades de razão m/z ao longo de um intervalo de m/z 400-800. Outro marcador de falsificação que foi observado em todas as notas apreendidas é o íon m/z 229. Os espectros de massas das amostras de falsificação “caseira”, ou seja, preparadas utilizando uma impressora com jato de laser (Figura 15c) e uma impressora com jato de tinta (Figura 15d) também apresentam perfil químico que é bem distinto do perfil observado para as notas autênticas (Figura 14). Nota-se que o espectro de massas obtido para a nota de real impressa em *LaserJet* é muito mais simples que o espectro de massas das notas autênticas, e é caracterizado principalmente por três íons de m/z 360, 388 e 667. A amostra de nota falsificada impressa por jato de tinta “caseira” exibiu um perfil por EASI(+) MS (Figura 15d) com um marcador de m/z 185 e também a mesma série polimérica de íons de m/z 400-800 foi detectada. Esta distribuição polimérica, centrada em íons de m/z 601 e 645, foi observada para todo o conjunto de amostras suspeitas de falsificação apreendidas (Figura 15a e b) e nas notas obtidas com a impressora de jato de tinta disponível (Figura 15d).

Estes íons, separados por 44 Dalton (Da), são típicos do composto polietileno glicol (PEG), onde esse polímero é representado por um conjunto de íons que contêm diferentes números de unidades C_2H_4O (Donnelly *et. al.*, 2010).

Os conjuntos de notas autênticas de real e os conjuntos com suspeita de falsificação apreendidos foram analisados por EASI(+) FT-ICR MS diretamente na superfície das amostras sem nenhum tipo de tratamento ou destruição da mesma. Esta análise produziu o perfil químico de altíssima resolução mostrado na Figura 16, e nas Tabelas 3 e 4.

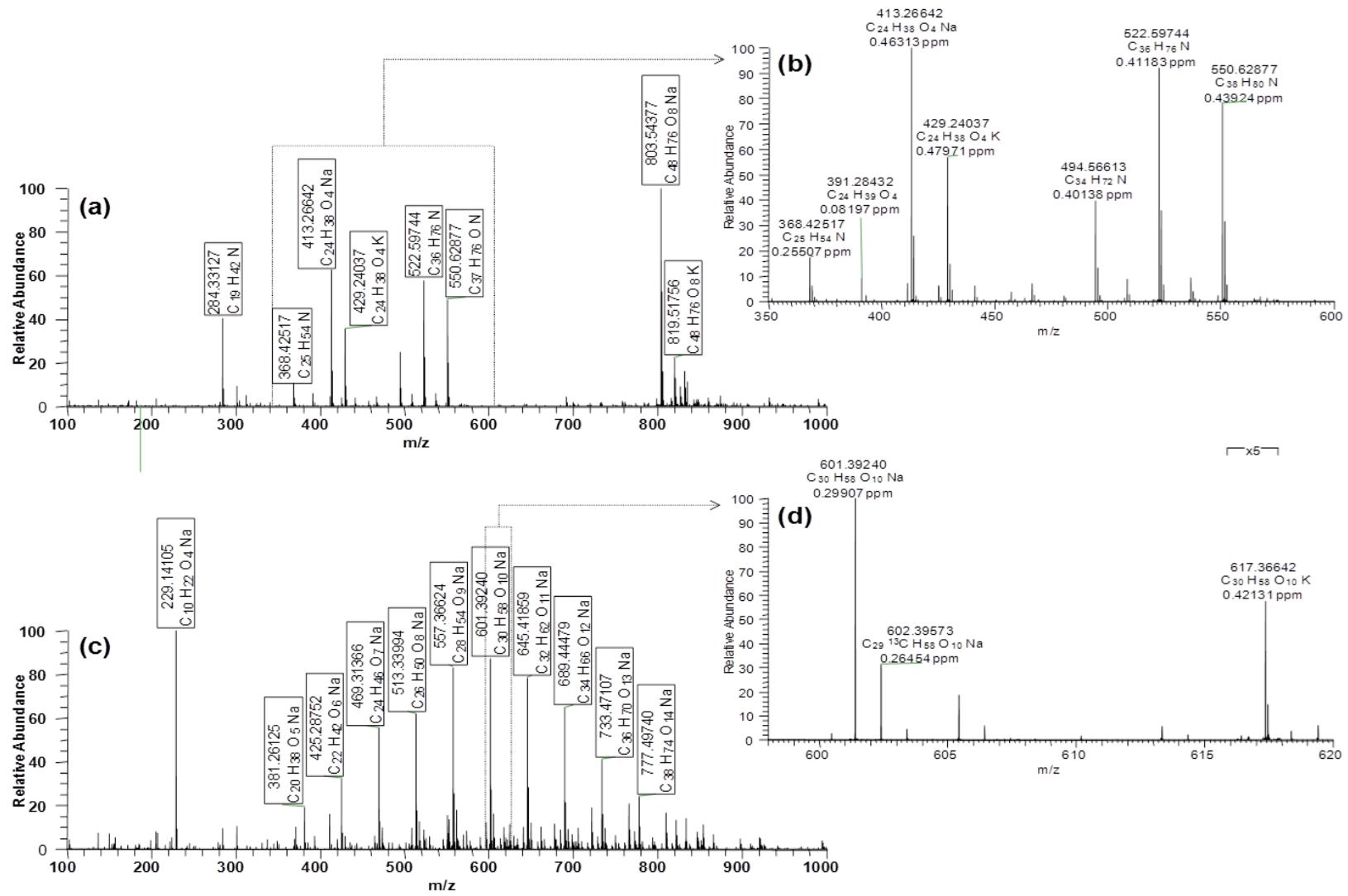


Figura 16 Altíssima resolução e exatidão por EASI(+) FT-ICR MS do perfil químico de: (a) notas autênticas de R\$ 100 de banco em uma faixa de m/z 100-1000, (b) um intervalo de m/z 350-600, (c) notas de R\$ 100 da segunda geração apreendidas com suspeita de falsificação em uma faixa de m/z 100-1000 e (d) ampliação em um intervalo de m/z 600-620.

Através da Figura 16, observa-se que na análise por EASI(+) FT-ICR MS de notas autênticas de R\$ 100 (Figura 16a e 16b), o mesmo perfil obtido por EASI (+) MS foi observado em documentos autênticos (Fig. 14 a, b, c e 15d), mostrando o mesmo conjunto de íons diagnósticos característico de documentos brasileiros oficiais analisados no modo de íon positivo, considerando todas as regiões das notas oficiais. Os dados por EASI(+) FT-ICR MS para o íon de razão m/z 391 são consistentes com a molécula protonada de bis-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP), $[C_{24}H_{39}O_4]^+$, e o íon de m/z 413 foi atribuído à fórmula molecular $[C_{24}H_{38}O_4Na]^+$ e m/z 429 para $[C_{24}H_{38}O_4K]^+$ com erro de m/z inferior a 0,5 ppm para ambos, como mostra a Tabela 3, que também apresenta a identificação das substâncias.

Tabela 3 Espectro adquirido para notas genuínas de R\$ 100 por EASI(+) FT-ICR MS (Figura 16 a e b).

Experimental m/z	Abundância Relativa	m/z Teórica	Erro (ppm)	Fórmula Molecular	Identificação
284.33127	40.37	284.33118	0.34	$[C_{19}H_{42}N]^+$	¹ [QAC] ⁺
301.14110	9.59	301.14103	0.22	$[C_{16}H_{22}O_4Na]^+$	² [DBP-Na] ⁺
368.42517	10.84	368.42508	0.26	$[C_{25}H_{54}N]^+$	¹ [QAC] ⁺
391.28432	5.94	391.28429	0.08	$[C_{24}H_{39}O_4]^+$	³ [DEHP-H] ⁺
413.26642	64.38	413.26638	0.46	$[C_{24}H_{38}O_4Na]^+$	³ [DEHP-Na] ⁺
429.24037	36.15	429.24044	0.48	$[C_{24}H_{38}O_4K]^+$	³ [DEHP-K] ⁺
494.56613	24.87	494.56593	0.4	$[C_{34}H_{72}N]^+$	¹ [QAC] ⁺
522.59744	59.4	522.59723	0.41	$[C_{36}H_{76}N]^+$	¹ [QAC] ⁺
550.62877	50.23	550.62853	0.44	$[C_{38}H_{80}N]^+$	¹ [QAC] ⁺
803.54377	100	803.54367	0.66	$[C_{48}H_{76}O_8Na]^+$	³ [2DEHP- Na] ⁺
819.51756	22.71	819.51718	0.46	$[C_{48}H_{76}O_8K]^+$	³ [2DEHP-K] ⁺

1: Cátions de amônio quaternário, QAC, do inglês, *quaternary ammonium cations*.

2. Dibutilftalato, DBP, do inglês, *dibutyl phthalate*.

3. Bis-(2-etil hexil)-ftalato, DEHP, do inglês, *bis(2-ethylhexyl)phthalate*.

Da mesma forma, os íons de razão m/z 803 e 819 foram atribuídos a adutos de sódio e potássio do DEHP, isto é, $[C_{48}H_{76}O_8Na]^+$ e $[C_{48}H_{76}O_8K]^+$ respectivamente. O íon de razão m/z 301 foi atribuído um aduto de sódio $[C_{16}H_{22}O_4Na]^+$ com um erro de aproximadamente 0,22 ppm é atribuído ao

dibutilftalato (DBP). Portanto, aqui o DEHP e o DBP são marcadores de diagnóstico das notas genuínas em nível molecular da superfície porque são constituintes de plastificantes comuns normalmente encontrados em tintas de impressão a laser (Eisenmenger, *Patent*) utilizado pelas instituições oficiais brasileiras para produzir as notas oficiais.

O íons de m/z 284, $[C_{19}H_{42}N]^+$, m/z 368 $[C_{25}H_{54}N]^+$, m/z 494, $[C_{34}H_{72}N]^+$, m/z 522 $[C_{36}H_{76}N]^+$, e m/z 550, $[C_{38}H_{80}N]^+$ foram atribuídos a cátions de amônio quaternário (Tabela 3). Especificamente, o íon de m/z 494,56613 é atribuído ao dimetil-hexadecil-amônio, o íon m/z 522,59744 ao e o de m/z 550,62877 ao dimetil-dioctadecil amônio (ou diestearil-dimetil-amônio) com erros menores que 1 ppm. Estas substâncias são contaminantes comuns encontrados em espectrometria de massas, quando utilizado técnicas de ionização com spray devido aos detergentes comuns de laboratórios e também aos componentes elétricos internos dos MS (*hardwares*), pois este sal é utilizado como antiestático (Keller et. al., 2008).

O conjunto de notas com suspeita de falsificação que foi apreendido também foi analisado diretamente por EASI(+) FT-ICR MS conforme ilustrados pelos espectros de massas nas Figuras 16c e 16d. A altíssima resolução e exatidão da técnica permitiu determinar a composição elementar através do íon aduto, que é formado pela associação de um íon com um ou mais átomos ou moléculas, formando assim um íon contendo todos os átomos do íon precursor e todos os átomos pertencentes aos átomos ou moléculas associadas. Além do íon aduto tem-se a fórmula molecular atribuída, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 Principais íons nos espectros obtidos por EASI(+) FT-ICR MS para uma nota de R\$ 100 suspeita de falsificação (Fig. 16 c e d).

Experimental <i>m/z</i>	Abundancia Relativa	<i>m/z</i> Teorica	Erro (ppm)	Fórmula Molecular	Identificação
229,14105	100	229,14103	0,02	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ ²³ Na	TBG*
337,23493	4,61	337,23493	0,01	C ₁₈ H ₃₄ O ₄ ²³ Na	SSA* n [#] = 2
381,26125	19,33	381,26115	0,10	C ₂₀ H ₃₈ O ₅ ²³ Na	SSA n= 3
425,28752	32,14	425,28736	0,16	C ₂₂ H ₄₂ O ₆ ²³ Na	SSA n= 4
469,31366	55,55	469,31358	0,09	C ₂₄ H ₄₆ O ₇ ²³ Na	SSA n= 5
513,33994	62,39	513,33979	0,15	C ₂₆ H ₅₀ O ₈ ²³ Na	SSA n= 6
557,36624	85,04	557,36601	0,24	C ₂₈ H ₅₄ O ₉ ²³ Na	SSA n= 7
601,39239	87,06	601,39222	0,28	C ₃₀ H ₅₈ O ₁₀ ²³ Na	SSA n= 8
617,36642	10,08	617,36616	0,38	C ₃₀ H ₅₈ O ₁₀ ³⁹ K	PSA n= 8
645,41859	78,44	645,41843	0,16	C ₃₂ H ₆₂ O ₁₁ ²³ Na	SSA n= 9
689,44479	64,76	689,44465	0,14	C ₃₄ H ₆₆ O ₁₂ ²³ Na	SSA n= 10
733,47107	41,17	733,47086	0,20	C ₃₆ H ₇₀ O ₁₃ ²³ Na	SSA n= 11
777,49740	24,26	777,49708	0,33	C ₃₈ H ₇₄ O ₁₄ ²³ Na	SSA n= 12
821,52365	13,65	821,52329	0,36	C ₄₀ H ₇₈ O ₁₅ ²³ Na	SSA n= 13
865,54982	6,89	865,54951	0,31	C ₄₂ H ₈₂ O ₁₆ ²³ Na	SSA n= 14
909,57595	2,50	909,57572	0,23	C ₄₄ H ₈₆ O ₁₇ ²³ Na	SSA n= 15

* Trietilenoglicol monobutil eter, TBG do inglês: *triethylene glycol monobutyl ether*.

SSA: Surfynol® 104 aduto de sódio

PSA: Surfynol® 104 aduto de potássio .

n: numero de etoxilações no Surfynol® 104 (2,4,7,9-tetramethyl-5-decyne-4,7-diol).

No espectro de massas foi observado o íon de razão *m/z* 229 e os sinais característicos de um polímero quando adquirido por ESI(+) FT-ICR MS (Figura 16c), ou seja, foram observados os mesmos valores nominais obtidos com o analisador monoquadrupolo EASI(+) MS (Figuras 15a e 15b), o que confirma estas análises efetuadas com MS mais simples. Os espectros de massas obtidos por EASI(+) FT-ICR mostraram a mesma série de adutos de sódio com sucessivos ganhos de C₂H₄O. Os derivados de PEG são componentes comuns de tintas,

funcionando, por exemplo, como lubrificantes para as impressoras (Heudt *et al.*, 2012). A fórmula molecular determinada por espectrometria de massas FT-ICR indica um óxido de polietileno, polímero com um ou dois diferentes grupos terminais funcionalizados. Um candidato provável é a família dos surfactantes etoxilados comercializados pela *Air Products* com o nome comercial de Surfynol, que são utilizados para melhorar a qualidade das tintas à base de água, comumente utilizadas nos jatos de tinta em impressoras com cartuchos (Krishnan *et al.*, 1999). Eles são descritos como Surfynol® 4XX (S4XX, XX= 40, 65 e 85), sendo que valores crescentes indicam aumento XX de etoxilação sobre um esqueleto de 2,4,7,9-tetrametil-5-decino-4,7-diol (Surfynol® 104, com a fórmula molecular C₁₄H₂₆O₂) (Parees *et. al.*, 1998). A Figura 17 representa esta estrutura.

Observando a Tabela 4 e a Figura 16d, o íon de *m/z* 601,39239 é o aduto de sódio do Surfynol® 104 (SSA), com n = 8 unidades de C₂H₄O e seu ¹³C característico com padrão isotópico de *m/z* 602,39573, seguido pelo íon de *m/z* 617,36642, constituindo o aduto de potássio do Surfynol® 104 aduto (PSA) com n = 8 unidades de C₂H₄O, como representa a Figura 17, ambos com erros menores que 1,0 ppm. O Surfynol® é também um surfactante com diversas aplicações em tintas com propriedades físicas que contribuem para a melhoria do líquido da tinta e de sua estabilidade (Fuji Photo Film Co. Ltda, *Patent*). O íon de *m/z* 229 foi determinado por EASI(+) FT-ICR MS e representou a fórmula molecular C₁₀H₂₂O₄Na, permitindo sua identificação como o aduto de sódio do éter monobutílico de trietileno glicol (TBG), que é também um componente comum de tintas de impressora (Mori, *Patent*).

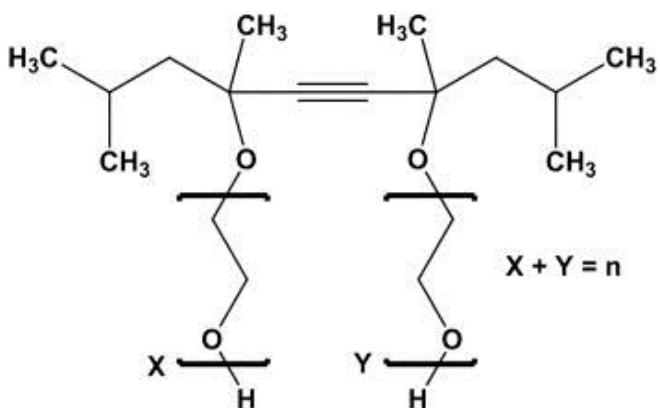


Figura 17 Estrutura química do Surfynol® 4XX, (Surfynol® 104 com fórmula molecular C₁₄H₂₆O₂) (Datenblatt, 2011).

8.2 Análise forense de corantes em notas roubadas

Os perfis químicos das amostras de notas de real foram analisados em modo positivo de ionização em um espectrômetro de massas tendo como analisador um monoquadrupolo e a Figura 18a mostra um espectro de massas característico por EASI(+) Q MS para diferentes tipos de notas de real de segunda geração, como discutido no caso anterior, sendo esta agora especificamente do valor nominal de R\$ 50.

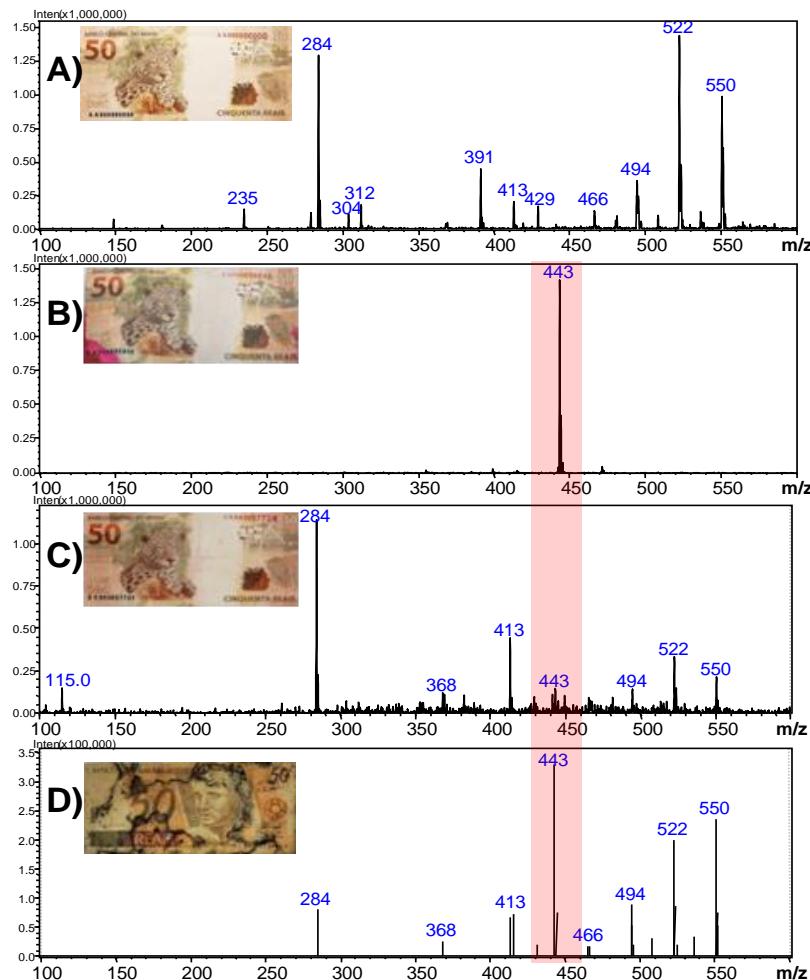


Figura 18 Perfis químicos obtidos por EASI(+) MS para A) notas padrões de R\$ 50, intactas B) Notas de R\$ 50 provenientes de explosão de caixa eletrônico apresentando aparente dispositivo antifurto em suas superfícies; C) Notas de R\$ 50 suspeitas de explosão do caixa eletrônico apresentando características de tentativas de limpeza possível utilização de solventes orgânicos; D) Notas de R\$ 50 com substância escura impregnada em sua superfície, apresentando características de resíduo de explosivo.

De acordo com a Figura 18, pode-se observar que, em todos os casos, perfis químicos semelhantes foram obtidos ao longo de toda impressão nas superfícies das notas. Conforme relatado, EASI(+) MS já foi aplicada para a caracterização de documentos de veículos brasileiros (Romão *et al.*, 2012), para a primeira geração de notas em Real (Eberlin *et al.*, 2010) e, recentemente, para a segunda geração de notas de Real (Schmidt *et al.*, 2014). Novamente, em nível molecular, o que compõe a superfície destes documentos são basicamente os plastificantes de bis-(2-etilhexil)-ftalato (m/z 391, 413, 429) e outros cátions

característicos de amônio quaternário (m/z 284, 368, 522 e 550) (Keller *et al.*, 2008). Note-se que o íon de razão m/z 304 e 235 (Figura 18A) corresponde à cocaína protonada e lidocaína protonada, respectivamente, constituindo contaminante ilegal de cocaína nas notas em circulação (Ifa *et al.*, 2008).

A Figura 18B está relacionada com as notas apreendidas reconhecidas a partir de caixa eletrônico violado apresentando tintas de segurança antirroubo aparentes em suas superfícies. Neste caso, a análise por meio de EASI(+) MS foi realizada diretamente sob a mancha gerada pelos dispositivos antifurto. Há um pico predominante no espectro de massas, de m/z 443, que representa o componente do corante vermelho. A Figura 18C apresenta este mesmo íon, contudo, com uma intensidade relativa menor em relação aos outros sinais da amostra. O mesmo íon também pode ser observado Figura 18D, confirmando a contaminação das notas por dispositivos antifurto nos três casos reais e demonstrado que a espectrometria de massas em condições ambiente é uma ferramenta bastante simples, rápida e confiável na análise de cédulas suspeitas de serem provenientes da explosão de caixas eletrônicos, mesmo quando o resíduo de tinta antifurto não pode ser identificado visualmente.

Com a aquisição de espectros de massas utilizando o ESI(+) FT-Orbitrap MS, foi possível resolver e com isso confirmar o íon de m/z 443 observado em EASI(+) MS (Figura 19) e determinar sua fórmula molecular mínima. Com base nos seus padrões isotópicos, também foi possível realizar uma comparação entre as intensidades do padrão isotopólogo experimental e teórico, conforme apresentado na Figura 20 (adquirida com software Xcalibur 2.1 Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, EUA).

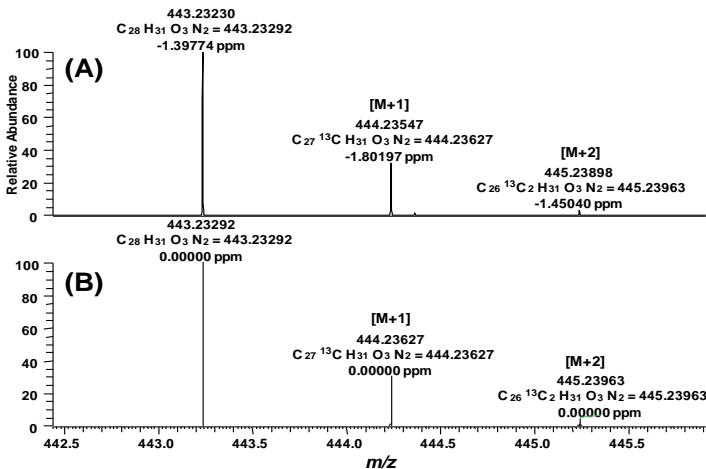


Figura 19 Espectro de massas obtido por ESI(+) FT-Orbitrap do íon isotopólogo padrão $[M + 1]$ e $[M + 2]^{13}\text{C}$ para o íon de m/z 443 relacionado com a contaminação do dispositivo antifurto observada na Figura 1: (A) experimental m/z 443 adquirido padrão isotopólogo $[M + 1]$ e $[M + 2]^{13}\text{C}$ e (B) $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_2$ padrão isotopólogo teórico $[M + 1]$ $[M + 2]^{13}\text{C}$.

Nota-se que o ESI(+) FT-Orbitrap MS, resolveu um íon isotopólogo, com a massa exata m/z 443,23230 atribuída ao íon $[\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_2]^+$ com um erro de -1,39774 ppm, o seu primeiro isótopo ^{13}C (C_{28} apresenta uma abundância relativa em torno de 29,96% de abundância relativa de um $[M + 1]$ isótopo ^{13}C) com a massa exata m/z 444,23547 atribuída ao íon $[\text{C}_{27}^{13}\text{C}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_2]^+$ com um erro de -1,80197 ppm, seguido por seu segundo isótopo ^{13}C (C_{28} produz cerca de 2,99% de abundância relativa de duas $[M + 2]$ isótopos ^{13}C) com a massa exata m/z 445,23898 atribuída ao íon $[\text{C}_{26}^{13}\text{C}_2\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_2]^+$ com um erro de -1,45040 ppm. Os isotopólogos concordantes e seu baixo erro corroboram ao caracterizar o corante vermelho do dispositivo antifurto mostrado na Figura 13, que tem fórmulas moleculares $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_2$, indicando provavelmente uma mistura ou isômeros isolados da Rodamina 6G ou Rodamina B.

Também foi realizado um estudo para investigar o corante através da aquisição de espectros de massas por MS/MS utilizando HCD 60 V por ESI(+) FT-Orbitrap MS. O sistema permitiu a identificação total do íon de diagnóstico (m/z 443). A Figura 20 e Tabela 5 mostram os valores relacionados com a fragmentação dos íons de razão m/z 443, os seus fragmentos de MS/MS, as fórmulas moleculares e erro predito fornecido pelo ESI(+) FT-Orbitrap MS.

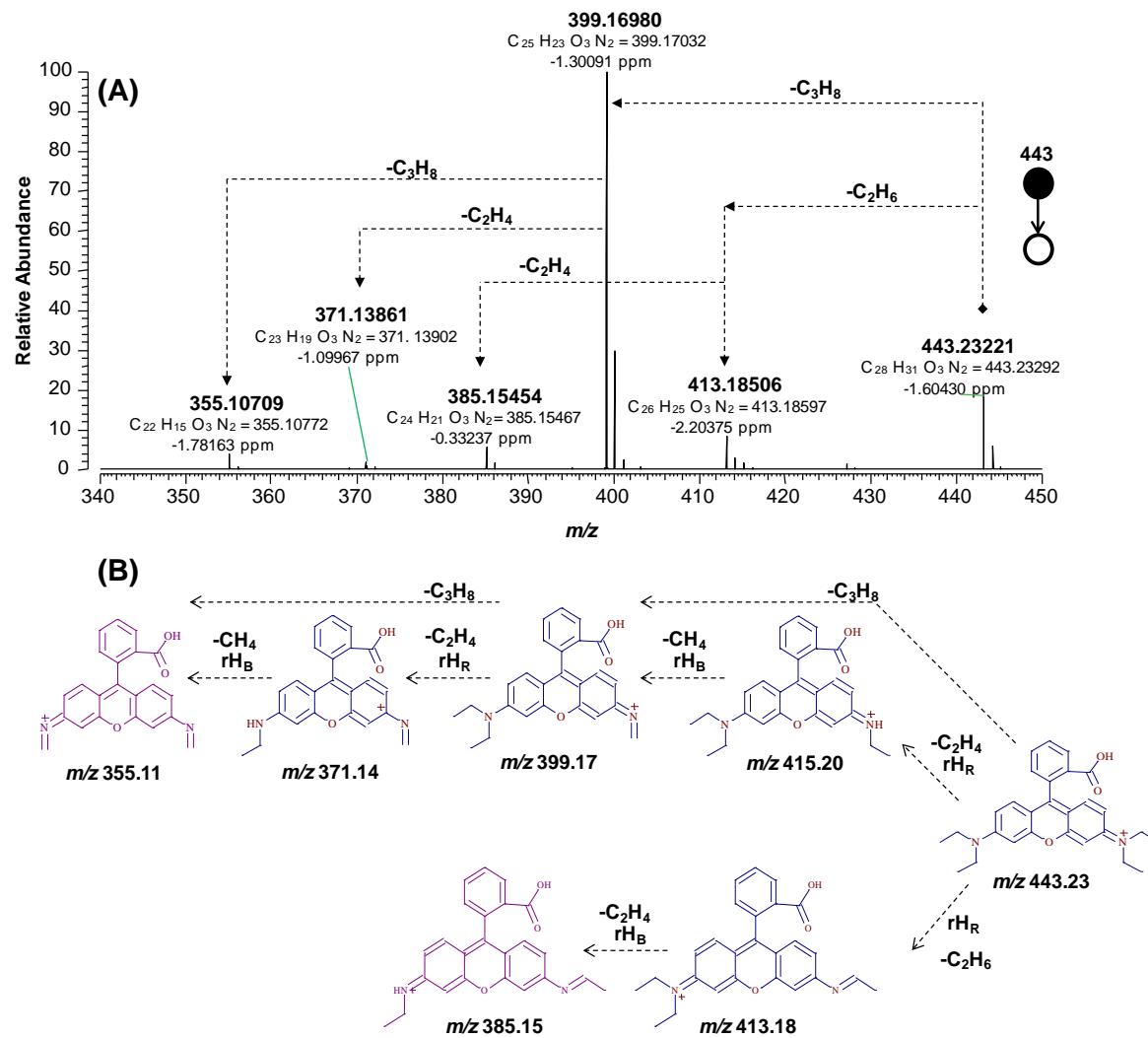


Figura 20 Espectro de massas por (A) ESI(+) MS/MS (HCD) FT-Orbitrap para a caracterização do íon m/z 443 relacionado com o dispositivo antifurto e (B) possíveis estruturas para os fragmentos formados a partir do íon m/z 443.

Tabela 5 Dados obtidos por ESI(+) MS/MS de espectros da Figura 20 adquiridos com a injeção direta do dispositivo antifurto.

<i>m/z</i>	Abundância	<i>m/z</i> Teórica	Erro (ppm)	Composição
	Relativa			
443,23221	18,08	443,23292	-1,6	C ₂₈ H ₃₁ O ₃ N ₂
415,20084	4,03	415,20162	-1,8	C ₂₆ H ₂₇ O ₃ N ₂
413,18506	8,72	413,18597	-2,2	C ₂₆ H ₂₅ O ₃ N ₂
399,16980	100	399,17032	-1,3	C ₂₅ H ₂₃ O ₃ N ₂
399,24286	0,50	399,24309	-0,5	C ₂₇ H ₃₁ ON ₂
385,16678	7,72	385,16725	-1,2	C ₂₄ H ₂₁ O ₃ N ₂
371,13870	3,02	371,13902	-0,8	C ₂₃ H ₁₉ O ₃ N ₂
357,12317	2,06	357,12392	-2,0	C ₂₂ H ₁₇ O ₃ N ₂
355,10709	5,86	355,10772	-1,7	C ₂₂ H ₁₅ O ₃ N ₂

De acordo com o apresentado, os espectros adquiridos por eletrospray com altíssima resolução e fragmentação com alta energia (ESI(+)) HighResolution (HCD)MS/MS) (Figura 20A) para o íon selecionado de *m/z* 443,23221 estão de acordo com o padrão da fragmentação Rodamina B. O fragmento de íon com razão *m/z* 399,16980 representa a perda de 44,06241 unidades de massa, e não um produto de descarboxilação (-CO₂ = 43,98928), que erroneamente é atribuído como fragmento de maior intensidade a partir do íon molecular da Rodamina B com os analisadores triploquadrupolo (QqQ) e por tempo de voo (QToF) (Ballard, 1986; Brown, 1984; Lech, 2014; Clemen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2013). O ESI(+) HRMS resulta em uma identificação inequívoca e confirma a perda de uma molécula de propano (-C₃H₈ = 44,06205) com um erro de -1.30 ppm contra a possibilidade de perda de CO₂ com de mais de 180 ppm de erro. Foi demonstrado que a perda de uma molécula de alcano do grupo dietilamina é favorecida quando comparada com a perda do CO₂ (Clemen *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2013), vide anexo 1. Como esperado e previsto pela literatura, o íon com razão *m/z* 443 ainda pode perder C₂H₆ para produzir o íon com razão *m/z* 413. A fragmentação proposta é mostrada na Figura 20B juntamente com oito estruturas para os íons mais intensos identificados.

A rodamina B é um corante fluorescente derivado da classe dos corantes xantenos, sendo estes uma classe dos corantes sintéticos mais antigos, porém ainda utilizado em caneta esferográfica de tinta vermelha (Lalli *et al.*, 2010). A contaminação das notas devido aos escritos de canetas esferográficas vermelhas é uma realidade, no entanto, o perfil da contaminação e da distribuição do corante vão demonstrar se esta é proveniente de uma anotação com caneta vermelha ou é um marcador de contaminação por dispositivos antifurto. Após a dispersão do dispositivo antifurto (Rodamina B) na estrutura celulósica das notas com explosão do caixa eletrônico, torna-se remota a possibilidade de uma limpeza e extração completa de rodamina B desta nota de banco, porque existe uma relação entre a limpeza das notas e a destruição do perfil químico. Neste caso, mesmo a olho nu poder-se-ia notar o aparecimento de mudanças físicas nas notas, caso contrário, técnicas como espectrometria de UV-visível, métodos de fluorescência e eletroanalíticos podem detectar baixos limites de detecção (Yu *et al.*, 2013) e no caso de espectrometria de massa ambiente, DESI por exemplo, pode-se detectar 100 ng/L dos compostos identificados (Bereman *et al.*, 2007).

9 CONCLUSÃO

Como demonstrado nestes estudos, EASI(+) MS fornece um método direto, robusto, rápido, não destrutivo e confiável de *fingerprinting* molecular para assegurar a autenticidade da segunda geração de notas de real e também na caracterização do corante rodamina B aplicado sobre notas suspeitas de explosão de caixa eletrônico seguido de contaminação por dispositivo antifurto. Essas análises permitem a obtenção de impressões digitais químicas garantindo a preservação do produto do crime. Os íons das notas autênticas da 2^a geração são facilmente dessorvidos pelas gotas do solvente da fonte EASI. O processo de falsificação também pode ser inferido a partir dos componentes típicos (íons adutos de sódio e potássio) de tintas utilizadas em qualquer LaserJet ou impressoras jato de tinta. A fonte EASI acoplada à espectrometria de massas constitui uma ferramenta interessante para a análise de documentos suspeitos, pois garantem a preservação das amostras forenses em uma análise direta da superfície seguida de uma interpretação de dados simples, através da comparação de impressão digital molecular direta entre uma amostra autêntica e uma amostra suspeita. Outra consideração importante é que a fonte EASI é muito simples e de fácil implementação, não se usa aquecimento, aplicação de tensões elevadas, feixes de laser, luzes UV, descargas corona e nem mesmo gases auxiliares. Essa fonte utiliza apenas temperatura ambiente e o spray supersônico, produzindo uma ionização suave. A fonte de íons EASI pode ser acoplada com espectrômetros de massas simples e também com espectrômetros sofisticados como os FT- MS, como foi mostrado no presente trabalho, permitindo sua aplicação em laboratórios forenses e em laboratórios com análises de rotina para caracterização de compostos e seus fragmentos. Finalmente, o analisador de massas Orbitrap tornou-se uma alternativa ao ICR no campo das técnicas de espectrometria de massas para periciar sistemas de investigações forenses, bem como para aumentar a seletividade e confiança de análises de rotina.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M. R.; Correa, D. N.; Rocha, W. F. C.; Scafi, F. J. O.; Poppi, R. J. Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using Raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation. *Microchemical Journal*, 109, 170-177. **2013**.
- Ballard, J. M.; Betowski, L. D.; Thermospray ionization and tandem mass spectrometry of dyes. *Organic Mass Spectrometry*, 21, 575–588. doi:10.1002/oms.1210210909. **1986**.
- Bereman, M. S. and Muddiman, D. C. Detection of Attomole Amounts of Analyte by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry (DESI-MS) Determined Using Fluorescence Spectroscopy. *Journal American Society Mass Spectrometry*, 18, 1093–1096. **2007**.
- Bones, J.; Macka, M.; Paull, B. Evaluation of monolithic and sub 2 mm particle packed columns for the rapid screening for illicit drugs - application to the determination of drug contamination on Irish euro banknotes. *Analyst*, 132, 208-217. **2007**.
- Bozicevic, M. S.; Gajovic, A.; Zjakic, I. Identifying a common origin of toner printed counterfeit banknotes by micro-Raman spectroscopy. *Forensic Science International*, 223, 314-320. **2012**.
- Brown, R. M.; Creaser, C. S.; Wright, H. J. The fast atom bombardment mass spectra of xanthane dyes. *Organic Mass Spectrometry*, 19, 311–314. doi:10.1002/oms.1210190704. **1984**.
- Clemen, M.; Gernert, C.; Peters, J.; Grottemeyer, Journal Europeum Mass Spectrometry, doi:10.1255/ejms.1216. **2013**.
- Datenblatt 2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyne-4,7-diol, mixture of (\pm) and meso bei Sigma-Aldrich, abgerufen am 23. April 2011
- Donnelly, S.; Marrero, J. E.; Cornell, T.; Fowler, K.; Allison, J. Analysis of pigmented inkjet printer inks and printed documents by laser desorption/mass spectrometry. *Journal Forensic Science*, 55, 129–135. **2010**.

CAPÍTULO I

Ebejer, K. A.; Brereton, R. G.; Carter, J. F.; Ollerton, S. L.; Sleeman, R. Rapid comparison of diacetylmorphine on banknotes by tandem mass spectrometry, Rapid Communication in Mass Spectrometry, 19, 2137-2143. **2005**.

Eberlin, L. S.; Haddad, R.; Neto, R. C. S.; Cocco, R. G.; Maia, D. R. J.; Maldener, A. O.; Zacca, J. J.; Sanvido, G. B.; Romão, W.; Vaz, B. G.; Ifa, D. R.; Dill, A.; Cooks, R. G.; Eberlin, M. N. Instantaneous chemical profiles of banknotes by ambient mass spectrometry. Analyst, 135, 2533–2539. **2010**.

Eisenmenger, E.; Dworowy, L.; Fuchs, G. R.; Rothbuhr, L.; Schafer, H.; Deutsche Gold- Und Silber-Scheideanstalt Vormals Roessler, Carbon black concentrate, Patent Number: US4197221 A, DE2648539A1, DE2648539C2

Fuji Photo Film Co. Ltda (FUJF-C) Fuji Film Corp (FUJF-C), Ink composition for inkjet recording application, includes surfynol surfactant and azo dye dissolved in waterbased medium, such that they are connected by single bond, Patent Number: JP2003012980-A; JP4738654-B2.

Heudt, L.; Debois, D.; Zimmerman, T. A.; Kohler, L.; Bano, F.; Partouche, F.; Duwez, A. S.; Gilbert, B.; Pauw, E.; Raman spectroscopy and laser desorption mass spectrometry for minimal destructive forensic analysis of black and color inkjet printed documents, Forensic Science International, 219, 64–75. **2012**.

Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Dill, A. L.; Cooks, R. G. Latent fingerprint chemical imaging by mass spectrometry. Science, 321, 805. **2008**.

Ifa, D. R.; Jackson, A. U.; Paglia, G.; Cooks, R. G. Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 394, 1995-2008. **2009**.

James, M. E.; Rickenbach, M.; Mooney, K. E.; Palenik, C. S.; Golombeck, R.; and Mueller, K. T.; Bank Security Dye Packs: Synthesis, Isolation, and Characterization of Chlorinated Products of Bleached 1-(methylamino)anthraquinone. Journal Forensic Science, 51. **2006**.

Jagerdeo, E.; Leibowitz, J. N.; Schumacher, L.; Henningsen, D. A.; LeBeau, M. Analysis of Trace Amount of Bank Dye and Lachrymators from Exploding Bank Devices by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Journal of Chromatographic Science, 44. **2006**.

CAPÍTULO I

Keller, B. O.; Suib, J.; Young, A.B.; Whittal, R. M. Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 6, 71–81. **2008.**

Lalli, P. M.; Sanvido, G. B.; Garcia, J. S.; Haddad, R.; Cocco, R. G.; Maia, D. R. J.; Zanca, J. J.; Maldaner, A. O. and Eberlin, M. N. Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 135, 745–750. **2010.**

Lech, K.; Wilicka, E.; Witowska-Jarosz, J.; Jarosz, M. Early synthetic dyes – a challenge for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 48, 141–147. doi:10.1002/jms.3090. **2013.**

Marise, C.; Ross, P.; Identification of 1-methylaminoanthraquinone on Australian polymeric bank notes. *Forensic Science International*. 206, 207–210. **2006.**

Martz, R. M.; Reutter, D. J.; and Lasswell, L. D.; A Comparison of Ionization Techniques for Gas Chromatography/Mass Spectroscopy Analysis of Dye and Lachrymator Residues from Exploding Bank Security Devices. *Journal of Forensic Sciences*. 28, 200-207. **1983.**

Mizrachi, N.; Aizenshtat, Z.; Levy, S.; Elkayam, R. Classification and identification of color photocopiers by FT-IR and GC/MS. *Journal Forensic Science*, 43, 353-361. **1998.**

Mori, S. Ink composition, for e.g. inkjet printing method, comprises C.I. acid red 52, C.I. acid red 92, C.I. direct yellow 87, water, water-soluble organic solvent, tetraethylene glycol monoethylhexyl ether and triethylene glycol monobutyl ether, Patent Number: US2009260540-A1; JP2009256547-A; US7789954-B2.

Parees, D. M.; Hanton, S. D.; Clark, P. A. C.; Willcox, D. A.; Comparison of mass spectrometric techniques for generating molecular weight information on a class of ethoxylated oligomers. *Journal American Society Mass Spectrometry*, 9, 282–291. **1998.**

Peters, J.; Grottemeyer, J. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 25,1169–1172. doi:10.1002/rcm.4972. **2011.**

Reilly, C. A.; Crouch, D. J.; Yost, G. S.; Fatah, A. A. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 912, 259–267. **2001.**

CAPÍTULO I

- Romão, W.; Vaz, B. G.; Lalli, P. M.; Bueno, M. I. M. S.; Correa, D. N.; Telles, V. L. C. N.; Castro, E. V. R.; Eberlin, M. N. Analyzing Brazilian vehicle documents for authenticity by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Journal Forensic Science*, 57, 539-43. **2012**.
- Rusanov, V.; Chakarova, K.; Winkler, H.; Trautwein, A.X. Mossbauer and X-ray fluorescence measurements of authentic and counterfeited banknote pigments. *Dyes Pigments*, 81, 254-258. **2009**.
- Seiden, H., Removal of dye-pack stains on U.S. currency: a reconstruction. *International Journal of Forensic Document Examiners* 2, 220–225. **1996**.
- Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Santos, J. M.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Eberlin, M. N. Direct Analysis of crude oil using Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. In: 62nd Conference on mass spectrometry and allied topics, Baltimore, EUA. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 25, 1-264. **2014**.
- Song, D. M.; Zhang, S. D.; Kohlhof, K. Determination of a trace amount of cocaine on a bank note by gas chromatography positive-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 731, 355-360. **1996**.
- Tang, H. W.; Wong, M. Y. M.; Chan, S. L. F.; Che, C. M. Molecular imaging of banknote and questioned document using solvent-free gold nanoparticle-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83, 453-458. **2011**.
- Vila, A.; Ferrer, N.; Mantecon, J.; Breton, D.; Garcia, J.F. Development of a fast and non-destructive procedure for characterizing and distinguishing original and fake euro notes. *Analytical Chimica Acta*, 559, 257-263. **2006**.
- Verweij, A. M. A. and Lipman, P. J. L. Comparison of mass spectrometric techniques for the analysis of trace amounts of l-methylaminoanthraquinone, used as smoke dye in exploding money suitcases. *Journal of Chromatography A*, 653, 359-362. **1993**.
- Wilson, C. V.; Dickey, J. B.; Allen, C. F. H., 1-ETHYLAMINOANTHRAQUINONE - ANTHRAQUINONE, 1-METHYLAMINO. *Organic Syntheses*. 29, 66-68. **1949**.

CAPÍTULO I

Yu, L.; Mao, Y.; Qu, L. Simple Voltammetric Determination of Rhodamine B by Using the Glassy Carbon Electrode in Fruit Juice and Preserved Fruit. *Food Analytical Methods*, 6,1665–1670. **2013**.

CAPÍTULO II

➤ Capítulo II

Estudo do perfil químico de petróleo e seus derivados utilizando os analisadores de massas ICR e *Orbitrap*.

CAPÍTULO II

11 INTRODUÇÃO

O petróleo é um óleo de origem mineral que foi formado durante milhões de anos em rochas sedimentares, sendo hoje, a principal fonte de energia no mundo (Petrobras, 2013). O termo petróleo refere-se à emulsão de óleo cru, água e gás natural encontrado na natureza (Milani, 2005). No Brasil, as maiores reservas concentram-se em campos marítimos com profundidade superior às de outros países. O Brasil tem hoje, a nona maior empresa de energia do mundo – a Petrobras - que produz mais de 3,5 milhões de barris de petróleo por dia em 135 plataformas de produção (Petrobras, 2014; PFC Energy, 2014).

O refino do petróleo compreende uma série de processos físicos e/ou químicos, onde o óleo bruto é fracionado. O refinamento de petróleo, por meio da separação por seus pontos de ebulação, gera diferentes frações das quais se obtêm a gasolina, querossene, óleo diesel, óleo de motor, nafta, gás de cozinha, entre outras (Dalmashio *et al.*, 2014).

Outra questão de suma importância para a exploração e o refino de petróleo é o conhecimento da evolução térmica, que consiste no avanço das transformações sofridas pelo querogênio, definido como a fração insolúvel da matéria orgânica presente nas rochas sedimentares, e pelo petróleo, sob condições crescentes de soterramento e temperatura, resultando na formação de hidrocarbonetos mais leves. Esta evolução térmica pode ser monitorada por uma série de indicadores geoquímicos, conhecidos como parâmetros de maturação térmica. Existe uma carência de estudos que correlacionam essas inúmeras classes de compostos e séries como indicadores e/ou parâmetros da evolução térmica do petróleo para um conjunto maior de amostras de óleos. Estes parâmetros podem ser úteis para responder perguntas sobre maturação, evolução térmica e diferenciar petróleos de origens diferentes e diferentes níveis de biodegradação (Vaz, 2011).

Processos clássicos de caracterização de misturas complexas envolvem, geralmente, múltiplas separações químicas de via úmida como extrações, precipitações, destilações e processos cromatográficos, para reduzir o número de componentes e, então, simplificar a determinação das várias composições moleculares, elementares e estruturais. Estes procedimentos são laboriosos, demandam muito tempo e implicam no gasto de grandes quantidades de solventes, gerando resíduos químicos. Por estes motivos, nos últimos anos, tem-se utilizado cada vez mais a técnica de espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR MS) para este fim (Colati *et al.*, 2013; Dalmaschio *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2013; Hughey *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2006; Mapolelo *et al.*, 2011).

Sabe-se que a composição química do petróleo é bastante complexa. Aproximadamente 90% de sua composição é dada por hidrocarbonetos e compostos aromáticos. Os outros 10% consistem em compostos polares, os quais apresentam pelo menos um heteroátomo como S, N, O e inclusive alguns íons metálicos como V e Ni. Apesar de serem minoria, os grandes problemas enfrentados pelas refinarias de petróleo provêm de compostos polares, pois estes podem formar emulsões, contaminações e corrosão. Para o petróleo, sua composição é geralmente determinada em termos da proporção de hidrocarbonetos, aromáticos e compostos polares, como representado na Figura 21 (Mapolelo *et al.*, 2011; Simas *et al.*, 2012).

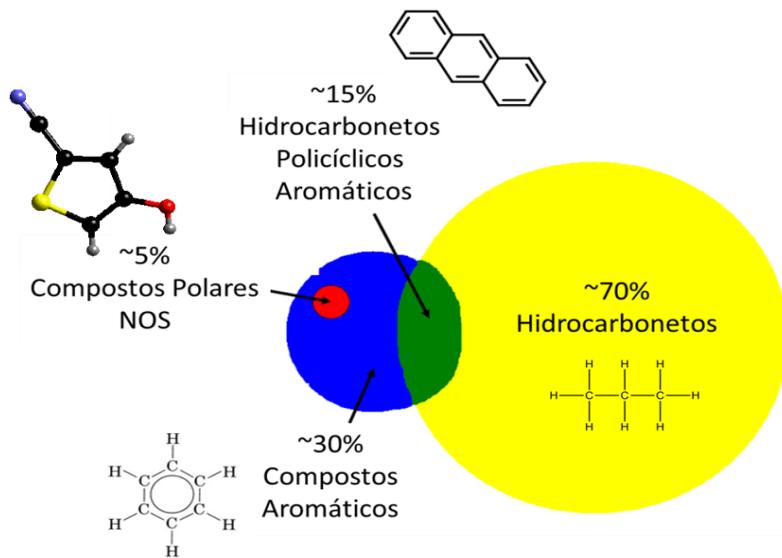


Figura 21 Composição média típica do petróleo com as correspondentes percentagens de cada tipo de compostos, sendo ~70 % de hidrocarbonetos, ~30 % de aromáticos, ~15% de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e ~5 % de compostos polares.

Como observamos na Figura 21, os compostos polares contendo nitrogênio e/ou oxigênio e/ou enxofre presentes na fração aromática variam de 3 a 15% dependendo da origem do petróleo (média~5%). Estes são considerados rejeitos, e quando em quantidades elevadas acentuam problemas de escoamento nas tubulações e com isso prejudicam a comercialização desse petróleo, diminuindo o valor agregado ao mesmo. Quanto aos processos de refino, estes podem se tornar mais caros não só pela alteração no perfil das temperaturas de destilação como também pela redução da qualidade dos produtos (Althelt e Bonduszynski, 1994; Tissot e Welte, 1984). A caracterização molecular do petróleo pode ser obtida através da combinação das técnicas de separação e métodos espectroscópicos por ser a mistura orgânica de maior complexidade existente, devido ao número de classes químicas distintas que o compõem (Speight, 2001). Assim, a caracterização das frações de petróleo é feita pela combinação de inúmeras técnicas analíticas e a fração polar é determinada por métodos de análise elementar que expressa o teor total em porcentagem de nitrogênio, enxofre e oxigênio.

A investigação e determinação qualitativa e, em especial, quantitativa dos compostos nitrogenados, sulfurados e oxigenados (NOS) é o principal objetivo da cadeia petrolífera, pois entender melhor a composição dos compostos polares permite em especial controlá-los e/ou eliminá-los dos processos de refino. Essa investigação beneficia toda cadeia petrolífera devido ao custo de produção e revenda do petróleo estar subindo constantemente e o mercado necessitar recorrer ao uso de petróleos mais pesados, mais ácidos e com maior teor de enxofre, e com isso reavaliar e otimizar a maneira de exploração das jazidas de petróleo.

11.1 Compostos com enxofre (S)

Os compostos com enxofre são os de maior destaque entre os compostos heteroatômicos presentes no petróleo. Em geral, estão distribuídos através de todas as faixas de destilação do petróleo e não excedem uma faixa de 0,05 a 14%, em média 4% (Ho *et al.*, 1974). Os compostos organo-sulfurados são normalmente instáveis termicamente e estão divididos em cinco grandes classes. Os tióis, sulfetos, dissulfetos e sulfóxidos podem ser divididos em espécies cíclicas e acíclicas (alquil e aril e seus derivados). Já os tiofenos apresentam anéis aromáticos como benzo, dibenzo, naftobenzo-tiofenos e outros derivados. As estruturas químicas de alguns compostos de enxofre, chamados também de S-compostos, estão representadas na Figura 22.

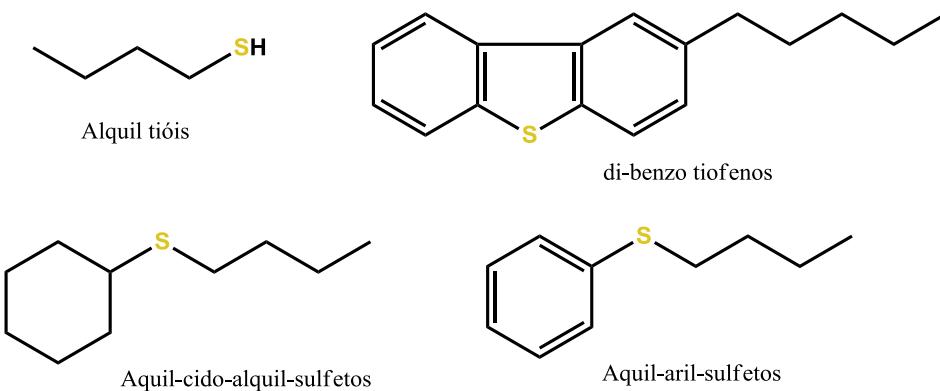


Figura 22 Exemplos de S-compostos encontrados em petróleo.

A presença dos S-compostos juntamente com outros tipos de heteroátomos, pode elevar muito o ponto de ebulição das frações de petróleo. Outros problemas são a formação de gomas com o depósito destas nas linhas de produção, processos de corrosão, diminuição da estabilidade dos combustíveis, deterioração da cor e o odor desagradável. Nos óleos refinados, compostos de enxofre podem ser removidos ou transformados em outros compostos que causem menos danos (Tissot e Welte, 1984). Os tiofenos, característicos pela formação do pentágono regular e seus derivados, são a classe mais abundante. Os sulfetos cíclicos e acíclicos, assim como os sulfóxidos, estão presentes em menor quantidade (Algelt e Bonduszynski, 1994). Os S-compostos são utilizados para classificação do petróleo, ou seja, quando compostos não tiofénicos são particularmente abundantes tem-se normalmente petróleos imaturos. Porém, o aumento da concentração dos tiofénicos está relacionado ao aumento da maturação e o que se verifica normalmente é a redução da razão entre os bezotiofenos e os dibenzotiofenos (Ho *et al.*, 1974).

11.2 Compostos nitrogenados (N)

O nitrogênio é um componente universal de combustíveis fósseis, geralmente associado à matéria orgânica. Em geral, a concentração de compostos de nitrogenados no óleo cru é baixa, com teores próximos de 0,01 a 0,8%, em média 0,4%. Os valores dos compostos nitrogenados (N-compostos) aumentam significativamente nas frações destiladas de petróleo acima de 345 °C (Algelt e Bonduszynski, 1994). Assim como os S-compostos, os N-compostos também apresentam combinações com outros heteroátomos em sua estrutura, nesse caso com S ou O, gerando principalmente moléculas contendo NO, NS e NOS.

A principal divisão dos N-compostos do petróleo é o caráter básico ou ácido (não básico). As classes dos compostos com caráter básico são os derivados da piridina, alguns pirróis, os azos (bases médias), as aminas primárias (bases fortes), os N-alquil-indóis e alquil-aryl-aminas (bases fracas). O caráter de compostos ácidos são atribuídos aos indóis, carbazóis, porfirinas, pirróis e a maior parte das amidas (Algelt e Bonduszynski, 1994). A Figura 23 apresenta a estrutura de alguns representantes de N-compostos presentes no petróleo.

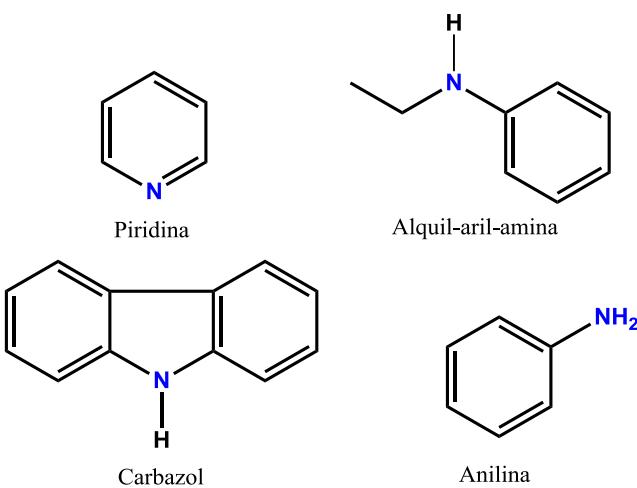


Figura 23 Exemplos de N-compostos encontrados em petróleo.

É conhecido que nas temperaturas de 535 e 675 °C da destilação do petróleo encontra-se um maior número de compostos com N básico que são conhecidos como venenos catalíticos. Como exemplo tem-se os benzo análogos da piridina, os diazo compostos, os derivados pirrólicos e as amidas. Quando em temperaturas menores de destilação, entre 370 a 535 °C, maior é a concentração dos compostos ácidos, derivados pirrólicos e amidas. Os derivados pirrólicos apresentam caráter anfótero, ou seja, ácido ou básico, dependendo da sua estrutura. A remoção de compostos orgânicos contendo nitrogênio e enxofre é uma parte muito importante durante o refino de petróleo. Suas presenças em destilados de petróleo, além dos já destacados envenenamentos de catalisadores, resultam também na formação de poluentes ambientais (SO_x , NO_x) durante a combustão (Homes, 1986).

Na Figura 24 é apresentada a estrutura dos N-compostos de caráter não básico, os carbazóis e alguns indóis que são os mais abundantes (Seifert e Howells, 1969).

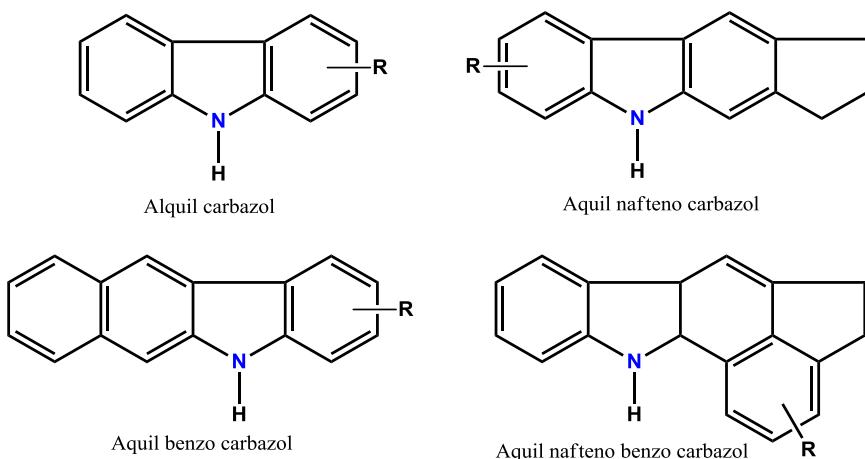


Figura 24 Exemplos de tipos e nomes de carbazóis encontrados no petróleo.

11.3 Compostos oxigenados (O)

Assim como os compostos de enxofre e nitrogênio, os compostos oxigenados também são relevantes para a análise química por MS do petróleo. Os compostos oxigenados são quase tão abundantes quanto os compostos de enxofre. De modo geral, estão relacionados à acidez, coloração (ácidos naftênicos que são os tipos mais abundantes), odor (fenóis), e assim como os S-compostos e N-compostos são também responsáveis pelas gomas e corrosividade dos derivados de petróleo. Ácidos carboxílicos e fenóis são os principais compostos oxigenados (O-compostos) que compõem o petróleo. (Figura 25). Os O-compostos estão presentes no petróleo em quantidade de 0,1 a 2% (Seifert, 1975).

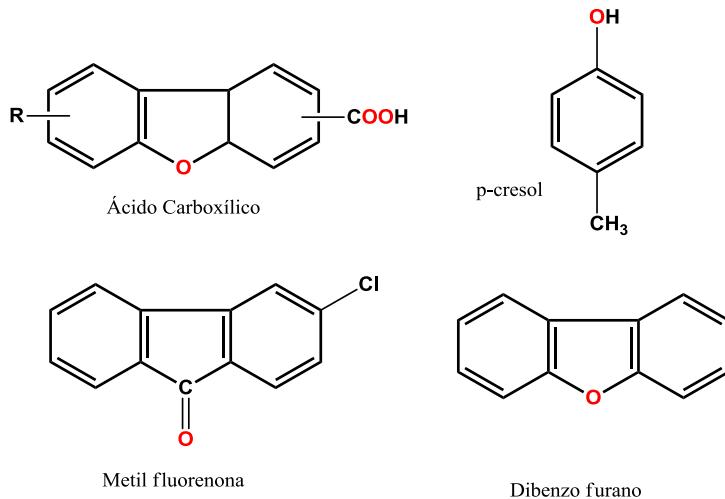


Figura 25 Exemplos de tipo e nomes dos O-compostos encontrados em petróleo.

Os fenóis e particularmente os cresóis, também conhecidos como hidroxitoluenos ou metilfenóis são abundantes na fração ácida do petróleo. Os compostos ilustrados na Figura 25, como o alquil ou ciclo fluorenonas e dibenzo furanos também fazem parte dos O-compostos, em menores quantidades (Tissot e Welte, 1984). Quando combinados com outros heteroátomos como enxofre e nitrogênio, os O-compostos multiplicam suas combinações gerando classes como NO, SO, NO₂ e outras.

CAPÍTULO II

Após a atividade de exploração realizada pela indústria petrolífera, seguida de produção – que envolve a perfuração de poços - o refino é considerado a última, mas não menos importante etapa que o petróleo passa até sua distribuição nas mais diversas formas. Essa etapa consiste em uma série de beneficiamentos pelos quais passa o óleo bruto, para a obtenção de seus derivados. Esses beneficiamentos englobam etapas físicas e químicas de separação que originam as grandes frações de destilação. Cada fração do petróleo é ainda uma mistura de hidrocarbonetos, formada por um número menor de substâncias, e sua separação só é possível porque as frações apresentam diferentes pontos de ebulição. Refinar petróleo é, portanto, separar as frações desejadas como gasolina, querosene, óleo diesel, nafta, gás de cozinha, entre tantas outras, processá-las e dar acabamento de modo a se obter produtos de alto valor agregado.

Sendo assim, os compostos polares (NOS) inicialmente podem fornecer informações valiosas sobre a origem do petróleo, relacionada aos vários ambientes deposicionais das rochas geradoras juntamente com o grau de evolução térmica dos óleos (maturação) e o nível de biodegradação.

Em decorrência da mistura de óleos provenientes de diferentes rochas geradoras e, ainda, diferentes níveis de biodegradação e graus de maturação, a pesquisa por novos indicadores moleculares se faz necessária. Como as respostas para a fase de exploração estão na mistura complexa que é o petróleo, obter novos marcadores polares passa a ser uma necessidade e também um desafio.

Para a determinação de todas essas classes (NOS) presentes no petróleo, análises químicas se fazem necessárias e por se tratar de uma amostra complexa, a análise demanda de técnicas que permitam a obtenção de alta resolução e exatidão durante as análises. A espectrometria de massas munida de analisadores de altíssima resolução como o ICR e o *Orbitrap* podem e tem realizado esse tipo de estudo.

11.4 Análise de petróleo por espectrometria de massas com infusão direta e suas variáveis

A espectrometria de massas vem sendo utilizada para a análise direta de petróleo a fim de se obter o maior grau possível de identificação de suas classes. Nesta técnica, as amostras são injetadas ou infundidas para dentro da fonte de ionização do espectrômetro de massas sem nenhuma separação cromatográfica preliminar, o que resulta em um espectro de massas para cada amostra em poucos segundos, representativo da composição da mesma. Ao se obter o espectro de massas, a lista obtida correlacionando os valores de razão m/z e respostas são utilizados para a classificação da amostra. Isto significa dizer que a identificação dos compostos pode ser realizada por meio de instrumentos de altíssima resolução e exatidão (Dunn; Ellis, 2005; Dettmer; Aronov; Hammock, 2007).

As vantagens a serem citadas ao se utilizar MS com infusão direta é que nenhuma separação cromatográfica ou etapas de derivatização da amostra são necessárias e, portanto, os compostos não são perdidos ou modificados durante o preparo da amostra. Além disso, o tempo de análise reduzido aumenta a reproduzibilidade entre as amostras (Villas-Boas *et al.*, 2005). Apesar da rapidez e elevado número de amostras que são analisadas dessa forma, algumas limitações são apresentadas por esta técnica. A primeira delas refere-se aos isômeros que não podem ser diferenciados, uma vez que apresentam a mesma fórmula molecular, consequentemente apresentam as mesmas massas e também podem possuir o mesmo perfil de fragmentação.

No entanto, esse problema vem sendo solucionado ao se utilizar espectrômetros com mobilidade iônica, onde é feita a separação de íons através da sua estrutura contra um fluxo de gás, mas ainda assim dependendo da altíssima resolução e exatidão para confirmação desses compostos (Fasciotti, et al., 2013). Além disso, os analisadores ICR e Orbitrap permitem a obtenção da

CAPÍTULO II

composição elementar dos analitos de baixa massa molecular por meio de medições acuradas de massa com erros na faixa de partes por milhão (ppm) (Lin *et al.*, 2010). Uma limitação a ser colocada é a possibilidade da presença de íons-fragmento na fonte de ionização, o que pode aumentar a complexidade dos espectros de massas levando a interpretações errôneas (Villas-Boas *et al.*, 2005). No entanto, a limitação mais preocupante na análise direta dessas matrizes complexas é a possibilidade de supressão iônica. Qualquer mecanismo que seja capaz de diminuir a taxa de produção das gotículas de evaporação (como por exemplo, a presença de compostos menos voláteis) e, portanto, influenciar a quantidade de íons carregados presentes na fase gasosa que atinjam o detector, pode participar na supressão de ionização (Annesley, 2003). Ao se utilizar a MS com infusão direta, todos os componentes das amostras são introduzidos simultaneamente na fonte de ionização, portanto os efeitos provenientes da matriz são inevitáveis e a supressão do sinal pode ocorrer, resultando em limitação de sensibilidade e capacidade de identificação de compostos reduzidos.

Este capítulo da tese apresenta resultados obtidos para a caracterização do perfil químico de compostos polares (NOS) de petróleo bruto por espectrometria de massas de altíssima resolução através dos analisadores ICR e *Orbitrap*, com a intenção de avaliar diferentes fontes de ionização e também diferentes analisadores de massas. Além disso, dois casos de análise forense envolvendo derivados de petróleo por esta mesma técnica serão discutidos.

12 OBJETIVOS

Desenvolver e otimizar novas metodologias analíticas aplicáveis à análise de petróleo por meio de espectrometria de massas utilizando fontes de íons a pressão atmosférica e ambiente acopladas aos analisadores de massas de altíssima resolução ICR e *Orbitrap*.

12.1 Objetivos específicos:

- Avaliar a fonte de ionização e a metodologia mais adequada para análise de amostras de petróleo por FT-ICR MS, realizando um comparativo direto entre a fonte ESI, e a nova fonte de íons *Spartan V-EASI*.
- Identificar classes de compostos característicos por comparação de perfil químico de amostras de petróleo encontrado em pinguins provenientes de diferentes embarcações navais para determinar a origem do petróleo e a fonte do vazamento.
- Avaliar diferentes tipos de óleo de motor automotivo (mineral, sintético e semi-sintético) e suas conformidades aos rótulos e legislação.
- Comparar o uso do analisador de massas ICR, *Orbitrap* (comercial) e *MegaOrbitrap* (experimental) para análises de petróleo.

13 MATERIAIS E MÉTODOS

13.1 Amostras e preparo das amostras

- Para o estudo de avaliação da fonte de ionização mais indicada para se trabalhar em petroleômica, 3 mg de três amostras referências de petróleo cedidas

CAPÍTULO II

pela Petrobras (M-ThoMSon), foram dissolvidas em 1 mL de tolueno. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi diluída em 0,5 mL de metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, e outra alíquota foi diluída em 0,5 mL de metanol contendo 0,1% (v/v) de hidróxido de amônio para análises no modo positivo e negativo, respectivamente.

- Três amostras de diferentes tipos de óleo de motor comercial (sintético, semi-sintético e mineral) de marcas distintas, foram diluídas em tolueno/metanol (1:1 v/v) e adicionado 0,1 % (v/v) de ácido fórmico para análises no modo positivo.

- Amostras (três) de petróleo de diferentes navios cargueiros e 14 amostras de poluentes encontradas no corpo dos pinguins foram concedidas pela Polícia Federal. Essas amostras foram diluídas em tolueno/metanol (1:1 v/v) até uma concentração final de 0,5 mg mL⁻¹.

- Para o estudo comparativo entre os analisadores de massas *Orbitrap*, *MegaOrbitrap* e ICR, uma quantidade de 3 mg das amostras de petróleo referência denominadas JC e M-ThoMSon foram dissolvidas em 1 mL de tolueno. Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi diluída em 0,5 mL de metanol para análises por ionização no modo positivo e negativo.

Todas as análises foram realizadas em triplicata (n=3).

13.2 Equipamentos

Os espectrômetros de massas utilizados na realização das análises descritas foram o LTQ FT Ultra (FT-ICR com campo magnético de 7.2 Teslas), Q-Exactive (*Std. Orbitrap*) e *Orbitrap* Elite modificado (*MegaOrbitrap*), (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma bomba de seringa para injeção direta (Havard).

13.3 Condições Experimentais

13.3.1 Técnicas de ionização acopladas ao analisador ICR:

ESI: Utilizou-se uma voltagem no capilar de 3,5 kV e -3,1 kV para ionização nos modos positivo e negativo, respectivamente. A vazão de introdução de amostra foi de $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

V-EASI Spartan: Foram utilizados $\sim 70 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de amostra de petróleo e metanol/tolueno (0.1% de ácido fórmico) como solvente em *vials* de vidro, para obtenção do sistema venturi de sucção. Vale ressaltar que o fluxo gerado pelo gás é dependente da força aplicada manualmente ao pressionar a tampa da lata (limitadores físicos foram utilizados). No entanto, quando pressionado de forma suave, produz-se uma vazão constante de $1,0 \text{ L min}^{-1}$, que pode ser mantido por 6 minutos, com intervalos de 5 minutos entre as análises. Após períodos superiores a 6 min, ocorre um resfriamento excessivo da lata, afetando então a vazão do gás. Esse tempo é importante devido ao tempo de órbita dos íons no ICR para obtenção da resolução de 400.000 em razão m/z 400.

Os valores de *tube lens* utilizados em todos os experimentos 148 V no modo positivo e -100 V no modo negativo e uma variação de 80 V para menores valores no capilar de transferência em relação à *tube lens*, para condução dos íons. Os espectros de massa foram obtidos no LTQ-FT Ultra (ICR) (Thermo Scientific) com 400.000 em m/z 400 de resolução e um acúmulo de 100 espectros (erroneamente denominado microscan pelo fabricante) na faixa de m/z de 200 a 1000.

As amostras de óleo de motor foram analisadas com a técnica de infusão direta e ionização por eletrospray em modo positivo (ESI(+) MS), enquanto as amostras de petróleo presentes nos pinguins e petróleo de diferentes embarcações foram analisadas por infusão direta e ionização por eletrospray em modo negativo (ESI(-) MS). Todas as análises foram realizadas utilizando o espectrômetro de massas LTQ-FT Ultra em altíssima resolução na ordem de

CAPÍTULO II

400.000 para razão m/z 400 e 100 espectros acumulados na faixa de m/z 200 a 1000 e exatidão de massa em níveis abaixo de 1 ppm.

13.3.2 Técnicas de ionização acopladas aos analisadores *Orbitrap* e *MegaOrbitrap*:

Para as análises realizadas no espectrômetro de massas Q-Exactive (Orbitrap) as amostras de petróleo foram analisadas usando a técnica de ionização eletrospray em modo positivo e negativo (ESI(\pm) MS) através da infusão direta da solução da amostra. Para estes experimentos, foram aplicadas, voltagens de 3,60 e -3,1 kV na agulha do ESI, para os modos de ionização: positivo e negativo, respectivamente. Os espectros de massas foram adquiridos com uma resolução 100.000 para a m/z 400 e 100 espectros na faixa de 200 a 1000 m/z .

Já para as análises realizadas no espectrômetro de massas *Orbitrap Elite* modificado (*MegaOrbitrap*), as amostras de óleo foram analisadas através da técnica ESI-(\pm) MS de ionização com infusão direta da solução da amostra. Para estes experimentos, foram aplicadas voltagens de 3,60 e 3,1 kV no capilar da fonte ESI, para os modos de ionização positivo e negativo, respectivamente, Na *S-lens* a voltagem aplicada foi de 50 V no modo positivo e negativo. Os espectros de massas foram adquiridos com uma resolução 850.000 para m/z 400 e coletados 100 espectros na faixa de aquisição entre m/z 200 a 1000.

13.4 Processamento de dados

Os arquivos dos espectros de massas gerados para cada amostra foram convertidos para o formato .txt usando o software Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific ,Bremen, Alemanha) para serem utilizados como arquivos de entrada no

CAPÍTULO II

software PetroMS (Corilo et al., 2010). Este software permite atribuição da composição elementar inequívoca para todos os sinais adquiridos através das seguintes etapas:

- 1) a atribuição da m/z para cada sinal do espectro;
- 2) atribuição do limiar ótimo de intensidade para o ruído de cada espectro individualmente;
- 3) construção de um banco de dados teórico de correlação massa e fórmula molecular para os possíveis constituintes polares do petróleo;
- 4) atribuição da composição elementar para cada sinal através da comparação com este banco teórico;
- 5) eliminação de duplicidade de atribuições através da confirmação do padrão isotópico e comparação com séries homólogas.

Os resultados destes tratamentos permitem a organização dos dados por classes de compostos (heteroátomos) e números de insaturações presentes nas moléculas químicas, expressão que vem do inglês *double bond equivalent* (DBE), sendo este definido a partir da fórmula empírica $CcHhNnOoSs$, através da equação 5.

$$DBE = c - \frac{h}{2} + \frac{n}{2} + 1 \quad \text{Equação 5}$$

Este valor é correlacionado com a quantidade de anéis e insaturações da molécula em questão. Por exemplo: a molécula de fórmula molecular $C_{10}H_{17}N$ será classificada como classe N e de tipo 3 e a molécula de fórmula molecular $C_{10}H_{21}N$ como classe N e tipo 1. Com essas informações temos a construção de bibliotecas gráficas para a visualização e interpretação das atribuições na forma de Diagramas de Kendrick e van Krevelen. A combinação destes algoritmos e a execução automática deles formam o software de alta eficiência e alta tecnologia para tratamento e visualização de dados de petroleêmica por ESI-MS.

Após o processamento dos espectros de massas de ESI MS utilizando o software PetroMS, os compostos identificados e suas intensidades relativas foram utilizados para construção de matrizes. Os dados foram processados usando o programa STATISTICA 7.1 (StatSoft Pacific Pty Ltd, Tulsa, USA). Estudos quimiométricos para o tratamento multivariado da análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) contribuíram para discriminação de novos indicadores moleculares no conjunto de dados que foram utilizados na classificação dos óleos de motor e na classificação das análises de petróleo.

14 RESULTADOS E DISCUSSÃO

14.1 Avaliação das Fontes de Ionização

Neste estudo, foi avaliado se a fonte de ionização V-EASI seria uma alternativa à consolidada técnica de ionização por ESI para análise de petróleo por espectrometria de massas FT-ICR. Nesta investigação foram levados em consideração aspectos teóricos, técnicos e práticos sobre as fontes de íons. Avaliaram-se as fontes de ionização ESI e V-EASI acopladas a espectrômetros de massas de altíssima resolução com analisador ICR.

Além de ser uma fonte de ionização branda, o destaque da fonte ESI é sua estabilidade em relação aos íons acumulados, pois os íons já estão presentes em solução, e a protonação ou desprotonação (Figura 26) pode ser favorecida com adição de ácido fórmico ou hidróxido de amônio, respectivamente (Pereira *et al.*, 2013).

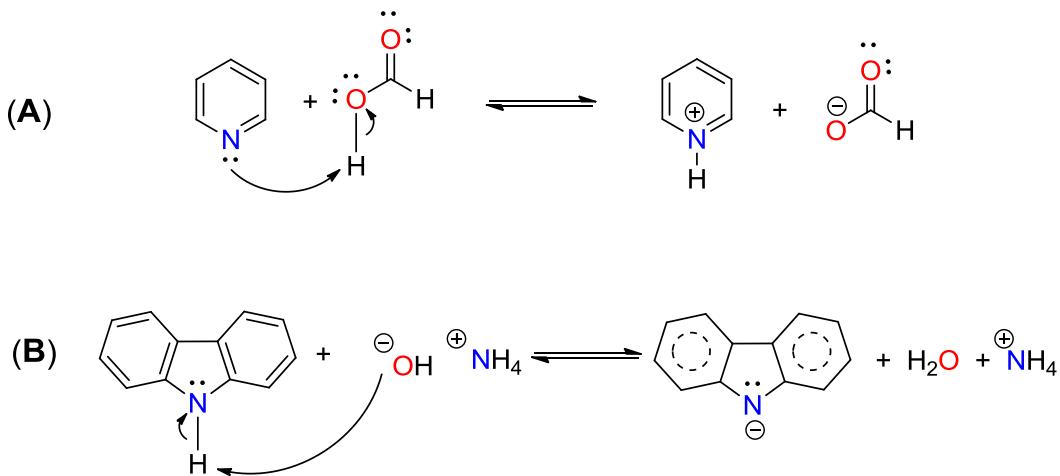


Figura 26 Ionização em solução (A) protonação da piridina, (B) desprotonação do carbazol.

As Figuras 27 (A e B) e as Figuras 28 – 32, apresentam os perfis químicos, ampliações e tratamento de dados, respectivamente, para as amostras de referência para petróleo bruto utilizadas no estudo com a fonte ESI nos modos positivo e negativo de ionização.

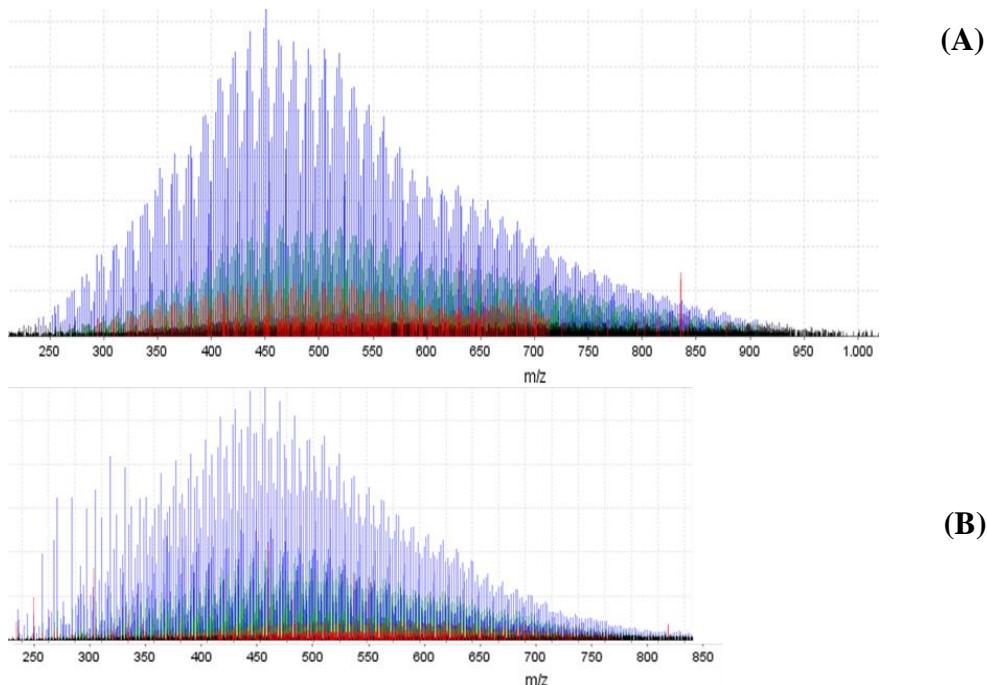


Figura 27(A) Ilustração espectro de ESI(+) FT-ICR MS m/z 200 a 1000 e (B) espectro de ESI(-) FT-ICR MS m/z 200 a 850, com poder de resolução de 400.000 em m/z 400, 100 microscans, para amostra (M-ThomSon) de petróleo.

De acordo com a Figura 27 (A e B), observa-se que utilizando a fonte de ionização ESI, tanto nos modos positivo como negativo, é possível obter o perfil químico das amostras de petróleo baseando-se na maior estabilidade dos íons acumulados e posteriormente detectados. Essa estabilidade é avaliada pelo monitoramento de um ou mais íons presentes na amostra, sendo a resposta expressa em porcentagem, cuja variação deve ser inferior a 10%. Obtém-se em média uma variação de 5%, uma maior relação sinal/ruído (ilustrado em preto na parte inferior do espectro ilustrado na Figura 27 A e B) e alta seletividade na ionização. Ou seja, a fonte ESI favorece a protonação ou desprotonação das moléculas em solução de forma reproduzível.

A ampliação do espectro de massas apresentado na Figura 28 permite diferenciar séries homólogas para classe N pelo aumento de unidades de CH_2 . Este perfil é observado em todo espectro de petróleo. O estudo das classes homólogas é um dos critérios utilizados para recalibração do espectro de massas no software PetroMS.

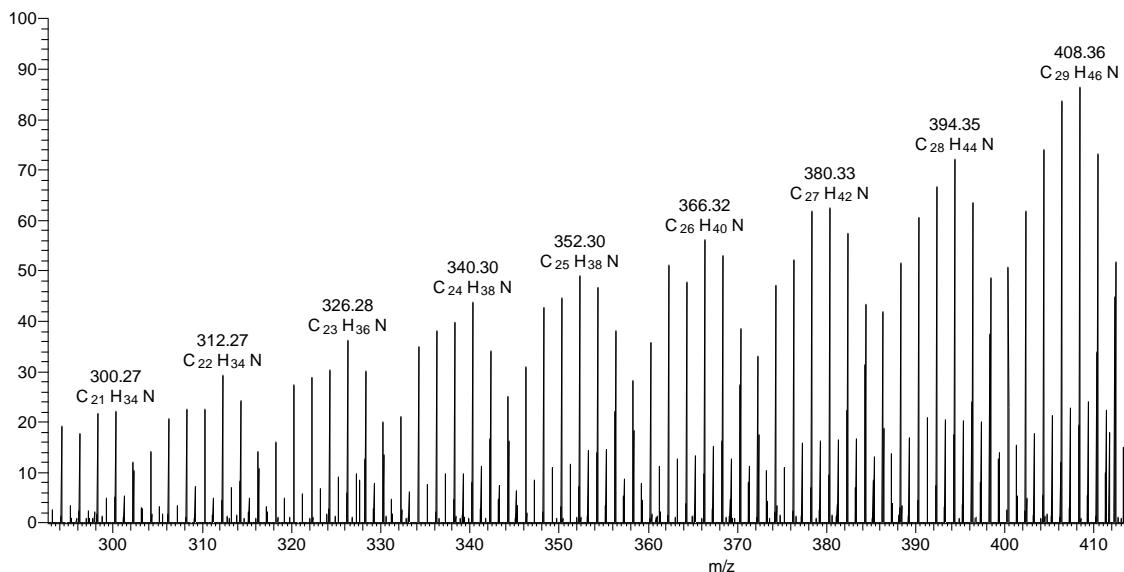


Figura 28 Ampliação do espectro de ESI(+) FT-ICR MS para amostra (M-ThoMSon) de petróleo. O incremento de 14 equivale a adição de CH_2 , indicativo de uma série homóloga para mesmo DBE (equivalente de dupla ligação).

Na ampliação de um segundo segmento do espectro de massas, pode-se observar variações de m/z correspondentes à perda de H_2 , (Figura 29). Com a redução de unidades de H_2 tem-se um aumento de ciclizações e/ou aromatização com compostos da classe N.

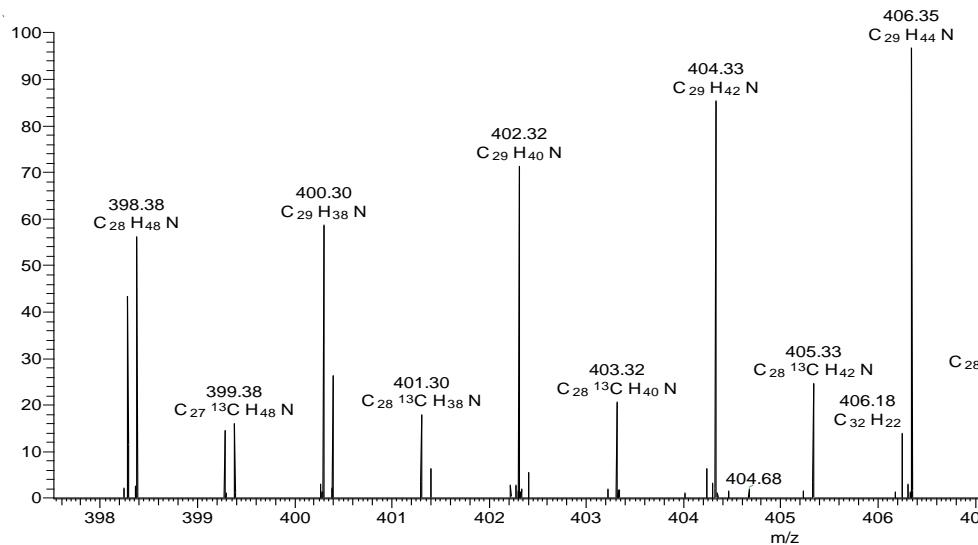


Figura 29 Ampliação do espectro de ESI(+) FT-ICR MS da amostra (M-ThoMSon) de petróleo. A variação de 2 (H_2) indica mudança de DBE (Equivalente de duplas ligações).

Por fim, em uma terceira ampliação do espectro de petróleo, pode-se observar o padrão isotópico apresentado pelos íons detectados. Por exemplo, a Figura 30 apresenta o padrão isotópico para o íons de razão m/z 400,2999, correspondente à fórmula molecular mínima $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}$. Comparando o espectro de relação isotópica experimental (Figura 30A) com o expectro de relação isotópica teórico (Figura 30B), nota-se um erro experimental de 0.2512 ppm. As definições de padrão isotópico também são aplicadas para confirmação do íon detectado, neste sentido, o íon de razão m/z 401,30331 com um erro para exatidão de massa de 0,20495 ppm, isso quando comparado com a razão m/z teórica correspondente à fórmula molecular mínima $\text{C}_{28}^{13}\text{CH}_{38}\text{N}$.

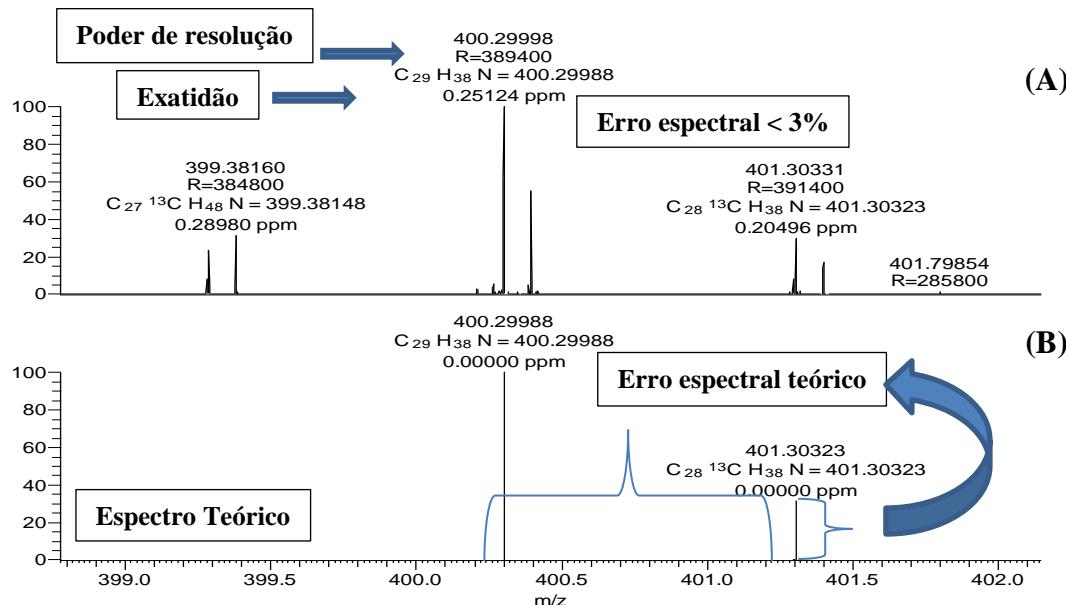


Figura 30 (A) Ilustração da expansão de 3 Daltons com a representação das figuras de mérito em espectrometria de massas, dado experimental e em (B) espetro teórico para o mesmo composto.

Chegamos agora à justificativa da nomenclatura do termo Petroleômica para a análise abrangente do petróleo (Rodgers et., al 2005), pois ao realizar o tratamento dos dados obtidos dos mais de 20 mil íons detectados, o software PetroMS seleciona os sinais que podem ser identificados e filtra os íons que possam ter grandes distorções através de um algoritmo que otimiza a relação sinal/ruído do espetro de massas. As classes dos compostos polares (NO) encontradas em ESI positivo e negativo estão mostradas nas Figuras 31 e 32.

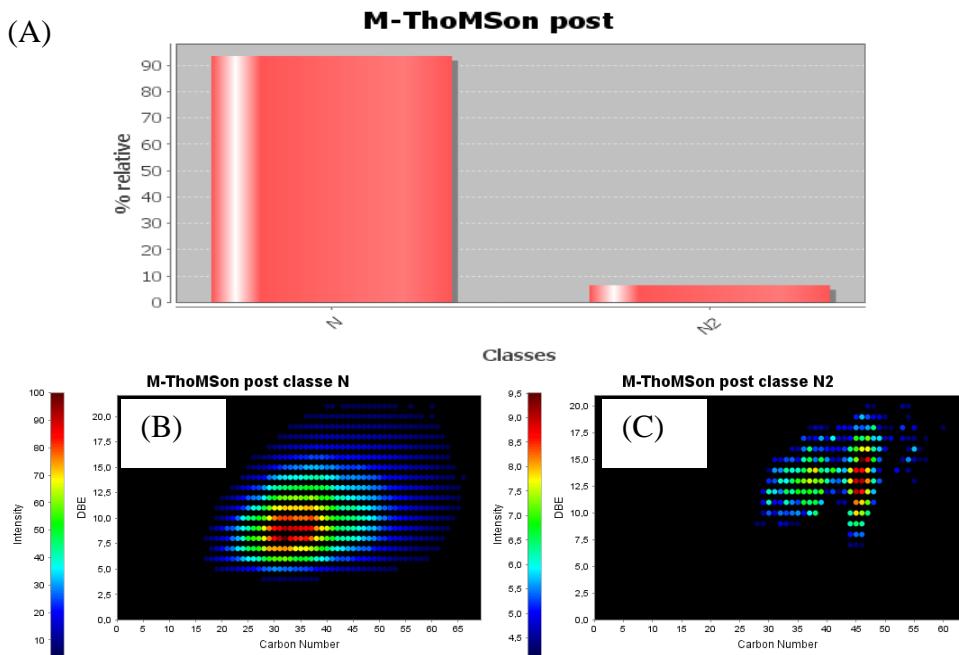


Figura 31 (A) Distribuição das classes N e N₂, (B) e (C) número de carbono versus DBE das classes N e N₂ da amostra M-ThoMSon analisada por ESI(+) FT-ICR MS.

Para a amostra M-ThoMSon (Figura 31A), foram atribuídas duas classes, em um total de 1504 compostos identificados com erro de exatidão de massas menor que 1 ppm. A classe N representa 92% dos compostos identificados e a classe N₂ 8%. A Figura 31 (B) e (C) descreve os gráficos de número de carbonos vs DBE para as classes N e N₂ respectivamente, presentes nas amostras de petróleo. A classe N da amostra M-ThoMSon apresenta compostos com 14 a 60 carbonos e com um número de insaturações que varia entre 5 a 20. O máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₃₀ a C₄₀ para DBE 7-12. O perfil da distribuição da série de composto da classe N₂ mostrou uma tendência singular onde se observa compostos com 30 a 63 carbonos e com insaturações de 7,5 a 20. O máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₄₀ a C₄₅ para DBE 10-15. A temperatura do reservatório do petróleo (~ 100 °C) favorece a quebra das ligações mais lábeis, explicando a menor proporção destes compostos polares mais funcionalizados como N₂ em relação à classe N. A Figura 32 apresenta os resultados obtidos para o modo negativo de ionização.

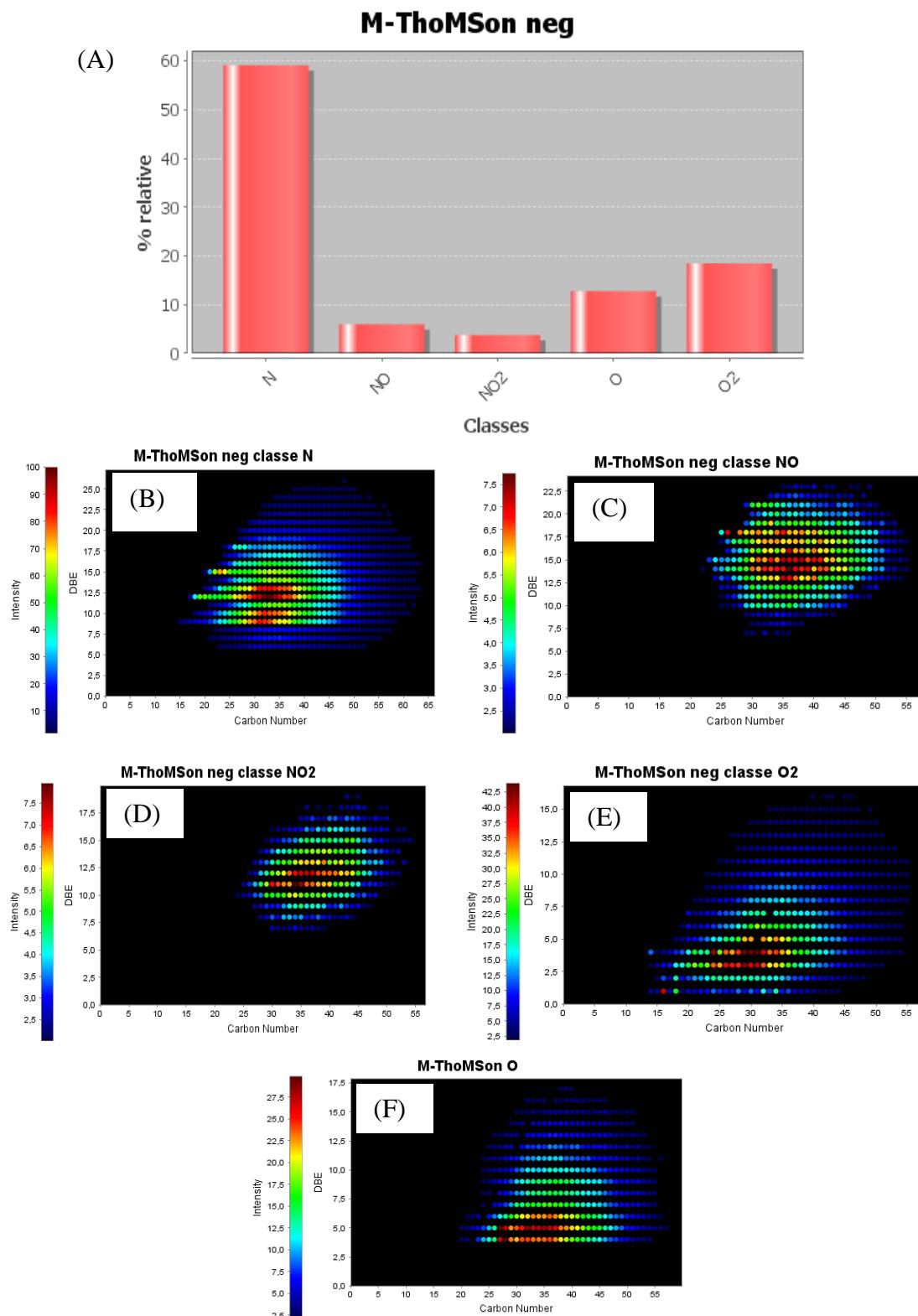


Figura 32 (A) Distribuição das classes e número de carbono vs DBE das classes (B) N, (C) NO, (D) NO₂, (E) O e (F) O₂ da amostra M-ThoMSon analisada por ESI(-) FT-ICR MS.

A Figura 32 apresenta as classes de compostos polares atribuídas no modo negativo para amostras de referência de petróleo. Foram identificadas na amostra M-ThoMSon (A) cinco classes de compostos em ESI(-)-MS, com um total de 1170 compostos polares atribuídos com erro menor que 0,9 ppm. A classe N representa 59%, a classe NO 6%, a classe NO₂ 4%, a classe O 13% e a classe O₂ 18%. Na amostra M-ThoMSon (B), a classe N apresenta DBE de 6 a 25, com número de carbonos de C₂₀ a C₆₀, e o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₃₀ a C₃₇ para as DBE 9-15. Já a classe NO, Figura 31 (C) apresenta valores maiores de DBE, variando de 10 a 22, com número de carbonos de C₂₅ a C₅₅, e o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₃₀ a C₄₀ para as DBE 13-18. A classe NO₂ (Figura 32D) apresenta valores de DBE ainda maiores, variando de 8 a 18, com um número de carbonos de C₂₇ a C₅₀, e o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₃₀ a C₄₀ para as DBE 10-13. A classe O₂ (Figura 32E) apresenta valores menores de DBE, variando de 1 a 16, com número de carbonos de C₁₅ a C₅₀. O máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₂₅ a C₃₅ para as DBE 3-5. Por fim, a classe O, (Figura 32F) apresenta DBE de 5 a 16, com número de carbonos de C₂₃ a C₅₅ e o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₂₇ a C₃₇ para DBE 6-7.

As classes de compostos contendo nitrogênio são as mais abundantes, observando as Figuras 31 e 32, nota-se que para ambos os modos de ionização (+) e (-), os compostos com maior intensidade relativa apresentam nitrogênio em suas estruturas. No modo positivo, compostos básicos análogos à piridina (N) e hidroxipiridinas (NO) foram detectados. Já no modo negativo, compostos análogos aos carbazóis (N) e as hidroxiquinolinas ou hidroxipiridinas (NO e NO₂) foram observados. Dos resultados expostos nas Figuras 31 e 32, observa-se que no modo negativo de ionização o número de classes identificadas é maior do que nas análises realizadas em modo positivo, no qual apenas a classe N é visualizada. Para o modo negativo, foi possível a distinção de cinco classes N, NO, NO₂, O e O₂, com a classe N apresentando a maior porcentagem relativa seguida da classe O₂. Esses resultados permitem indicar a origem do petróleo e a evolução térmica.

Todas essas informações são de grande relevância para as pesquisas na área petrolífera.

14.1.1 Avaliação da fonte de ionização V-EASI Spartan (+) FT-ICR MS (V-EASI S (+) FT-ICR MS)

A fim de comparação, a mesma análise foi realizada trocando apenas a fonte de ionização ESI pela V-EASI S, com o intuito de verificar qual a fonte de ionização melhor responde a análise de petróleo por espectrometria de massas. Outras fontes comerciais foram testadas, como APCI e APPI, mas devido à vazão elevada (maior que 50 microlitros por minutos) intrínseca destas técnicas, elas não se mostraram viáveis devido à contaminação cruzada e instabilidade. Contudo, serão discutidas as mais relevantes, ESI e *Spartan* V-EASI, pois está última é inédita na análise de petróleo. A fonte de ionização V-EASI S teve como alicerce a técnica EASI. Em ambos os casos, o processo de ionização está baseado no efeito que um gás a alta velocidade pode provocar nas gotas de um líquido durante a formação do spray. Na Figura 33 observa-se o perfil obtido com a técnica V-EASI S. Com este processo de ionização obtém-se somente analitos protonados.

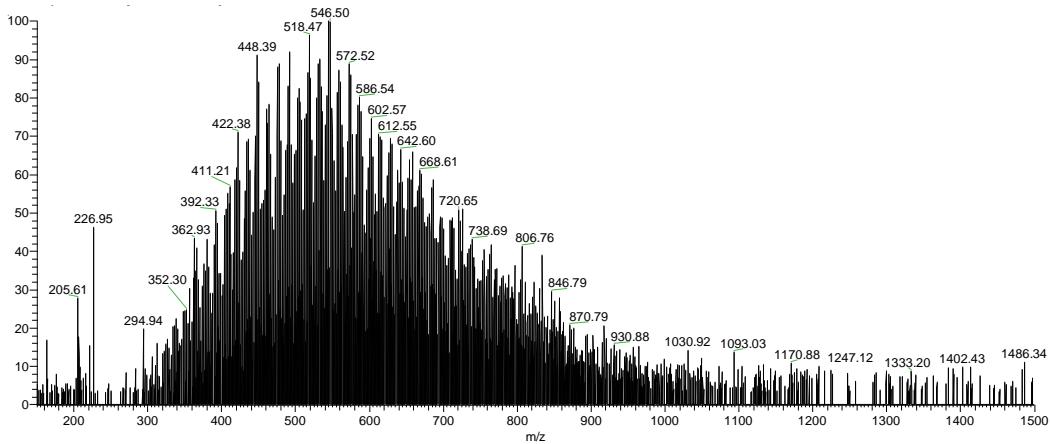


Figura 33 Espectros de V-EASI S (+) FT-ICR MS para amostra de petróleo referência (M-ThoMSon), com poder de resolução 400.000 em m/z 400 e acúmulo de 100 espectros.

Na ampliação da Figura 33, é possível diferenciar séries homólogas para a classe N pelo aumento de unidades de CH₂ e checar a variação de DBE em unidades H₂ na Figura 34.

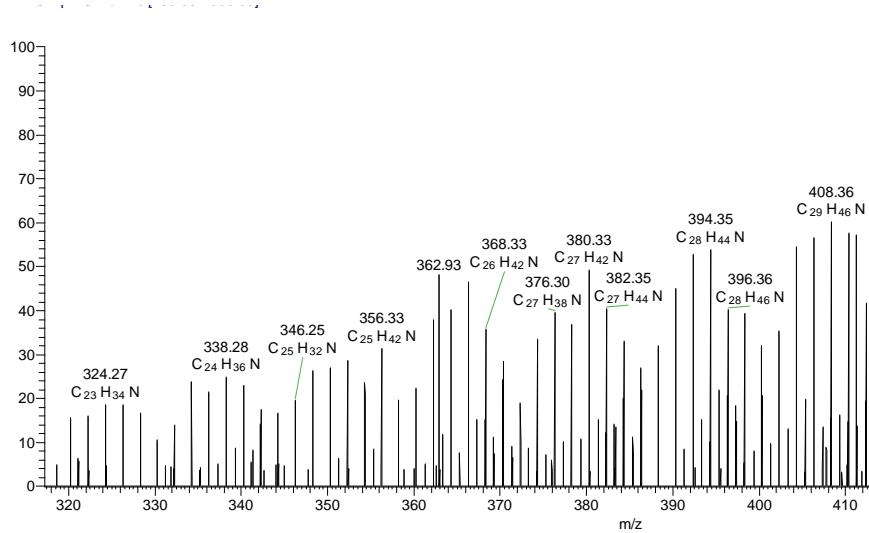


Figura 34 Ampliação do espectro de V-EASI S (+) FT-ICR MS para amostra (M-ThoMSon). O incremento de 14 equivale à adição de CH₂, indicativo de uma série homóloga para mesmo DBE (equivalente de dupla ligação).

Assim como em ESI, quando é empregada a fonte de íons V-EASI S, em uma terceira ampliação visual do espectro de petróleo pode-se observar o sinal de *m/z* experimental e compara-lo com o *m/z* teórico, e obter uma resposta aceitável para esta comparação. E, por fim, comparar o espectro teórico com experimental, porém o íon *m/z* 400 não foi utilizado devido à não atribuição do seu padrão isotópico, vide Figura 35.

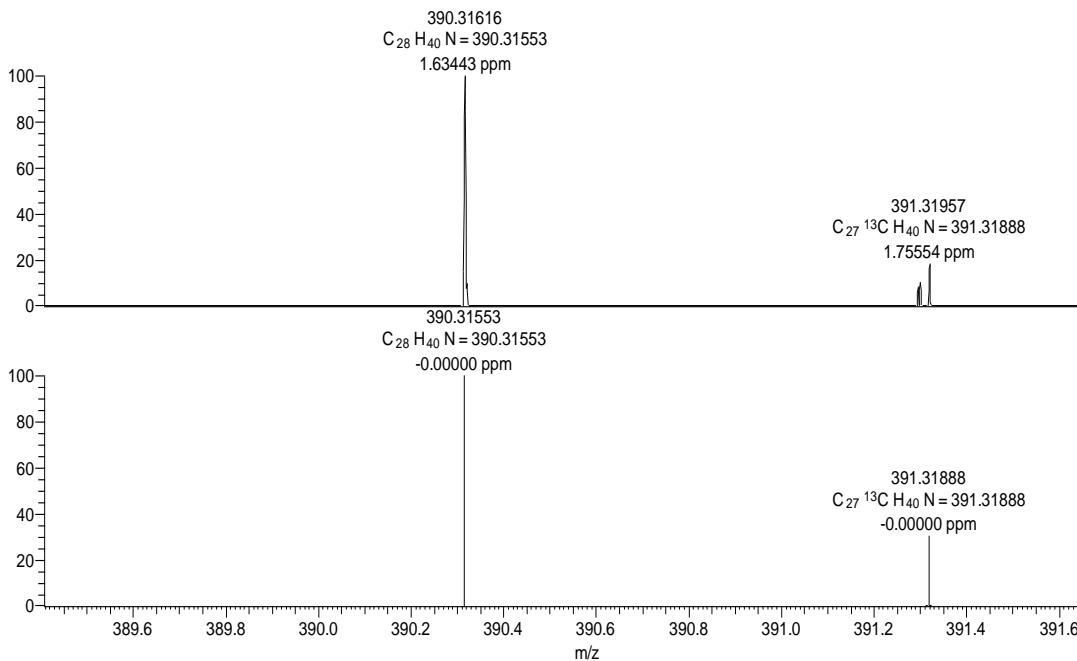


Figura 35 Ampliação do espectro de V-EASI S (+) FT-ICR MS da amostra de petróleo (M-ThoMSon). Observa-se o padrão isotópico ^{13}C e ainda tem-se no espectro inferior o espectro teórico confirmando a intensidade deste padrão.

Após realizar o processamento dos dados obtidos através da fonte V-EASI, com o software PetroMS, observou-se um maior número de sinais não identificados (Figura 36).

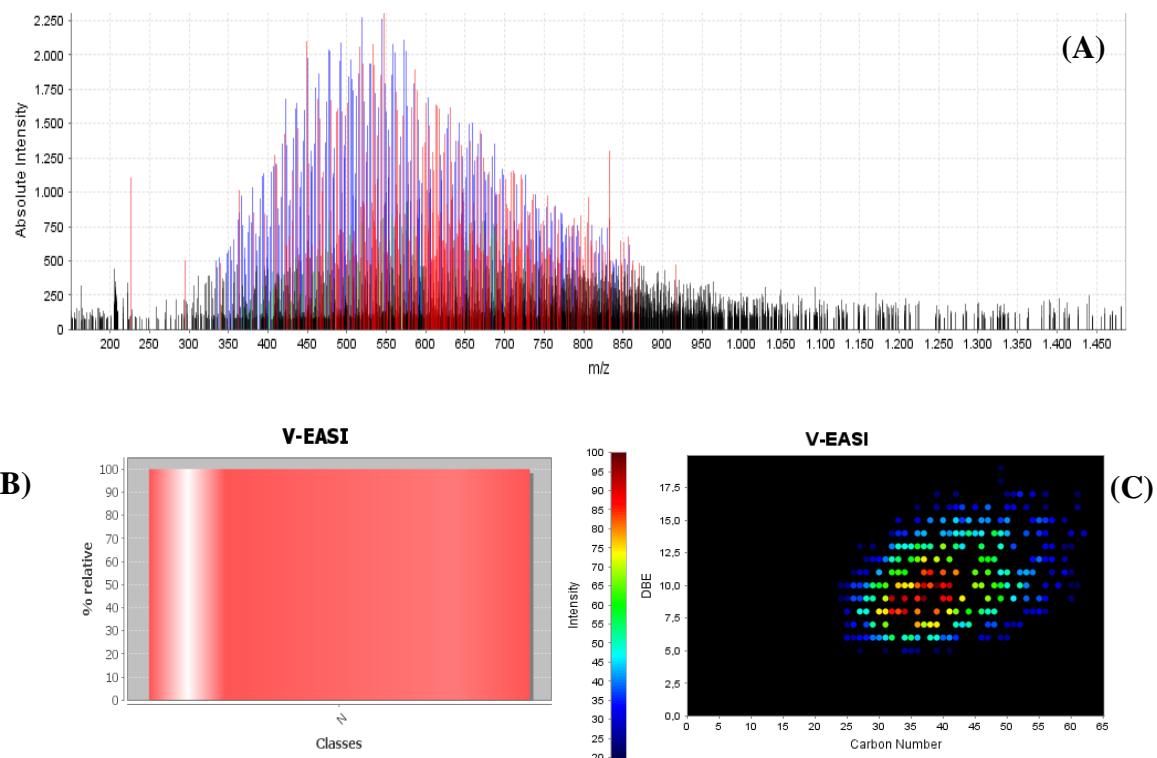


Figura 36 (A) Exemplo dos espectros de massas de má qualidade obtidos por V-EASI S (+) FT-ICR MS amostra (M-ThomSon), resolução 400.000 em m/z 400, 100 espectros para amostras de petróleo, (B) Classe N atribuída e (C) DBE x Carbono.

Através da Figura 36, demonstra-se que foi detectada apenas a classe dos compostos nitrogenados (B). Com a fonte de ionização V-EASI S, em modo positivo de ionização, observou-se maior intensidade de compostos C_{30} e C_{45} com DBE entre 5 e 14, Figura 36 (C). Ou seja, com essa fonte foi possível diferenciar séries homólogas para classe N pelo aumento de unidades de CH_2 , e H_2 , similares aos resultados obtidos com a técnica de ionização por ESI, porém, menos reproduutíveis, pois a variação da estabilidade para as fontes de íons para ESI foi de 2,66 e para V-EASI S foi de 23,33%, assim, a mesma não é indicada para esse estudo em questão, pois o valor mínimo de variação de íons na fonte estipulado pelo fabricante é de 12%. Um comparativo entre as fontes estudadas em modo positivo de ionização é apresentado na Tabela 6, não obteve-se sucesso nas análises em modo de negativo de ionização com a fonte V-EASI S.

CAPÍTULO II

Tabela 6 Avaliação das fontes de ionização ESI e V-EASI S para petroleômica.

Parâmetro	ESI	V-EASI S
Vazão da amostra	$5,00 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$	$\sim 70,00 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$
Estabilidade da fonte	$2,66 \pm 0,28$ (9,89) %	$23,33 \pm 4,72$ (20,25) %
Intervalo Dinâmico	$129,33:1 \pm 7,50$ (5,80)	$83,33:1 \pm 35,11$ (42,14)
Erro Espectral	$3,51\% \pm 0,25$ (7,19)	$3,73\% \pm 1,52$ (14,60)
Razão Sinal/ Ruído	$625,66 \pm 10,26$ (1,64)	$340,33 \pm 41,40$ (12,16)

n=3, desvio padrão e Coeficiente de Variância em porcentagem (CV)

A Tabela 6 mostra as diferentes técnicas de ionização que foram comparadas acopladas ao mesmo espectrômetro de massas LTQ FT Ultra. A fonte ESI se destaca pelo menor fluxo de amostra $5 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, maior estabilidade da técnica de ionização com 2,55% de variação dos íons e coeficientes de variação (razão entre o desvio padrão e a média) menores que 10% para intervalo dinâmico, erro espectral e razão sinal/ruído, os quais são as principais figuras de mérito no que se refere a intensidade dos íons. Neste sentido, ESI é a fonte de ionização mais indicada para a análise e caracterização de petróleos e seus derivados, de forma simples e rápida, sem que seja necessário nenhum pré-tratamento das amostras. Esta técnica também pode ser aplicada em metodologias analíticas de rotina em laboratórios de centro de pesquisas ou em refinarias de petróleo. Juntamente com ferramentas de tratamento de visualização dos resultados, pode oferecer respostas rápidas para auxiliar a otimização de processos de refino em plantas-pilotos, caracterizar amostras provenientes de novos poços de exploração, além de permitir a comparação e a determinação de diversas características de amostras de petróleos e seus derivados, como óleo de motor.

Sabendo que a fonte ESI é a mais adequada para a análise de petróleo por espectrometria de massas, a técnica analítica de ESI FT-ICR MS foi utilizada para

algumas análises forenses que envolvem petróleo e seus derivados e estas serão discutidas a seguir.

14.2 Aplicação da ESI FT-ICR MS em análises forenses envolvendo petróleo e derivados

14.2.1 Derrame de petróleo

Amostras das penas de pinguins contaminados com resíduos de petróleo proveniente de derrame em alto mar, juntamente com amostras de petróleo de três navios petrolíferos suspeitos de causarem o derramamento foram enviadas ao laboratório ThoMSon para saber qual embarcação foi a causadora do desastre ambiental através da comparação dos perfis químicos das amostras. A Tabela 7 apresenta as amostras utilizadas nesse estudo e a Figura 37 ilustra as partes dos animais estudadas.

Tabela 7 Amostras utilizadas no estudo de derrame de petróleo.

Número de amostras e Observação	Nome da amostra	Origem da amostra
1 Referência	Zeus ThoMSon	Lab. ThoMSon
3 Embarcações	Golfinho	
	Zeus PF	Polícia Federal
	Roncador	
14 coletadas dos animais	10 Penas (P)	Polícia Federal
	4 Raspas de pele ©	



Figura 37 Amostras coletadas nos pinguins: R raspagem da pele e P de penas.

CAPÍTULO II

Das amostras coletadas dos animais, as dez amostras coletadas das penas (P) foram analisadas e não apresentaram um perfil de espectro de massas característicos de amostras de petróleo. Das quatro amostras que foram coletadas através da raspagem © apenas três geraram um perfil de espectro de massas esperado para uma amostra de petróleo.

A Figura 38 apresenta os espectros de massas obtidos da comparação das amostras Zeus-ThoMSon, Zeus-PF e da embarcação suspeita de causar o derrame de petróleo e suas respectivas classes de compostos polares atribuídos em modo negativo. As amostras Zeus-ThoMSon e Zeus-PF têm sua origem comum, a saber, mesmo poço de perfuração, contudo, chegaram ao laboratório ThoMson por diferentes meios e em diferentes datas. Entretanto, quando analisadas, apresentaram as mesmas classes e perfil químico, confirmando a robustez da metodologia.

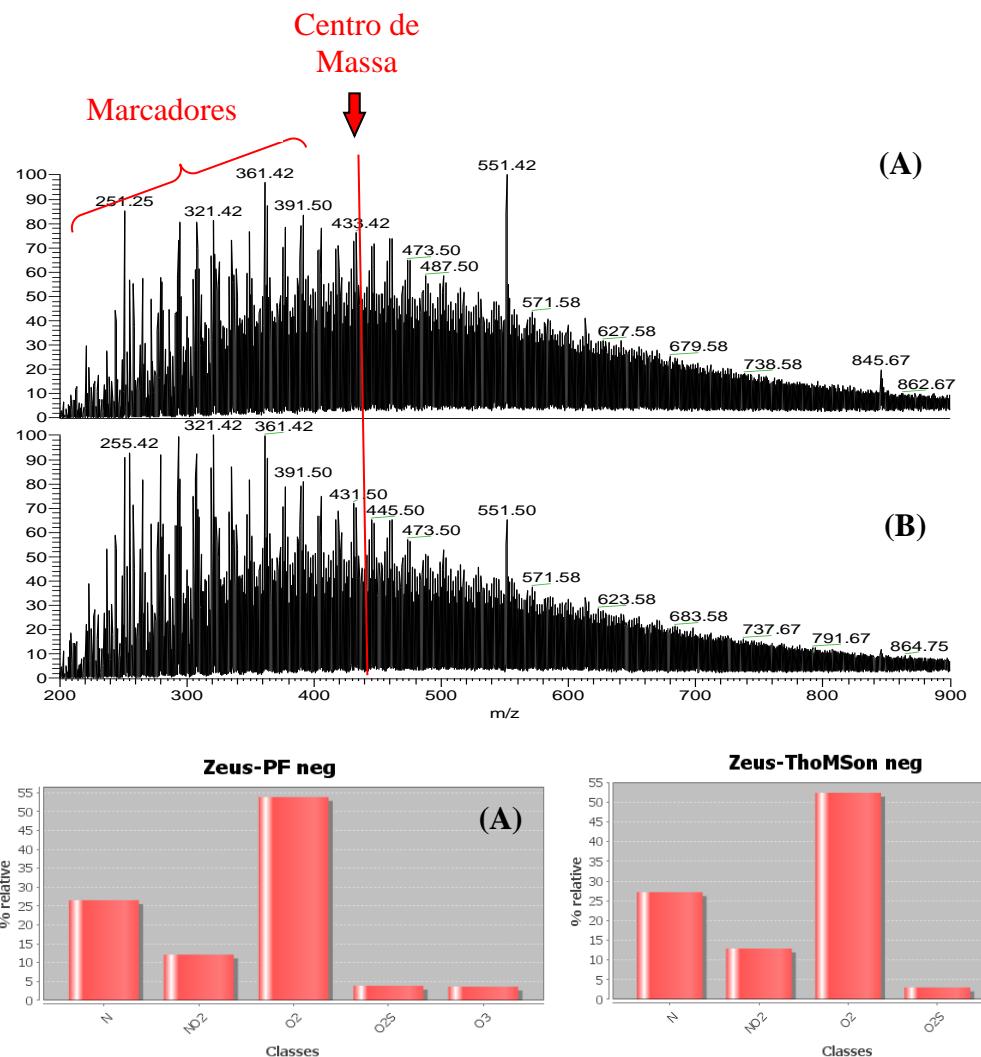


Figura 38 Perfil químico e as classes atribuídas das amostras (A) Zeus-ThoMSon e (B) Zeus-PF, obtidas por meio da técnica ESI(-) FT-ICR MS, e suas respectivas classes atribuídas.

Observa-se na Figura 38, a semelhança do perfil químico e das classes dos compostos (carbazóis, oxigenados, etc) das amostras Zeus-ThoMSon e Zeus-PF quanto ao centro de massas e a presença dos possíveis marcadores e/ou contaminantes em menores valores para m/z (200-400). A semelhança também é observada nas intensidades das classes atribuídas N, NO₂, O₂ e O₃, com uma pequena discrepância na intensidade da classe O₃. A Figura 39 apresenta os perfis químicos (“impressões digitais químicas”) das amostras de petróleo provenientes das outras embarcações também investigados neste estudo.

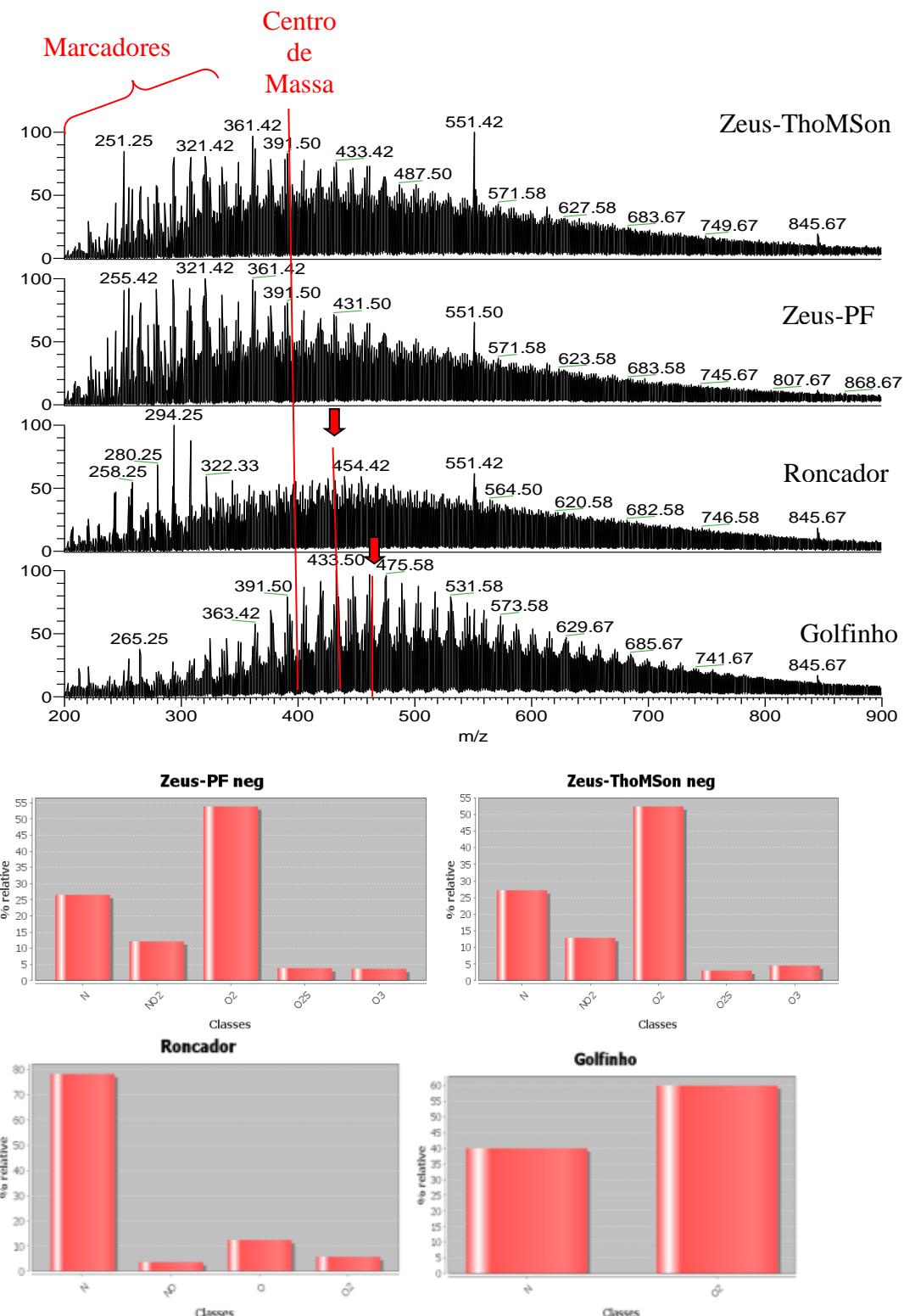


Figura 39 Perfil químico e as classes dos compostos polares das amostras de petróleo Zeus-ThoMSon e das três amostras de petróleo das embarcações Zeus-PF, Roncador e Golfinho e suas respectivas classes atribuídas à baixo.

Nota-se na Figura 39 uma diferença entre os perfis químicos das amostras provenientes de diferentes embarcações (Zeus-PF, Roncador e Golfinho) tanto em termos do centro de massa, classes de compostos polares, quanto em relação aos marcadores e/ou contaminantes em m/z 200-400. Em termos das classes de compostos mantém-se a discussão realizada anteriormente para as amostras Zeus. As amostras Roncador e Golfinho apresentam menor quantidade de classes atribuídas, sendo que a amostra Roncador apresenta quatro classes, a saber N (carbazóis de maior intensidade), NO, O e O₂. Já para amostra Golfinho, apenas as classes N (carbazóis) e O₂ (oxigenados) foram detectadas, sendo esta última a mais intensa.

Para melhor visualização e interpretação destes dados complexos, se fez necessário o uso da quimiometria por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) e da Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA), que podem ser visualizadas na forma de gráficos, facilitando a identificação de estruturas e agrupamentos existentes no conjunto de dados. Na PCA, o gráfico de escores identifica a posição de cada amostra em relação a outra, quanto mais próximos os escores mais semelhantes serão as amostras com base nas variáveis analisadas. Já no HCA, os resultados são apresentados na forma de uma árvore hierárquica, *Dendrograma*, em que o comprimento dos ramos da árvore representa o grau de similaridade entre os objetos. As análises quimiométricas PCA e HCA foram aplicadas aos resultados e estão apresentadas na Figura 40.

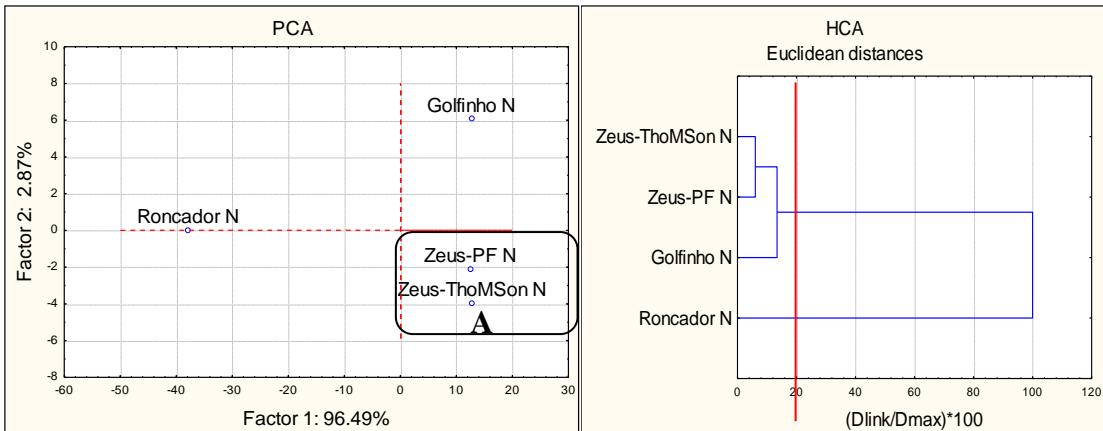


Figura 40 PCA e HCA, respectivamente, dos resultados obtidos por ESI-MS da amostra de Zeus-ThoMSon e das amostras das embarcações Zeus-PF, Golfinho e Roncador.

Na Figura 40, observou-se que a variância acumulada para a 1^a componente principal foi de 96,49% e para a 2^a componente principal foi de 2,87%, representando uma soma de 99,37% de variância capturada pelas duas PCs. Isso significa que a análise multivariada descreve bem as amostras. Além disso, na distância euclidiana de 10 (marcador vermelho), observou-se que o Roncador e o Golfinho foram discriminados dos demais, o que comprova o agrupamento observado na PCA.

Com base nos resultados das massas de íons obtidos pelas análises espectrométricas em conjunto com as análises exploratórias das amostras de petróleo, observou-se a similaridade das amostras Zeus-ThoMSon e Zeus-PF (Grupo A) e a separação destas da amostra Roncador através da 1^a componente. Por outro lado, a PCA mostra que 2^a componente foi responsável por separar as amostras Zeus (Grupo A) da amostra Golfinho. O mesmo agrupamento e separações foram observados na HCA através das distâncias euclidianas. A Figura 41 mostra os perfis químicos das amostras de poluentes coletadas nos pinguins, utilizadas neste estudo.

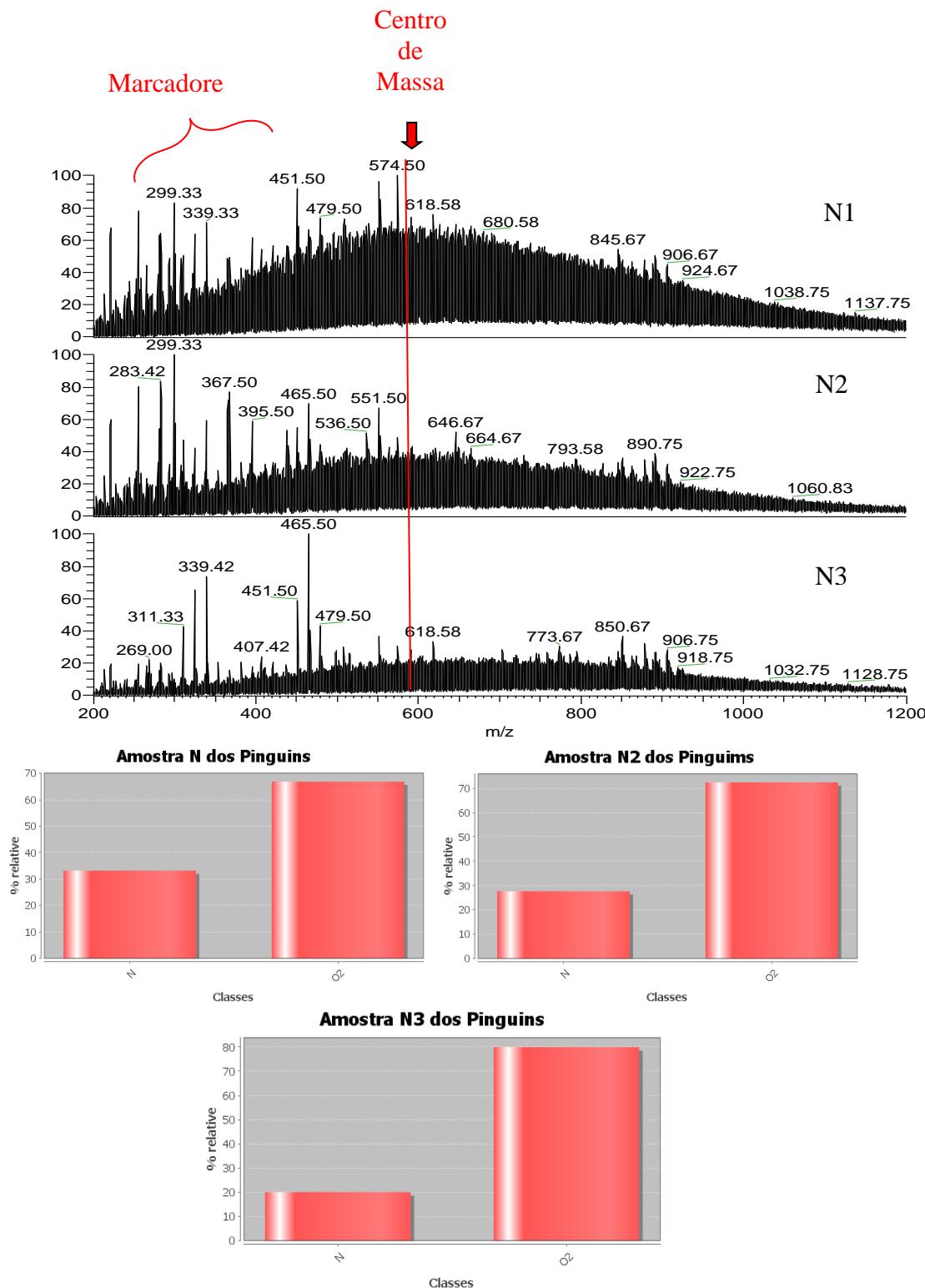


Figura 41 Perfil químico das amostras de pinguins N1, N2 e N3 e suas representações das classes atribuídas, N e O₂.

É possível observar através da Figura 41 a semelhança do perfil químico e no centro de massa das amostras N1, N2 e N3. Apesar de não serem comuns todos os contaminantes presentes nas amostras, destaca-se que estas são amostras coletadas em pinguins diferentes, contendo diferentes níveis de contaminantes do mesmo poluente. Quanto às classes atribuídas para as três amostras temos a classe O₂ como a mais intensa e a variação entre as classes é inferior a 10%, indicando, assim, a semelhança entre as amostras coletadas nos pinguins.

Devido à complexidade visual dos dados multivariados, foi utilizada a análise exploratória (PCA e HCA). Pode-se observar (Figura 42) que a variância explicada para a 1^a componente principal foi de 90,36% e para a 2^a componente principal foi de 7,31%, representando uma soma de 97,63% de variância acumulada pelas duas PCs. É possível notar também diferenças nas distâncias euclidianas.

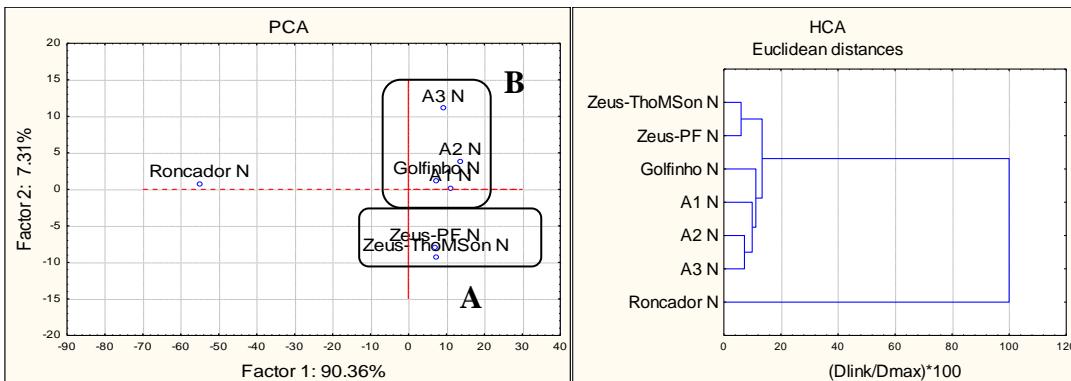


Figura 42 PCA e HCA, respectivamente, dos resultados obtidos por ESI-MS das amostras Zeus-ThoMSon e das amostras das embarcações Zeus-PF, Golfinho e Roncador

Na Figura 42, observa-se que os resultados das massas dos íons moleculares obtidos pelas análises espectrométricas em conjunto com as análises exploratórias das amostras de petróleo apresentaram maior similaridade entre as amostras Zeus-ThoMSon e Zeus-PF (grupo A) e similaridade das amostras de poluentes encontradas nos pinguins N1, N2 e N3 com a amostra Golfinho (grupo

B). Pode-se observar que a separação destes dois grupos A e B da amostra Roncador através da 1^a componente. Além disso, a PCA mostra que a componente 2 foi a responsável pela discriminação dos grupos A, na região negativa e grupo B na região positiva. Os mesmos agrupamentos foram observados na HCA por meio das distâncias euclidianas. Portanto, a embarcação Golfinho parece ser a principal responsável pelo derrame de petróleo e contaminação ambiental. O fato de se conseguir correlacionar a embarcação que promoveu o derrame com as amostras de raspas da pele dos pinguins contaminados por espectrometria de massas utilizando a fonte ESI juntamente com o analisador ICR demonstra o grande potencial, versatilidade e precisão dessa técnica analítica. Por isso, outro caso forense de derivados de petróleo foi estudado do mesmo modo e descrito a seguir.

14.2.2 Estudo forense de caracterização e identificação de óleos de motor mineral, semi-sintético e sintético

O óleo do motor é utilizado para lubrificar as partes móveis do motor de combustão interna de automóveis, mas também limpar, inibir a corrosão e melhorar a vedação. Estas propriedades estão diretamente relacionadas à sua composição química. Os óleos de motor podem ser derivados do petróleo (óleo mineral) ou não (sintético). Atualmente, os óleos de motor são uma mistura que utilizam óleos à base de hidrocarbonetos, compostos de polialfaolefinas (PAO) e olefinas (semi-sintéticos) (Chevron, 2005). Nesta aplicação, foram avaliados diferentes óleos de motor comerciais declarados como sintéticos, semi-sintéticos e minerais de diferentes marcas encontradas no mercado por ESI FT-ICR MS. Foi obtido um perfil químico para caracterizar amostras de óleo do motor, com o objetivo de identificar a origem desses óleos e avaliar a conformidade do rótulo do produto com a sua composição. A Figura 43 apresenta três espectros característicos dos óleos de motor de estudo obtidos no modo positivo de ionização e a Figura 44 mostra dois espectros de massas que representam o perfil químico de óleos sintéticos: verdadeiro e falso.

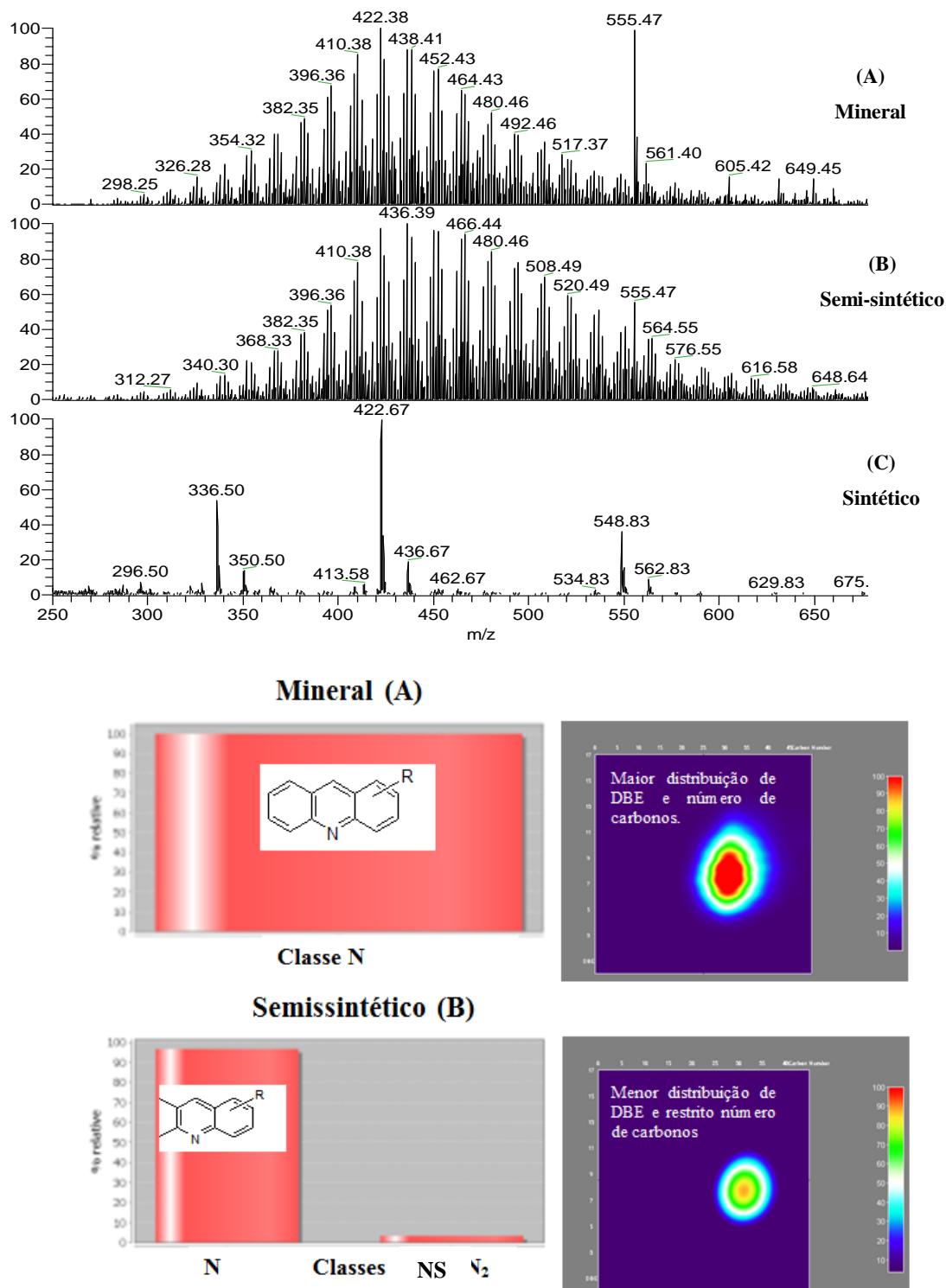


Figura 43 Espectros de massas ESI(+) FT-ICR para amostras de (A) óleo mineral, classe N e maior DBE, (B) semissintético, classes N e NS e menor DBE.

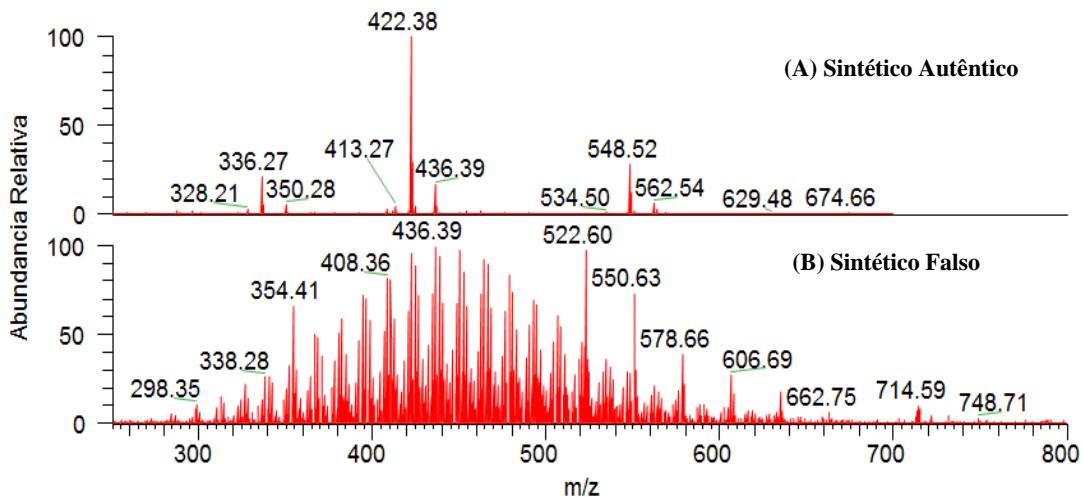


Figura 44 Espectros de massas ESI(+) FT-ICR MS para amostras de (A) óleo de motor sintético autêntico e (B) óleo de motor sintético falso.

Por meio das Figuras 43 e 44, pode-se observar que os íons positivos obtidos por ESI-MS evidenciaram as diferenças entre amostras de óleos de motor mineral e sintético. De acordo com a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Brasil) e as normas da API (*American Petroleum Institute, EUA*), as amostras sintéticas não devem conter resíduos de petróleo bruto (compostos polares). Nas amostras de óleo de motor mineral e semi-sintéticos foram detectados compostos da classe N (piridina e homólogos) e classe N₂ na faixa de m/z 300-700. A análise no modo negativo também foi realizada (Figura 45), mas apenas alguns aditivos como: anticorrosivos oxigenados de m/z 297,11, detergentes (Sulfonato de alquilbenzeno linear R-SO₃) de m/z 353,17 e corante conhecido como Solvente Amarelo 14 (Azocorantes, R1-OH) de razão m/z 361,28, atendendo à especificação API (*American Petroleum Institute*). Observou-se também um polímero com variação de m/z 28 na faixa de m/z 900 -1200, que pode estar relacionado as poliolefinas modificadas, mas não foram observadas classes de compostos oxigenados, carbazóis e hidroxipiridinas, comumente detectados em amostras de petróleo bruto para as três categorias de óleos de motor investigadas.

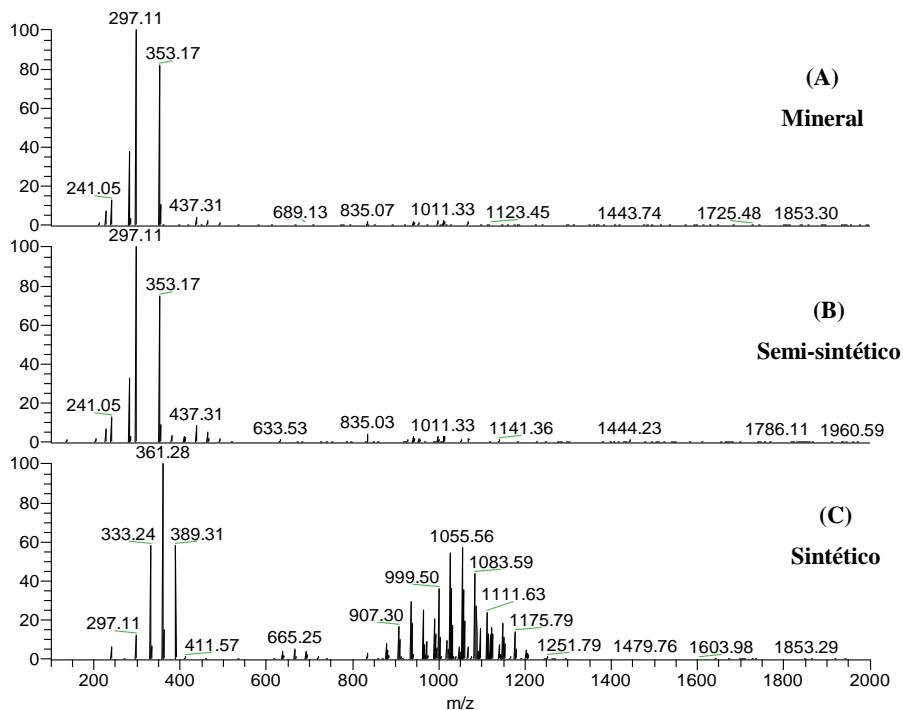


Figura 45 Espectros de massas ESI(-) FT-ICR MS para amostras de (A) óleo de motor mineral, (B) óleo de motor semi-sintético e (C) óleo de motor sintético.

Outras três amostras de óleos comercializados como sintéticos foram analisados e possuem compostos de resíduos de petróleo (compostos polares) em sua composição, pois apresentaram resultados similares às demais amostras de óleo mineral e semi-sintético. Por esse motivo, acredita-se que estas amostras não são provenientes de síntese. A diferença entre as DBE e números de carbono pode estar relacionado à quebra de ligações químicas provenientes de maiores variações de temperaturas e/ou outras formas de processamentos dos óleos semi-sintéticos.

Com esses resultados, constata-se que diferentes óleos de motor estudados podem ser monitorados e investigados sempre que necessário até mesmo por um analisador quadrupolar, pois somente o perfil do petróleo já indica a irregularidade do óleo de motor sintético pertencente ao grupo IV 100% Polialolefinas (PAOs). Mas as análises por ESI FT-ICR MS se mostraram necessárias para caracterização destes compostos polares do petróleo.

14.3 Estudo dos analisadores de massas na investigação de amostras de petróleo bruto: um comparativo entre o ICR, *STANDARD ORBITRAP* e o *MEGAORBITRAP*.

Dois analisadores de massas de altíssima resolução, o ICR e o Orbitrap foram avaliados e comparados para aplicação em análise de petróleo bruto. A maneira mais indicada de avaliar um analisador de massas é utilizar suas figuras de mérito, que estão indicadas na Figura 46 (Reid *et al.*; 2013). A definição exata das figuras de mérito e seus significados é um dos assuntos mais discutidos na área de espectrometria de massas, sendo tema de várias publicações (Hoffmann *et al.*, 2007; Michael *et al.*; 2004 e Murray *et al.*, 2013).

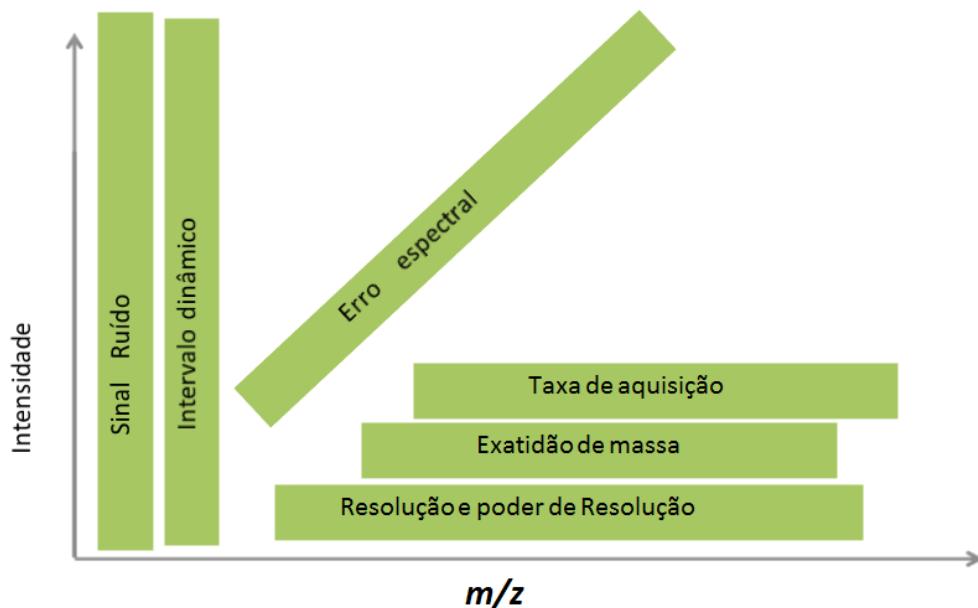


Figura 46 Figuras de mérito para os analisadores de massas em termos de intensidade e razão massa sobre carga (Schmidt *et al.*; 2014)

O analisador por ressonância ciclotrônica de íons (ICR), já discutido no item 1.3.2 desta tese, baseia-se em uma tecnologia que utiliza um campo elétrico juntamente com radiofrequência e, ainda, campo magnético. A separação é devida

à frequência de órbita dos íons, e a sua aplicação prática foi difundida pelo desenvolvimento de técnicas de transformada de Fourier (FT) por Comisarow e Marshall, em 1974. Sua aplicação na análise de petróleo bruto foi iniciada por Rodgers em meados de 2005.

A fim de comparação, a aplicabilidade em análises de petróleo bruto foi realizada com os analisadores ICR, *Orbitrap* e *MegaOrbitrap*, sendo este último apenas um protótipo experimental, ainda indisponível comercialmente. Para isso, duas amostras de petróleo referência denominadas JC e M-ThoMSon foram utilizadas nos ensaios utilizando os três analisadores de massas. Os resultados obtidos estão dispostos nas Figuras 47, 48 e 49.

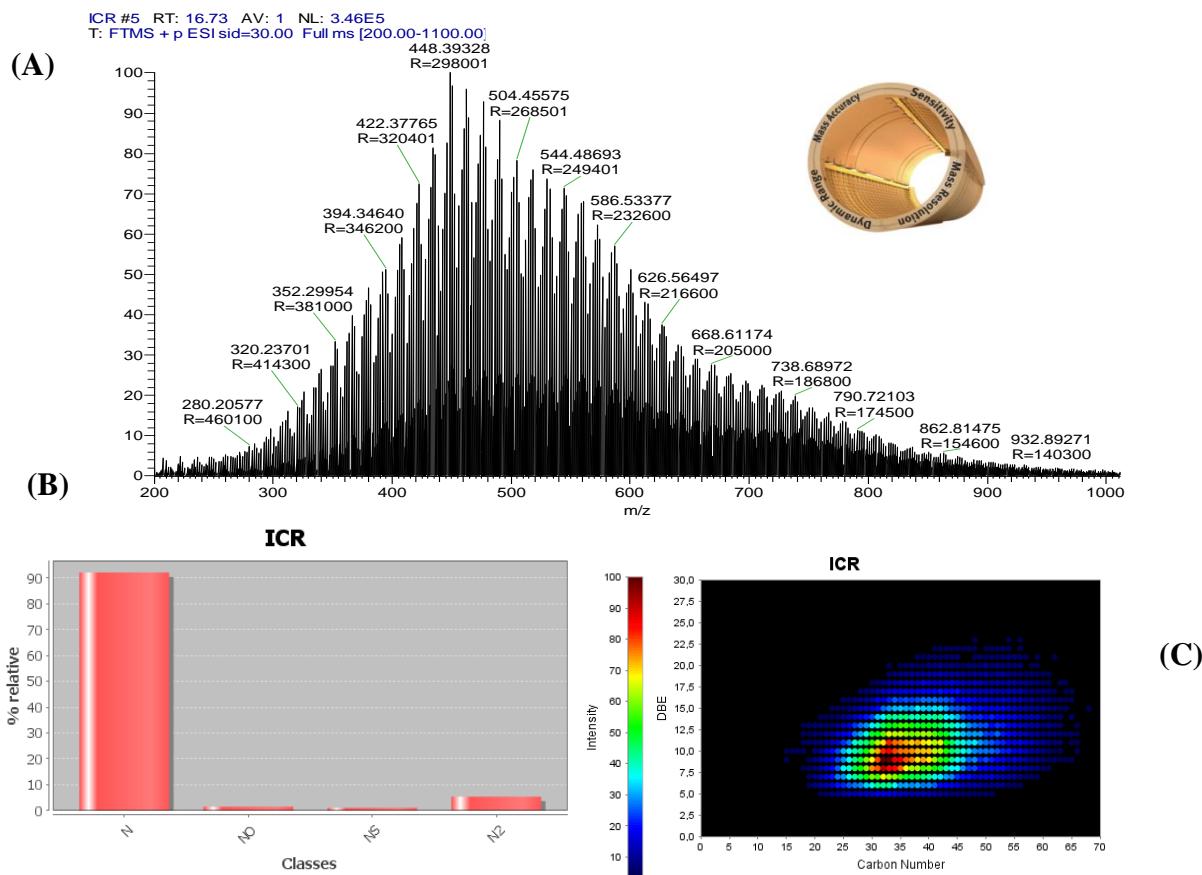


Figura 47 (A) Espectro de massas obtido com o analisador ICR em modo positivo da amostra JC. Observar o decaimento da resolução com o aumento da m/z . No destaque, uma ilustração da cela do ICR. (B) indicação da distribuição da DBE x números de carbonos nesses compostos e (C) Classe N.

A Figura 47(A) apresenta um espectro de massas característico de uma análise de petróleo, demonstrando que o decaimento da resolução é inversamente proporcional à m/z , ou seja, na m/z 394 obtém-se aproximadamente 340.000 de resolução, quando esta m/z é dobrada a resolução obtida é de aproximadamente 170.000. Isto ocorre devido a uma menor frequência de órbita dos íons mais pesados dentro do analisador ICR. Na Figura 47 B, é exibido o perfil de distribuição da série de composto da classe N, demonstrou uma tendência homogênea na sua distribuição. Além da classe de compostos análogos à piridina (N), foram detectadas também as classes N₂, NO e NS no modo positivo de ionização. Pode-se observar na Figura 47 C o gráfico de número de carbonos em função do DBE para a classe N presente nas amostras de petróleo a qual apresenta compostos na faixa 20 a 65 carbonos com insaturações de 5 a 22, sendo que o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C₃₀ a C₄₀ para DBE 7-12.

A mesma amostra foi em seguida analisada pelo analisador de massas *Std. Orbitrap* e os resultados estão apresentados na Figura 48. O estudo das frações de petróleo por esta tecnologia foi iniciado por Pomerantz e colaboradores em meados de 2011.

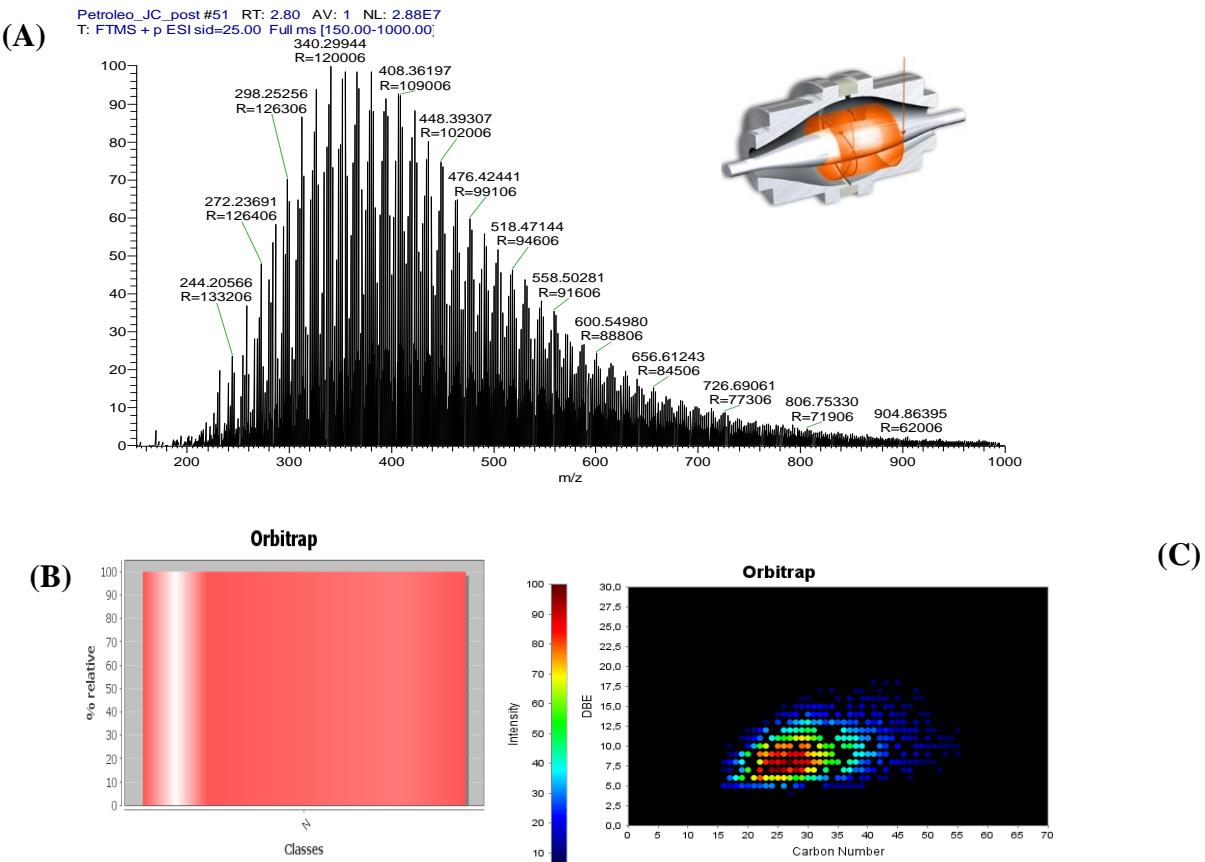


Figura 48 (A) Espectro de massas obtido com o analisador Orbitrap da amostra JC, apresentando o decaimento da resolução com o aumento da m/z . Em destaque a ilustração do analisador orbitrap, (B) Classe das piridinas e (C) indicação da distribuição da DBE e os números de carbonos nos compostos.

A Figura 48 (A) apresenta o mesmo perfil espectral característico de análise de petróleo e semelhante àquele obtido pelo analisador ICR. Nesta análise, pode-se observar também um decaimento de resolução inversamente proporcional à raiz quadrada da m/z . Entretanto, o decaimento da resolução é mais suave no Orbitrap do que quando utilizado o ICR, ou seja, em m/z 340 obtém-se aproximadamente 120.000 de resolução, quando essa razão m/z é dobrada a resolução obtida é de aproximadamente 84.000. A Figura 48 (C) apresenta os gráficos de número de carbonos vs DBE para a classe N, presente na amostra de petróleo. Nesta amostra JC, a classe N apresenta compostos na faixa de 17 a 60 carbonos e com insaturações de 6 a 20, com um máximo de intensidade relativa na faixa de C_{20} a C_{35} para as DBE 6-11. O perfil da distribuição da série de compostos da classe N mostrou uma tendência irregular, devido à necessidade de uma maior resolução para separar todos os íons, com

várias falhas na atribuição no número de carbonos vs DBE para os compostos análogos à piridina presentes na classe (N) e foi a única classe presente no modo positivo de ionização.

Nas Figuras 48 e 49, nota-se que a distribuição da m/z apresentou uma gaussiana semelhante para ambos os espectros de massas. Contudo, o centro de massa foi deslocado para m/z menores no analisador Std. *Orbitrap*, a relação sinal/ruído que se encontra abaixo de 5%. A exatidão de massa para ambos os analisadores foi semelhante e abaixo de 1 ppm.

O analisador “*MegaOrbitrap*” baseia-se nas tecnologias dos analisadores *Orbitrap* (2005) e *Orbitrap High-Field* (2009) e continua utilizando a eletrostática, porém, o potencial aplicado aumentou de 3 kV para 5 kV e o tamanho do analisador *Orbitrap* que era de 30 mm para as “calotas” externas e 12 mm para o eletrodo central diminuiu para 20 mm e 10 mm, respectivamente, como mostra a Figura 12 da Introdução geral desta tese. A separação dos íons continua sendo devido à frequência de oscilação harmônica dos mesmos, desenvolvido por Denisov e colaboradores (2012). Da mesma forma que o ICR, este também utiliza transformada de Fourier (FT). Foi realizada uma análise de petróleo bruto nesse analisador de forma a tentar obter resultados similares aos encontrados no analisador ICR. A Figura 49 mostra os resultados obtidos para a análise de petróleo pelo analisador de massas *MegaOrbitrap*.

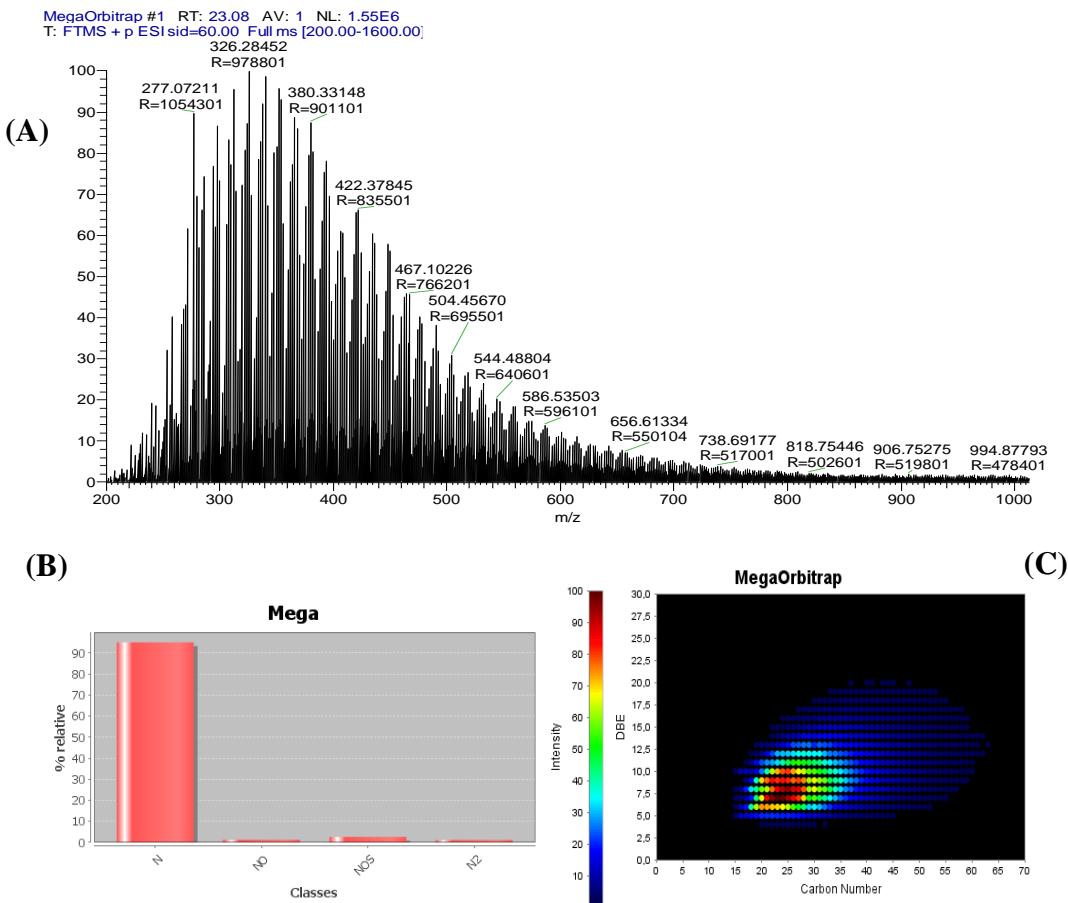


Figura 49 (A) Espectro de massa obtido com o analisador MegaOrbitrap da amostra JC e o decaimento da resolução com o aumento da m/z , (B) Classe das piridinas e (C) Distribuição da DBE em função dos números de carbonos nesses compostos.

A Figura 49 (A) apresenta um espectro de massas característico de análise de petróleo, o qual mostra o decaimento da resolução inversamente proporcional à raiz quadrada da razão m/z . Por exemplo, para m/z 277 obtém-se aproximadamente 1.000.000 de resolução, quando essa razão m/z é dobrada a resolução obtida é de aproximadamente 640.000.

A Figura 49C mostra os gráficos de número de carbonos em função dos DBE para a classe N, presente nas amostras de petróleo. A amostra JC classe N apresenta compostos na faixa de 15 a 65 carbonos e com insaturações de 4 a 22, o máximo de intensidade relativa é obtido na faixa de C_{20} a C_{30} para as DBE 6-11. O perfil da distribuição da série de compostos da classe N mostrou uma tendência homogênea em sua distribuição, similar ao ICR. A classe dos compostos análogos

à piridina (N) é a classe mais intensa, mas também foram detectadas as classes hidroxipiridinas NO, NOS e N₂. Também foi observado que um valor menor de *threshold* (1%) pôde ser utilizado no processamento dos dados, além de se utilizar aproximadamente o dobro do poder de resolução para a mesma *m/z* 400 em relação ao ICR.

Na Figura 50 pode-se observar as diferentes resoluções obtidas com os analisadores *Std. Orbitrap*, ICR e *MegaOrbitrap*, respectivamente.

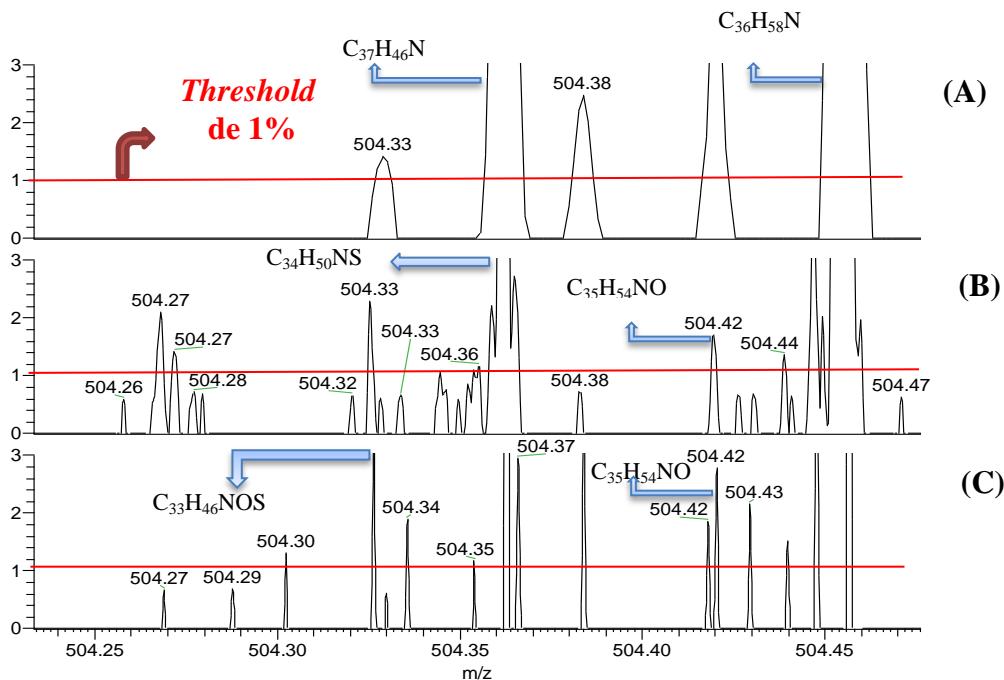


Figura 50 Expansão dos espectros obtidos com os espectrômetros de massas (ilustração): *Std. Orbitrap* (A), ICR (B) e *MegaOrbitrap* (C), respectivamente.

Na Figura 50, que ilustra íons detectados referentes aos compostos presentes nas classes N, NO, NOS, N₂ de heteroátomos identificados, foi possível observar que o *threshold* automático diminuiu de 5-10% para 1% manualmente é possível perceber os mesmos compostos detectados nos três analisadores para a classe N (*m/z* 504,36248 $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}$, *m/z* 504,4563773 $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}$). Já os compostos da classe NS e N₂S só foram detectados no ICR e *MegaOrbitrap* (*m/z* 504,36585 $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{NS}$) e por fim alguns compostos só foram detectados e identificados no analisador de massas *MegaOrbitrap* como por exemplo a classe NO (*m/z*

CAPÍTULO II

504,41999 C₃₅H₅₄ON) e NO₂ (*m/z* 504,38361 C₃₄H₅₀O₂N) dos constituintes polares do petróleo, confirmando a habilidade do que o analisador *MegaOrbitrap* tem em reproduzir os mesmos perfis que o analisador ICR.

Outro dado interessante é o número de íons resolvidos e identificados na Figura 50 que foi de 4 íons para o *Std. Orbitrap*, 7 íons para o ICR e 13 íons para o *MegaOrbitrap*, todos em uma expansão de 0,2 Da. A Tabela 8 apresenta todos os íons resolvidos e caracterizados.

Tabela 8 Comparativo dos compostos detectados e atribuídos através dos analisadores *Std. Orbitrap*, ICR e *MegaOrbitrap*

Composição Elementar	Massa Teórica	Analisadores de Massas	Massa Experimental	Erro (ppm)	Poder de Resolução
C₃₆H₄₂NO	504,32609	<i>Std, Orbitrap</i>	X	X	X
		<i>ICR</i>	X	X	X
		<i>MegaOrbitrap</i>	504,32635	0,513	66,5004
C₃₇H₄₆N	504,36248	<i>Std, Orbitrap</i>	504,36182	-1,303	92,802
		<i>ICR</i>	504,36188	-1,184	266,200
		<i>MegaOrbitrap</i>	504,36279	0,621	634,604
C₃₄H₅₀NS	504,36585	<i>Std, Orbitrap</i>	X	X	X
		<i>ICR</i>	504,36603	0,361	664,404
		<i>MegaOrbitrap</i>	X	X	X
C₃₅H₅₄NO	504,41999	<i>Std, Orbitrap</i>	X	X	X
		<i>ICR</i>	X	X	X
		<i>MegaOrbitrap</i>	504,42035	0,710	692,604
C₃₃H₄₆NOS	504,32946	<i>Std, Orbitrap</i>	X	X	X
		<i>ICR</i>	X	X	X
		<i>MegaOrbitrap</i>	504,32986	0,797	630,456
C₃₆H₅₈N	504,45637	<i>Std, Orbitrap</i>	504,45566	-1,422	97,506
		<i>ICR</i>	504,45575	-1,244	268,501
		<i>MegaOrbitrap</i>	504,45670	0,640	695,501

Gráficos que mostram o comparativo entre as classes detectadas são ótimos recursos para obter uma melhor visualização para análise e interpretação

dos dados. A Figura 51 mostra estes gráficos para as classes compostas por heteroátomos NOS e suas combinações para os diferentes analisadores avaliados.

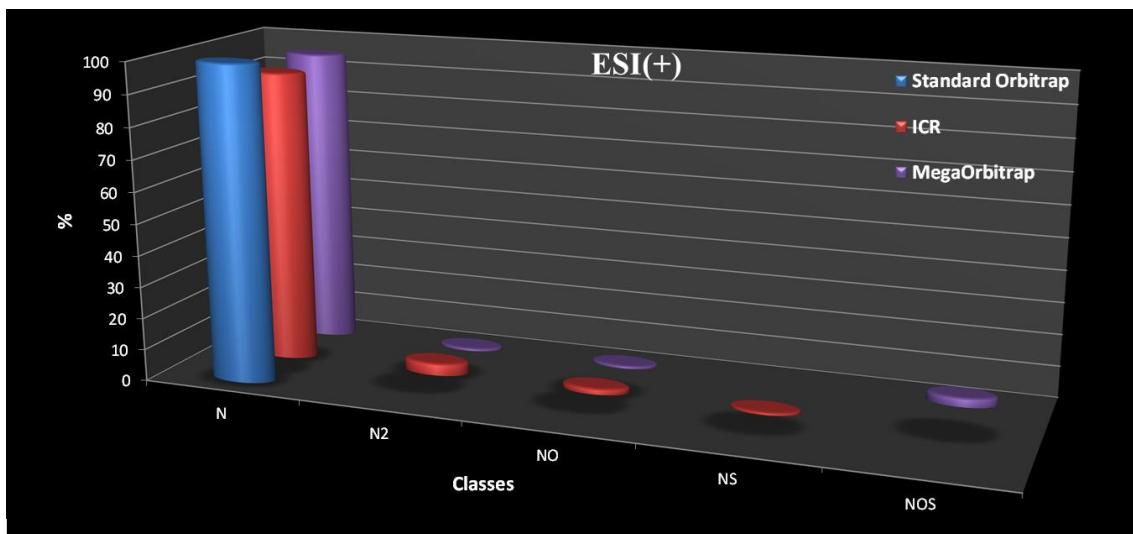


Figura 51 Gráfico das classes atribuídas e suas intensidades relativas no modo positivo de ionização para petróleo bruto por ESI(+) FT MS.

Através da Figura 51, é possível observar que a classe dominante em modo positivo de ionização é a classe das piridinas (N), ou seja, compostos polares aromáticos com nitrogênio como heteroátomos sem participar da ressonância do íons. As classes N₂ e NO não foram detectadas pelo analisador *Std. Orbitrap*, devido à limitação de resolução, mas essas duas últimas classes piridinas e hidroxipiridinas foram detectadas tanto pelo analisador ICR quanto pelo analisador *MegaOrbitrap* com intensidades similares considerando o desvio padrão. Porém, foram detectadas classes diferentes e exclusivas tanto pelo analisador ICR (NS) quanto para o *MegaOrbitrap* (NOS). A semelhança está em que nas duas classes foi observada a presença do heteroátomo de enxofre, que é de grande interesse de investigação na rede petrolífera devido as suas possíveis contaminações como, por exemplo, na chuva ácida. Para as análises por ESI(-) FT-MS, obteve-se diferentes números de íons totais detectados e atribuídos (Figura 52). Com isso, um número maior de classes foi identificada, sendo 8 para *MegaOrbitrap*, 7 para o ICR e 3 *Std. Orbitrap*.

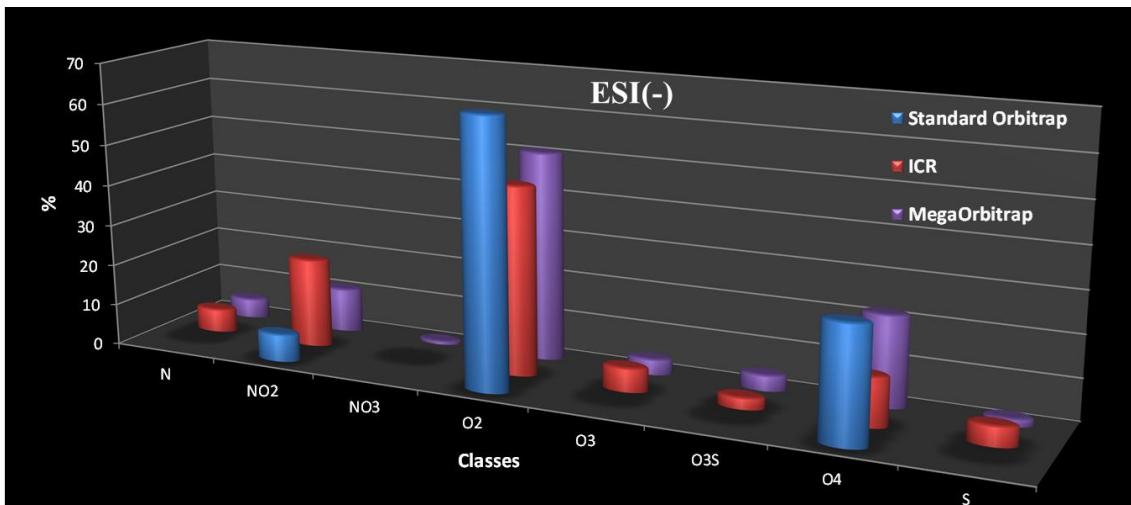


Figura 52 Gráfico das classes atribuídas e suas intensidades relativas no modo negativo de ionização para petróleo bruto por ESI(-) FT MS.

Avaliando os três analisadores, agora em modo negativo de ionização, pode-se observar na figura 52 que maiores porcentagens de compostos polares heteroaromáticos da classe O₂ e ácidos carboxílicos, foram detectados (50% com o analisador *MegaOrbitrap*, 45% com o ICR e 65% com o *Orbitrap Padrão*). Apenas os analisadores *MegaOrbitrap* e ICR foram capazes de detectar e identificar a classe N que contém derivados com anel pirrólido, com a intensidade de 5% para ambos os analisadores. Porém, apenas o analisador *MegaOrbitrap* foi capaz de detectar e identificar a classe NO₃. As intensidades relativas de cada classe podem ser utilizadas como indício nas diferenças de acidez entre as amostras (classe O₂), e nos processos de refino que estes óleos devem seguir de acordo com abundância das classes contendo S e N em suas estruturas. Desse modo, acredita-se que o analisador *MegaOrbitrap* é uma ferramenta analítica tão confiável quanto o analisador ICR, pois detectou as mesmas classes de compostos polares, e/ou senão melhor, pois detectou uma classe não resolvida pelo analisador ICR.

Em estudos com analisadores de massa de ultra-alta resolução e alta exatidão de massas utilizando Transformada de Fourier (FT), como FT-ICR e FT-Orbitrap, os seis principais parâmetros (figuras de mérito) que podem fornecer subsídios para o desenvolvimento e evolução da espectrometria de massas e em

especial dos seus analisadores são: sinal/ruído, intervalo dinâmico, erro espectral, velocidade de varredura, exatidão de massas e poder de resolução ou resolução mínima. Cada um desses parâmetros tem um papel na análise de MS de uma matriz particular, sendo dependente de m/z , intensidade ou ambos, e, no caso de matrizes complexas, como os encontrados em estudos no campo proteômica e petroleêmica, as melhorias destes parâmetros são de importância fundamental e serão discutidas a seguir.

14.4 Avaliação das figuras de mérito para os analisadores *Std. Orbitrap*, *ICR* e *MegaOrbitrap*

14.4.1 Sinal / ruído

O primeiro parâmetro refere-se à razão estimada entre sinal/ruído (S/N) que, em MS, é diretamente influenciada pela intensidade de íons no espectro de massas. No entanto, o S/N não sofre influência direta para a variação da m/z . Na Figura 53, pode-se observar para uma amostra de petróleo bruto no intervalo de m/z 100 – 1500, o S/N para os três diferentes analisadores.

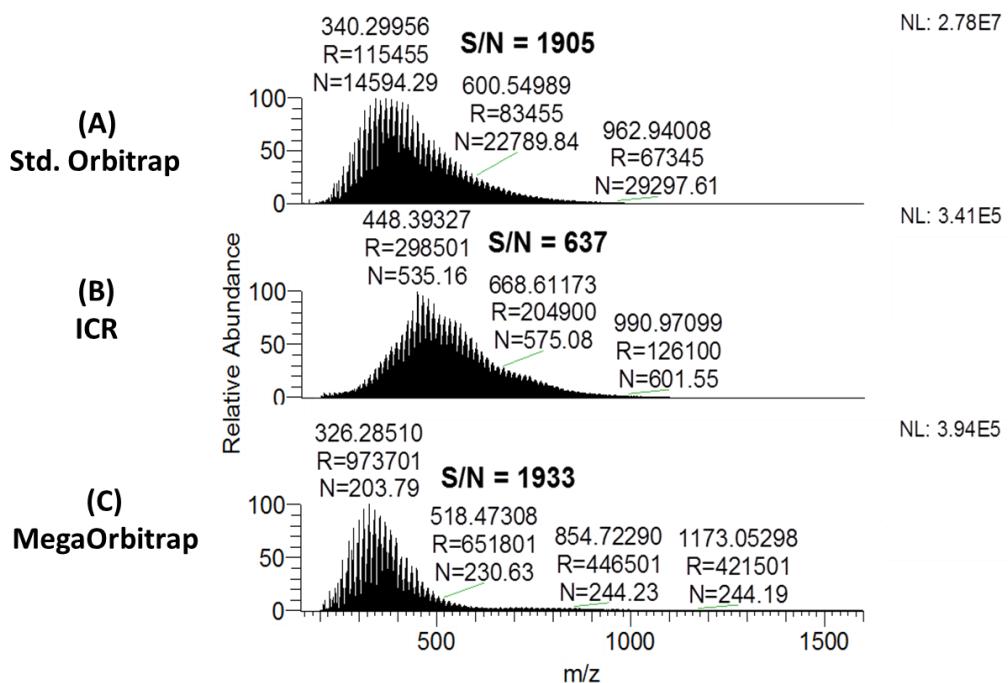


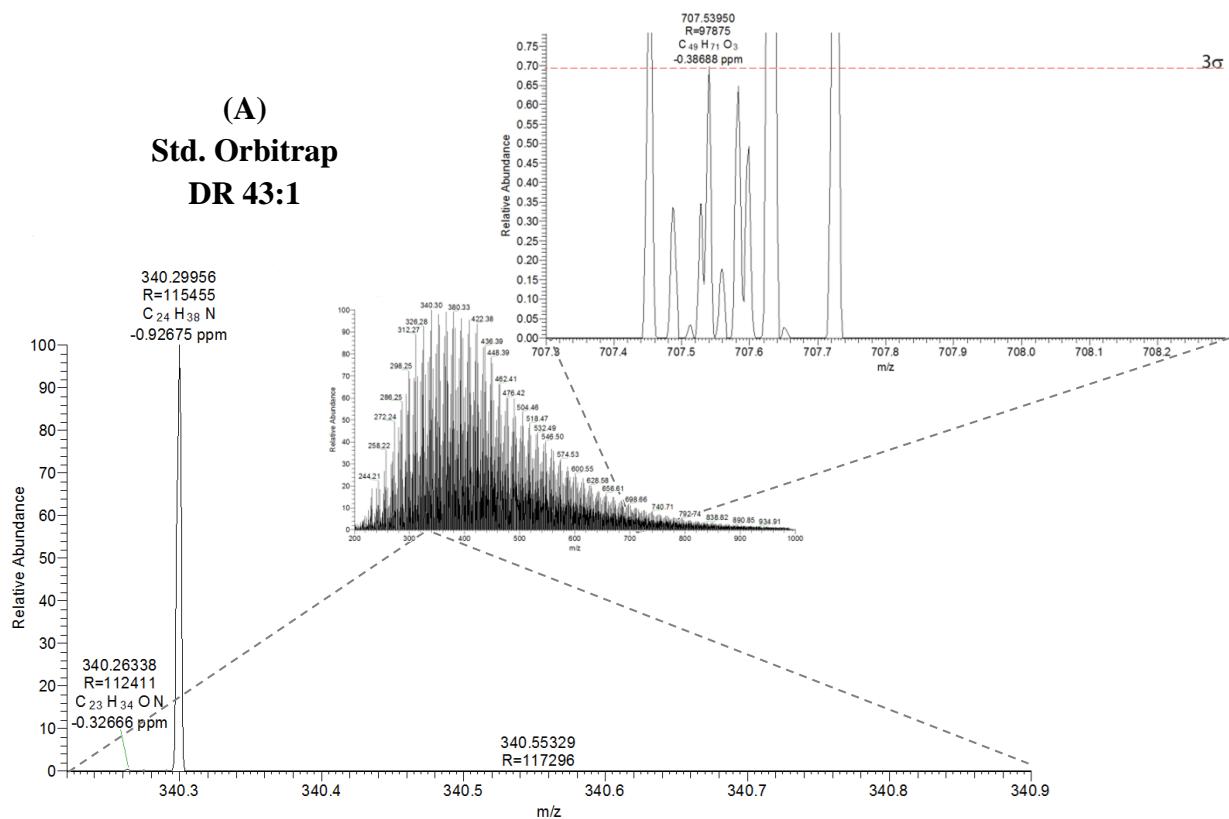
Figura 53 Relação sinal-ruído (S/N) com desvio padrão ($n = 3$), obtido a partir da análise de uma amostra de óleo cru típico (A) Std.Orbitrap, (B) ICR, e (C) MegaOrbitrap.

Os dez sinais selecionados para S/N foram obtidos ao logo de todo espectro de m/z e foram divididos pelo ruído (N), que foi determinado pela medida de três sinais de menor intensidade do espectro. Considerando os intervalos obtidos para a relação S/N, os analisadores Orbitrap (S/N=1905) e MegaOrbitrap (S/N=1933) têm desempenho superior ao analisador ICR (S/N=637).

Na aquisição de dados por analisadores de massas utilizando o aprisionamento de íons, um aumento da relação S/N é o ideal, no entanto, de acordo com Makarov *et al.* (2006), o S/N aumenta com o tempo de aquisição, que em alguns casos, torna-se inviável. Um Orbitrap com menor capacidade é melhor para reduzir o ruído e aumentar a relação sinal/ruído.

14.4.2 Intervalo dinâmico

Adicionalmente ào S/N existe o intervalo dinâmico (DR, do inglês *Dynamic Range*), que é a relação entre o íon mais intenso e o íon de menor intensidade do espectro, desde que para estes íons possam ser determinadas todos os seis parâmetros (figuras de mérito) utilizados em espectrometria de massas. O DR foi calculado para os três analisadores em um intervalo m/z 200 – 1000 e os resultados estão representados na Figura 54.



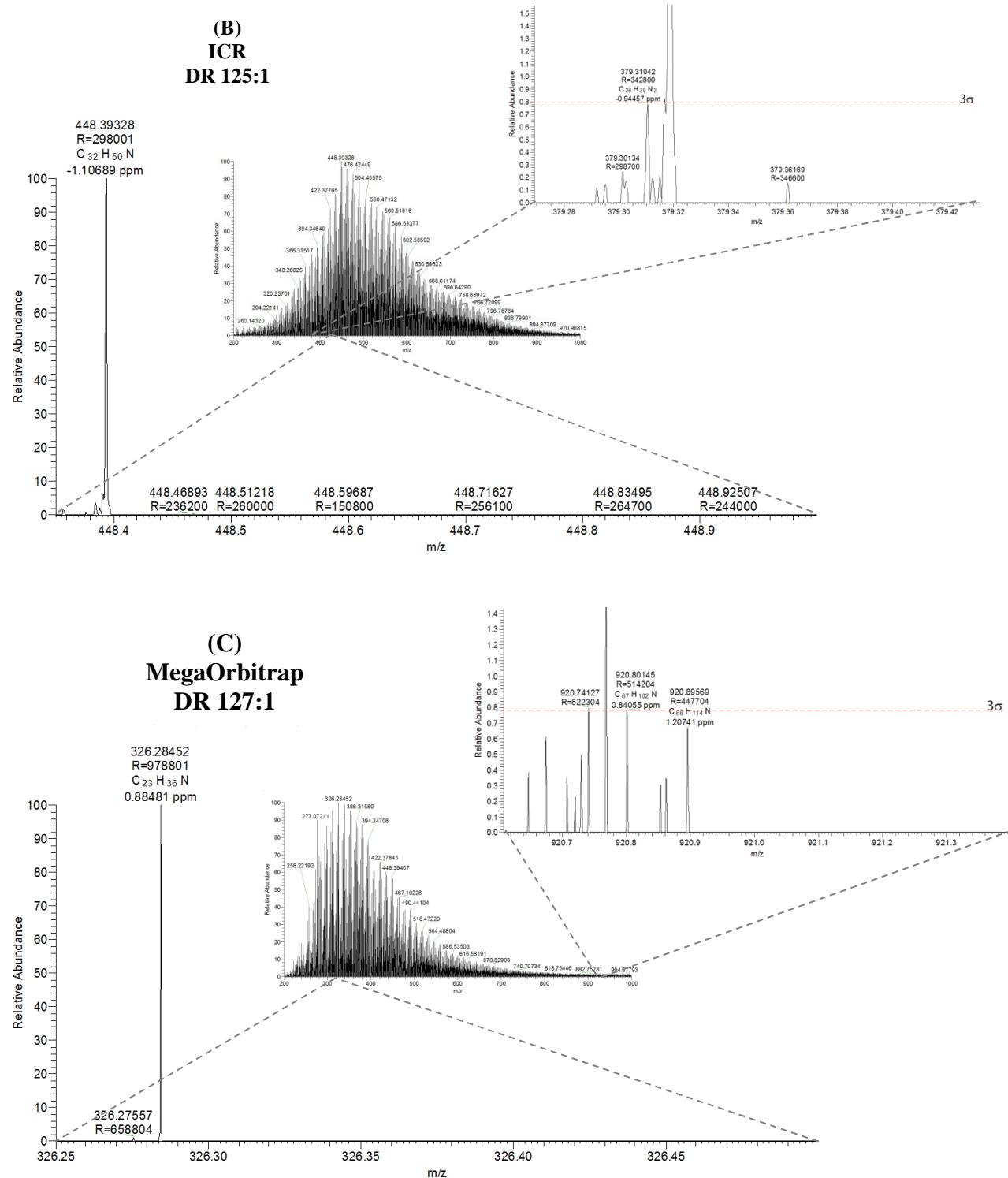


Figura 54 Cálculo do intervalo dinâmico para as análises de amostras de petróleo bruto utilizando os analisadores (A) Std. *Orbitrap*, (B) ICR e (C) MegaOrbitrap.

A Figura 54 foi obtida de modo a determinar primeiro a intensidade relativa mínima em que a fórmula molecular mínima possa ser atribuída com segurança, ou seja, valores de erro de massas menores que 1 ppm. Assim, assumindo que o ruído químico tem uma distribuição normal com a média (μ) igual a zero, é possível calcular o desvio padrão da população, obtendo o valor de sigma (σ) o qual é usado para determinar o *threshold*. Para o *threshold* foi utilizado o valor de 3σ proporcionando um intervalo de confiança 99,75%. Para o teste no analisador *Orbitrap* é possível observar que o composto mais baixo atribuído nesse intervalo tem intensidade relativa igual a 0,901%, quando comparado com o pico mais alto da escala, que dá um DR de 43:1. Para o ICR, o sinal com menor intensidade relativa de 0,796%, em comparação com o íon mais intenso, gera uma DR de 125:1. Usando o mesmo procedimento para o analisador experimental *MegaOrbitrap* obteve-se com uma intensidade relativa de 0,784 %, que representa um DR de 127:1. Estes resultados indicam que o *MegaOrbitrap* fornece um DR similar comparado ao ICR em análise de petróleo bruto, mas um DR inferior para o analisador *Std. Orbitrap*. Isso está relacionado ao menor acúmulo de íons nesse analisador, com consequente menor número de íons resolvidos e identificados.

14.4.3 Erro espectral

Outro parâmetro utilizado como figura de mérito em MS é o erro espectral, que varia de acordo com a composição elementar, com a intensidade de sinal relativa dos íons, assim como com a variação da razão entre massa e carga (m/z) ao longo da aquisição de espectros de massas. O erro espectral é definido como a razão entre a intensidade relativa de um íon e os seus padrões isotópicos, como, por exemplo, o ^{13}C . A Figura 55 apresenta um espectro teórico para o íon de $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}$ de m/z 366,31553 que inclui o sinal com a incorporação do ^{13}C que deverá ter, em teoria, uma intensidade relativa de cerca de X% do sinal da molécula protonada.

CAPÍTULO II

C26H40N: C26 H40 N1 pa Chrg 1

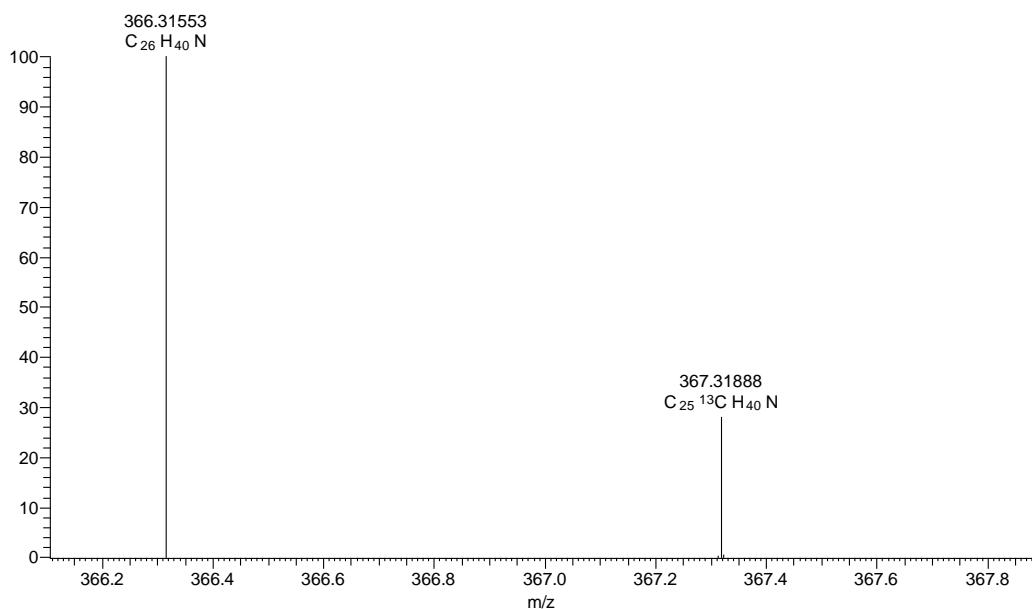


Figura 55 Erro espectral teórico (SET) para $C_{26}H_{40}N$ e seu isótopologo $C_{25}^{13}CH_{40}N$.

Pode-se visualizar com o espectro teórico da Figura 55 a ampliação do espectro de massa do petróleo bruto na faixa de m/z de 366,0-367,4, uma região com atribuição do íon $C_{26}H_{40}N$ e seu isotopólogo $C_{25}^{13}CH_{40}N$, através de uma comparação matemática o erro espectral foi então calculado e a Figura 56 apresenta esses resultados.

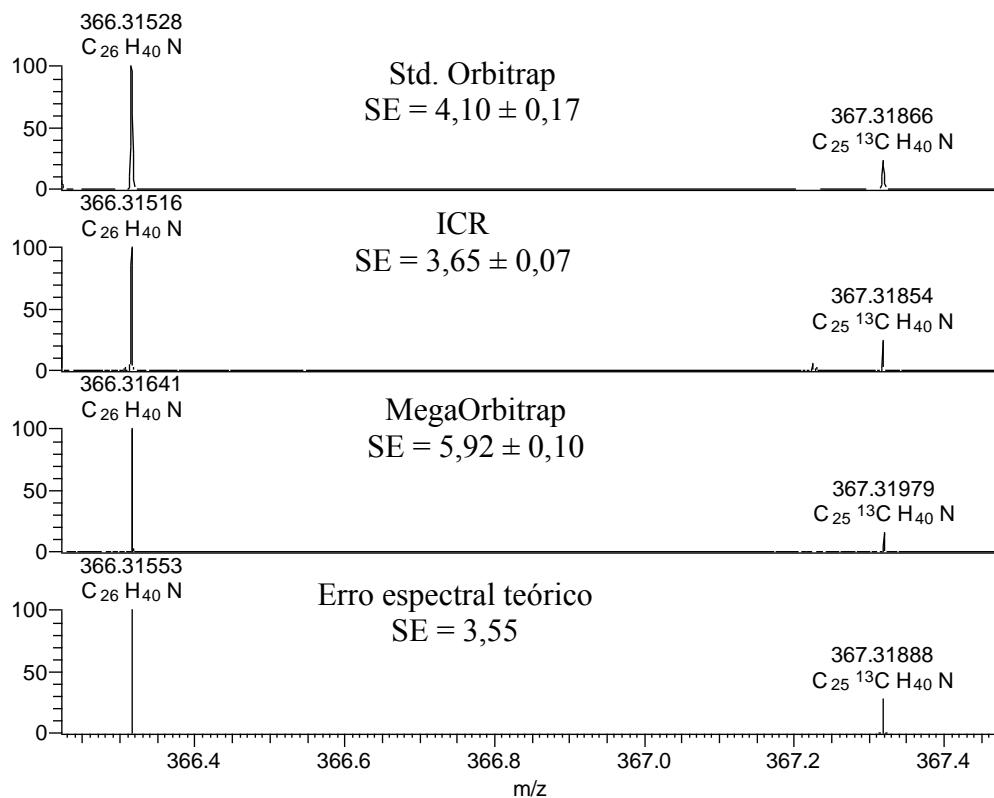


Figura 56 Erro espectral (SE) para C₂₆H₄₀N e seu isótopo C₂₅¹³CH₄₀N obtido a partir da análise de uma amostra de óleo bruto por *Std. Orbitrap*, *ICR*, e *MegaOrbitrap*.

Na Figura 56, pode-se observar o erro espectral calculado com o desvio padrão ($n = 3$) para os diferentes analisadores. Os resultados indicam que o analisador ICR apresentou o valor mais próximo do teórico (3,55). O analisador *Std. Orbitrap* demonstrou um erro espectral equivalente e o analisador *MegaOrbitrap* apresentou um erro de desvio espectral mais elevado, quando comparado com o espectro teórico.

14.4.4 Velocidade de varredura

Outra figura de mérito em MS é a velocidade de varredura, que é o tempo de permanência do conjunto de íons dentro dos analisadores, e isto foi determinado com base no tempo de detecção proporcionado pelo transiente de cada analisador. Os resultados são comparados na Figura 57 na mesma escala de tempo.

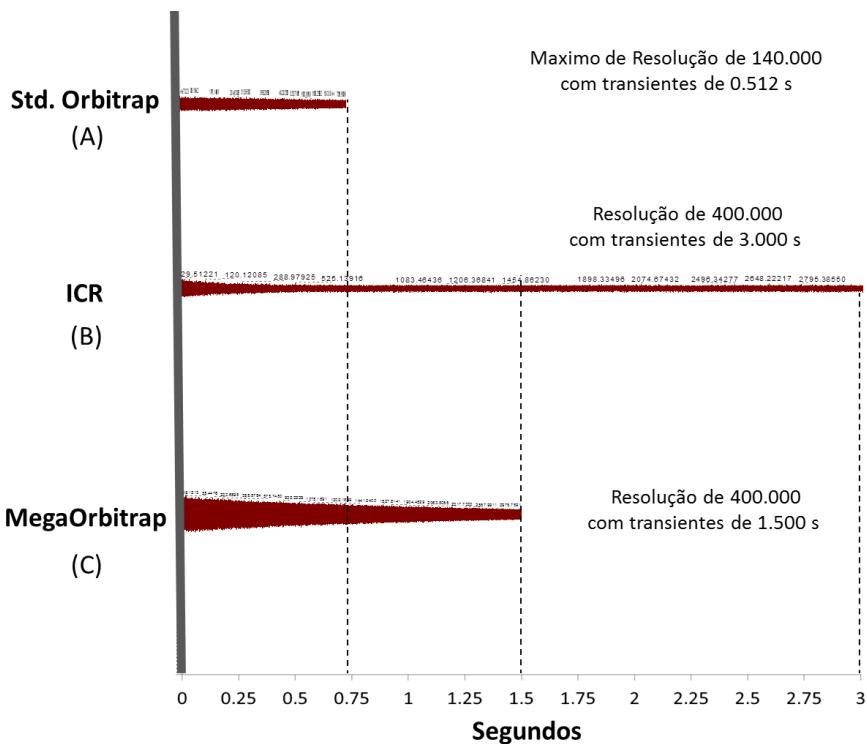


Figura 57 Transientes obtidos para cada analisador, organizado na mesma escala de tempo em 125 milissegundos. Eles referem-se ao analisador (A) *Std. Orbitrap* (B) *ICR* (C) *MegaOrbitrap*.

Como mostrado na Figura 57, o analisador *Std. Orbitrap* tem o menor tempo de detecção (fornecendo a mais alta velocidade de detecção), que é de 0,75 s. Ao comparar ICR com o *MegaOrbitrap* pode-se observar que o ICR leva o dobro do tempo, ou seja, transientes de 3 segundos, enquanto que o analisador *MegaOrbitrap* apresenta transientes de 1.5 segundos de órbita dos íons para atingir o mesmo poder de resolução de 400.000 na razão m/z 400.

14.4.5 Exatidão de massa

A exatidão de massa é uma figura de mérito importante na análise de massas, visto que ela é medida pelo erro calculado em ppm do desvio da medida experimental em relação ao valor de massa teórico, ou seja, indica quão próximo o valor experimental está do valor teórico, representado pelo cálculo pela equação 6.

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{\text{Massa medida} - \text{Massa teórica}}{\text{Massa teórica}} \times 10^6 \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{Erro (ppm)} = \frac{394,34708 - 394,34683}{364,34683} \times 10^6$$

$$\text{Erro} = 0.63 \text{ ppm}$$

Uma alta exatidão de massa oscila em valores entre 0,1 a 5 ppm de erro. Quanto menor o erro, maior é a probabilidade de a fórmula molecular atribuída ser a verdadeira. A exatidão de massa foi avaliada entre os três analisadores e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 58.

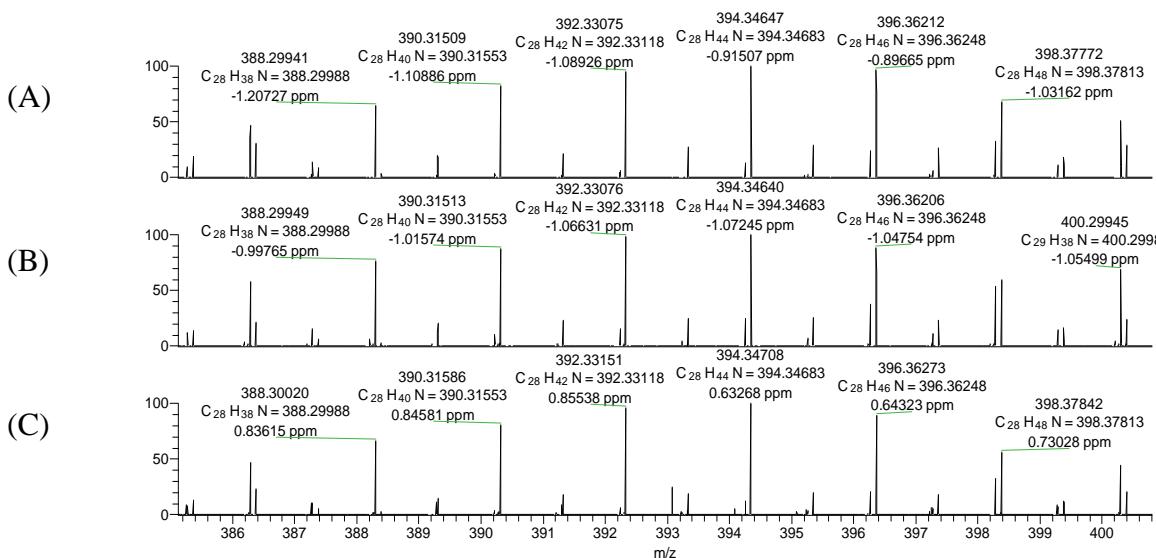


Figura 58 Espectros no mesmo range de massa, relatando as diferenças e semelhanças de exatidão de massa detectadas entre os espectrômetros avaliados (A) *Std. Orbitrap*, (B) *ICR* e (C) *MegaOrbitrap*, respectivamente.

A Figura 58 apresenta um conjunto de íons na mesma faixa de m/z , obtida através dos 3 diferentes analisadores. É possível observar que os erros de massa em ppm são semelhantes entre o analisador *Std. Orbitrap* e o ICR e está em torno de 1ppm. Porém, o *MegaOrbitrap* detectou íons com erros de massas no nível de sub-ppm. Este padrão pode ser visto em toda a faixa de massas de m/z 200 – 1000 e atribui-se o melhor desempenho de calibração para o *MegaOrbitrap*. Porém, uma maior estabilidade de calibração (5-7 dias) foi obtida no ICR, quando comparado com o *Orbitrap* ou *MegaOrbitrap* (2-3 dias).

Avaliando apenas esse parâmetro, pode dizer que o analisador *MegaOrbitrap* é o mais adequado para essa figura de mérito, desde que calibrado de forma adequada. Cabe ainda destacar a maior velocidade (três vezes mais rápido) de calibração do analisador *Orbitrap* (*Std. Orbitrap* e *MegaOrbitrap*) quando comparado com o analisador ICR.

14.4.6 Resolução e/ou Poder de resolução

A separação dos íons em suas relações de m/z é definida de duas maneiras. A primeira, denominada Resolução, é definida através da separação entre dois íons. Ela é normalmente utilizada para analisadores de baixa resolução. A segunda definição é chamada Poder de Resolução onde é avaliado um único íon para obtenção desse valor. As duas definições são ilustradas com dados experimentais na Figura 59.

CAPÍTULO II

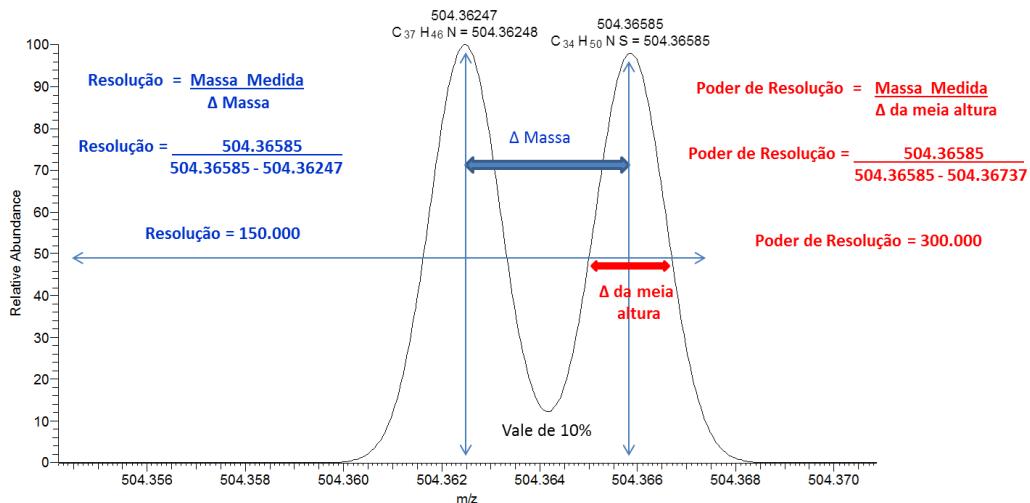


Figura 59 Ilustração do cálculo da Resolução e do Poder de Resolução para um espectro de massas. Este último é normalmente utilizado tanto pelo analisador ICR quanto com o analisador *MegaOrbitrap*.

O Poder de Resolução nos analisadores FT-MS é dependente da razão m/z e faz-se necessária sua investigação em toda faixa de massas do perfil de compostos de petróleo bruto, para avaliar principalmente os compostos de maiores m/z . Devido a esta necessidade, o poder de resolução para cada analisador foi determinado ao longo de toda a gama de massas e traçado em função de razão m/z , como mostrado na Figura 60.

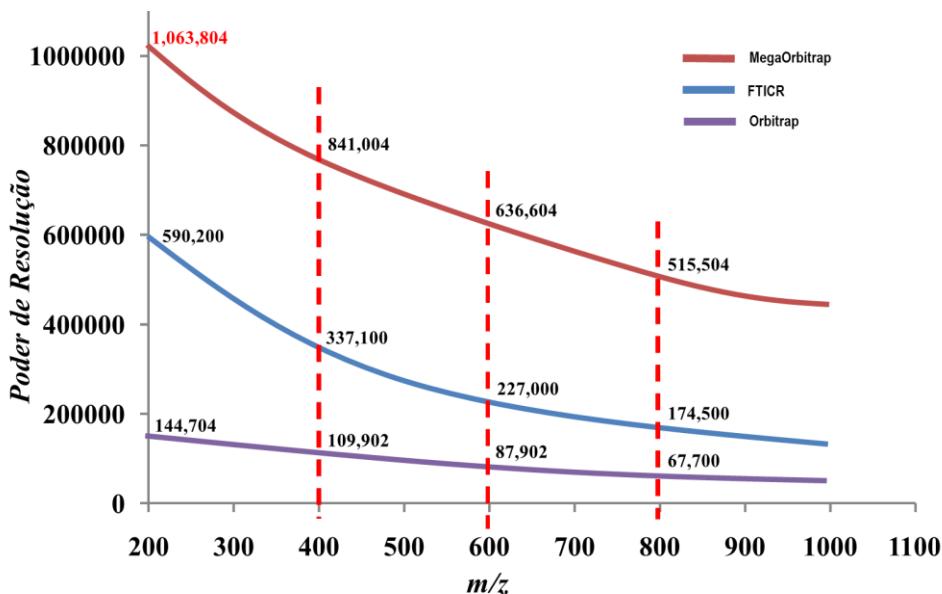


Figura 60 Poder de resolução obtido para análises de petróleo bruto com os analisadores Std. Orbitrap, ICR e *MegaOrbitrap*, usando ESI(+).

Outra definição é aquela empregada para o termo Poder de Resolução Mínima que é definido de acordo com a equação: $\text{Resolução}_m = 2m/\Delta m$ em que m é a m/z levando em conta que Δm é a diferença de massa entre os dois íons a serem resolvidos. Uma dificuldade constante é resolver compostos diferentes no somatório de C_3 e SH_4 , essa diferença pode ser determinada pela equação da Resolução_m obtendo-se um valor mínimo de separação de 0,0034 unidades de massas, Tabela 9.

Tabela 9 Poder de resolução mínima para resolver íons com diferença de massas de C_3 e SH_4 em distintas m/z .

m/z	Poder de resolução Mínimo
200	117,647
400	235,294
600	352,941
800	470,588

CAPÍTULO II

Após avaliar as figuras de mérito, atribui-se o grande sucesso desta separação e identificação de classes por ESI à altíssima resolução fornecida pelo *FT-MegaOrbitrap MS* que rapidamente (com transientes de 3 s) identifica a classe de heteroátomos corretamente, mesmo para espécies isobáricas que podem apresentar diferenças de massas uma da outra de até 0,003 unidades de massas (por exemplo, C₃ versus SH₄). Desta forma, o acoplamento da fonte ESI com a técnica *FT-MegaOrbitrap MS* produziu uma excelente resposta analítica para análise dos componentes polares presentes em misturas complexas, como o petróleo, uma vez que mais de 20.000 compostos são caracterizados em uma única análise. Os dados da Tabela 10 permitem realizar uma avaliação e comparação dos analisadores de ultra-alta resolução e exatidão de massas em níveis de sub-ppm.

Tabela 10 Comparativo das figuras de mérito dos analisadores *Std. Orbitrap*, ICR e *MegaOrbitrap*.

Parâmetros	Std. Orbitrap	FTICR, 7T	MegaOrbitrap
Sinal / Ruído	1905 \pm 30,11	637 \pm 26,15	1933 $^{*}\pm$ 27,47
Intervalo dinâmico	43:1	125:1	127:1
Erro espectral	4,10% \pm 0,17	3,55% \pm 0,07*	5,92% \pm 0,10
Duração do Transiente	0.5 s	3 s	3 s
Exatidão de Massas	1,01 \pm 0,23 ppm	0,81 \pm 0,10 ppm*	0,93 \pm 0,15 ppm
Poder de resolução R_p	109,902 \pm 752 <i>m/z</i> 400	337,100 \pm 439 <i>m/z</i> 400	841,004 \pm 339 <i>m/z</i> 400*
Número de classes identificadas (+ESI)	1	4	4
Número de classes identificadas (-ESI)	3	7	8*

* Melhores resultados, n=3, desvio padrão. CVs menores que 10%

Com base na Tabela 10, observa-se que o analisador de massas *MegaOrbitrap* obteve um poder de resolução superior ao analisador ICR (levando em conta a transferência da faixa de massas de 1.000 Da, entre os analisadores), sendo que o ICR atribui fórmulas aos íons com maiores exatidões de massas (menor erro) equivalentes ao longo de toda a faixa de massas. Outro aspecto importante foi o tempo de escaneamento, que foi de cerca de 3 segundos tanto para o ICR quanto para o *MegaOrbitrap*, e já para o *Orbitrap* foi de apenas 0,7 segundos. Sendo assim, apesar da maior rapidez entre as análises obtidas pelo analisador *Orbitrap*, o mesmo não é adequado (com a resolução obtida) para as análises de petróleo bruto. Dessa forma, no momento, apenas os analisadores ICR e *MegaOrbitrap* são indicados para análise de petróleo bruto. Isso não faz desmerecer o alto poder de aplicação do *Orbitrap* na análise de petróleo, pois quando se trabalha com frações de petróleo, o mesmo é eficiente, como reportado na literatura (Schmidt *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2010; Zhurov *et al.*, 2013).

Outra questão que deve ser discutida sobre os analisadores de massas é seu custo de manutenção e operação. O custo de manutenção do ICR é elevado, por trabalhar com supercondutores que necessitam de resfriamento contínuo por meio de hélio e nitrogênio líquido. A operação do ICR é considerada difícil, pois a distância entre os íons provenientes da fonte, até o analisador *Linear Trap* até por fim chegar ao analisador ICR, devido à interferência que o campo magnético pode causar em outros analisadores. Por isso, têm-se muitos parâmetros entre o aprisionamento, resfriamento, condução e detecção dos íons. O oposto é observado para o analisador *Orbitrap*, resfriado simplesmente por *chiller* e/ou *cooler* e cuja operação é relativamente simples devido à baixa variação espectral entre os analisadores traps, quadrupolo, *C-Trap* até se chegar ao *Orbitrap*, consequência do avanço tecnológico na condução de íons e da pequena distância entre os *traps* já citados.

15 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a fonte de ionização mais adequada para a análise forense em petroleômica é a ESI, pois apresenta seletividade e estabilidade, não tem necessidade de pré-tratamentos laboriosos das amostras, podendo ser aplicada nas rotinas de análises em laboratórios de investigação ou de refinarias de petróleo. Os tratamentos das respostas obtidas nas análises dos derivados de petróleo permitiram uma melhor visualização dos resultados, podendo, assim, ajudar tanto na otimização dos processos de refino em plantas-piloto, como nos estudos de casos forense. Sabendo que a fonte de ionização ESI é a mais adequada para a análise de petróleo por MS com o analisador já conceituado de altíssima resolução ICR, partiu-se para uma avaliação do poder da análise de petróleo bruto por outro analisador de massas de altíssima resolução, o *Orbitrap*. Para os resultados obtidos no estudo dos analisadores de massa *Std. Orbitrap*, ICR e *MegaOrbitrap*, foram avaliadas todas as figuras de mérito para os 3 analisadores, sendo que todos mostraram-se capazes de realizar as análises. No entanto, o *Std. Orbitrap* apresentou limitações para o estudo de petróleo bruto, em especial devido à resolução insuficiente. Destaca-se que o *MegaOrbitrap* ainda não está disponível comercialmente, no entanto, este estudo aponta para um futuro promissor para esse analisador, como uma ferramenta fundamental quando existir uma demanda de análise de altíssima resolução.

16 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aeppli, C., Carmichael, C.A., Nelson, R.K., Lemkau, K.L., Graham, W.M., Redmond, M.C., Valentine, D.L., Reddy, C.M., Oil weathering after the Deepwater Horizon disaster led to the formation of oxygenated residues. *Environmental Science and Technology*, 46, 8799-8807. **2012**.
- Altgelt, K. H. B.; Bonduszynski, M. M. Composition and analysis of heavy petroleum fractions. New York: Marcel Dekker. **1994**.
- Chevron Brasil Ltda. Fundamentos de Lubrificação, **2005**.
- Colati, K. A. P., Dalmaschio, G. P., de Castro, E. V. R., Gomes, A. O., Vaz, B. G., Romão, W. Monitoring the liquid/liquid extraction of naphthenic acids in brazilian crude oil using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry (ESI FT-ICR MS). *Fuel*, 108, 647–655. **2013**.
- Dalmaschio, G. P., Malacarne, M. M., de Almeida, V. M. D. L., Pereira, T. M. C., Gomes, A. O., de Castro, E. V. R., Greco, S. J., Vaz, B. G., Romão, W. Characterization of polar compounds in a true boiling point distillation system using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Fuel*. 115. 190-202. **2014**.
- D'Auria, M., Emanuele, L., Racioppi, R., Velluzzi, V., Photochemical degradation of crude oil: Comparison between direct irradiation, photocatalysis, and photocatalysis on zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 32-38. **2009**.
- Freitas, M., Malacarne, M.M., Romão, W., Dalmaschio, G.P., Castro, E.V.R., Celante, V.G., Freitas, M.B.J.G. Analysis of the heavy oil distillation cuts corrosion by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry, electrochemical impedance spectroscopy, and scanning electron microscopy. *Fuel*, 104, 656–663. **2013**.
- Hughey, C. A., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., Walters, C. C., Qian, K., Mankiewicz, P. Acidic and neutral polar NSO compounds in smackover oils of different thermal maturity revealed by electrospray high field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, 35, 863–880. **2004**.
- Ho, T. Y.; Rogers, M. A.; Drushel, H. V.; Koons, C. B.; Evolution of the sulfur compounds in crude oils. *Am Assoc Pet Geol Bull*, 58, 2338-2348. **1984**.

CAPÍTULO II

Homes, A. S.; Nitrogen functional groups in Utah tar sand bitumen and produced oils.

AOSTRA J Res, 2,167-175. **1986.**

Klein G. C., Rodgers, R. P., Marshall, A. G. Identification of hydrotreatment-resistant heteroatomic species in a crude oil distillation cut by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. Fuel, 85, 2071–2080. **2006.**

Fasciotti, M.; Lalli, P. M.; Klitzke, C. F.; Corilo, Y. E.; Pudenzi, M. A.; Pereira, R. C. L.; Bastos, W.; Daroda, R. J.; Eberlin,M. N. *Energy Fuels*, 27, 7277-7286. **2013.**

Mapolelo, M. M., Rodgers, R. P., Blakney, G. T., Yen, A. T., Asomaning. S., Marshall, A. G. Characterization of naphthenic acids in crude oils and naphthenates by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry, 300, 149-157. **2011.**

Petrobras. Petróleo. Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/pt/energia-e-tecnologia/fontes-de-energia/petroleo/> Acesso em: 19 de setembro de **2013**

PFC Energy. The Definitive Annual Ranking of the World's Largest Listed Energy Firms. Janeiro, **2014.**

Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Santos, J. M.; Damoc, E.; Denisov, E.; Makarov, A.; Eberlin, M. N. Direct Analysis of crude oil using Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. In: 62nd Conference on mass spectrometry and allied topics, Baltimore, EUA. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 25, 1-264. **2014.**

Simas, R. C., Pereira, R. C. L., Klitzke, C. F., Eberlin, Y. C., Vaz, B. G., Pudenzi, M. A., Schmidt, E. M., do Nascimento, H. D. L., de Moraes, H. T., Bastos, W. L., Eberlin, M. N., Petroleômica: caracterização rápida e abrangente de petróleo bruto e derivados via espectrometria de massas FT MS de altíssima resolução e exatidão. Petrobras, Rio de Janeiro, 20, 211, **2012.**

Speight, J. C. Handbook of petroleum analysis. New York: John Wiley and Sons. **2001.**

Seifert, W. K.; Howells, W. G.; Interfacially active acids in a California crude oil. Isolation of carboxylic acids and phenols. Analytical Chemistry, 41, 554-562. **1969.**

Seifert, W. K.; Carboxylic acids in petroleum and sediments. Fort Chem Org Nat, 32,1-49. **1975.**

CAPÍTULO II

Tissot, B. P.; Welte, D. H.; Petroleum formation and occurrence. Berlin: Springer-Verlag.
1984.

Vaz, B. G. Petroleômica por FT-ICR MS: Desvendando a composição de polares do petróleo e derivados. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. **2011.**

Wang, C., Chen, B., Zhang, B., He, S., Zhao, M., Fingerprint and weathering characteristics of crude oils after Dalian oil spill, China. Marine Pollution Bulletin, 71, 64-68. **2013.**

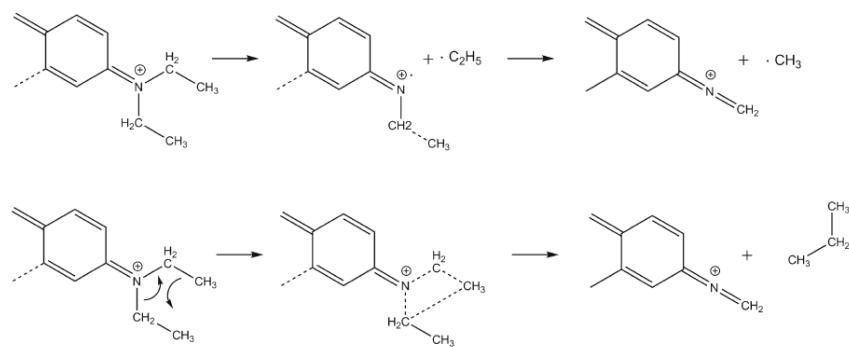
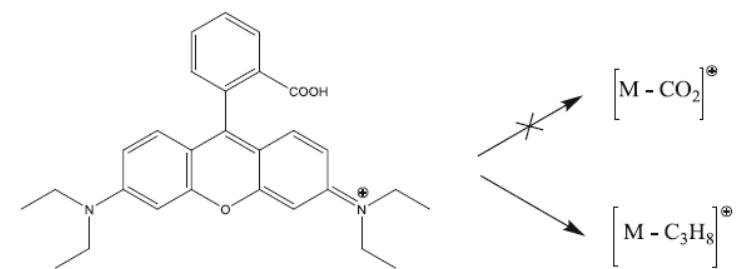
17 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Nessa tese, foi abordada a análise química forense por espectrometria de massas de altíssima resolução obtida a partir das armadilhas de íons de *Penning* e *Kingdon*. No capítulo 1, obteve-se a confirmação inequívoca dos compostos marcadores de crimes por meio dos íons moleculares, utilizando padrões isotopólogos M+1 e M+2 e MS/MS. A fonte de ionização EASI se mostrou viável no que diz respeito à ionização, podendo auxiliar a polícia científica em análises não destrutíveis de amostras de prova de crime, pois não destrói amostra a níveis macroscópicos, o que vem a ser um ponto de destaque quando comparado com outras técnicas de ionização, como a portátil V-EASI *Spartan* e a consagrada e robusta ESI.

No capítulo 2, destaca-se o fato de se trabalhar com amostras complexas como o petróleo e seus derivados também em um aspecto forense. Em MS, muitas vezes pode-se obter respostas simples que atendam às perguntas iniciais, como relatado no caso dos óleos de motor, onde apenas a presença ou ausência do perfil dos compostos polares do petróleo já indica a conformidade do óleo de motor sintético. Mas, a caracterização destes compostos polares, conhecida com Petroleômica, só era realizada de maneira satisfatória com o analisador de massas ICR. Pois com a tecnologia *Orbitrap* os resultados não se mostraram eficientes. No entanto, nesta tese, demonstramos que o analisador de massas *MegaOrbitrap* (ainda em fase experimental) se mostrou tão adequado quanto o ICR para essa análise, de acordo com os resultados obtidos para as figuras de mérito de cada um destes. O fato de se obter uma altíssima resolução com *MegaOrbitrap* (chegando a 1.000.000 em m/z 200), possibilita a confirmação dos compostos não mais por exatidão de massas, mas sim pela “ultra-alta” resolução com um novo conceito que não depende de calibração do analisador. Este conceito pode ser abordado como confirmação de fórmula molecular através do padrão fino de isotopólogos.

➤ **Anexos**

Anexos



Anexo 1: Proposta de fragmentação com perda de propano (C_3H_8)

REFERÊNCIA

Peters, J.; Clemen M; Grottemeyer, J Peters J1, , Grottemeyer J., Fragmentation of deuterated rhodamine B derivatives by laser and collisional activation in an FT-ICR mass spectrometer. Anal Bioanal Chem, 25,1169–1172; Jun 15., 2013.