

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DE ALTA MASSA
MOLECULAR PRESENTES EM PETRÓLEO E DEPÓSITOS
NAFTÊNICOS**

*STUDY OF HIGH MOLECULAR MASS ORGANIC ACIDS PRESENT IN OIL AND
NAPHTHENIC DEPOSITS*

ELIANE VALÉRIA DE BARROS

Tese de Doutorado

**VITÓRIA
2022**

ELIANE VALÉRIA DE BARROS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Química.

Área de Concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química do Petróleo e Biocombustíveis

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Romão

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas – SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B277e Barros, Eliane Valéria de, 1978-
 Estudo de ácidos orgânicos de alta massa molecular
 presentes em petróleos e depósitos naftênicos / Eliane Valéria de
 Barros. – 2022.
 149 f. : il.

 Orientador: Wanderson Romão.
 Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do
 Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

 1. Ácidos. 2. Petróleo. 3. Reaproveitamento (Tecnologia
 química). 4. Extração (Química). 5. Química Analítica. 6.
 Espectrometria de massa. I. Romão, Wanderson. II.
 Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
 Exatas. III. Título.

CDU: 54

Estudo de ácidos orgânicos de alta massa molecular presentes em
petróleos e depósitos naftênicos

Eliane Valéria de Barros

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em 23/03/2022 por:

Prof.(a) Dr.(a) Wanderson Romão¹
Instituto Federal do Espírito Santo
Orientador(a)

Prof.(a) Dr.(a) Álvaro Cunha Neto¹
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.(a) Dr.(a) Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro¹
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr.(a) Luiz Silvino Chinelatto Júnior¹
PETROBRAS

Prof.(a) Dr.(a) Boniek Gontijo Vaz¹
Universidade Federal de Goiás

¹ O documento será assinado eletronicamente em conformidade com as normas prescritas na Portaria
Normativa PRPPG/ UFES nº 08/2021.

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, março de 2022





Eliane Anexo C - Defesa da Tese

Data e Hora de Criação: 03/04/2022 às 20:42:41

Documentos que originaram esse envelope:

- Anexo C - Defesa da Tese.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 3f4ba357b1cb15ccccc37d510c22919abe2120995d88349153be4fca2e54f1f

[SHA512]: f7b377f538621b253431a14537760c7a1e09d77963c531dc05f73d99acd95780137db89b880be38b55a750ef95416558bd5d3b5e807a7f426d5418568c4e

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Wanderson Romão (wanderson.romao@ufes.br)

Data/Hora: 06/04/2022 - 05:59:16, IP: 191.248.43.247, Geolocalização: [-20.275882, -40.284029]

[SHA256]: 66147197c797506283f0cfa98ebde2048dcee6ea55dfc2272675b5d2ac13e2d



ASSINADO - Alvaro Cunha Neto (alvarocunhaneto@gmail.com)

Data/Hora: 06/04/2022 - 09:36:04, IP: 200.137.65.100

[SHA256]: a4a41612d6a2e9f362c85957d493c696dc17d09e2cf1eb2d6e3436b1b4c71da4



ASSINADO - Eustaquio Vinicius Ribeiro de Castro (eustaquiovinicius@uol.com.br)

Data/Hora: 07/04/2022 - 06:37:00, IP: 177.58.164.123, Geolocalização: [-20.342634, -40.285681]

[SHA256]: a7b0cf394d9875b6180234326d12d51bd5543fa71b1f52bffd07e9cb743a089



ASSINADO - Lutz Silvino Chinelatto (lsilvino@petrobras.com.br)

Data/Hora: 07/04/2022 - 08:38:37, IP: 191.212.234.49, Geolocalização: [-22.754575, -41.879429]

[SHA256]: e250b97782792656867c156048c128083282df18b7a084c8f87c789eadeb1c9



ASSINADO - Boniek Gontijo Vaz (boniek@ufg.br)

Data/Hora: 07/04/2022 - 08:41:11, IP: 179.242.61.65

[SHA256]: d08192d7d85217596b4bf3cabd227437df885c7ef9d54483dfba9b98fb1472

Histórico de eventos registrados neste envelope

07/04/2022 08:41:11 - Envelope finalizado por boniek@ufg.br, IP: 179.242.61.65

07/04/2022 08:41:11 - Assinatura realizada por boniek@ufg.br, IP: 179.242.61.65

07/04/2022 08:38:37 - Assinatura realizada por lsilvino@petrobras.com.br, IP: 191.212.234.49

07/04/2022 08:38:24 - Envelope visualizado por lsilvino@petrobras.com.br, IP: 191.212.234.49

07/04/2022 06:37:00 - Assinatura realizada por eustaquiovinicius@uol.com.br, IP: 177.58.164.123

07/04/2022 06:36:51 - Envelope visualizado por eustaquiovinicius@uol.com.br, IP: 177.58.164.123

06/04/2022 09:36:04 - Assinatura realizada por alvarocunhaneto@gmail.com, IP: 200.137.65.100

06/04/2022 05:59:16 - Assinatura realizada por wanderson.romao@ufes.br, IP: 191.248.43.247

03/04/2022 20:44:20 - Envelope registrado na Blockchain por wanderson.romao@ufes.br, IP: 177.133.238.56

03/04/2022 20:44:19 - Envelope encaminhado para assinaturas por wanderson.romao@ufes.br, IP: 177.133.238.56

03/04/2022 20:42:42 - Envelope criado por wanderson.romao@ufes.br, IP: 177.133.238.56



Documento em conformidade com o padrão de assinatura digital ICP-Brasil e
validado de acordo com o Instituto Nacional de Tecnologia da Informação

Os registros de assinatura presentes nesse documento pertencem única e exclusivamente a esse envelope.
Documento final gerado e certificado por Universidade Federal do Espírito Santo



Aos meus filhos Daniel e Júlia dedico este trabalho, o meu amor e a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao soberano Deus por conceder saúde, sabedoria e proteção.

Aos meus pais que me presentearam com a vida, momentos felizes e a determinação necessária para as superações diárias e vitórias conquistadas.

Aos maiores incentivadores da vida, minha mãe Elza Quintella de Barros e meu esposo Wanderson Lyrio Bermudes pelo amor, cuidado, companheirismo e compreensão.

Aos meus amados e maravilhosos filhos, Daniel Barros Bermudes e Júlia Barros Bermudes, por abrilhantarem a minha vida.

Aos amigos e familiares, em especial as minhas queridas vovós Nini e Amélia por todo o amor e cuidado. E aos meus tios e padrinhos, Florêncio e Cristina, pelo carinho desde minha tenra idade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wanderson Romão pela confiança e dedicação a mim depositada para a construção desta tese. Gratidão por muito contribuir para a minha formação.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Eustáquio Vinicius Ribeiro de Castro, Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz, Dr. Luiz Silvino Chinelatto Júnior e Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto, pelo aceite do convite.

Ao IFES - *Campus* Vitória, a direção, a administração e a coordenação do Proeja, que oportunizaram a minha dedicação integral ao doutorado.

Ao CENPES/Petrobras, pela disponibilização das amostras e financiamento da pesquisa, particularmente ao Dr. Luiz Silvino pelo apoio técnico ao projeto.

Ao LACEM/UFG, pelas análises do Orbitrap MS, em especial ao Prof. Dr. Boniek pelas colaborações.

À UFES, pelo ensino público, gratuito e de excelência. Sou grata por aqui conquistar mais um título.

Ao PPGQUI-UFES e seu corpo docente pelo aprendizado e conclusão do curso, em especial ao Prof. Dr. Valdemar Lacerda Júnior.

À todas as equipes dos conjuntos de laboratórios do NCQP-UFES, particularmente aos grupos dos Laboratórios de Cromatografia e de Instrumentação.

Ao grupo do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C . Ao Prof. Dr. Álvaro pela prontidão e cooperação ao longo deste trabalho.

Ao grupo do Laboratório Quimiometria, em particular ao Prof. Dr. Paulo R. Filgueiras, e as alunas Gabriely e Mariana pela construção dos modelos de regressão e Márcia pela apreciação do trabalho.

Ao grupo do Laboratório de Caracterização e Processamento Primário de Petróleo pelas análises, em particular a Dra. Cristina M. S. Sad pela contribuição na construção da patente, parcerias, apoio e amizade em nossa exímia trajetória acadêmica e profissional.

Ao grupo do Laboratório de Petroleômica e Química Forense: Nayara, Rayana, Camila, Flávia, Larissa, Clebson, Victor, Radgyia, Bruna, João, Franciene, Jadson, Iago, Layla e Juliana pelas colaborações nos trabalhos, amizade e apreço que tenho por todos. E em especial aos colegas Lindamara, Natã e Thieres pelas importantes contribuições para construção deste trabalho.

Aos egressos da Pós-Graduação: Heloisa, Lílian, Fernanda, Heloá e Eloilson pela amizade.

À pesquisadora do IFES, Prof. Dra. Glória M. F. V. Aquije pelo apoio e admiração.

Aos meus *pets* Thor, Fafi e Black, por despertar a ternura e a sensibilidade em dias difíceis.

E a todos que de alguma forma colaboraram para esta conquista a minha gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Algumas estruturas químicas dos ácidos naftênicos presentes no petróleo bruto, sendo que DBE representa o número de anéis e duplas ligações, R a cadeia alquil, z a deficiência de hidrogênio e n o número de unidades CH ₂ ; (b) ácido ciclohexano di-1,4-carboxílico; (c) ácido hexacíclico C ₈₀ .'	23
Figura 2. Formação de ácidos carboxílicos (ANs) a partir da degradação aeróbia (a) e anaeróbia (b) de n-alcenos em petróleo	26
Figura 3. Número de publicações por ano	28
Figura 4. Principais relações entre palavras-chaves, autores e países de artigos científicos que envolvem os ANs no petróleo a partir da busca realizada na base <i>Web of Science</i> , entre os anos de 2011 e 2021.	29
Figura 5. Análise bibliométrica a partir da busca dos termos " <i>tetrameric</i> " ou " <i>tetraacids</i> " ou "ARN" e " <i>naphthenate</i> " ou " <i>naphthenates</i> " realizada na base <i>Web of Science</i> entre os anos de 2011 e 2021: (a) Relação de autores e (b) Rede de colaboração.	30
Figura 6. Cromatogramas obtido por (a) GC/qMS resultante da análise de uma mistura técnica de ANs derivatizada, onde se observa uma perda na resolução cromatográfica, indicada pela linha de base elevada, resultante de uma UCM e (b) GCxGC/ToF-MS resultante da análise de ésteres metílicos de ácidos naftênicos ANs.	34
Figura 7. Espectros de massas ESI(-)FT-ICR de um petróleo brasileiro. A expansão mostra os valores da massa experimental e a fórmula molecular das espécies de ANs identificadas em <i>m/z</i> 400-420	37
Figura 8. Espectro ESI(-)-MS/MS do íon típico da classe O ₂ . Note que o íon de <i>m/z</i> 185.1549 produz fragmentos com <i>m/z</i> 167, 141 e 125, que correspondem às perdas de 18 Da (H ₂ O), 44 Da (CO ₂) e 60 Da (CH ₃ CO ₂ H, ácido acético).	38
Figura 9. Formação de espécies com menor número de carbonos pelo craqueamento de ANs via um rearranjo [1,4]	40
Figura 10. Esquemas das interações entre ANs e sorventes.	43
Figura 11. Espectros de massa ESI(-)FT-ICR, distribuição de classes de heteroátomos e gráficos DBE <i>versus</i> NC para a classe O ₂ do óleo original e suas respectivas frações ácidas obtidas por: LLE e SPE.	44
Figura 12. Imagens de depósitos naftênicos residuais em instalações de superfícies.	48

Figura 13. Ilustração esquemática do equilíbrio químico da formação de espécies de naftenatos a partir de moléculas vizinha de monoácidos e de ARN em conformação aranha.....	49
Figura 14. Ilustração das possibilidades de reticulação entre o íon cálcio e ARN.	58
Figura 15. Esquema de extração de ANs	63
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do extrato de ácidos orgânicos do depósito de naftenatos A e suas principais frações (FA1-FA4).....	68
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C do extrato de ácidos orgânicos do depósito de naftenatos A e suas principais frações (FA1-FA4).....	69
Figura 18. (a) Espectro ESI(-)FT-ICR MS do extrato de ácido orgânico obtido do depósito A. As expansões mostram os valores de m/z teórica e experimental, erro de massa (em ppm) e fórmula molecular das principais espécies de ANs identificadas. (b) DBE <i>versus</i> número de carbono de ESI(-)FT-ICR MS para as classes $\text{O}_4[\text{H}]$ e $\text{O}_8[\text{H}]$ presentes no extrato de ácido orgânico obtido a partir do depósito de naftenatos A.	73
Figura 19. (a) Espectros de massa de extrato de ácido orgânico do depósito de naftenato A e suas principais frações (FA1-FA4) obtidos por ESI(-)FT-ICR MS, (b) ESI(-)Orbitrap MS e; (c) e (d) suas expansões, que mostram os valores de m/z experimental, a erro de massa (em ppm) e a fórmula molecular das principais espécies de ARN^{-1} identificadas.	75
Figura 20. Heteroátomo contendo a distribuição de classe dos compostos presentes no extrato de ácidos orgânicos do depósito A e suas principais frações (FA1-FA4) identificadas por ESI(-)FT-ICR MS (a) e ESI(-)Orbitrap MS (b).	79
Figura 21. DBE <i>versus</i> número de carbonos do extrato de ácidos orgânicos do depósito A e suas principais frações (FA1-FA4) geradas por ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS.	80
Figura 22. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS da fração de interesse, FA4 (a); obtida do extrato de ácido orgânico (b) do depósito de naftenatos B.....	82
Figura 23. Gráficos DBE <i>versus</i> número de carbonos para as classes O_4 e O_8 gerados a partir dos dados ESI(-)FT-ICR MS do extrato de ácidos orgânicos (a) e sua fração principal FA4 (b) do depósito de naftenatos B.	83
Figura 24. Espectro ESI(-)FT-ICR MS (a) e gráfico de DBE <i>versus</i> número de carbono para as classes $\text{O}_4[\text{H}]$ e $\text{O}_8[\text{H}]$ (b) da fração FA4_{sl} obtida a partir do extrato de ácidos orgânicos do depósito B, submetido a SPE sem a etapa de limpeza.	85

Figura 25. Espectros de RMN de ^1H do extrato de ácidos orgânicos do depósito de naftenatos B (a) e sua fração principal, FA4 (b). A expansão mostra as regiões de integração dos (i) sinais de ácido ARN e (ii) ácido benzóico.	86
Figura 26. Espectros ESI(-)MS/MS de ácidos ARN de carga única encontrado na fração de interesse, FA4, obtido do depósito B.	87
Figura 27. Espectros ESI(-)MS/MS de ácido ARN duplamente carregado encontrado na fração FA4, obtida do depósito B.	88
Figura 28. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS do padrão de ácidos ARN dosado no petróleo A.	100
Figura 29. Construção de modelos de regressão Univariado e multivariado para as misturas de ARNs com o petróleo A.	102
Figura 30. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS do padrão de ácidos ARN dosado no petróleo B (baixa acidez)	103
Figura 31. Construção de Modelos de regressão Univariado e multivariado (PLS) para as misturas de ARNs com o petróleo B.	105
Figura 32. Construção de Modelos de regressão multivariado para a técnica de ESI(-)FT-ICR MS: (a)(d) gráficos dos espectros das amostras de calibração; (b)(e) gráficos dos espectros médios das amostras de calibração; (c)(f) gráfico dos dados previstos vs. dados experimentais das amostras de calibração dos modelos PLS construído a partir dos petróleos A e B, respectivamente.	107
Figura 33. Espectros médios das amostras de calibração para o petróleo A e B; espectros médios das amostras reais obtidos pelas técnicas de FT-ICR MS, RMN de ^1H , MIR e NIR.	110
Figura 34. Espectros de FT-ICR MS das amostras de petróleo 1 e 2 e; seus respectivos gráficos de distribuição de classes de heteroátomos contendo compostos presentes, obtidos por ESI no modo positivo, ESI(+) e negativo com adição de ácido fórmico, ESI(-) _{AF}	112
Figura 35. Espectros de FT-ICR MS das amostras de petróleo 1 e 2 ionizadas no modo negativo pela adição de NH_4OH no ESI(-) e ESI(-) _{AF} nas concentrações de 0,1; 0,5; e 1,0 %m/v e seus respectivos gráficos de distribuição de classes de heteroátomos contendo os compostos presentes.	114
Figura 36. Réplica dos espectros de FT-ICR MS ionizados no modo negativo pela adição de AF dos petróleos 1, 2 e; gráfico de distribuição média das classes de heteroátomos contendo os compostos presentes.	115

Figura 37. Espectro de FT-ICR MS obtido da injeção direta do depósito de naftenatos, ionizados no modo negativo pela adição de AF, ESI(-)_{AF}; DBE *versus* número de carbono de ESI(-)FT-ICR MS para as classes O₄[H] e O₈[H] presentes do depósito de naftenato.

.....117

Figura A1. (a) Depósito de naftenato de cálcio impregnado com óleo residual, (b) depósito triturado com auxílio de almofariz e pistilo; (c) depósito envolvido no papel de filtro, (d) sistema utilizado na extração sólido-líquido via soxhlet; (e) depósito triturado antes da limpeza; (f) depósito após a limpeza com tolueno; (g) depósito após a limpeza com diclorometano; (h) depósito após a limpeza com metanol.119

Figura A2. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS dos calibrantes (a) L-arginina, (b) tunnig mix e (c) L-arginina e tunnig mix119

Figura A3. ESI(-)FT-ICR MS dos petróleos A e B enriquecidos com extrato de ácidos orgânicos em diferentes concentrações.120

Figura A4. Espectro de RMN de ¹H dos petróleos A e B enriquecidos com extrato de ácidos orgânicos em diferentes concentrações121

Figura A5. Construção de Modelos de regressão multivariado para RMN de ¹H: gráficos dos espectros médios de calibração; gráficos dos *loadings* e; gráficos dos dados previstos vs. dados experimentais por PLS construído a partir dos petróleos A e B. ..122

Figura A6. Construção de Modelos de regressão multivariado para a técnica de MIR: gráficos dos espectros de calibração; gráficos dos espectros médios de calibração; (c)(g) gráficos dos dados previstos vs. dados experimentais e; gráficos dos *loadings* dos modelos PLS construído a partir dos petróleos A e B.....123

Figura A7. Construção de Modelos de regressão multivariado para a técnica de NIR: gráficos dos espectros; gráficos dos espectros médios; gráficos dos dados previstos vs. dados experimentais e; gráficos dos *loadings* dos modelos PLS construído a partir dos petróleos A e B, respectivamente124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Instrumentação analítica aplicada a caracterização de ANs em matrizes relacionadas a petróleo.....	41
Tabela 2. Atribuições estruturais para RMN de ^1H e ^{13}C	64
Tabela 3. Abundância relativa de átomos de hidrogênio e carbono presentes no extrato de ácido orgânico obtido do depósito de naftenatos A e suas principais frações ácidas obtidas por RMN de ^1H agrupadas de acordo com sua faixa de deslocamento químico.	70
Tabela 4. Atribuição de fórmulas moleculares, erro de massa (em ppm) e m/z medido e teórico obtidos a partir de dados ESI(-)-FT-ICR MS para espécies da classe O_8 presentes na quarta fração ácida (FA4) do depósito de naftenato A.....	76
Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos petróleos utilizados neste trabalho.....	93
Tabela 6. Concentrações de extrato de ácidos orgânicos no petróleo A	96
Tabela 7. Parâmetros na utilizados na aquisição dos espectros de FT-ICR MS das amostras investigadas.	99
Tabela A1. Parâmetros de desempenho da construção dos modelos de regressão e teores de ARN valores previstos nas amostras reais.	125
Tabela A2. Atribuição das fórmulas, erro de massa (em ppm), m/z medido e teórico obtido dos íons ARN^- presentes no depósito, obtido a partir dos dados de FT-ICR MS com ionização pela adição de AF no ESI(-).....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF – Ácido Fórmico

AFS – *amino-functionalized silica* – sílica funcionalizada com amino

ANs – Ácidos naftênicos

ASTM – *American Society for Testing and Materials* – Sociedade Americana para Testes e Materiais

CAFs – *carboxylic acid-functionalized silica* – sílica funcionalizada com ácido carboxílico

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

CD_2Cl_2 – Dicloro metano deuterado

CHCl_3 – Clorofórmio

CH_2Cl_2 – Dicloro metano

CENPES/PETROBRAS – Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS

$\text{Cr}(\text{Acac})_3$ – acetilacetonado de cromo (III)

DBE – *double bond equivalent* – número de anéis e duplas ligações

DCM – Diclorometano

ESI – *eletrospray ionization* – ionização por *eletrospray*

FT-ICR MS – *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* – espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier

FTIR – *Fourier transform-infrared spectroscopy* – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GC – *gas chromatography* – cromatografia gasosa

GC×GC/TOF-MS – *comprehensive two dimensional gas chromatography/ time-of-light mass spectrometry* – cromatografia gasosa bidimensional abrangente associada à espectrometria de massas por tempo de voo

GC/MS – *gas chromatography/ mass spectrometry* – cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas

GC-qMS – *gas chromatography/ quadrupole mass spectrometry* – espectrometria gasosa associada à espectroscopia de massa quadrupolar

HPLC – *high performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência

TOF-MS – *time-of-flight mass spectrometry* – espectrometria de massas por tempo de voo

HTGC – *high temperature gas chromatography* – cromatografia a gás de alta temperatura

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LC – *liquid chromatography* – cromatografia líquida

LLE – *liquid-liquid extraction* – extração líquido-líquido

MeOH – Metanol

$[M+H]^+$ – Íon protonado

$[M-H]^-$ – Íon desprotonado

MS – *mass spectrometry* – espectrometria de massas

MS/MS – *tanden mass spectrometry* – espectrometria de massas sequencial

NAT – número de acidez total

NC – número de carbonos

nvl – variáveis latentes

o/a – óleo/água

R^2 – coeficiente de determinação para previsão

RMN – espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RMSEC – erro médio de previsão

SAX – *strong anion exchange* – troca aniônica forte

PLS – Mínimos Quadrados Parciais

SPE – *solid phase extraction* – extração em fase sólida

TMS – tetrametilsilano

Tol – tolueno

UCM – *unresolved complex mix* – mistura complexa não resolvida

LISTA DE SÍMBOLOS

g – grama

μg - micrograma

m – massa

mL– mililitro

M_w – distribuição média de massa molar

m/z – razão massa sobre carga

% m/v – porcentagem em massa por volume

% m/m – porcentagem em massa

% mol – porcentagem relativa em mol

pH – potencial de hidrogênio

ppm – partes por milhão

RESUMO

Dentre as controvérsias apresentadas a respeito da definição dos ácidos naftênicos (ANs), destacamos as que tratam de ácidos carboxílicos encontrados naturalmente no petróleo cru, considerando os ANs clássicos (monoácidos) e os poliácidos. Ao longo do capítulo 1, discutiremos a respeito dos desafios da indústria do petróleo no processamento de petróleos ácidos, bem como os fenômenos a ele relacionados. Uma consulta bibliométrica exploratória salienta a expansão do número de publicações a respeito dos ANs a partir dos anos 2000. Os avanços nas análises de caracterização contribuíram para descoberta de um grupo específico de ANs tetraméricos de alta massa molecular (M_w), por vezes denominados de ARN, precursores de depósitos de naftenato de cálcio, dos quais a discussão receberá atenção especial. Apresentamos as principais técnicas de extração e caracterização utilizadas na elucidação de ANs, sendo que a espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR MS) se sobressai na caracterização de ANs. No capítulo 2 propomos um método de isolamento de ARN, por extração em fase sólida (SPE), a partir de depósitos de naftenato. Os resultados de ESI(-)FT-ICR MS mostraram que a estratégia proporcionou uma ótima separação dos ANs em função das distintas faixas de M_w . A alta resolução e exatidão de massa indicaram que uma das frações concentrou apenas as espécies de ARN, que foram identificadas a partir de seus padrões de fragmentação característicos por experimentos ESI(-)MS/MS. As integrações dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C das frações ácidas salientaram a expressiva presença de compostos alquílicos e ausência de hidrogênios aromáticos na fração de interesse. Orbitrap MS ofereceu alto poder de resolução e exatidão de massa como FT-ICR MS, mostrando-se conveniente para elucidar misturas complexas de ANs com importante diferencial na viabilidade econômica oferecida pela técnica. A extração SPE desenvolvida, proporcionou o isolamento de ácidos ARN com pureza da ordem de 95% (de acordo com os resultados de RMN de ^1H), frente aos 84% alcançados sem esta etapa, aumentando substancialmente a eficiência do método de obtenção de padrões de referência dos ácidos precursores de depósitos de naftenatos de cálcio. Dentre os desafios da extração e caracterização de ARN a partir da sua matriz complexa, propomos no capítulo 3, o emprego de uma nova metodologia de análise para a identificação dessas espécies em amostras de petróleo e em depósitos de naftenatos *in situ*. Tal metodologia, baseia-se numa abordagem não convencional da utilização ESI(-)FT-ICR MS, através da dopagem da amostra com ácido fórmico para transformação dos sais de ARN em sua forma mono ou dicarregada. Essa metodologia mostrou-se promissora e vantajosa, por requerer um preparo mais simples de amostra, a redução de consumo de reagentes e tempo de análise. Com boa viabilidade de aplicação para identificar a natureza de depósitos e também estimar em um estágio inicial do potencial de incrustação e a necessidade de tratamento do petróleo em unidades de produção.

Palavras Chave: ácidos naftênicos, ARN, depósitos de naftenato, métodos de extração, preparo de amostra, ESI(-)FT-ICR MS.

ABSTRACT

Among the controversies presented regarding the definition of naphthenic acids (NAs), we will focus on that NAs are carboxylic acids found naturally in crude oil, considering classic NAs (monoacids) and polyacids. Throughout Chapter 1, we will discuss a revision about NAs highlighting the challenges of the petroleum industry in the processing of acid petroleum, related phenomena to it. An exploratory bibliometric consultation highlights the expansion in the number of publications about NAs from the 2000s onwards. Advances in chemical characterization analyses contributed to discovering a specific group of high molecular weight tetrameric NAs, sometimes-called ARN, precursors of calcium naphthenate deposits, whose discussion will receive special attention. Here, we present the primary extraction and characterization techniques used in the elucidation of NAs, in which Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) stands out. In chapter 2 we propose a method for isolating ARN by solid phase extraction (SPE) from naphthenate deposits. The ESI(-)FT-ICR MS results showed that the strategy provided an optimal separation of acids with a distinct M_w range. The high resolution and mass accuracy indicated that one of the fractions concentrated only the ARN species, which were identified from their characteristic fragmentation patterns by ESI(-)MS/MS experiments. The integrations of the ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of the acidic fractions highlighted the expressive presence of alkyl compounds and the absence of aromatic hydrogens in the subfraction of interest. Orbitrap MS offered high-resolution power and mass accuracy like FT-ICR MS, proving to be convenient for elucidating complex mixtures of NAs with an important differential in the economic viability offered by the technique. The SPE extraction developed provided the isolation of ARN acids with a purity of the order of 95% (according to the ^1H NMR results), compared to the 84% achieved without this step, substantially increasing the efficiency of the method for obtaining reference of precursor acids of calcium naphthenates deposits. In Chapter 3 we propose the use of a new analysis methodology for the identification of these species in oil samples and naphthenate deposits *in situ*. This methodology is based on an unconventional approach of using ESI(-)FT-ICR MS, doping the sample with formic acid to transform the ARN salts into their mono or unloaded form. This methodology proved to be promising and advantageous, as it requires simpler sample preparation, reduced consumption of reagents and analysis time. With good feasibility of application to identify the nature of the deposits and also to estimate in the initial phase the potential for incrustation and the need for oil treatment in the production units.

Keywords: naphthenic acids, ARN, naphthenate deposits, extraction methods, sample preparation, ESI(-)FT-ICR MS.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 - ESTADO DA ARTE	22
1.1 Ácidos Naftênicos	22
1.1.1 Definição	22
1.2 Origem e aplicação	24
1.3 Revisão da literatura a respeito dos ANs	27
1.4 Caracterização e obtenção dos ANs em matrizes relacionadas a petróleo	31
1.5 Fenômenos relacionadas aos ANs na produção de petróleo	45
1.6 Ácidos tetraméricos	50
1.7 Conclusões e desafios	56
2. CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO DE ÁCIDOS TETRAMÉRICOS DE DEPÓSITOS DE NAFTENATOS E CARACTERIZAÇÃO POR TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ALTA RESOLUÇÃO (RMN, ESI(-)FT-ICR MS E ESI(-)ORBITRAP MS)	57
2.1 INTRODUÇÃO	57
2.2 OBJETIVOS	61
2.2.1 Objetivo geral	61
2.2.2 Objetivos específicos	61
2.3 METODOLOGIA	62
2.3.1. Materiais e reagentes	62
2.3.2. Obtenção das frações ácidas a partir do depósito de naftenatos	62
2.3.3. RMN de ^1H e ^{13}C	64
2.3.4. ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS	65
2.3.5 ESI(-)MS/MS	66
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
2.4.1. Obtenção das frações ácidas a partir do depósito de naftenatos	67
2.4.2. RMN de ^1H e ^{13}C	67
2.4.3 ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS	71
2.4.4. Determinação da pureza da fração concentrada de ácidos com ARN	85
2.4.5. ESI(-)MS/MS	87
2.5. CONCLUSÃO	88
3. CAPÍTULO 3 – RASTREAMENTO DE ARN EM AMOSTRAS DE PETRÓLEO E DEPÓSITOS NAFTÊNICOS	90
3.1 INTRODUÇÃO	90
3.2 OBJETIVOS	92
3.2.1 Objetivo geral	92
3.2.2 Objetivos específicos	92
3.3 METODOLOGIA	92

3.3.1. Materiais e reagentes	92
3.3.2. Amostras	92
3.3.3. Determinação dos modelos de calibração	94
3.3.3.1. Com adição do padrão ARN (FA4) em petróleo e a partir de dados obtidos de FT-ICR MS	94
3.3.3.2. Com adição do extrato de ácidos orgânicos em petróleo e a partir de dados obtidos de diferentes técnicas analíticas	95
3.3.4 Identificação e caracterização de espécies ARN em amostras de petróleo e naftenato por FT-ICR MS com preparo mínimo de amostra	98
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	100
3.4.1 Determinação dos modelos de calibração e validação em amostras testes	100
3.4.1.1 Com adição do padrão ARN (FA4) em petróleo e a partir de dados obtidos de FT-ICR MS	100
3.4.1.2 Com adição do extrato de ácidos orgânicos em petróleo e a partir de dados obtidos de diferentes técnicas analíticas	106
3.4.2. Identificação e caracterização de espécies ARN em amostras de petróleo e naftenato por FT-ICR MS com preparo mínimo de amostra	111
3.5 CONCLUSÃO	118
4. APÊNDICE	119
5. REFERÊNCIAS	129

1. CAPÍTULO 1 - ESTADO DA ARTE

1.1 Ácidos Naftênicos

1.1.1 Definição

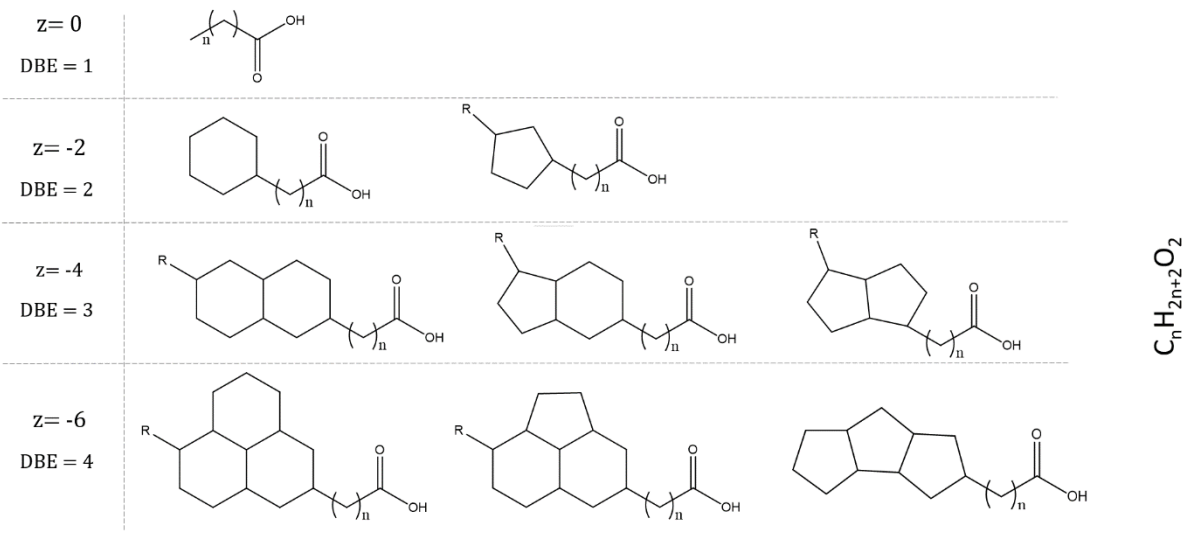
Ácidos naftênicos (ANs) são estruturas com funcionalidades oxigenadas, presentes no petróleo bruto, que atendam a fórmula $C_nH_{2n+z}O_2$ ^{1,2,3} sendo que n representa o número de átomos de carbono e z indica a “deficiência de hidrogênio” advindo de processos de ciclização da estrutura, sendo $z \leq 0$.^{3,4,5} **Figura 1a.**

Por outro lado, o termo ANs é considerado obsoleto pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), o qual referia-se à ácidos, principalmente os monocarboxílicos, derivados do nafteno.⁶ No entanto, a indústria do petróleo adotou o termo, por vezes considerado amplo⁷ e ambíguo,^{1,8} para definir como todos os ácidos orgânicos encontrados no petróleo.⁹ Isso em razão de que a fração de ácidos naftênicos contidas no petróleo bruto, que pode incluir um grande número de estruturas com grupos funcionais heterolementares (NSO), anéis aromáticos e insaturações.^{10,11}

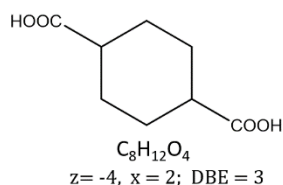
Nesta conjuntura, a literatura alude que em um petróleo bruto Sul Americano com mais de 3.000 espécies ácidas detectadas por espectrometria de ultra-alta resolução (UHR), menos da metade desse total correspondem a ANs “verdadeiros”,¹² ácidos monocarboxílicos pertencentes a classe O_2 . Em outras palavras, mais da metade das estruturas ácidas identificadas em alguns petróleos brutos, apresentaram grupos funcionais adicionais de oxigênio, nitrogênio, aromáticos e enxofre, como os ácidos alquil sulfônicos.¹¹ Ademais, Grewer *et al.*⁸ demonstraram que apenas 50% das espécies ácidas extraíveis de águas de produção de areias betuminosas (OSPW) confere a ANs convencionalmente definidos.⁸

Além desse fato, reporta-se ainda a existência de poliácidos, de fórmula geral $C_nH_{2n+z}O_x$,^{1,3,12,13,14} sendo $x \geq 3$,¹ que descreve espécies de ANs polioxigenados, os quais explicam as estruturas como a do ácido ciclohexano-dicarboxílico (dois grupos carboxílicos, diácidos, classe O_4), **Figura 1b**, e os ácidos tetraméricos, também denominados de ARN^a, (quatro grupos carboxílicos, classe O_8), que são precursores de depósitos de naftenato de cálcio,^{1,15} como por exemplo o tetra-ácido natural (C_{80}) que foi descrito por descrito nos trabalhos de Lutnaes e colaboradores,¹⁶ **Figura 1c**.

(a) Monóácidos, classe O_2



(b) Diácidos, classe O_4



(c) Tetra-ácido, classe O_8

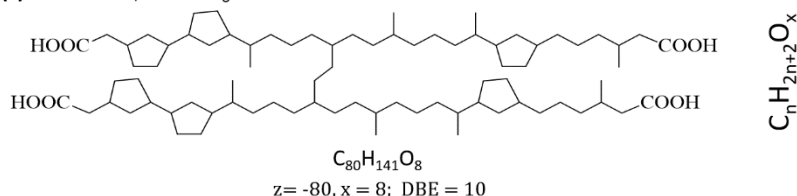


Figura 1. (a) Algumas estruturas químicas dos ácidos naftênicos presentes no petróleo bruto, sendo que DBE representa o número de anéis e duplas ligações, R a cadeia alquil, z a deficiência de hidrogênio e n o número de unidades CH_2 (adaptado de ref.4,10,17); (b) ácido ciclohexano di-1,4-carboxílico¹⁸ e; (c) ácido hexacíclico C_{80} .^{19,20}

De maneira menos usual a fórmula geral $C_nH_{2n+z-f}O_{2+f}$, sendo f um número par positivo que representa os grupos carboxílicos adicionais (isto é, $f = 2$, um $-COOH$ adicional; $f = 4$, dois $-COOH$ adicionais; etc), pode ser utilizada para descrever os ácidos oxi-naftênicos.^{14,18}

^a Termo em norueguês para água.¹⁵

Aqui, concentraremos a definição de que ANs são ácidos carboxílicos encontrados no petróleo cru, sendo considerado os ANs clássicos (monoácidos) aqueles do tipo $R[CH_2]_nCOOH$, em que n representa o número de grupos $(-CH_2-)$ e R representa cadeias alifáticas e/ou aromáticas ou ainda a porção naftênica^{14,17} e os poliácidos.¹⁴

1.2 Origem e aplicação

Os ANs constituem até cerca de 4 %m/m da composição média dos petróleos crus.³ Algumas referências revelam que em uma única amostra de petróleo podem existir cerca de 1,500 diferentes ANs com uma faixa de massa molecular (M_w) entre 115 e 1.500.^{3,17,21,22} Esses ácidos ocorrem naturalmente no petróleo bruto^{23,24} oriundos da ação bacteriana que utilizam o petróleo (hidrocarbonetos) como fonte de energia.²⁵ Durante a biodegradação, as cadeias de hidrocarbonetos parafínicos são preferencialmente atacadas, tornando-as mais curtas.¹² De modo que os hidrocarbonetos são removidos inicialmente gerando novos compostos como, por exemplo, ácidos saturados, aromáticos, cíclicos e acíclicos e fenóis,²⁵ o que implica na diminuição de compostos de baixa massa molecular e consequente diminuição do M_w na frações saturada e aromáticas e aumento da fração polar,²⁵ afetando significativamente as propriedades físicas e composição molecular do petróleo bruto.

25

Neste âmbito, a degradação aeróbia de hidrocarbonetos de petróleo na superfície é bem estabelecida na literatura.^{25,26} A **Figura 2a** apresenta a principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos por microrganismos aeróbios, que pode ocorrer na porção terminal e/ou subterminal de n-alcanos.^{25,27,28} Na biodegradação terminal ocorre inicialmente a oxidação de um grupo metila terminal (alcano monooxygenase, AM) originando um álcool primário, que é oxidado (álcool deidrogenase, AD) a um aldeído correspondente e finalmente (aldeído desidrogenase, ALD) convertido a um ácido carboxílico.^{25,27,28} Enquanto na biodegradação subterminal os produtos gerados são: um álcool secundário (AM), cetona (AD), éster (Baeyer – Villiger monooxygenase, BVM) e ácidos carboxílicos (esterase, E), respectivamente.^{25,26,27} Em alguns casos, ambas as extremidades da molécula de alcano podem ser oxidadas no grupo metil terminal que é convertido em um ácido dicarboxílico.^{25,26,27}

Por outro lado, a ocorrência de petróleos biodegradados em reservatórios subterrâneos, onde as condições aeróbias são improváveis, sugerem que os processos de degradação de hidrocarbonetos aconteçam por mecanismos anaeróbicos.²⁶ No entanto, o conhecimento das rotas de biodegradação para anaeróbios é limitado e muitas vezes contestada.^{25,26} Entretanto, algumas propostas de processos anaeróbicos são reportadas na literatura,^{25,26,28} podemos citar dois mecanismos para a formação de ácidos carboxílicos alifáticos (**Figura 2b**): no primeiro o carbono subterminal do hidrocarboneto é ativado e adicionado ao fumarato produzindo ácidos carboxílicos lineares e ramificados, no segundo ocorre a carboxilação do hidrocarboneto na posição C-3 formando apenas ácidos lineares.²⁵

Todavia, a capacidade enzimática e as preferências metabólicas diferenciadas para degradar aqueles componentes são definidas pela microbiota presente nos reservatórios de petróleo.²⁵ Em geral, óleos crus imaturos, óleos biodegradados, frações e óleos pesados frequentemente apresentam ácidos orgânicos presentes em sua constituição.²⁵ Isso confere aos ácidos carboxílicos uma importante aplicação como fonte de informação geoquímica estreitamente correlacionada à origem e ao grau de biodegradação do petróleo.^{9,29,30,31,32}

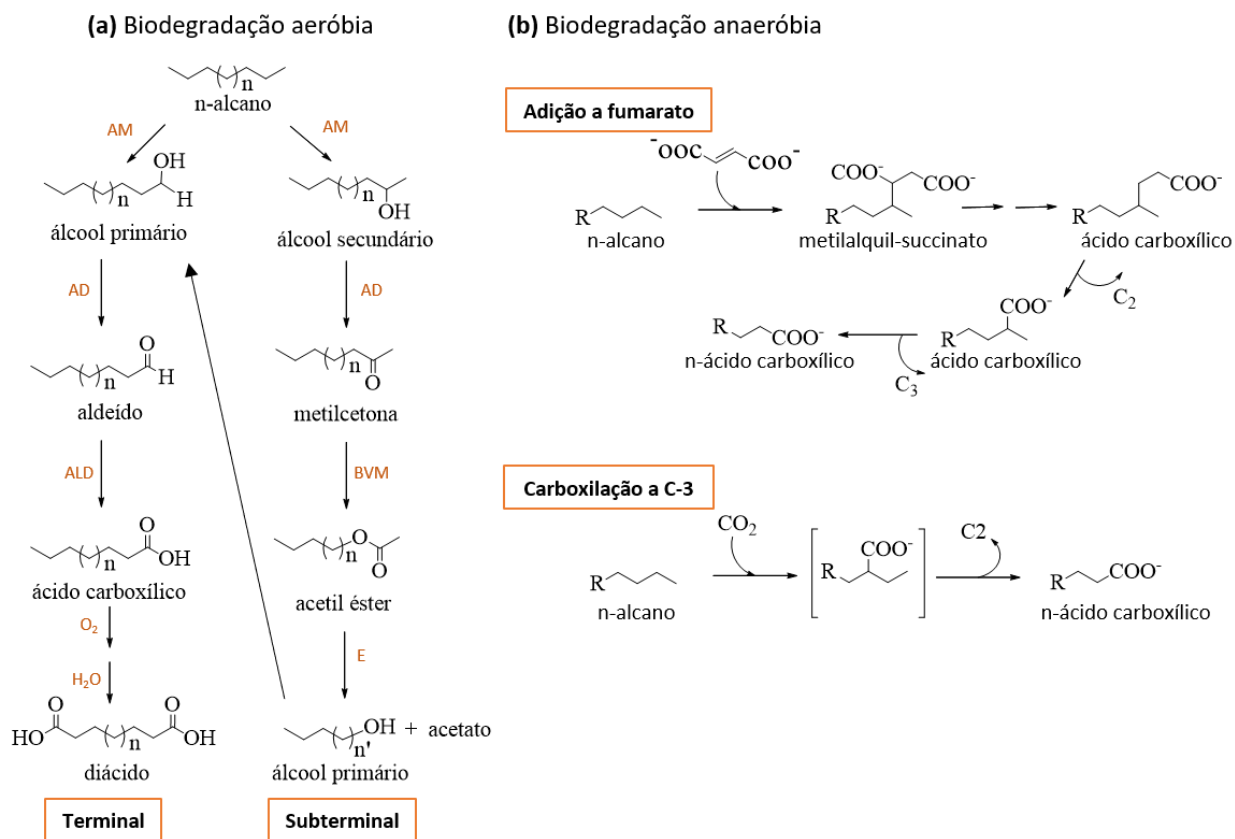


Figura 2. Formação de ácidos carboxílicos (ANs) a partir da degradação aeróbia **(a)** e anaeróbia **(b)** de n-alcenos em petróleo (adaptado de ref. 25,27,28).

Na indústria do petróleo, os ANs são potencialmente úteis na melhoria da recuperação do óleo³³ e seus derivados podem ser utilizados como aditivos de combustível para combustão aprimorada.⁵

Essas espécies podem ser utilizadas como padrões de referência para a simulação e avaliação dos efeitos dos ANs e seus derivados em sistemas de produção de petróleo, com vista nos processos que envolvam a corrosão naftênica^{21,34} e o equilíbrio na interface óleo e água (o/a),^{1,11,35,36} bem como as suas atividades interfaciais a fim de avaliar a previsão, mitigação e formação de emulsões, naftenatos^{1,36,37,38,39,40,41} e assim compreender os processos de recuperação e produção de petróleo.

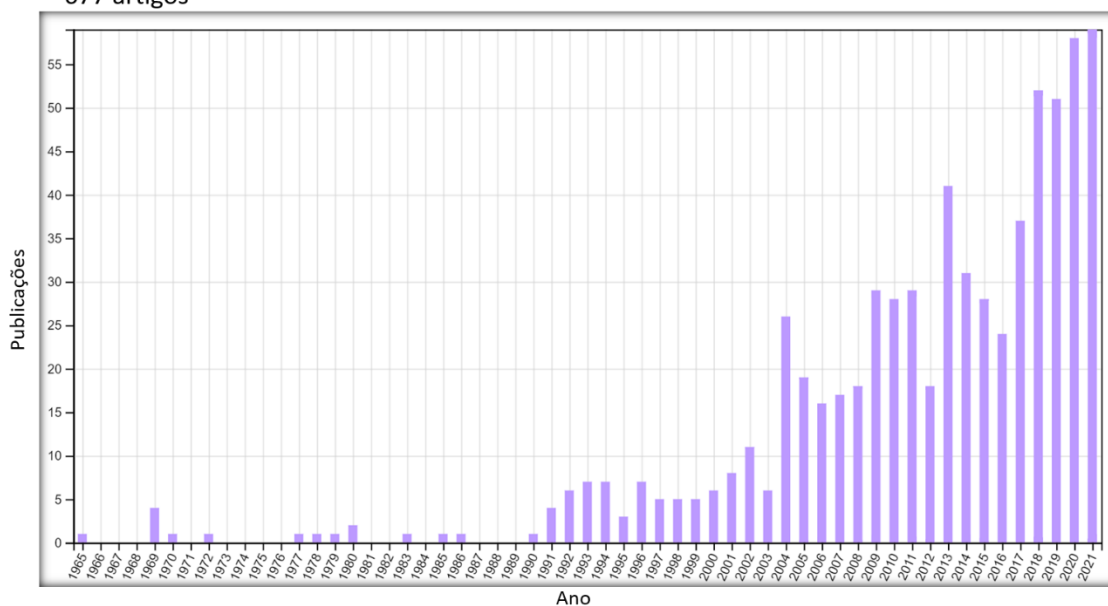
Dentre outras aplicações, os ANs e seus derivados (ésteres e sais metálicos, naftenatos) são ainda utilizados na indústria como lubrificantes, emulsificantes, secadores de tinta, agente catalisadores oxidativos, conservantes de madeira e etc.^{4,5,14} Desta forma, estão disponíveis comercialmente em quantidade, variedade e pureza limitado sendo, em geral, recuperados a partir do petróleo. A composição e pureza da preparação comercial dependem da origem do petróleo e do processo de refino utilizado.⁴²

1.3 Revisão da literatura a respeito dos ANs

A presença ANs no petróleo tem sido relatada desde meados dos anos de 1870,⁴³ porém somente na década 1960 a estrutura fundamental dos ANs foi determinada.⁴² Destarte, até antes da década de 90 havia moderado número de trabalhos publicados sobre o ANs no petróleo.⁴⁴ A expansão do número de publicações sobre o tema ocorreu próximo aos anos 2000, devido a necessidade de exploração das reservas de petróleo não convencionais (com significativo teor de ANs), gravidade API < 20,⁹ em declínio das reservas de petróleo convencionais.^{8,44}

A esse respeito, uma consulta bibliográfica, de caráter exploratório foi realizada na base *Web of Science* utilizando os termos “*Carboxylic acids*” ou “*Carboxylic acid*” e “*petroleum*” ou “*crude oil*”, entre os anos de 1945 e 2021 (**Figura 3a**). Os termos foram buscados nos títulos, resumos e palavras-chave dos artigos, que salientou um crescente número de registros relacionados ao assunto, com 677 artigos científicos encontrados. Analogamente, Fernandes *et al.*⁴⁴ realizaram uma busca utilizando os termos (“*Naphthenic acids*” ou “*Naphthenic acid*”) e (“*petroleum*” ou “*crude oil*”), salientando que até 2018 foram encontrados 517 artigos naquela base de pesquisa. Aqui, a partir da mesma fonte e termos de busca, utilizados por aqueles autores, foi possível notar a continuidade progressiva do número de trabalhos catalogados, alcançado um número total de 750 artigos científicos, **Figura 3b**. Sendo que apenas no último ano (2021) foram registrados 50 artigos e 2697 citações relacionados ao assunto.

(a) Publicações por ano usando os termos (“*Carboxylic acids*” ou “*Carboxylic acid*”) e (“*petroleum*” ou “*crude oil*”) 677 artigos



(b) Publicações por ano usando os termos (“*Naphthenic acids*” ou “*Naphthenic acids*”) e (“*petroleum*” ou “*crude oil*”) 750 artigos

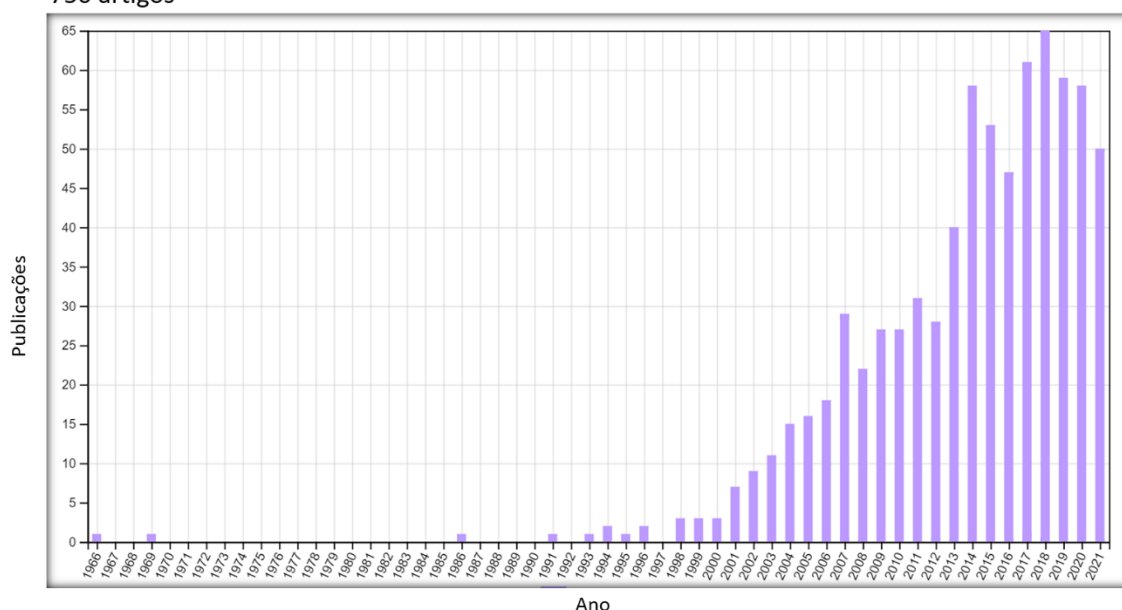


Figura 3. Número de publicações por ano. Fonte *Web of Science*. Acesso em 12 de fevereiro de 2022.

Atendendo os mesmos critérios de pesquisa bibliográfica exploratória, os dados foram exportados no formato BibTex e analisados no software RStudio com a ferramenta bibliometrix^{45,46}. O gráfico gerado (**Figura 4**) salientou as principais relações entre as palavras-chaves, autores e países de artigos científicos que envolvem os ANs no petróleo, entre os anos de 2011 e 2021, a partir de um total de 555 artigos e 1595 pesquisadores.

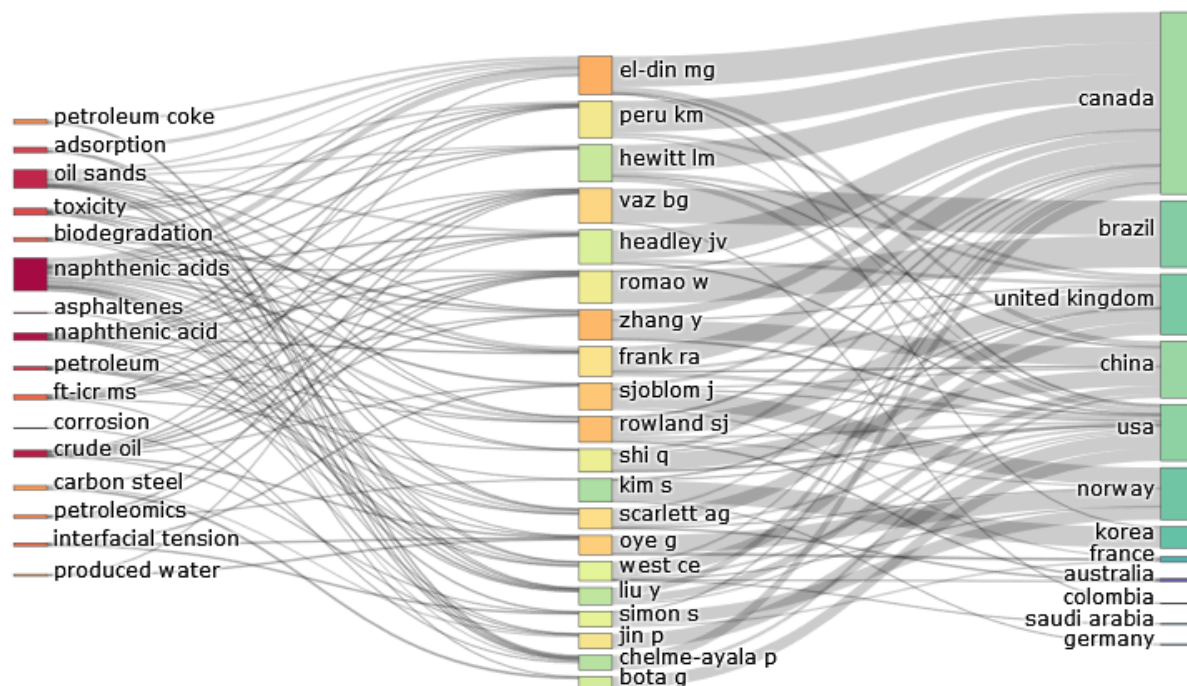
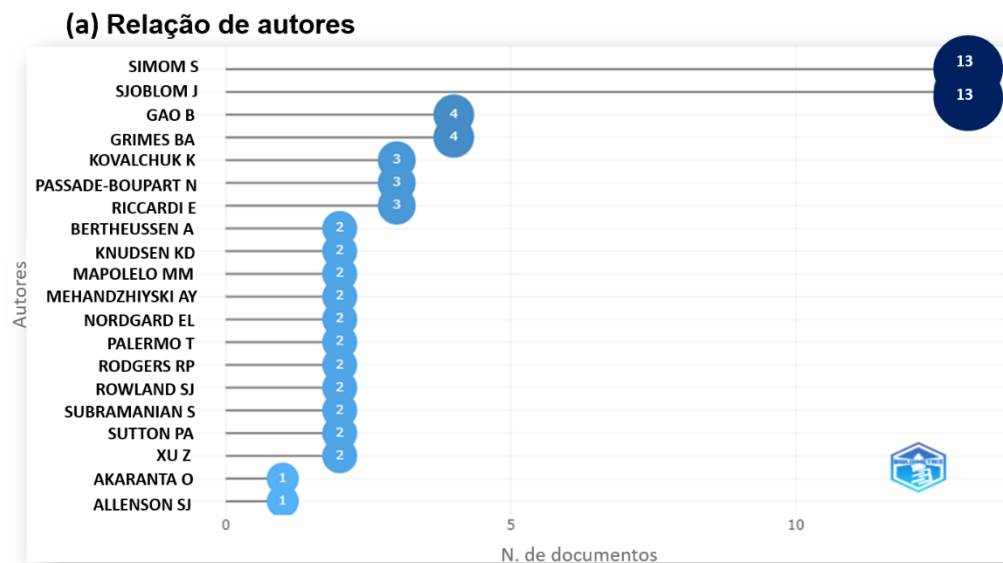


Figura 4. Principais relações entre palavras-chaves, autores e países de artigos científicos que envolvem os ANs no petróleo a partir da busca realizada na base *Web of Science*, entre os anos de 2011 e 2021, com documentos do tipo “artigo”. Gráfico formulado pela plataforma *Bibliometrix*. Acesso em 13 de fevereiro de 2022.

No que diz respeito a ácidos ARN, de maneira análoga a descrita anteriormente, uma nova consulta exploratória pela *Web of Science* e a análise bibliométrica foram realizadas,⁴⁵ utilizando os termos (“*tetrameric*” ou “*tetraacids*” ou “*ARN*”) e (“*naphthenate*” ou “*naphthenates*”), que revelou a existência de 60 pesquisadores envolvidos em 25 artigos científicos com o tema entre os anos 2011 e 2021, **Figura 5.**



(b) Rede de colaboração

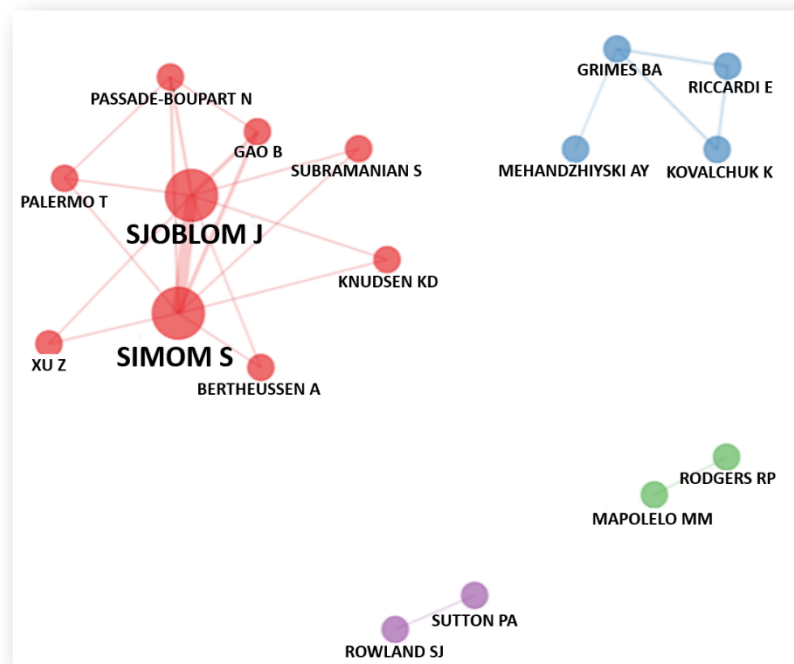


Figura 5. Análise bibliométrica a partir da busca dos termos "*tetrameric*" ou "*tetraacids*" ou "ARN" e "*naphthenate*" ou "*naphthenates*" realizada na base *Web of Science* entre os anos de 2011 e 2021, com documentos do tipo "artigo": Fonte *Web of Science*. Acesso em 13 de fevereiro de 2022, com documentos do tipo "artigo": **(a)** Relação de autores e **(b)** Rede de colaboração. Gráfico formulado pela plataforma *Bibliometrix*.

1.4 Caracterização e obtenção dos ANs em matrizes relacionadas a petróleo

A avaliação acerca do conteúdo ANs em petróleo e derivados pode ser dada em termos de número de acidez total (NAT), que é definido como a quantidade em miligramas de hidróxido de potássio necessária para neutralizar um grama de amostra de óleo.⁴⁷ No entanto, a medida do NAT não se correlaciona necessariamente, com o teor de ANs, pois este parâmetro não fornece informações precisas a respeito da composição molecular dos ANs e demais espécies ácidas presentes no petróleo.^{12,29}

Nesta perspectiva, a literatura destaca os progressos existentes na instrumentação analítica para análise de ANs.^{48,49} Gruber *et al.*⁴⁹ declararam que na química do petróleo tradicionalmente são empregadas as técnicas de FTIR (espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier) e RMN (Espectroscopia de ressonância magnética nuclear) para análise de frações ácidas.

Por outro lado, Parisotto *et al.*⁵⁰ argumentam que a FTIR oferece vantagens como menor pré-tratamento das amostras e análise mais rápida com relação a medida do NAT.⁵⁰ Em seu trabalho os autores combinaram a técnica de FTIR com a análise multivariada de dados, de modo a melhorar a qualidade dos dados obtidos superando problemas relacionados à sobreposição de sinais, para determinar o NAT em resíduos de destilação atmosféricas e destilação a vácuo. O modelo construído apresentou um coeficiente de correlação de 0,991 entre os valores de referência e previstos, sugerindo a aplicação em controle de qualidade em processos industriais com vantagem quando comparado ao método normatizado.^{47,50}

A FTIR é uma técnica analítica popular, devido a capacidade de fornecer informações acerca da vibração do grupo carboxila e de outros grupos funcionais que possam estar presentes nos ANs. Inclusive a técnica pode ser usada para determinação desses ácidos em águas residuais de refinarias de petróleo e plantas de extração de areias betuminosas,⁵¹ extraíndo-os em cloreto de metileno e medindo a absorção do grupo carboxila.⁵¹

A RMN tem uma importante contribuição na literatura científica na compreensão de ANs.^{21,40,52,53,54,55,56} A técnica é uma poderosa ferramenta que oferece uma boa resolução espectral adequada para o estudo de misturas complexas, que utiliza as propriedades magnéticas dos núcleos para a determinação do tipo, número e das posições relativas de certos átomos de uma molécula.^{57,58}

A RMN atribui os benefícios de uma análise rápida e não destrutiva.^{57,58} Em vista disso, Barbosa *et al.*⁵² empregou a técnica para a construção de modelos de regressão para prever a acidez de petróleo crus como alternativa menos laboriosa ao método tradicional⁴⁷ de determinação do NAT que utilizam solventes orgânicos tóxicos, procedimentos analíticos complexos e destroem a amostra.⁵²

A técnica espectroscópica de RMN é ainda importante para a caracterização de amostras com elevados valores de M_w , tais como, tais como asfaltenos e resinas,^{59,60,61} resíduos de vácuo,^{62,63,64} óleos brutos de petróleo^{21,58,80} e ARN.^{16,41,65,66}

Lutnaes *et al.*^{16,65} descreveram pela primeira vez estrutura de uma nova classe de octaterpeno ácidos tetracarboxílicos responsável pela deposição de naftenato no processamento de petróleo bruto¹⁶ e elucidaram da estrutura das séries homólogas de tetra-ácidos C_{80} (ARN) contendo 4-8 anéis e estruturas análogas C_{81} e C_{82} substituídos por metilo contendo 7 e 8 anéis de cinco membros.⁶⁵ Os autores apresentaram inclusive a regioquímica dos anéis naftênicos e até mesmo a configuração absoluta dos vários carbonos assimétricos separados por unidades isopreno.¹⁶

Simon *et al.*⁴¹ em seu trabalho de determinação de tetra-ácidos C_{80} em depósitos de naftenato de cálcio, propôs um cálculo do teor de ARN na presença de outros ácidos naftênicos pelas atribuições de sinais observados por Lutnaes e colaboradores,⁶⁵ que atribuem os entre 2,26 e 2,38 ppm aos 4 hidrogênios H_α para a carbonila de ARN.^{41,65}

Métodos cromatográficos também são usados no estudo desses ácidos.⁵¹ Yen *et al.*⁵¹ usaram um método aprimorado de cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* - HPLC) para detectar hidrazinas ANs em baixas concentrações ($\sim 5 \text{ mg L}^{-1}$) em efluentes de areias betuminosas, que provou ser mais simples, rápido e preciso do que o método FTIR.⁵¹

Por outro lado, devido as complexidades das matrizes, a baixa concentração de ANs nos petróleos crus e por vezes à ausência de cromóforos em sua estrutura, é comum na etapa anterior a análise cromatográfica, preconcentrar, isolar e submeter os ANs a estereificação a fim de aumentar a volatilidade, diminuir a polaridade, ou ainda, intensificar a sensibilidade de detecção.⁶⁶

Por intermédio da cromatografia gasosa associada à massa (GC/MS) é possível acompanhar as mudanças composicionais que ocorrem com as diferentes frações do óleo,²⁵ que inclui a identificação e quantificação de alguns ANs, como ácidos monocarboxílicos acíclicos, ácidos tri e pentacíclicos (hopanóicos), que são úteis para determinar a origem e o grau de biodegradação do petróleo.⁶⁷

Damasceno *et al.*⁴⁸ realizaram uma comparação entre três técnicas cromatográficas demonstrando suas aplicabilidades na análise de uma mistura de técnica de ANs disponível comercialmente. Os autores argumentaram que a técnica cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas quadrupolar (GC-qMS), que é mais barata e amplamente utilizada na análise de ANs esterificados, apresentou um bom desempenho. Enquanto a técnica de MS sequencial com ESI (ESI-MS/MS) mostrou-se promissora, por ser uma análise rápida e proporcionar uma classificação preliminar (como uma impressão digital, *fingerprint*) das misturas petroquímicas, por um perfil geral de cada amostra.⁴⁸ Em relação as demais, a técnica de cromatografia gasosa bidimensional aliada a espectrometria de massas de tempo de voo (GCxGC/TOF-MS) apresentou uma avaliação minuciosa dos diferentes componentes de cada amostra de ANs esterificada.⁴⁸

Rowland *et al.*⁶⁸ empregaram a GCxGC/TOF-MS (**Figura 6a**) para caracterizar uma mistura de ANs comercial, obtidos a partir de petróleo. Os resultados revelaram que as distribuições de ácidos no petróleo e no OSPW são muito diferentes, embora alguns ácidos diamantóides tenham sido identificados em ambos.⁶⁸ Isso é promissor, pois por um século a maioria dos membros individuais de misturas complexas de ANs encontradas no petróleo permaneceram não resolvidas pelos métodos convencionais de cromatografia gasosa.⁶⁸

Nesta perspectiva, encontra-se a GCxGC como uma técnica analítica conhecida e poderosa indicada para a caracterização de amostras complexas. A seletividade e sensibilidade superiores a 1D-GC podem ser atribuídas, respectivamente, ao conjunto de colunas cromatográficas ortogonais e ao sistema de modulação, que permite observar o efeito nos diagramas de cores, classificando os compostos de forma ordenada em dois espaços dimensionais de acordo com suas características químicas.⁴⁸

Quando combinado com TOF-MS, GCxGC torna-se uma excelente escolha de estratégia de identificação e quantificação de analitos,⁶⁸ permitindo resolver problemas que culminam em uma mistura complexa não resolvida, UCM (do inglês *unresolved complex mix*), **Figura 6b**. Tal fenômeno é frequentemente observado durante a cromatografia gasosa de amostras petroquímicas devido a muitos isômeros ou compostos semelhantes com tempos de retenção semelhantes.⁴⁸

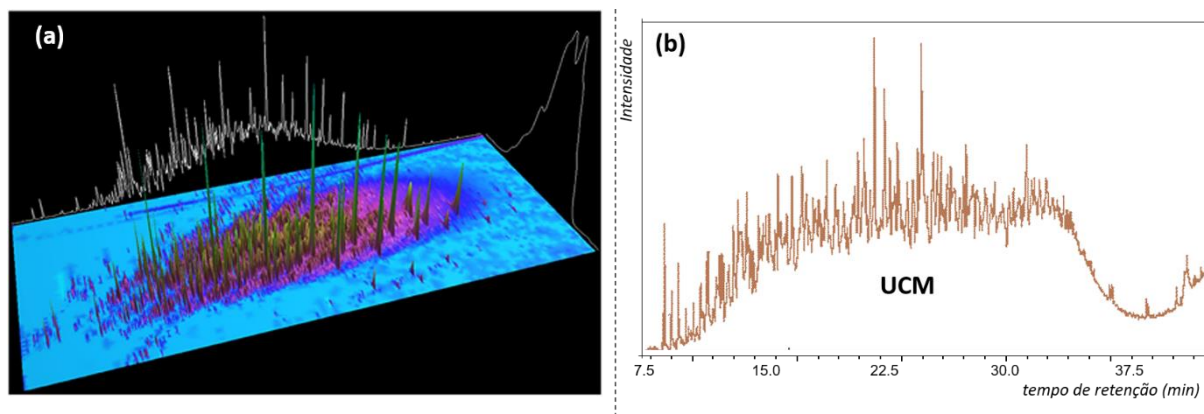


Figura 6. Cromatogramas obtido por **(a)** GC/qMS resultante da análise de uma mistura técnica de ANs derivatizada, onde se observa uma perda na resolução cromatográfica, indicada pela linha de base elevada, resultante de uma UCM adaptado de 48 e **(b)** GCxGC/ToF-MS resultante da análise de ésteres metílicos de ácidos naftênicos ANs, onde as cores indicam a intensidade das respostas (verde>amarelo>rosa), adaptado de Rowland *et al.* 69.

Rowland *et al.*⁶⁹ também discorrem acerca do desempenho de técnicas na caracterização de ANs e afirmam que a cromatografia gasosa (GC) proporciona uma melhor resolução do que os métodos de cromatografia líquida (*liquid chromatography* - LC), mas estão limitados a compostos voláteis (ponto de ebulição < 330 °C).⁶⁹ Em alternativa, a cromatografia a gás de alta temperatura (HTGC) pode auxiliar na análise de espécies moderadamente voláteis, mas a decomposição térmica pode ser um obstáculo na análise dos ANs.⁷⁰

Quanto a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) os autores alegam que apesar da capacidade de isolar e separar frações de ANs, a técnica com detecção espectroscópica não alcança a resolução adequada para misturas complexas de ANs, mas a espectrometria de massas de ultra-alta resolução (UHR-MS) poderia resolver os sinais espectrais.⁷⁰

A aplicação da UHR-MS na elucidação dos ANs envolve o campo da denominada petroleômica, que trata da relação entre a composição química de um combustível fóssil e suas propriedades e reatividade,⁷¹ mas é frequentemente definida como a caracterização molecular detalhada de amostras relacionadas ao petróleo por espectrometria de massas de alta resolução.⁷²

Ainda sob a perspectiva crescente de trabalhos nos anos 2000, o estudo de Hsu *et al.*² se destaca como o pioneiro a fazer uso da espectrometria de massas (MS) na caracterização de ANs em petróleo cru e frações ácidas isoladas a partir do petróleo.^{2,72} No entanto, os trabalhos de Qian *et al.*¹² e Barrow *et al.*⁷³ foram os primeiros a empregar UHR-MS⁷² e atestar que a espectrometria de massas com ressonância de íons com transformada de Fourier (FT-ICR MS) como uma técnica adequada para a elucidação dos ANs.⁷² A FT-ICR MS aliada à ionização por *eletrospray* no modo negativo, ESI(-), é essencial para a caracterização daquelas espécies, por sua notável ionização “suave” que proporciona às espécies polares e ácidas,⁷² as quais são seletivamente desprotonadas, pela adição de um reagente básico,⁷⁴ gera íons quasimoleculares, do tipo $[M-H]^-$, à pressão atmosfera, sem fragmentação extensa ou interferência de matriz.²²

Um espectro de ESI(-)FT-ICR MS pode alcançar um poder de resolução na ordem de dez milhões (10.000.000) e uma exatidão menor do que 1 ppm, detectando espécies iônicas ou fortemente polares com a capacidade máxima necessária para separar os componentes individuais com uma quantidade mínima de amostra.⁷⁴

Entretanto, a aplicação bem-sucedida do FT-ICR MS na caracterização molecular detalhada de amostras relacionadas ao petróleo (petroleômica)⁷² é possível, em parte, a avanços nos métodos de processamento de dados.⁷⁵

Isso porque avaliar um espectro de massas de uma amostra de petróleo não é uma tarefa simples, pois pode conter até 100.000 sinais para serem interpretados.⁷⁶ Neste sentido, histogramas e gráficos de DBE *versus* número de carbonos (NC) são ferramentas úteis para estimar a intensidade relativa das classes e diferenciar de misturas orgânicas complexas baseadas na composição química.

Estas estruturas podem ser relacionadas com o número de anéis e duplas ligações (*double bond equivalent* – DBE) presentes na estrutura de uma molécula que é calculado a partir da **equação 1**.

$$DBE = C - \frac{H}{2} + \frac{N}{2} + 1 \quad (1)$$

Sendo que C, H e N representam, respectivamente, NC, de hidrogênio e nitrogênio presentes na fórmula molecular de um composto. Em outras palavras, o DBE descreve o número de pares de hidrogênios que são removidos da fórmula “saturada”, assim uma molécula de DBE = 0 é totalmente hydrogenada e a adição de insaturações ou anéis aromáticos resulta na perda de pares de hidrogênios e no consequente aumento do DBE.¹⁷

A fim de entender esta problemática, construiu-se a **Figura 7** que exibe o espectro de ESI(-)FT-ICR MS de um petróleo cru de um campo de produção localizado na bacia sedimentar da costa brasileira, com um perfil gaussiano com m/z 200-800 e $M_w = 447,4$ Da. Por meio de um software (*Compass DataAnalysis* 4.0, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) foi possível identificar 23.951 fórmulas moleculares. A expansão do espectro em m/z entre 400-420 permite observar sinais da classe O_2 (monoácidos). Os dados obtidos a partir das análises de ESI(-)FT-ICR MS foram processados (pelo software *Composer* (Sierra Analytics, Pesadena, CA, EUA), que possibilitou a construção do histograma de classe de compostos e do gráfico de contornos de isoabundância de DBE versus NC (**Figura 7**).

Assim foi possível verificar a predominância da classe O_2 (~80%), justificado pelo NAT (2,1 mg KOH g⁻¹) deste petróleo ácido. Além disso, de forma simples e prática, o gráfico de DBE versus NC (*insert Figura 7*) facilitou a apreciação dos sinais da classe O_2 , em que cada linha horizontal do diagrama representa uma série homóloga com um valor de DBE específico, revelando a variação de DBE de 1-12 e NC de C₁₇₋₅₀, com abundância dos compostos com DBE de 4-5 e C₂₈₋₃₄.

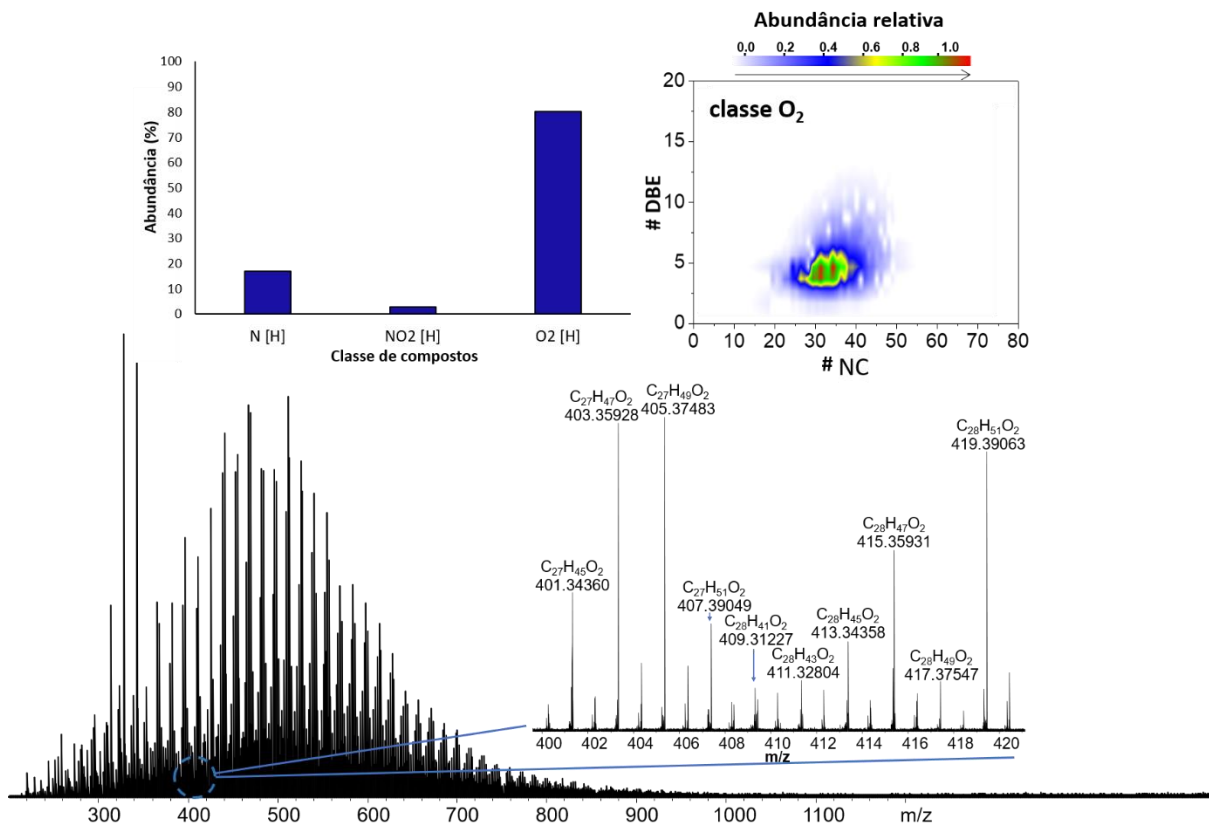


Figura 7. Espectros de massas ESI(-)FT-ICR de um petróleo brasileiro. A expansão mostra os valores da massa experimental e a fórmula molecular das espécies de ANs identificadas em m/z 400-420. Inserido no topo mostra o histograma de classe de compostos e o gráfico de DBE vs NC, respectivamente.

Nesta conjuntura, Qian *et al.*¹² empregou a ESI(-)FT-ICR MS que viabilizou a identificação de ácidos de diferentes composições elementares, contendo O₂, O₃, O₄, O₂S, O₃S e O₄S, no petróleo cru.¹² Smith *et al.*⁷⁷ avaliaram oito frações de destilação a vácuo de óleo pesado (HVGO) de um betume. Os resultados do FT-ICR MS revelaram que as espécies alifáticas da classe O₂ estão presentes em todas as faixas de destilação e que o DBE e o CN aumentam em função do aumento da temperatura.

Nesta perspectiva, Dalmaschio *et al.*⁷⁸ empregou a ESI(-)FT-ICR MS para a caracterização química de compostos polares de amostras oriundas de um sistema de destilação. Os autores reconheceram 122 espécies de ANs com variação de m/z de 153 a 421 e constataram que quanto maior a temperatura do corte de destilação, maior a distribuição da média de M_w e conteúdo de ANs, que contribuíam para o aumento da acidez dos cortes de petróleo. De acordo com os resultados de ESI(-)FT-ICR MS as espécies de ANs foram detectadas em 11 cortes (cortes 2-12) dos doze avaliados.

A **Figura 8a** mostra os espectros de massa dos cortes obtido no estudo de Damaschio *et al.*,⁷⁸ indicando que o m/z para as espécies $[M-H]^-$ com maior população de compostos polares, em especial a classe fenólica (classe O) e a classe de ANs (classe O₂), cresce com o aumento da temperatura de corte e da acidez. O trabalho apresenta, ainda, a estratégia de espectrometria de massas tandem (MS/MS), que foi útil para identificar os ANs a partir de seus padrões característicos de fragmentação, na **Figura 8b** o íon $[C_{11}H_{22}O_2-H]^-$ de m/z 185,1549 e DBE = 1, revela as perdas características e confirma a existência de compostos da classe O₂ como ácidos carboxílicos.⁷⁸

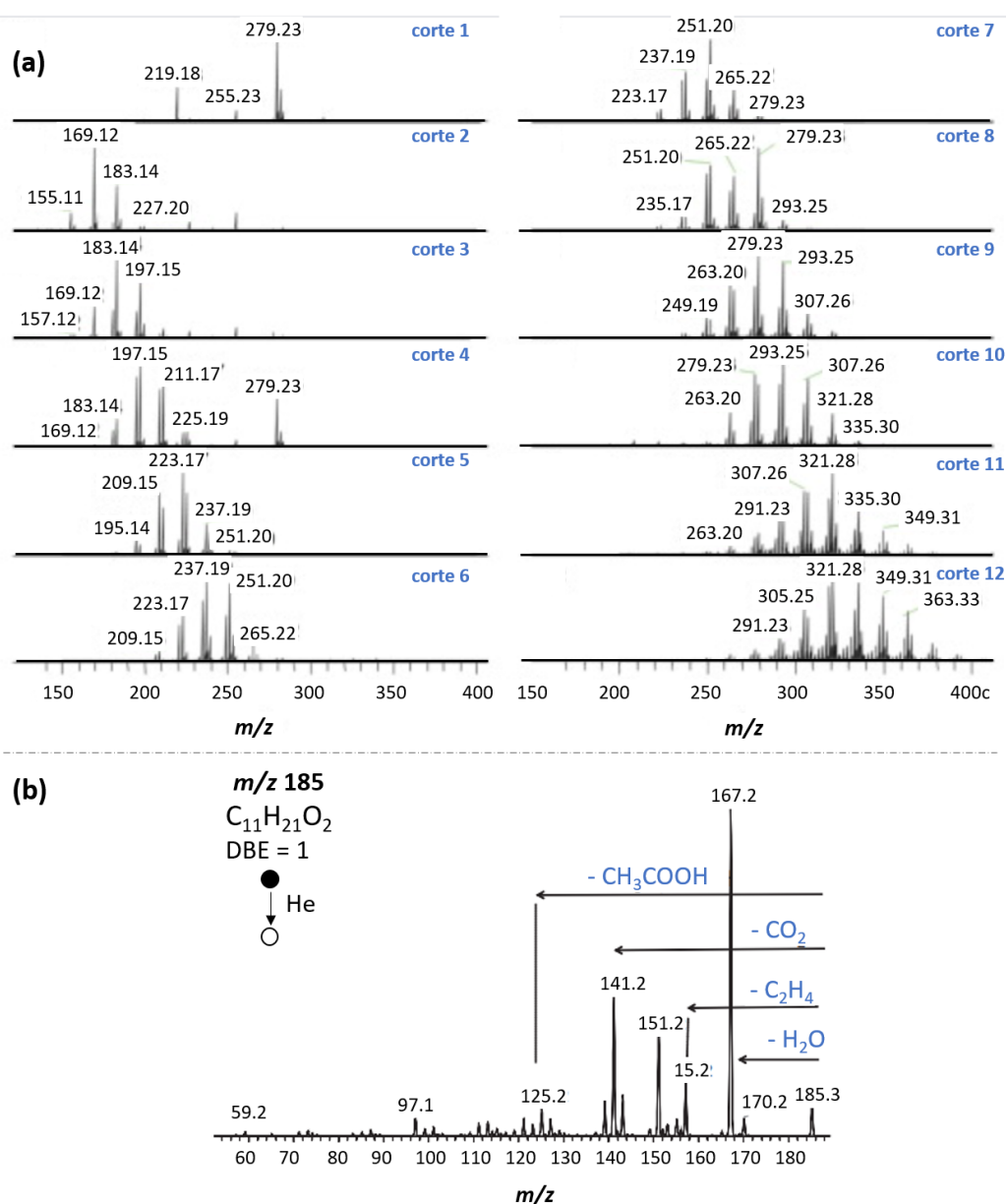


Figura 8. Espectro ESI(-)-MS/MS do íon típico da classe O₂. Note que o íon de m/z 185.1549 produz fragmentos com m/z 167, 141 e 125, que correspondem às perdas de 18 Da (H₂O), 44 Da (CO₂) e 60 Da (CH₃CO₂H, ácido acético). Adaptado de Damaschio *et al.* 78.

A espectrometria de massas de alta resolução também foi aplicada por Dias *et al.*⁷⁹ ao monitorar a degradação térmica de um petróleo ácido. Os pesquisadores notaram uma significativa redução da acidez (80%, m/m) em função do tempo de degradação e que atribuíram a descarboxilação do ANs em contraste com as espécies de enxofre que permaneceram estáveis. Os dados de ESI(-)FT-ICR MS também revelaram uma redução M_w conferida a remoção das espécies de ANs no petróleo degradado termicamente.

Smith *et al.*⁷⁰ avaliaram o efeito térmico em espécies orgânicas ácidas de óleo betuminoso HVGO por FT-ICR MS. Os autores concluíram que as reações de descarboxilação são responsáveis pelas grandes alterações no NAT. Além disso, os pesquisadores explicaram que a redução significativa da NAT foi mais evidente principalmente quando o tratamento térmico em temperaturas mais altas, $T > 350\text{ }^{\circ}\text{C}$, é realizado.⁷⁰

De maneira análoga, Barros *et al.*⁸⁰ avaliaram as propriedades físico-químicas e o comportamento a nível molecular de um petróleo ácido submetido a degradação térmica a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ em função do tempo. Os resultados de HTGC e RMN indicaram que a fração saturada praticamente não é afetada durante o estresse térmico. Os resultados de ESI(-)FT-ICR MS indicaram um aumento do número de DBE e a redução da distribuição de M_w devido a desagregação de resinas e asfaltenos, e também ao processo de descarboxilação térmica de ANs.

Neste sentido, Barros *et al.*,²¹ aplicando uma metodologia de extração de ANs em função de M_w , investigaram o comportamento dessas espécies em um petróleo tipicamente brasileiro submetido à um estresse térmico. Os dados de ESI(-)FT-ICR MS (**Figura 9**) mostraram que no óleo degradado por 72 horas foram produzidas apenas cinco frações ácidas com variação de $M_w = 382,2$ e $831,2$ Da, enquanto no óleo original, as ANs estavam presentes em seis frações ácidas, com valores de M_w diferentes (359 - 867 Da). Os autores esclareceram que os a fração de ANs de maior M_w (fração ácida 6) foram seletivamente craqueados durante o processo de degradação produzindo espécies com menores números de carbonos, conforme o mecanismo mostrado na **Figura 9**.

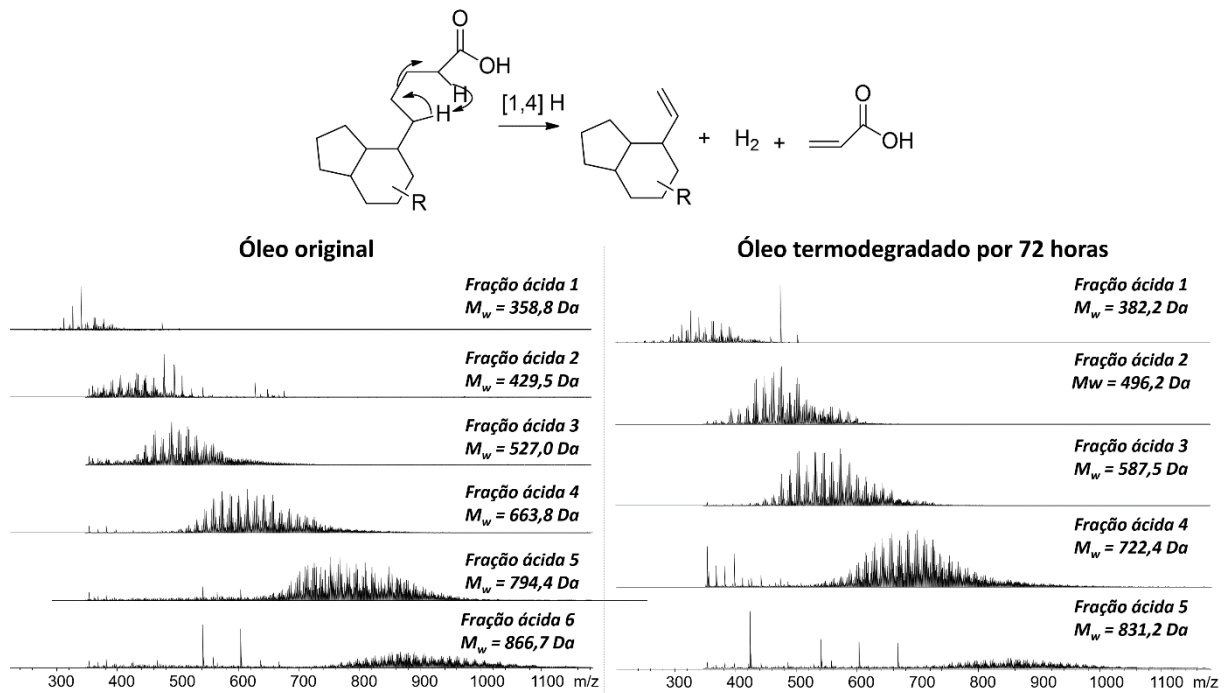


Figura 9. Formação de espécies com menor número de carbonos pelo craqueamento de ANs via um rearranjo [1,4] descrito por Barros *et al.*²¹ Adaptado de ref. 21.

Dentro do vasto número de publicações, existe uma diversidade de instrumentação analítica para a elucidação de ANs em petróleo e derivados, as quais estão em destaque na **Tabela 1**.

Tabela 1. Instrumentação analítica aplicada a caracterização de ANs em matrizes relacionadas a petróleo.

Técnica analítica		Referência
FTIR		40, 55, 73, 81, 82, 83, 84, 85, 86
RMN		21, 40, 52, 53, 54, 55,56
HPLC-*		24, 53, 55,56,51
HTGC		80, 74, 87
GC		56, 88, 89
Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	GC-GC	48, 68
		3, 88, 90, 91,92
Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)		93
Espectrometria de massas (MS)	Armadilha de íons <i>(ion-trap)</i>	53
	Tempo de voo <i>Reflecton</i> (TOF)	48, 94, 95
	Quadrupolo	48, 96
	Orbitrap	66, 97
	FT-ICR	3, 8, 12, 21, 22, 40, 66, 70, 82, 83, 85, 94, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105

*MS ou analisador com detecção por ultravioleta (UV).

O interesse da comunidade científica aliado ao surgimento de novos métodos analíticos contribuíram para os avanços nas análises de caracterização desses ácidos^{8,44} em diferentes matrizes relacionadas ao petróleo. Neste âmbito, pela combinação de algumas técnicas analíticas, Baugh *et al.*¹⁵ descobriram a presença de um grupo específico de ANs tetraméricos de alta M_w , por vezes denominados de ARN, como constituintes majoritários nos depósitos de naftenatos.

Contudo, devido à complexidade da composição do petróleo e de outras matrizes a ele relacionadas, é cada vez mais comum realizar separações prévias *offline* ou *online* de analitos de amostra antes das análises.⁷² Dentre os métodos de separação dos ANs, a literatura destaca a extração por fluido supercrítico, e os métodos clássicos de separação como a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* - LLE)^{21, 53, 82, 83, 90, 106, 107} e a extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE).^{2,12,21,40,56,66, 70,86,87,89,92,94,95,102,103,105,108,109}

A LLE com soluções hidroalcoólicas alcalinas é uma técnica eficiente e amplamente empregada na remoção de AN. Empregada por diferentes grupos de pesquisadores, como Seifert *et al.*,¹¹⁰ Hemmingsen *et al.*,¹¹¹ e Colati *et al.*⁸² Neste âmbito, Colati e colaboradores relatam ter alcançado uma boa seletividade e eficiência de remoção dos ácidos, (~90%) em pH 14. Apesar da operacionalidade e custo relativamente baixo, o emprego deste processo envolve grande volume de solventes e sua eficiência pode ser prejudicada em amostras com baixa concentração de analito devido susceptibilidade de formar emulsões estáveis.^{49,56}

Por outro lado, a SPE tem como principais características baixo consumo de solvente e capacidade de separar compostos de polaridades diferentes.⁴⁹ A respeito, Qian *et al.*¹² caracterizaram os ANs diretamente no petróleo cru por ESI(-)FT-ICR MS e ao combinar a técnica com a separação por SPE, notaram que o espectro de massa da fração ácida apresentou a relação sinal-ruído mais alta do que a amostra bruta e composição elementar mais ampla e detalhada, indicando que a pré-separação pode facilitar muito a detecção de componentes de menor concentração no petróleo cru.¹²

Saab *et al.*⁵⁶ propuseram um estudo quantitativo de ANs em petróleos crus. Aplicando inicialmente a LLE, os autores não obtiveram uma recuperação quantitativa dos ácidos.

Assim, desenvolveram um processo de separação por SPE, utilizando resina de troca iônica (QAE Sephadex A25) e derivatização da fração ácida, posteriormente quantificada por cromatografia gasosa.

A SPE é uma técnica de extração por sorção,¹¹² que adota a adsorção e a eluição seletiva para separar, enriquecer e purificar analitos.¹¹³ A técnica emprega a separação sólido-líquido, sendo que a fase sólida (sorvente) pode ser encontrada, inclusive, comercialmente.¹¹²

Zhu *et al.*⁹² compararam a eficiência de extração, de ANs a partir do petróleo bruto, com diferentes sorventes e constataram que a sílica funcionalizada com amino (*amino-functionalized sílica* – AFS) apresentou uma performance superior, comparada a sílica funcionalizada com amina quaternária (*strong anion exchange* – SAX) e a sílica funcionalizada com ácido carboxílico (*carboxylic acid-functionalized sílica* – CAFs). Os autores atribuíram o desempenho da AFS as interações de ligação de hidrogênio/troca iônica de modo misto, diferente das adsorções dos ácidos em SAX (troca iônica) e CAFs (ligação de hidrogênio), **Figura 10**.⁹²

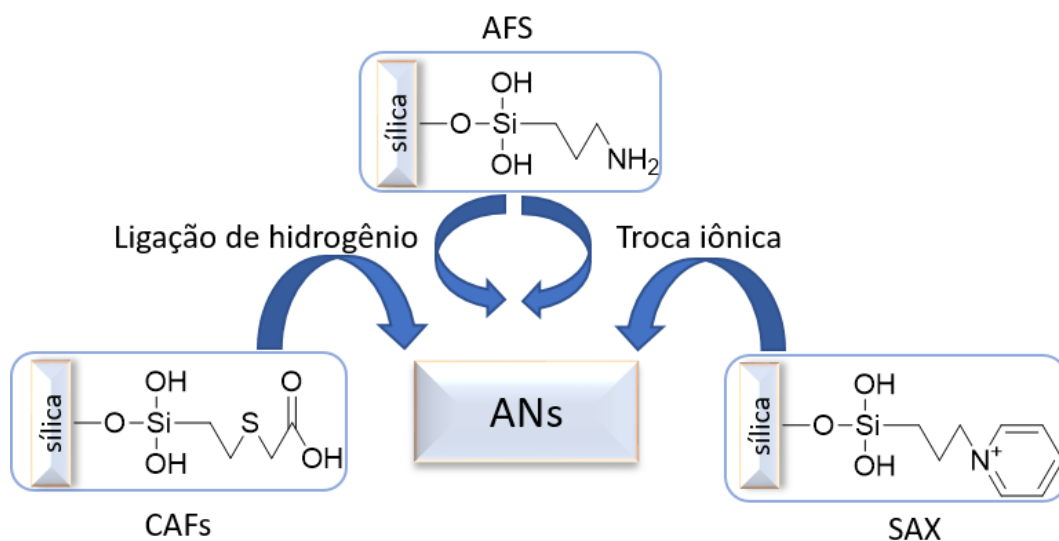


Figura 10. Esquemas das interações entre ANs e sorventes (adaptado de ref. 92).

Rowland *et al.*⁶⁹ desenvolveram uma metodologia de SPE, com AFS, para obtenção de ANs a partir de petróleo cru, que proporcionou separação por diferença de polaridade em função das distintas faixas de M_w . Nesta conjuntura, Barros *et al.*²¹ empregaram as metodologias propostas por Colati *et al.*⁸² e Rowland *et al.*⁶⁹ a fim de comparar a LLE com a SPE para obtenção de ANs a partir de amostras de petróleo.

Os resultados de ESI(-)FT-ICR MS, **Figura 11**, revelaram que a SPE se mostrou mais eficiente que a LLE para a recuperação daqueles ácidos. Barros e colaboradores²¹ enfatizaram que o método por SPE proporcionou uma maior seletividade e gama de compostos da classe dos ANs, sendo que o processamento dos espectros de massa atribuiu de um total de 253, 138 fórmulas moleculares para a classe O₂ às frações ácidas obtidas via SPE e LLE, respectivamente.²¹

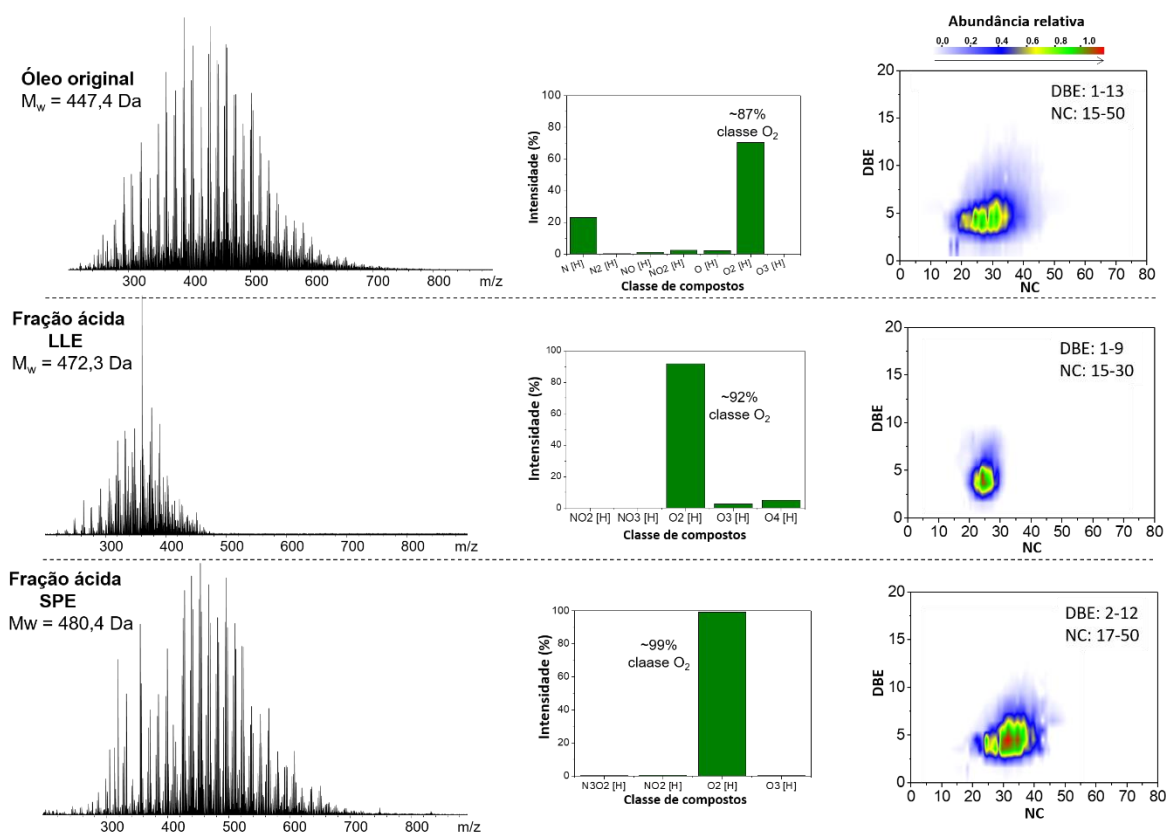


Figura 11. Espectros de massa ESI(-)FT-ICR, distribuição de classes de heteroátomos e gráficos DBE versus NC para a classe O₂ do óleo original e suas respectivas frações ácidas obtidas por: LLE e SPE. Adaptado de ref. 21.

Entretanto, métodos clássicos de separação, como LLE e SPE, têm sido substituídos por metodologias que sejam mais rápidas, seletivas e que minimizam o uso de solventes. A exemplo disso, Putman e Marshall¹¹⁴ desenvolveram um método de remoção de ácidos ARN, com a tradicional e bem estabelecida combinação de um monômero funcional, um agente de reticulação e um iniciador radicalar, que permitiu detectar baixas concentrações (subpartes por milhão) de ácidos ARN, demonstrando o potencial de polímeros molecularmente impressos para isolar uma ampla gama de membros dessa classe de compostos.¹¹⁴

Além disso, existe uma tendência analítica de substituição das técnicas clássicas de preparo de amostra por técnicas miniaturizadas,⁹² que são caracterizadas pelo baixo custo, alta eficiência, reduzida quantidade de solvente,^{92,115} além da possibilidade de automação.¹¹⁵

1.5 Fenômenos relacionadas aos ANs na produção de petróleo

Os ANs conferem um expressivo impacto na produtividade e consequente valor econômico ao petróleo cru, uma vez que pode favorecer além da corrosão de metais, a formação de sais de metais (naftenatos) que podem estabilizar emulsões (sais de Na) ou ainda precipitar (sal de Ca ou Mg, pouco solúveis), sendo o naftenato de cálcio o mais comum.^{26,116}

Além disso, existem relevantes questões ambientais com relação aos ANs pois algumas dessas espécies demonstraram ser tóxicas e cancerígenas, sendo as principais contaminantes de águas oriundas do processo de areias betuminosas e da descarga de água produzida a partir de instalações *offshore*.³⁵

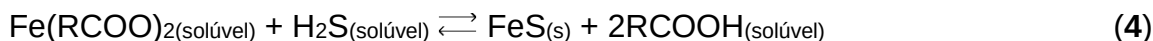
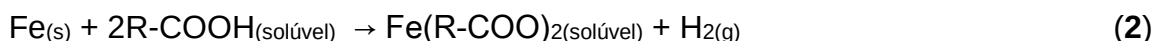
- **Corrosão naftênica**

Frequentemente o poder corrosivo de um petróleo é avaliado em termos de TAN. Petróleos com NAT superiores a 0,5 mg KOH g⁻¹ são considerados inadequados para processamento em refinarias tradicionais devido ao seu poder corrosivo, causada principalmente pelos ANs (corrosão naftênica).⁷¹

No entanto, é importante destacar que a medida do NAT não se correlaciona necessariamente, com sua corrosividade^{3,117} e demais espécies ácidas presentes no petróleo, embora tipicamente quanto maior o NAT mais corrosivo é o petróleo.^{42,70}

Neste âmbito, Dias e colaboradores¹¹⁸ avaliaram o poder corrosivo de amostras de petróleos crus de distintos valores de NAT (0,33 e 3,10 mg KOH g⁻¹) sob um tipo de aço inoxidável (AISI 316). Os resultados de ESI(-)FT-ICR revelaram que o petróleo cru de maior NAT apresentou maior concentração de espécies da classe O₂ (classe dos ANs) e maior poder de corrosão.¹¹⁸

O mecanismo reacional típico da corrosão naftênica no topo das torres de destilação¹¹⁹ que se inicia com a formação de um sal de naftenato de ferro $[\text{Fe}(\text{RCOO})_2]$, solúvel no petróleo, formado a partir do ataque de ANs $[\text{RCOOH}]$ ao ferro metálico $[\text{Fe}_{(s)}]$ presente na liga metálica **(2)**. Alguns compostos de enxofre, encontrados no petróleo, podem reagir diretamente com superfícies de aço, enquanto outros podem primeiro se decompor para formar sulfeto de hidrogênio $[\text{H}_2\text{S}]$ e atacar diretamente o metal produzindo o sulfeto de ferro $[\text{FeS}_{(s)}]$ **(3)**, que constitui de uma fina camada que protege parcialmente a superfície metálica de novos ataques corrosivos. Por outro lado, o naftenato de ferro pode, ainda, reagir com H_2S e reconstituir o ANs; na direção reversa, a alta concentração de ANs pode dissolver a incrustação de sulfeto liberando o naftenato solúvel **(4)**.^{79,118,119,120,121} Em suma, as duas reações **(2 e 3)** representam as principais reações corrosivas no óleo cru, um processo que continua devido à reação **(4)** quando espécies reativas são regeneradas e reintroduzidas no ciclo de reação corrosiva.



Por influência disso, é importante avaliar os valores de NAT, teor de S total, temperatura, fluxo de trabalho e o tipo de material presente na construção da refinaria como fatores que possam interferir no potencial corrosivo dos ANs.^{34,79,119,122}

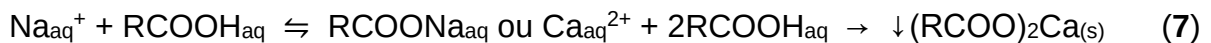
Além do tipo de enxofre e as possibilidades da formação de camada de passivação na superfície metálica,^{34,121} e ainda, o teor, a natureza estrutural e a M_w das espécies de ANs presentes no petróleo,^{121,123} devem ser considerados na corrosão naftênica.

Neste cenário, Dias *et al.*³⁴ combinaram técnicas microscópicas para estudar a influência da taxa de corrosão no comportamento morfológico de amostras de aço AISI 1020 submetidas à ensaios de degradação térmica em um óleo ácido (NAT ~ 2,14 mg KOH g-1). Após 6 horas de exposição das amostras ao petróleo submetido ao estresse térmico, uma película de passivação sobre a superfície do aço, sendo uma mais externa composta por FeS e outra por óxidos e oxihidróxidos de ferro (hematita, goethita e magnetita).³⁴ Todavia, a morfologia do aço foi alterada após 48 horas de degradação térmica, onde observaram uma única camada composta principalmente por cristais de FeS.³⁴

- Formação de emulsões

ANs são considerados surfactantes naturais do petróleo, que devido a sua natureza anfifílica, irão se particionar entre a fase de petróleo e água (coproduzida) e permanecerão na interface dependendo de parâmetros como tamanho molecular, estrutura e pH.^{1,11,35} Ademais, contribuem para a estabilização de emulsões como resultado da formação de sais de ácidos naftênicos monopróticos, os quais se agregarem as interfaces óleo/água (o/a), dependendo de várias condições, como composição da água, pH, pressão, temperatura e do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico do composto.^{1,11,23,35}

Assim, quando o petróleo cru entra em contato com a fase aquosa, os ANs dividem-se entre as fases o/a (5).¹²⁴ Após a partição na fase aquosa, os ácidos se dissociam formando prótons [H⁺] e ânions do tipo carboxílico [RCOO⁻], (6),^{1,35,124} que reage com cátions metálicos (Na⁺ ou Ca²⁺), presentes no meio, produzindo os sais de naftenatos (7).



- Deposição de naftenatos

Em contraste ao produto da reação entre o cálcio e um ácido naftênico monoprótico, que é disperso como partículas na fase oleosa,²³ os depósitos de naftenatos (polipróticos) ocorrem como um produto insolúvel devido à presença dos poliácidos do tipo ARN. Desta forma, analogamente, podemos descrever o comportamento das espécies ARN [H₄TA] em um sistema o/a, resumidamente, pelas equações de particionamento, dissociação e formação de naftenato de cálcio [Ca₂(TA)], (8, 9 e 10), respectivamente.^{23,125}



Devido as quatro terminações carboxílicas que possuem, os ARN têm a capacidade de realizar ligações cruzadas com íons cálcio e formar um gel interfacial, que produz um sal insolúvel, de estrutura polimérica, de comportamento “pegajoso” e alta atividade interfacial.¹²⁵ Estes depósitos curiosamente endurecem, quando expostos ao ar ou ao resfriamento,²² podem formar incrustações duras e sólidas que restringem a produção, tornando os sistemas de controle inoperantes,¹²⁶ **Figura 12.**

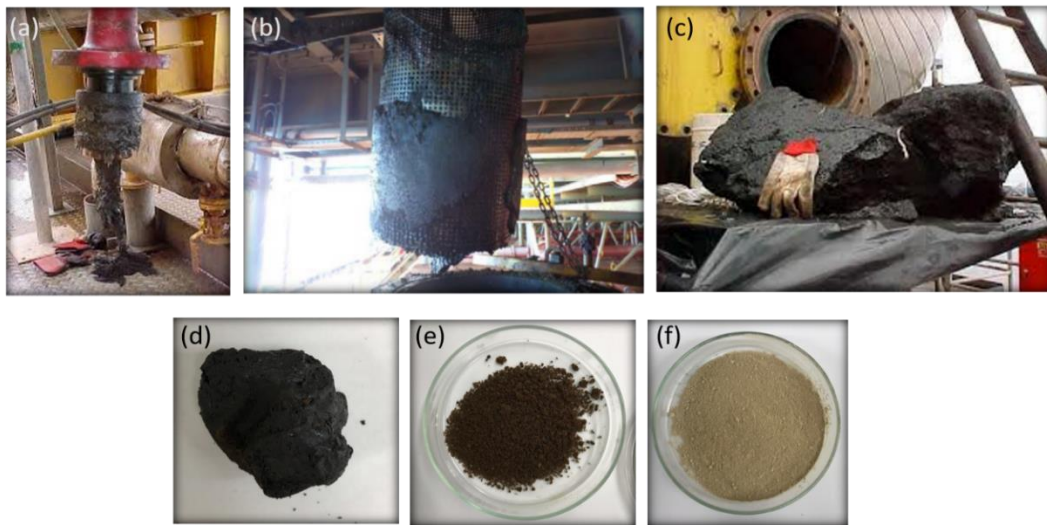


Figura 12. Imagens de depósitos naftênicos residuais em instalações de superfícies **(a)** válvula de controle de nível bloqueada,¹²⁶ **(b)** filtro de bomba de óleo obstruído,¹²⁷ **(c)** blocos sólidos de naftenato de cálcio removidos de um separador¹²⁶ e; imagem de uma das amostras de depósitos **(d)** com petróleo residual, **(e)** com petróleo residual macerado e **(f)** isento de petróleo, que foi utilizada neste estudo.

A deposição ocorre durante o transporte de fluidos do reservatório para as instalações de superfície, por meio de queda de pressão, que afeta o equilíbrio do ácido carbônico presente na água coproduzida. Isso provoca a liberação de dióxido de carbono aumentando o pH da água, que deve ser alto o suficiente para a dissociação dos ARN, que reagem com o íon cálcio,^{37,40,116,125,128} **(Figura 13)** levando à formação do gel interfacial na interface o/a.¹²⁸

A **Figura 13** mostra os diferentes equilíbrios químicos que levam à formação de ANs monopróticos e naftenatos de cálcio mono- e polipróticos.

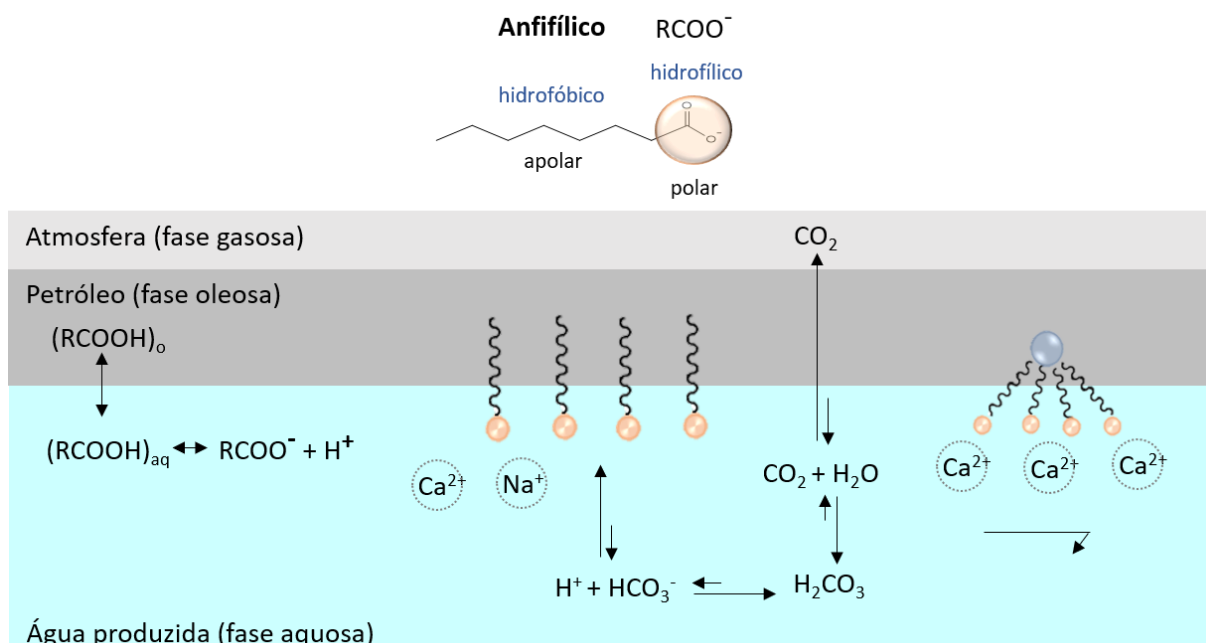


Figura 13. Ilustração esquemática do equilíbrio químico da formação de espécies de naftenatos a partir de moléculas vizinha de monoácidos e de ARN em conformação aranha.

Vindstad *et al.*¹²⁹ fizeram os primeiros relatos de problemas relacionados à deposição de naftenatos de cálcio, ocorridos em 1996, no campo de Heidrun, no Mar da Noruega, e descreveram como uma ameaça à continuidade da produção de petróleo.¹²⁹ A partir disso, este tipo de ocorrência tornou-se recorrente em campos produtores de petróleo de diferentes localizações geográficas.^{15,16,108,130,131,132,133,134,135} Inclusive no Brasil,^{66,74} onde os primeiros episódios de deposição aconteceram em 2011, em dois campos de produção diferentes.^{127,136}

Esses depósitos se acumulam nas instalações de superfície superfícies em sistema de operações, como um grave obstáculo para a garantia de um fluxo bem-sucedido na produção e processamento do petróleo cru, o que implica a sérios problemas e aumento dos custos operacionais. Sjöblom *et al.*¹³⁷ argumentam a respeito dos prejuízos econômicos gerados devido a necessidade de paradas não planejadas para remoção daqueles depósitos.¹³⁷ Os autores estimaram que, em 2014, em um campo produzindo 200.000 barris por dia a 100 dólar por barril representava uma perda de cerca de 20 milhões de dólares por dia de produção.¹³⁷

Simon *et al.*⁴¹ discorrem que devido as consequências econômicas, o ARN e seu fenômeno de deposição têm sido objeto de diversos estudos desde a sua descoberta em 2004.^{15,40} Desta forma, a ocorrência dos ácidos percussores destes depósitos (ARN) é um tema atual e preocupante para a indústria petrolífera. Uma vez que o fenômeno da deposição da naftenato de cálcio continua sendo desafiador na produção de petróleo mundial. No Brasil, inclusive, a presença de ARN é um fator predominante na análise técnico econômica para se iniciar ou inviabilizar a exploração de um novo campo petrolífero.

Por isso é muito importante, logo na etapa de avaliação de um novo petróleo a ser produzido, se dispor de um método analítico capaz de detectar a presença de ácidos ARN ou até estimar a sua concentração.

No entanto, a deposição de naftenato é mitigada pelo uso de desemulsificante ácidos, bem como os não ácidos.^{133,138} Por isso é muito importante, logo na etapa de avaliação de um novo petróleo, se dispor de um método analítico capaz de detectar a presença de ácidos ARN ou até estimar a sua concentração. Sendo que a eficácia na prevenção da deposição dependerá das diferenças de composição das águas de produção diferentes de reservatórios.¹³³

1.6 Ácidos tetraméricos

Os ARN são ácidos oxi-naftênicos¹⁸ por vezes são denominados de ácidos tetraméricos ou ainda tetra-ácidos C_{80} (C_{80-TA}),^{37,137} são os ANs tetracarboxílicos que apresentam alta M_w e cadeia carbônica alifática que pode variar de C_{60-83} uma variedade de unidades de ciclopentenil.^{15,16,23,66,22,125,132,133,139}

Estudar os ARN é um tema relevante para a compreensão do processo de mitigação, prevenção, previsão de formação de depósitos.^{19,136} Alguns trabalhos descritos na literatura destacam os progressos existentes na elucidação daquelas estruturas químicas.

A **Figura 13** ilustra a estrutura de um ARN natural, ácido hexacíclico C_{80} ($M_w = 1230 \text{ g mol}^{-1}$), descrito por Lutnaes *et al.*¹⁶ fórmulas empíricas de $C_{80}H_{138}O_8$, $C_{80}H_{140}O_8$, $C_{80}H_{142}O_8$, $C_{80}H_{144}O_8$, e $C_{80}H_{146}O_8$ com DBE entre 8 e 12.

Tendo em vista isso, Mapolelo *et al.*²² por meio de uma especiação molecular detalhada de depósitos de naftenato de cálcio e sódio obtida por FT-ICR MS, reiteraram que emulsões de naftenato de sódio constituem de monoácidos, saturados, acíclicos e baixo DBE enquanto que os depósitos de naftenato de cálcio consistem majoritariamente de ácidos tetrapróticos (ARN) com um esqueleto de hidrocarboneto C₈₀.²² Espectros de massa de extrato ácido de naftenato de cálcio exibem duas faixas de m/z típicas decorrentes da desprotonação de ARN com intervalos próximos a: **(i)** m/z 615-630 atribuída a íons duplamente carregados do tipo $[M-2H]^{-2}$ (ARN⁻²) e; **(ii)** m/z 900-1275 referente a íons monocarregados, $[M-H]^{-1}$ (ARN⁻¹),^{22,130} como mostrado na **Figura 13**. A imagem inferior (**Figura 13b**) destaca, ainda, as fórmulas moleculares ácidos tetrapróticos de baixo M_w (ARN) com esqueletos de hidrocarbonetos C₆₀₋₈₃ identificados em amostras de depósitos de campo de produção localizados na bacia sedimentar da costa brasileira.⁶⁶ Neste caso, espera-se que ARN de baixo M_w com esqueletos de hidrocarbonetos entre C₆₀₋₇₀ sejam encontrados em depósitos de campo da América do Sul.^{66,74} Eles indicam similaridade molecular entre ARN de baixo M_w da África Ocidental atribuída à relação genética entre depósitos de campo em ambos os lados do Oceano Atlântico.⁷⁴

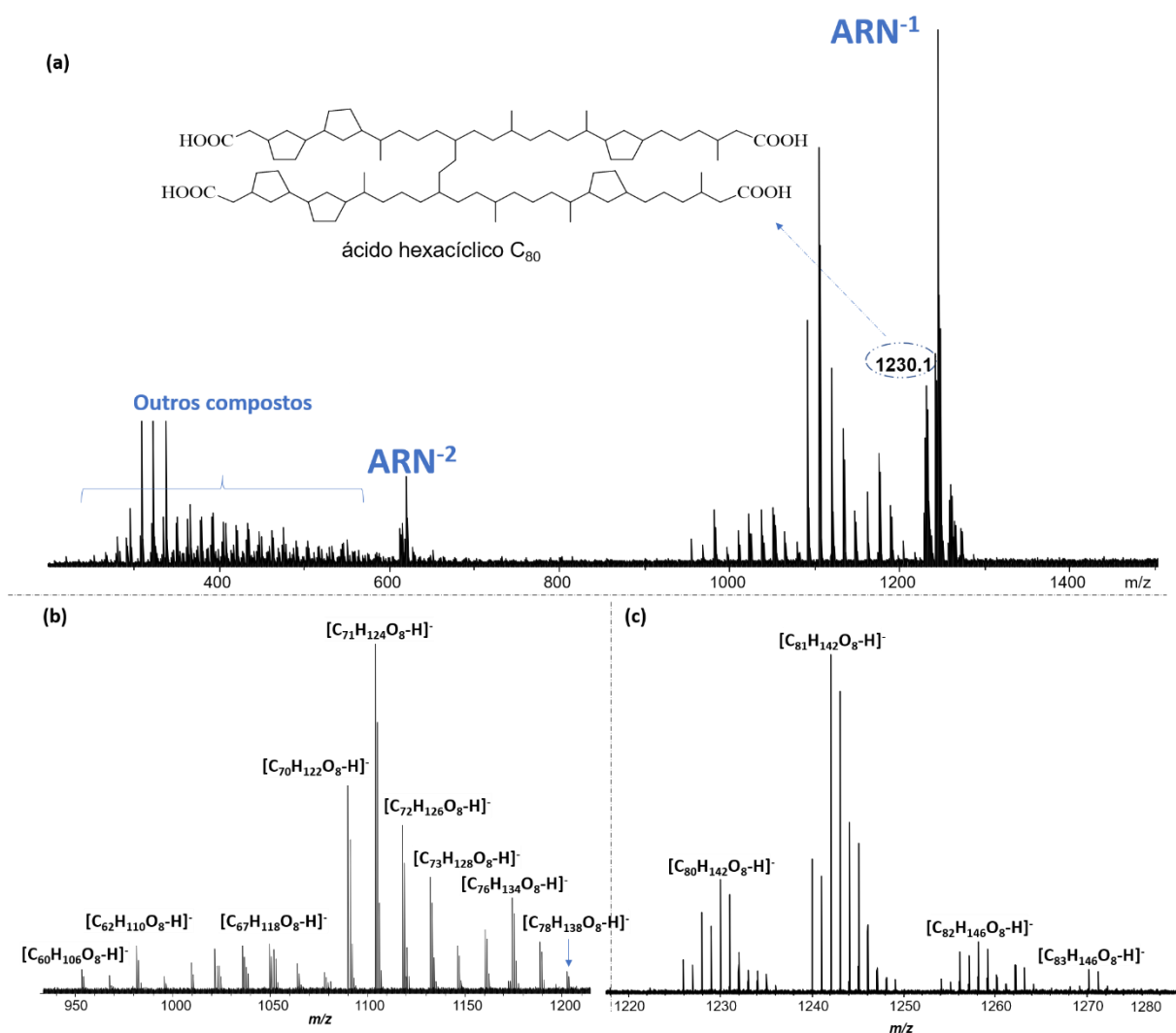


Figura 13. ESI FT-ICR MS do extrato ácido de um depósito de naftenato de cálcio. As imagens do meio mostram as expansões nos intervalos m/z 950–1210, **(a)** 1200–1280 **(b)** e apresentam as fórmulas moleculares identificadas de íons monocarregados ARN⁻¹ no depósito. A imagem superior mostra a estrutura do ácido hexacíclico C₈₀ Insert ($M_w = 1230 \text{ g mol}^{-1}$).

Reporta-se que moléculas de ácidos ARN não estão disponíveis comercialmente. Assim a obtenção destas espécies ocorre a partir de sua matriz de origem, requerendo a aplicação de métodos prévios de extração.²¹ A etapa de extração, como qualquer método de preparo de amostra, é uma etapa crítica do processo analítico, sendo particularmente trabalhosa, demorada e também a principal fonte de erro do método analítico.

Mediaas *et al.*¹⁰⁹ desenvolveram uma metodologia para obtenção de ácidos naftênicos a partir do óleo cru e outros solventes orgânicos por resina de troca iônica à base de carboidratos (Acid-IER). Nesse procedimento, é importante que a razão volumétrica entre as duas soluções seja suficiente para que os sais de naftenatos sejam convertidos em ácidos livres dissolvidos na fase orgânica, deixando os contra íons na fase aquosa.⁴⁰ No entanto, Nordgard *et al.*²³ esclarece que esse procedimento requer um significativo consumo de solvente e o produto obtido permanece ainda contaminado com outros constituintes, os quais são formados principalmente de monoácidos, classe O₂, produzindo assim, um produto final, isto é um conjunto de ARN de pureza variando de 80 a 94 %m/m.²³

Marshall *et al.*¹⁴⁰ descrevem uma metodologia de obtenção de ARN a partir da submissão de amostras de hidrocarbonetos líquidos (incluindo petróleo cru) à um tratamento com amônia gasosa e o produto da reação é envelhecido, recuperado e analisado por espectrometria de massas. Entretanto, o método é considerado demorado e exige controle de temperatura e cuidados extras com a amônia gasosa que é tóxica.

Em outros trabalhos, Mediaas *et al.*^{141,142} propuseram o isolamento e quantificação de ARN em amostras de petróleo cru. O processo consiste em submeter a amostra de petróleo a um meio sólido de absorção/adsorção seletiva para ARN, que são recuperados por um solvente orgânico e por fim quantificados por técnicas analíticas apropriadas.

Albuquerque *et al.*^{143,144,145} apresentam um método de extração e quantificação de ácidos precursores de depósitos de naftenato de cálcio presente em petróleo cru. O sistema consiste em utilizar uma coluna com sólidos granulados (terras diatomáceas, por exemplo) e agentes tamponantes de cálcio. Os ARN são regenerados pela adição de um ácido em um solvente orgânico que são rotoevaporados e quantificados por técnicas analíticas apropriadas.

Paek *et al.*¹⁴⁶ descrevem o uso de uma resina de troca iônica à base de amina quaternária e uma sequência de solventes e misturas de solventes para a obtenção de ARN em amostras de petróleo cru.

No entanto, os estudos citados estão restritos a recuperação de ARN em hidrocarbonetos líquidos e petróleo cru, logo não tem como objeto a obtenção de ARN em quantidade e grau de pureza adequados a estudos em escala laboratorial, dentre outras aplicações, aos quais podemos citar: (i) preparo de lipossomas para a produção de fármacos e outros agentes ativos a indivíduos humanos e animais;¹⁴⁷ (ii) na produção de surfactantes inibidores de hidratos;¹⁴⁸ (iii) molécula molde para impressão em polímeros moleculares que poderão ser úteis para quantificação e recuperação de ARN a partir de petróleo cru;¹¹⁴ (iv) padrões de quantificação; (v) padrões para a avaliação do comportamento destes ácidos em sistemas de interface óleo-água com vista no processo de mitigação, prevenção, previsão de formação de depósitos, e ainda (vi) influência de inibidores para a formação de depósitos de naftenato de cálcio¹³⁴ e etc.

ARN ocorrem em baixa concentração (0,6 – 3,6 ppm) no petróleo cru, mas são predominantes nos depósitos de naftenato de cálcio.^{74,149,150} Assim, a obtenção de ARN a partir de depósitos de naftenatos de cálcio não apenas é vantajoso no potencial de reaproveitamento de resíduos, que é um passivo ambiental relevante pela redução de prejuízos ambientais, como também para evitar uma possível liberação de ácidos naftênicos, principalmente ARN, ao meio ambiente e migração para algum curso de água.

Convencionalmente, ARN são obtidos a partir de depósito naftenato de cálcio, por extração acidificada, que consiste em submeter o sal de naftenato a um tratamento com ácido aquoso e extração com solvente orgânico.^{109,136} Nesse procedimento, é importante que a razão volumétrica entre as duas soluções seja suficiente para que os sais de naftenatos convertam-se em ácidos livres dissolvidos na fase orgânica, deixando os contra íons na fase aquosa.⁴⁰ A partir desta etapa os ácidos podem ser recuperados por secagem sob corrente de nitrogênio,^{22,74,130} por filtração e roto evaporação do solvente sob o controle de temperatura^{151,152} ou por filtração e evaporação do solvente à temperatura ambiente.^{136,153}

Porém, esses procedimentos nem sempre fornecem pureza satisfatória para os ARN, uma vez que a partir do mesmo depósito naftênico, o teor de ARN pode variar de uma extração para outra. Isto porque outros constituintes, principalmente outros tipos de ANs, podem estar presentes no petróleo que originou o depósito.²³

Por outro lado, Simon *et al.*¹⁵⁴ descreveram um procedimento de determinação do teor de ARN em depósitos de naftenato de cálcio utilizando uma resina de troca iônica à base de amina quaternária. Vale destacar que esse material apresenta inconveniente pelo fato de ser considerado um trocador iônico forte que pode dificultar a etapa de eluição por reter indesejavelmente grupos fortemente ácidos. O processo ainda é considerado laborioso, pois exige várias etapas, que incluem a extração acidificada, conversão química de ácidos à ésteres, o que limita o processo a técnica de cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (HPLC-UV).

Levine *et al.*¹⁵³ descreve um processo de extração de ácidos naftênicos de alta massa molecular a partir de sal de naftenato de cálcio. A metodologia utiliza um método denominado de duplo solvente, mas que mantém o princípio da extração por acidificação, conversão dos sais de naftenatos em ácidos. No entanto, esse método tem como objetivo obter ARN em escala industrial para aplicar em processos que não exigem graus de pureza elevados.

Diante dos procedimentos de obtenção de ARN apresentados, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficientes para uma melhor elucidação estrutural desses ácidos, a partir de uma matriz de depósitos de naftenatos.

A transformação de depósitos de naftenatos, formados em unidades de produção, em uma amostra padrão de alto valor agregado, confere vantagem econômica ao conceito de tratamento de resíduo. Sendo um diferencial frente a processos de síntese química para a produção de moléculas padrões ARN e também de outros ANs de menores M_w que possam estar presentes no depósito.

1.7 Conclusões e desafios

Inegáveis são as adversidades geradas pela presença de ANs na indústria do petróleo. Uma vez que sob certas condições, conferem um expressivo impacto na produtividade e consequentemente no valor econômico ao petróleo.

Diante disso, relevante e crescente é o desenvolvimento científico a respeito das implicações relacionadas aos ANs. No entanto, ainda há muito a ser elucidado em relação aos ANs na indústria do petróleo, como as interações dos ANs com outras espécies químicas, diferentes metais e possibilidades de formação de camadas passivadoras que podem ou não potencializar a corrosão naftênica. Bem como, a investigação das propriedades interfaciais que envolvem o equilíbrio de partição e ácido-base, considerando o pH e a presença de cátions mono e divalentes na água produzida, o que pode implicar na formação de naftenatos responsáveis pela estabilização de emulsões ou formação de depósitos. Outrossim, pesquisas sobre os fenômenos que envolvem os mecanismos de predição e também de inibição da deposição de naftenato de cálcio em sistemas de produção de petróleo são fortemente encorajadas.

No entanto, como constituinte natural de depósitos de hidrocarbonetos, a análise, extração e caracterização de ANs não são triviais. Compreender o comportamento dessas espécies é desafiador diante de suas complexidades física e molecular em diferentes matrizes relacionadas ao petróleo.

Diante disso, o avanço na elucidação das espécies de ANs e seus efeitos nas unidades produtivas continua apresentando importantes desafios analíticos, tais como: o desenvolvimento de métodos para preparo, detecção, determinação, remoção, isolamento e caracterização de ANs a partir de sua matriz, que pode instigar a comunidade científica e impulsionar o avanço tecnológico, que é essencial para o progresso da indústria do petróleo.

O capítulo 1 foi publicado na Fuel, 319, 123775, 2022.

2. CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO DE ÁCIDOS TETRAMÉRICOS DE DEPÓSITOS DE NAFATENATOS E CARACTERIZAÇÃO POR TÉCNICAS ANALÍTICAS DE ALTA RESOLUÇÃO (RMN, ESI(-)FT-ICR MS E ESI(-)ORBITRAP MS)

2.1 INTRODUÇÃO

Depósitos de naftenatos de cálcio são normalmente encontrados em instalações de superfícies, como separadores de óleo-água, de recuperação e dessalinizadores.^{15,19,22,125,154} Estes depósitos podem causar sérios problemas durante o transporte, separação e produção de petróleo, como paralizações não planejadas e aumento dos custos operacionais.^{19,22,23,154}

Esse tipo de ocorrência é mundialmente reconhecido como um fenômeno desafiador no processamento de petróleos ácidos.⁷⁴ Isso porque a precipitação de naftenatos está potencialmente associada a recuperação de petróleos imaturos e pesados, que acumulam ácidos orgânicos (ácidos naftênicos, ANs) oriundos da biodegradação de hidrocarbonetos.^{25,125} Contudo, a literatura mostra que a formação de depósitos de naftenato de cálcio não se limita a ácidos e óleos pesados, mas inclui uma variedade dessas características.¹⁵⁵

Em geral, a deposição de naftenatos ocorre durante o transporte de fluidos reservatório para as instalações de superfície, mediante a queda da pressão e liberação de dióxido de carbono (CO₂), que aumenta o pH da água produzida, provocando a dissociação dos ANs, presentes na interface o/a, que por fim combinam com cátions metálicos (neste caso o íon Ca²⁺) produzindo sal de naftenato insolúvel,^{40,116,125,154} conforme as equações a seguir:¹⁵⁶

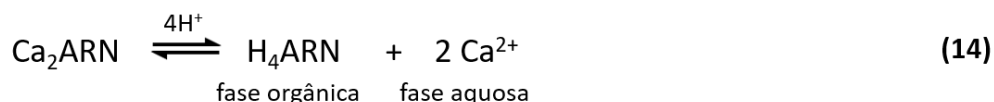


Além da composição da água de produção (pH e teor de bicarbonato),^{22,125,154} a formação do depósito depende principalmente da presença de um grupo específico de ANs tetraméricos de alto massa molecular (do inglês *molecular weight*, M_w), cerca de 1230 Da,¹⁵⁴ por vezes denominado ARN,^{15,137} termo norueguês para água¹⁵ ou mesmo tetra-ácidos C₈₀ (abreviado C₈₀-TA).^{137,156}

Reporta-se que os ARN ocorrem em baixa concentração (0,6 – 3,6 ppm) no petróleo cru,^{74,149,150} mas são predominantes nos depósitos de naftenato de cálcio (28-40 %m/m)^{39,19,37,154} o que justifica a obtenção de ARN a partir de depósitos de naftenatos. Por esse motivo as metodologias de recuperação de ARN a partir de hidrocarbonetos líquidos e em petróleo bruto^{140,141,142,143,144,145,146} permanecem limitadas a quantidade e ao grau de pureza exigidos a certas aplicações.^{114,134,147}

Assim, a retirada de ARN dos depósitos de naftenato de cálcio, além de ser vantajosa no potencial de reaproveitamento de resíduo, que é um passivo ambiental relevante, pode reduzir danos ambientais, bem como evitar uma possível liberação de ANs, principalmente ARN, para o ambiente e migração para algum curso de água.

Convencionalmente, ARN são obtidos a partir de sua matriz, por extração acidificada, que consiste em submeter o sal de naftenato à um ácido aquoso e um à solvente orgânico para a sua recuperação.^{22,40,130,136,151,152} Neste processo é importante que a razão volumétrica entre as duas soluções seja suficiente para que os de sais de naftenatos sejam convertidos em monômeros de ácidos livres dissolvidos na fase orgânica, deixando os contra-íons na fase aquosa.⁴⁰ Para um sal de naftenato de cálcio, a reação se processaria como representada na equação (14).



A partir desta etapa, os ácidos podem ser recuperados por secagem sob corrente de nitrogênio,^{22,74,130} por filtração e rotoevaporação do solvente sob o controle de temperatura^{151,152} ou por filtração e evaporação do solvente à temperatura ambiente.^{136,153}

Contudo, os procedimentos reportados na literatura nem sempre fornecem pureza satisfatória para os ARN, uma vez que em um mesmo depósito naftênico, o teor de ARN pode variar de uma extração para outra.^{116,154} Isto porque outros constituintes, principalmente outros tipos de ANs, podem estar presentes no petróleo que originou o depósito.^{125,154}

Neste âmbito, algumas estratégias analíticas auxiliares podem ser utilizadas adicionalmente na identificação e isolamento de ARN.^{109,132,154} É comum converter ANs em geral, inclusive os tretra-ácidos, em ésteres metílicos a fim de diminuir a polaridade, aumentar a volatilidade e, em alguns casos, intensificar a sensibilidade de detecção.^{15,16,19,74,87,137,154} No entanto, isso pode tornar o processo laborioso, por exigir uma etapa a mais (derivatização química)¹²⁵ e limitar-se apenas a técnicas analíticas com detecção por ultra-violeta.

Outra estratégia que se destaca na obtenção de ANs, em geral, a partir de sua matriz é a extração em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE)^{21,55,56,69,86,89,108,109,116,154} Barros *et al.*²¹ aplicou a SPE para obtenção de ANs em amostras de petróleo, empregando um material sorvente a base de sílica com grupos funcionais de aminopropil (AFS), que são trocadores iônicos mais fracos do que sorventes de amina quaternária, sendo ideal para interagir com analitos fortemente ácidos ou com múltiplos grupos ácidos.^{157,158}

Com relação à obtenção de ARN por SPE a partir de naftenatos, um método bastante citado na literatura^{39,40,116,132,134,137,152,154,155,159,160} envolve o uso de sorventes à base de carboidratos.¹⁰⁹ No entanto, é considerado desvantajoso por requerer um consumo significativo de solvente e o produto obtido permanece contaminado principalmente com monoácidos.^{41,116,125} Outra estratégia conhecida na obtenção de ARN por SPE utiliza uma resina de troca iônica a base de amina quaternária,^{127,154} que apresenta o inconveniente de ser um trocador iônico forte que pode dificultar a etapa de eluição e reter indesejavelmente grupos fortemente ácidos.

É importante destacar que um dos fatores essenciais na escolha da estratégia de separação é o método em que a amostra deverá ser analisada. Neste cenário, a RMN além de pioneira na elucidação de ARN,¹⁵ tem uma importante contribuição na literatura científica na compreensão destas espécies.^{16,40,87,161}

Igualmente, a espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (do inglês *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry* (FT-ICR MS) denota de expressivas aplicações em estudos acerca da compreensão daquelas espécies.^{15,22,74,130} Com seu ultra-alto poder de resolução e exatidão de massas, o FT-ICR MS permite determinar inequivocamente fórmulas moleculares e definir com precisão assinaturas isotópicas.⁷⁸ É pioneira na petroleômica. Redefiniu as análises da composição de óleo bruto e de suas frações.

Por pelo menos duas décadas, a maioria das pesquisas envolvendo petróleo e espectrometria de alta resolução inclui a FT-ICR MS. A técnica aliada à ionização por *eletrospray* ESI(-) é essencial para caracterizar diferentes ANs de massa muito semelhante e de mesma classe de heteroátomo em uma mistura complexa.^{3,21,130} A ESI é uma técnica de ionização suave e produz íons com uma fragmentação mínima da amostra,¹³⁰ amplamente empregada por sua aplicação em diferentes classes de compostos e a possibilidade de ser acoplada a outros analisadores.¹³⁰

A ESI associada à espectrometria de massas Orbitrap (Orbitrap MS) fornece uma resolução de massa suficiente para atribuir fórmulas moleculares a componentes individuais presentes em misturas, especialmente aqueles componentes em abundância relativamente alta.^{97,162,163} Embora o poder de resolução de massa ser inferior ao instrumento FT-ICR,^{162,163} a viabilidade econômica apresentada pelo Orbitrap MS é um importante diferencial para aplicação da técnica.^{164,165} Isso porque, para o funcionamento do espectrômetro Orbitrap MS, um campo elétrico é utilizado em vez de um campo magnético que demanda menor custo de manutenção com relação ao FT-ICR MS.^{164,165}

Considerando o que foi apresentado, devido à necessidade de desenvolver novas e eficientes metodologias de recuperação de ARN em depósitos residuais formados em unidades de produção de petróleo, apresentamos um método alternativo de isolamento específico de ARN de depósitos de naftenato de cálcio, bem como a separação de outros ANs de menor M_w que estão presentes no depósito. Aqui, avaliamos a pureza da fração de interesse e investigamos a composição química da espécie obtida no fracionamento por RMN, Orbitrap MS e FT-ICR MS.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para o isolamento específico de ácidos tetraméricos de outros ácidos orgânicos extraídos a partir de depósitos de naftenatos e caracterização por técnicas analíticas de alta resolução.

2.2.2 Objetivos específicos

- Promover a limpeza das amostras de depósitos de naftenatos de cálcio sob a remoção óleo residual;
- Converter os sais de naftenatos presentes no depósito à ácidos carboxílicos;
- Realizar o isolamento dos ácidos tetraméricos de outros ácidos orgânicos extraídos de depósitos de naftenatos por extração em fase sólida;
- Caracterizar o extrato de ácido orgânico e as frações ácidas obtidas por técnicas analíticas de alta resolução, como RMN, Orbitrap MS e FT-ICR MS;
- Determinar a pureza da fração de interesse.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1. Materiais e reagentes

Todos os produtos químicos empregados eram de grau analítico (pureza superior a 99,5%). Tolueno, ácido clorídrico, clorofórmio e diclorometano (DCM), sendo fornecido pela Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Brasil. Metanol e sulfato de sódio anidro pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Indaiatuba, Brasil. O ácido fórmico, o ácido benzóico, o clorofórmio-*d* (99,8% átomo D, contém 0,03% v/v, TMS) e o hidróxido de amônio foram adquiridos na Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA. Um cartucho *mega bond elut-NH₂*, 2g x 12 mL, foi fornecido pela Agilent Technologies, Santa Clara, EUA.

Foram estudadas duas amostras de depósitos de naftenato de cálcio, referenciados como depósito A e depósito B, do mesmo campo de produção localizado na bacia sedimentar da costa brasileira, fornecido pelo CENPES/PETROBRAS (Rio de Janeiro, Brasil).

2.3.2. Obtenção das frações ácidas a partir do depósito de naftenatos

Neste estudo, uma amostra de aproximadamente 20,6 g do depósito A foi submetida a remoção do óleo residual, em banho ultrassônico, utilizando tolueno seguido de diclorometano por repetidas vezes até que o solvente tornasse incolor ou próximo disso.^{22,152}

Em seguida, 80 mL de solução de HCl 6 mol L⁻¹ e 300 mL de clorofórmio foram adicionados em ~ 4,1 g ao depósito A limpo. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 25 h. Posteriormente, a mistura foi transferida para um funil de separação de 1 L e a fase aquosa (fase superior) foi descartada. A fase orgânica foi submetida à extração líquido-líquido, em triplicata, com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ e a seguir com água deionizada. A fase orgânica foi transferida para um Erlenmeyer de 1 L e sulfato de sódio anidro foi adicionado para remover a água residual. A mistura foi filtrada com de papel de filtro e deixada evaporar em uma coifa em temperatura ambiente, conforme mostrado na **Figura 15a**. Finalmente, o extrato de ácido orgânico foi pesado e caracterizado. O método aqui aplicado, foi adaptado de Bertelli *et al.*¹³⁶

ARN foram isolados de depósitos de naftenato usando o método de patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) n.º BR 10 2020 025105 8 de 09 dezembro de 2020. Assim, aproximadamente 200 mg do extrato de

ácido orgânico diluído em 2 mL de DCM foram submetidos à SPE utilizando um material adsorvente AFS, previamente testado, por meio de uma sequência de eluição (**Figura 15a**), a partir da adaptação do procedimento e abordado por Barros *et al.*²¹

Na SPE foram omitidas as primeiras frações coletadas resultantes da etapa de limpeza (CU, do inglês *clean up*) obtidas por eluição com: (i) DCM, (ii) solução de DCM:MeOH (1:1 v/v), (iii) MeOH e (iv) solução de MeOH:H₂O (70:30 v/v), **Figura 15b**. As espécies ácidas foram removidas com adição de ácido fórmico (AF) aos gradientes de eluição. As principais frações ácidas (de FA1 a FA4) foram caracterizadas por FT-ICR MS e Orbitrap MS, RMN de ¹H e ¹³C. As análises do Orbitrap MS foram realizadas no LACEM/ Instituto de Química, da UFG (Goiânia, Brasil), as análises e ensaios foram realizados no Labpetro/UFES (Vitória, Brasil).

O extrato de ácidos orgânicos obtido a partir do depósito B, também, foi submetido a SPE sem a etapa de limpeza, originando as frações FA1_{sl}-FA4_{sl} (que foram caracterizadas por FT-ICR MS).

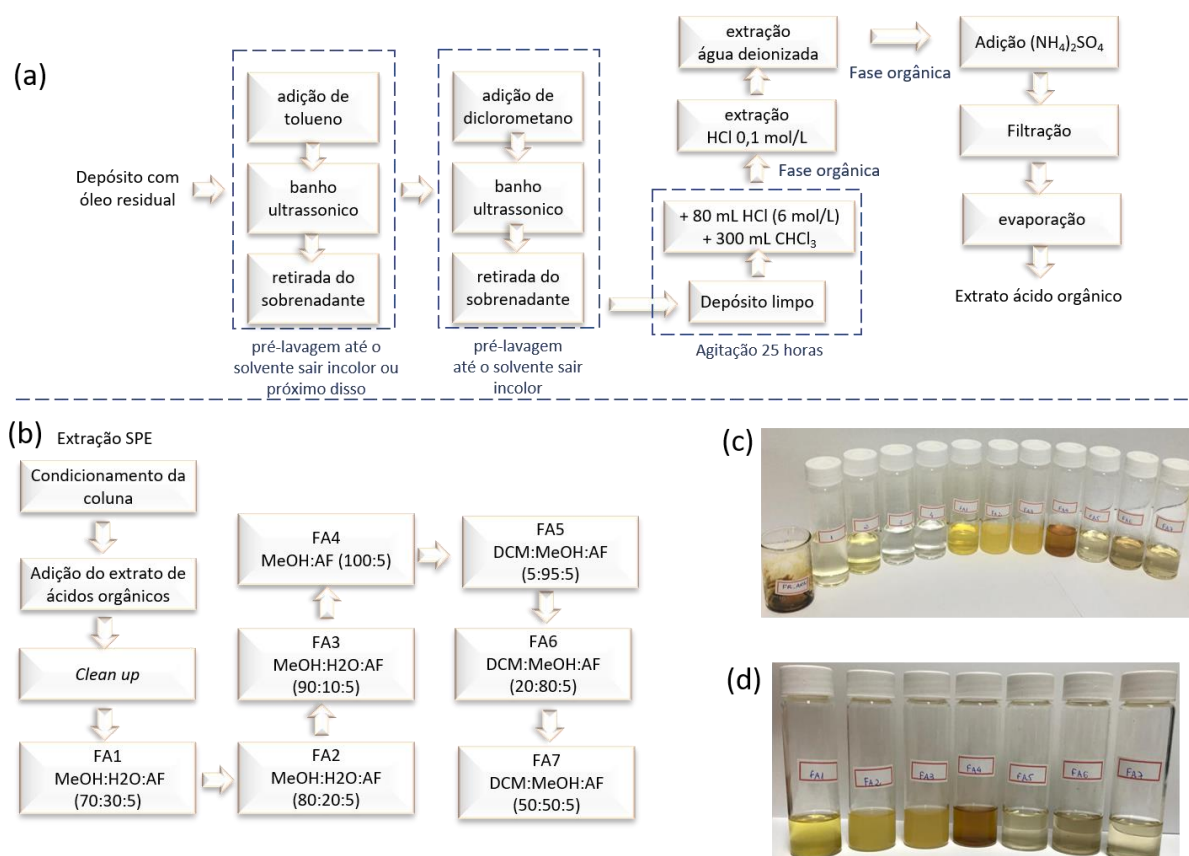


Figura 15. Esquema de extração de ANs: **(a)** limpeza do depósito naftênico e obtenção do extrato ácido orgânico e **(b)** o fracionamento do extrato de ácido orgânico por SPE. Imagens da **(c)** sequência de frações obtidas no processo, destacando as **(d)** frações ácidas.

2.3.3. RMN de ^1H e ^{13}C

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro da Varian-Agilent (VNMR400) operado sob um campo magnético de 9,4 T, por meio de uma sonda de 5 mm *Broad Band* $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$ a 25 °C. Todos os espectros foram processados usando o ACD/Spectrus Processor 2020.1.0 (ACD/Labs, Toronto, Canadá). Aproximadamente 20 mg de amostra foram diluídos em 600 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). Como referencial das mudanças químicas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , foram usados, respectivamente, o tetrametilsilano (TMS) e o sinal do CDCl_3 remanescente (δ : 77,23 ppm).

As análises de RMN de ^1H foram realizadas sob os parâmetros: frequência de 399,73 MHz, janela espectral de 6410,3 Hz, sequência de pulso S2pul, tempo de aquisição de 3,4 s, tempo de espera 1,2 s e 128 *scans*.¹³⁶ Durante a análise de RMN de ^{13}C uma solução de $\text{Cr}(\text{Acac})_3$ em CDCl_3 foi empregada como agente de relaxação e os parâmetros ajustados para uma frequência de 100,52 MHz, janela espectral 25.000 Hz, sequência de pulso S2pul, tempo de aquisição de 1,3 s, tempo de espera 7,0 s e 512 *scans*.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das amostras foram determinados por meio da integração das regiões assinalamento estrutural conforme mostrado na **Tabela 2**

Tabela 2. Atribuições estruturais para RMN de ^1H e ^{13}C .^{166,58}

Parâmetro molecular/ Faixa δ (ppm)	Referência
H_γ (0,1-1,0)	Hidrogênio parafínicos do tipo CH_3 , em posição γ e/ou mais em relação ao sistema aromático
H_β (1,0-2,0)	Hidrogênios parafínicos ou naftênicos do tipo CH_2 , em posição β ao sistema aromático e alquis terminais.
H_α (2,0-4,5)	Hidrogênios parafínicos ou naftênicos do tipo CH , CH_2 e CH_3 , ligados a sistemas aromáticos na posição α e outros grupos que podem aparecer nesta região ($-\text{OH}$ e $-\text{SH}$).
H_{ol} (4,5-6,0)	Hidrogênios olefínicos.
H_{ar} (6,0-9,0)	Hidrogênios aromáticos.
$\text{H}_{\text{ald/car}}$ (9,0-12,0)	Hidrogênios de aldeídos e ácidos carboxílicos.
C_{alq} (3,0-75,0)	Carbono alifático total.
C_{ar} (110-160,0)	Carbono aromático total.
C_{cbx} (160,0-190,0)	Carbono carboxílico/quinolínico.
C_{cbn} (190,0-220,0)	Carbonos aldeídico/cetônico.

2.3.4. ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS

As análises ESI(-)FT-ICR MS foram realizadas em um espectrômetro de massas FT-ICR (Bruker Daltonics Bremen, Alemanha, modelo 9,4 T *Solarix*) configurado para operar em uma faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR com m/z 200-1500.^{21,80,162,167}

As amostras foram dissolvidas $\sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tolueno:metanol (1:1) a 0,1% m/v de NH_4OH . As soluções resultantes foram injetadas na fonte ESI(-) a um fluxo de $2,0 \mu\text{L min}^{-1}$. As condições de operação da fonte de ESI(-) foram: voltagem no capilar de 3600 V, temperatura e fluxo do gás de secagem de 180°C e 4 L min^{-1} , respectivamente, pressão de gás nebulizador de 1,0 bar, placa final *offset* de 500 V, *collision voltage* de 2,0 V, *skimmer* -25,0 V.

Os espectros de massas foram adquiridos por meio de 200 varreduras de sinais transientes de domínio de tempo de 4M (*mega-point*) com um tempo de acumulação de íons de 0,001 s e tempo de voo (TOF) de 0,9 ms. Antes da aquisição, o equipamento foi calibrado externamente a partir de uma solução de L-arginina (m/z 200-1500).¹⁶⁷ Os espectros obtidos foram recalibrados no software *Compass DataAnalysis* 4,0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) utilizando um conjunto de compostos alquilados homólogos mais abundantes para cada amostra.^{21,80,162,167}

Um poder de resolução, $m/\Delta m_{50\%} = 514.000 - 571.000$ (sendo que $m/\Delta m_{50\%}$ é a largura à meia altura do sinal m/z 400)^{21,162,167} e exatidão de massa inferior a 3 ppm e as atribuições de fórmulas moleculares inequívocas para todos os íons.

Os dados de ESI(-) Orbitrap MS foram obtidos com um espectrômetro de massas Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha).¹⁶² A metodologia de preparo foi semelhante ao usado para as análises por FT-ICR MS, onde as soluções preparadas na concentração de $\sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções resultantes foram injetadas na fonte ES(-) sob as seguintes condições de operação: voltagem do spray 2,8 kV; faixa de massa m/z 100 a 1300; Sheath gas 10-20; S-lens 50-100; temperatura do capilar 275°C .

Os dados foram processados pelo software *Composer* (Sierra Analytics, Pesadena, CA, EUA) e foram determinadas as composições elementares de acordo com valores de m/z .

2.3.5. Determinação da pureza da fração concentrada de ácidos tetraméricos

Uma porção do depósito B foi submetida à remoção de petróleo residual por extração sólido-líquido via *Soxhlet* conforme procedimento estabelecidos por Albuquerque¹⁶⁸ e Albuquerque e Lopes.¹⁶⁹ Cerca de 5,0223 g desse depósito limpo foi tratado com HCl e o extrato de ácidos orgânicos obtido foi submetido a SPE, como descrito anteriormente (**Figura 15**). O teor de ARN existente na amostra (fração FA4, obtidos a partir do depósito B) foi determinado pela adição de uma quantidade conhecida de um composto padrão (ácido benzóico) em CDCl₃ e análise de RMN de ¹H conforme Simon *et al.*¹⁵⁴

A determinação da pureza do ARN existente nas amostras (extrato de ácidos orgânicos e na fração de interesse, FA4, obtidos do depósito B) foi obtida pela integração do sinal espectral do ácido benzóico (8,1 ppm) e do ARN (2,11 a 2,30 ppm) observado no espectro de RMN de ¹H, em relação ao M_w do ácido benzóico (122,12 g mol⁻¹) e as amostras, calculadas a partir da equação (15).¹⁵⁴

$$P = 50 \frac{m_{BA} \cdot Area_{2.11 \rightarrow 2.30 ppm} \cdot M_{ARN}}{M_{BA} \cdot Area_{8.1 ppm} \cdot m_{ARN}} \quad (15)$$

Sendo M_{BA} e m_{BA} são os respectivos o M_w (122,12 g mol⁻¹) e a massa de ácido benzóico adicionada na amostra a ser determinada a pureza (P), e M_{ARN} e m_{ARN} são os respectivos M_w (determinado por ESI(-)FT-ICR MS) e suas quantidades de massa usadas na análise.

2.3.5 ESI(-)MS/MS

Os experimentos de espectrometria de massas em tandem (MSⁿ) foram realizados em um LTQ, (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). A metodologia de preparação da amostra foi utilizada na análise FT-ICR MS, com ~ 10 µg mL⁻¹. As soluções resultantes foram injetadas na fonte ESI(-) em um fluxo de 3,0 µL min⁻¹, nas condições de operação: temperatura do aquecedor de 50 °C, *sheath gas flow* de 10 (unidade arbitrária), fluxo de gás auxiliar de 5 (arbitrário unidade), *iso spray voltage* de 4 kV, temperatura do capilar de 275 °C, *tube lens* de 109 V e tensão do capilar de 33 V.

Os espectros ESI(-)MS/MS foram adquiridos com controle automático de ganho com média de 200 *microscans* para cada espectro com janela de isolamento de 1,0 (unidades *m/z*) e 16–22% da energia de colisão. Os espectros foram processados usando o software Xcalibur (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha).

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1. Obtenção das frações ácidas a partir do depósito de naftenatos

A limpeza do depósito A com lavagem repetida com tolueno e diclorometano resultou em uma massa de ~4,1 g de depósito limpo e seco (~20 %m/m) de recuperação. A partir disso, obteve-se 1,9 g extrato de ácidos orgânicos, que responde a um rendimento próximo a 47,7 %m/m.

Na SPE, a dessorção dos ANs da fase estacionária, AFS, ocorreu pela adição de AF adicionado ao gradiente de eluição. A eluição dos ANs menores foi facilitada pela adição de água. Uma vez que a formação de ligações de hidrogênio aumenta a solubilidade dos ácidos carboxílicos.¹⁷⁰ No entanto, para os ácidos de cadeia maior, a solubilidade em água decresce devido ao fato da cadeia carbônica se tornar a parte mais significativa da molécula.¹⁷⁰

Os ANs foram recuperados em função ao aumento de M_w dos compostos, por causa da redução gradativa da polaridade dos solventes empregados. Isso é devido a maior afinidade que moléculas de massa maiores possuem com solventes apolares eluídos no modo de fase reversa.¹⁷¹ De forma que após a SPE, as recuperações das principais frações ácidas FA1, FA2, FA3 e FA4 ficaram próximas de 9,2%, 7,2%, 4,1% e 68,8% (%m/m), respectivamente.

2.4.2. RMN de ^1H e ^{13}C

A **Figura 16** mostra os espectros de RMN de ^1H do extrato de ácido orgânico obtido do depósito A e suas principais frações de ácido (FA1-FA4). Os espectros revelaram que, em todas as amostras, há uma predominância de sinais na região dos hidrogênios alifáticos ($\delta = 0,1\text{-}4,5$ ppm),¹⁶⁶ com destaque para a região entre 0,7 e 1,4 ppm atribuída à sobreposição do metil e grupos metilênicos.⁵⁷ É possível observar que uma banda entre o δ de 2,1 e 2,5 ppm indicando a presença de hidrogênios adjacentes ao ácido carboxílico (H_α carboxila) em todos os espectros (**Figura 16a-e**).⁵⁸

No entanto, os espectros de RMN de ^1H do extrato de ácido orgânico (**Figura 16a**) e FA4 (**Figura 16e**) diferem dos demais, devido à presença de um maior número de sinais nas regiões de 0,7-2,7 ppm, que são típicos de ácidos tetrapróticos, referindo-se a hidrogênios ligados a cadeias de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos^{16,136,154} sendo os sinais próximos da faixa entre 2,11 e 2,30 ppm correspondem a quatro H_α para a carbonila de ARN (como destacado na cor azul da estrutura do ARN na inserção de **Figura 16**).^{136,154} O espectro de RMN de ^1H da fração FA4 revelou um sinal em 3,65 ppm que se refere, possivelmente, a prótons metílicos do metanol remanescente da eluição.

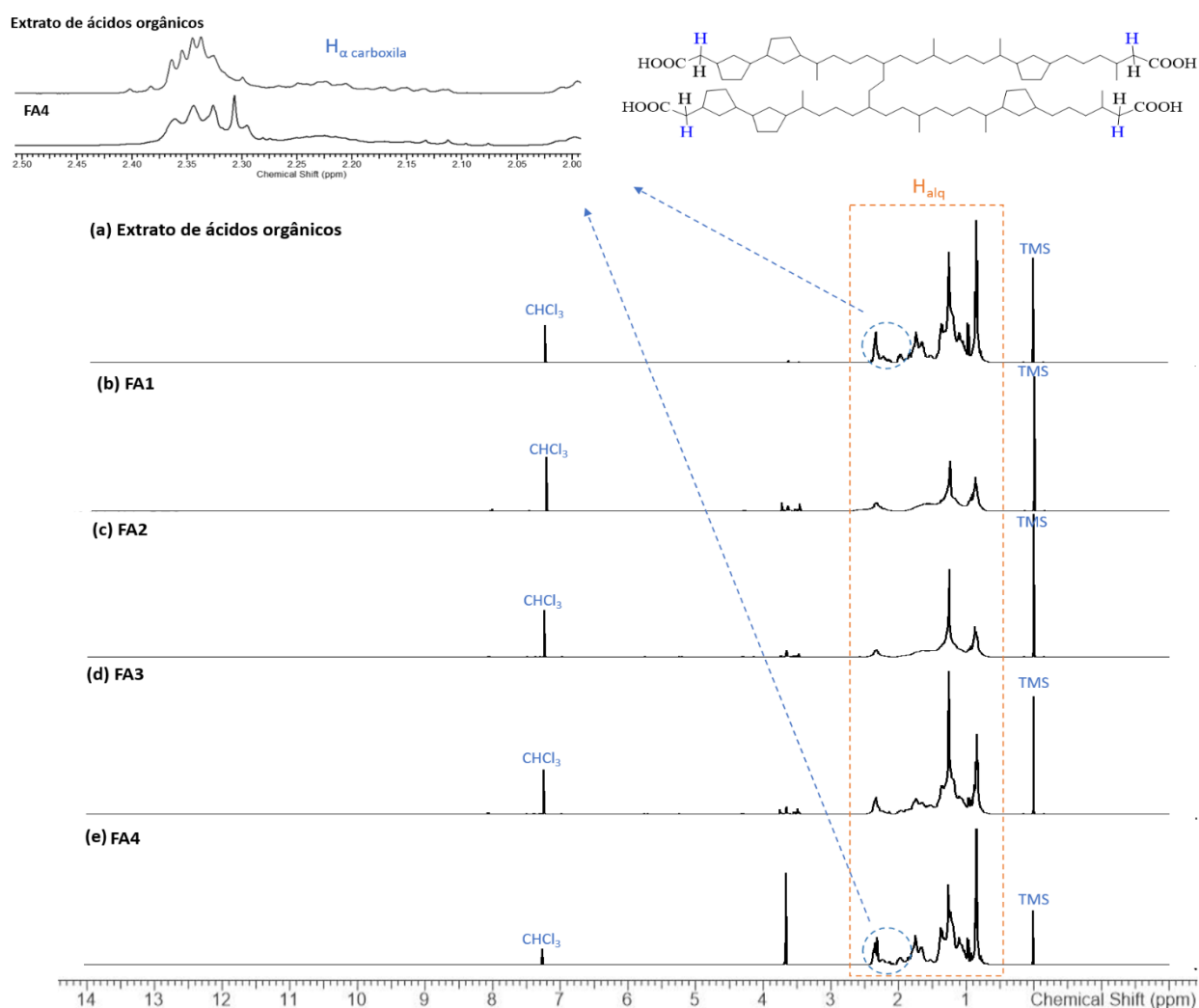


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do extrato de ácidos orgânicos do depósito de nafenatos A e suas principais frações (FA1-FA4).

Como o que foi previsto pelos dados de RMN de ^1H , os espectros de RMN de ^{13}C (**Figura 17**) revelaram uma maior concentração de sinais na região dos carbonos alifáticos totais (sinais de mudança química na faixa δ : 3,0-75,0 ppm).¹⁶⁶ Da mesma forma, o extrato de ácido orgânico (**Figura 17a**) e a fração FA4 (**Figura 17e**) diferiram dos demais, apresentando um maior número de sinais naquela região. Além disso, apenas os espectros de RMN de ^{13}C dessas amostras (**Figura 17a e 17e**) revelaram visualmente a presença de sinais na região entre 160-185 ppm para o grupo carbonil de ácidos carboxílicos.⁵⁷ E ainda, um sinal em 51,5 ppm no espectro de RMN de ^{13}C da fração FA4 que confirmou presença de metanol remanescente da eluição.

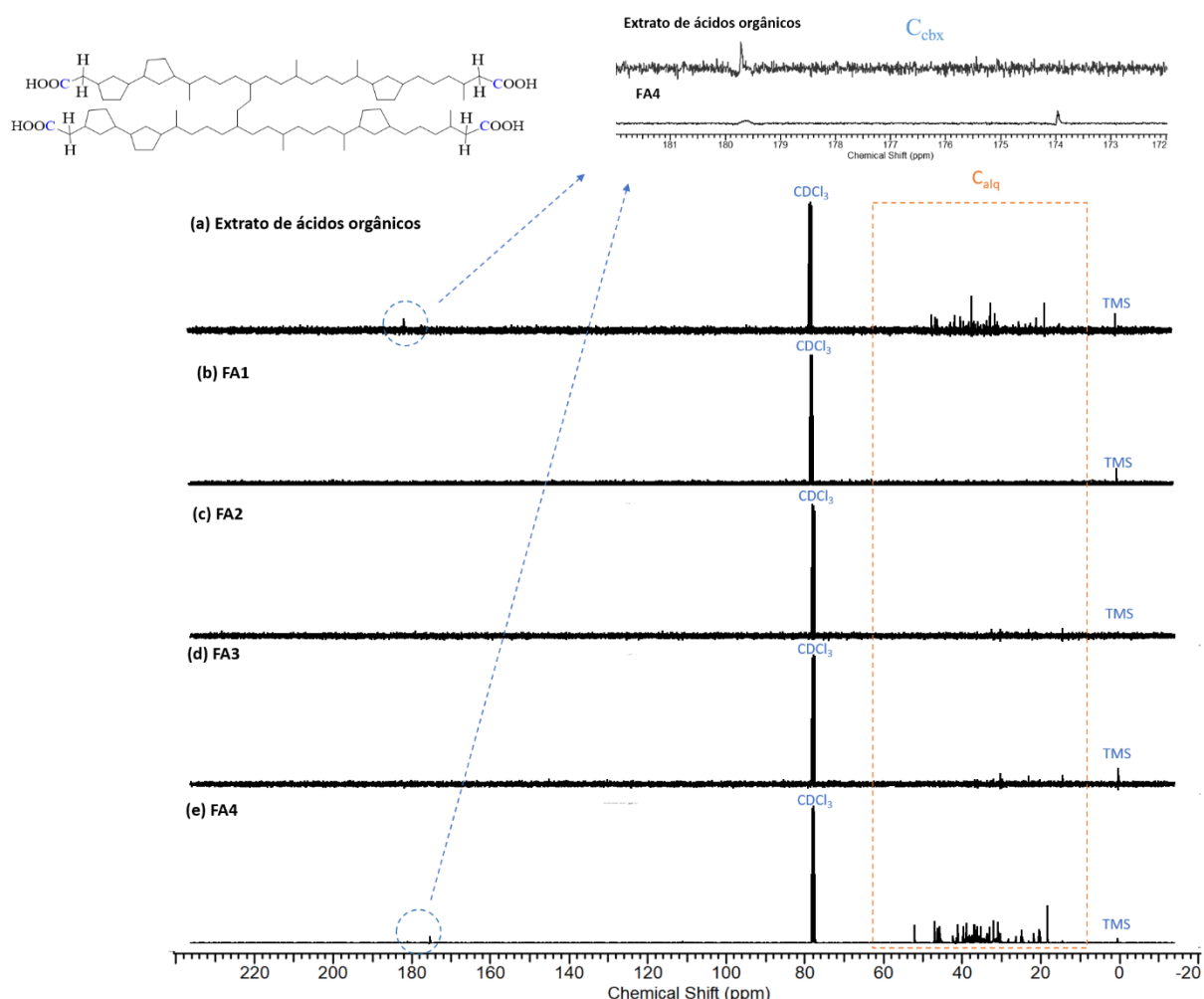


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C do extrato de ácidos orgânicos do depósito de naftenatos A e suas principais frações (FA1-FA4).

As características moleculares foram avaliadas a partir da integração das regiões de interesse reveladas nos espectros de RMN de ^1H (**Figura 16**), após ajuste da linha de base dos espectros e supressão do sinal do solvente (CHCl_3 , δ : 7,25 ppm). As abundâncias relativas (em %mol) dos átomos de hidrogênio pela integração dos espectros estão expressas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Abundância relativa de átomos de hidrogênio e carbono presentes no extrato de ácido orgânico obtido do depósito de naftenatos A e suas principais frações ácidas obtidas por RMN de ^1H agrupadas de acordo com sua faixa de deslocamento químico.

Parâmetro molecular/ Faixa δ (ppm)	Quantidade relativa				
	Extrato de ácidos orgânicos	FA1	FA2	FA3	FA4
H_γ (0,1-1,0)	23,3	16,9	17,8	18,7	20,0
H_β (1,0-2,0)	64,7	50,7	58,8	63,7	69,2
H_α (2,0-4,5)	9,0	20,8	15,0	12,4	10,9
H_{ol} (4,5-6,0)	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
H_{ar} (6,0-9,0)	2,8	11,7	7,3	5,2	0,0
$\text{H}_{\text{ald/car}}$ (9,0-12,0)	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0

A predominância de compostos alquílicos presentes no extrato de ácidos orgânicos obtido a partir do depósito A e de suas principais frações ácidas (FA1-FA4) é confirmada e expressa pelo teor de hidrogênios alifáticos totais ($\text{H}_\gamma + \text{H}_\beta + \text{H}_\alpha$), com valores superiores a 88,4% para a FA1 e superiores a 91% para as demais amostras. Os resultados salientam uma diversidade estrutural entre as amostras devido à variação das diferentes espécies de hidrogênios, sendo a presença majoritária de H_β (64,7, 50,7, 58,8, 63,7 e 69,2 %mol para o extrato de ácidos orgânicos, FA1, FA2, FA3 e FA4, respectivamente), em todas as amostras, indica a existência de ramificações confirmando a complexidade das estruturas.

As predominâncias de H_β (de 58,8 a 69,2 mol%) e H_γ (de 17,8 a 23,3 %mol) para as amostras, sugerem que os compostos possuem cadeias longas e ramificações confirmando a complexidade das estruturas.

Por outro lado, é possível observar menor proporção de H_α (valores de 9,0 e 10,9 %mol) para o extrato de ácidos orgânicos e a fração FA4, o que é esperado para a estrutura molecular de ARN ($H_\alpha < 10$ %mol).¹⁶ Além do mais, a fração FA4 se difere e se destaca, com relação as demais amostras, pela ausência de hidrogênios aromáticos.

A integração do espectro de RMN de ^{13}C , após ajuste da linha de base e supressão do sinal do solvente ($CHCl_3$, 77,23 ppm), indicou a presença de carbonos carboxílicos ($C_{cbx} = 2,9$ %mol) para a fração FA4, confirmou predominância de estruturas alquílicas ($C_{alq} = 97,1$ %mol) e atestou a ausência de compostos aromáticos, em concordância com espécies típicas de ARN.

2.4.3 ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS

- *Caracterização do extrato de ácidos orgânicos obtido a partir de depósito naftênico*

A **Figura 18a** apresenta o espectro de ESI(-)FT-ICR MS do extrato ácido obtido a partir do depósito A, as expansões mostram os valores de m/z teórico e experimental, erro de massa (em ppm), fórmula molecular e valores de DBE para os ANs identificados. Os resultados mostraram que as classes $O_4[H]$ e $O_8[H]$ são predominantes no extrato de ácidos orgânicos e se concentram em três regiões, que se destacaram no espectro: (i) com um perfil gaussiano de m/z 200-600, atribuída a uma mistura de compostos com predominância da classe $O_4[H]$, que podem ser à atribuídas espécies dímeras formadas pela auto-associação de ANs. Essas espécies possuem os mesmos valores DBE de seus monômeros constituintes (classe O_2);²² (ii) intervalo de m/z 610-640, atribuído a íons de carga dupla do tipo $[MH]^{-2}$ (ARN^{-2}), devido à desprotonação de dois grupos dos quatro grupos carboxílicos do ácido tetramérico original (ARN)²² e ainda mais; (iii) intervalo de m/z 950-1300, atribuído a íons carregados individualmente do tipo $[M-H]^{-1}$ (ARN^{-1}), formado pela desprotonação de apenas um dos grupos carboxílicos do ARN .²²

A **Figura 18b** apresenta o diagrama de distribuição de abundância do DBE *versus* o número de carbono (NC) do extrato ácido obtido a partir do depósito A, para as classes $O_4[H]$ e $O_8[H]$. O gráfico revela que a presença de compostos da classe $O_4[H]$, que corresponde a uma mistura de: (i) espécies de dímeros formados pela auto-associação de ANs, com DBE variando de 2 a 8 e NC entre C_{15} a C_{36} , dos quais os mais abundantes possuem DBE = 4 com NC de C_{19} a C_{23} ; e (ii) espécies ARN duplamente carregadas, ARN^{-2} , com abundância de espécies que possuem DBE = 8 com NC de C_{40} a C_{41} , isto é, C_{80} a C_{82} considerando o dobro do carbono devido à carga dupla do íon. Por outro lado, podemos observar que a classe $O_8[H]$, ARN^{-} , apresenta espécies químicas mais abundantes com distribuição de NC variando de C_{70} a C_{80} e com alto grau de insaturação (DBE de 9 a 11). Este resultado é consistente com a estrutura dos ANs tetrapróticos.^{15,22,127} Foi possível identificar 122 fórmulas moleculares das quais 37 foram atribuídas espécies de ARN, sendo possível identificar a presença do tetra-ácido natural C_{80} ($M_w = 1230 \text{ g mol}^{-1}$), denominado ácido hexacíclico C_{80} ,²⁰ descrito nos trabalhos de Lutnaes e colaboradores.¹⁶ A alta resolução e exatidão de massa do FT-ICR MS forneceu a especiação química detalhada dos ARN, que contêm esqueletos de hidrocarbonetos com NC de C_{60} a C_{83} e DBE de 8 e 12, bem como espécies duplamente carregadas (**Figura 18b**).

(a) Extrato de ácidos orgânicos $M_w = 1112,2 \text{ Da}$ $m/z = 200-640 \text{ e } 980-1300$

122 compostos identificados

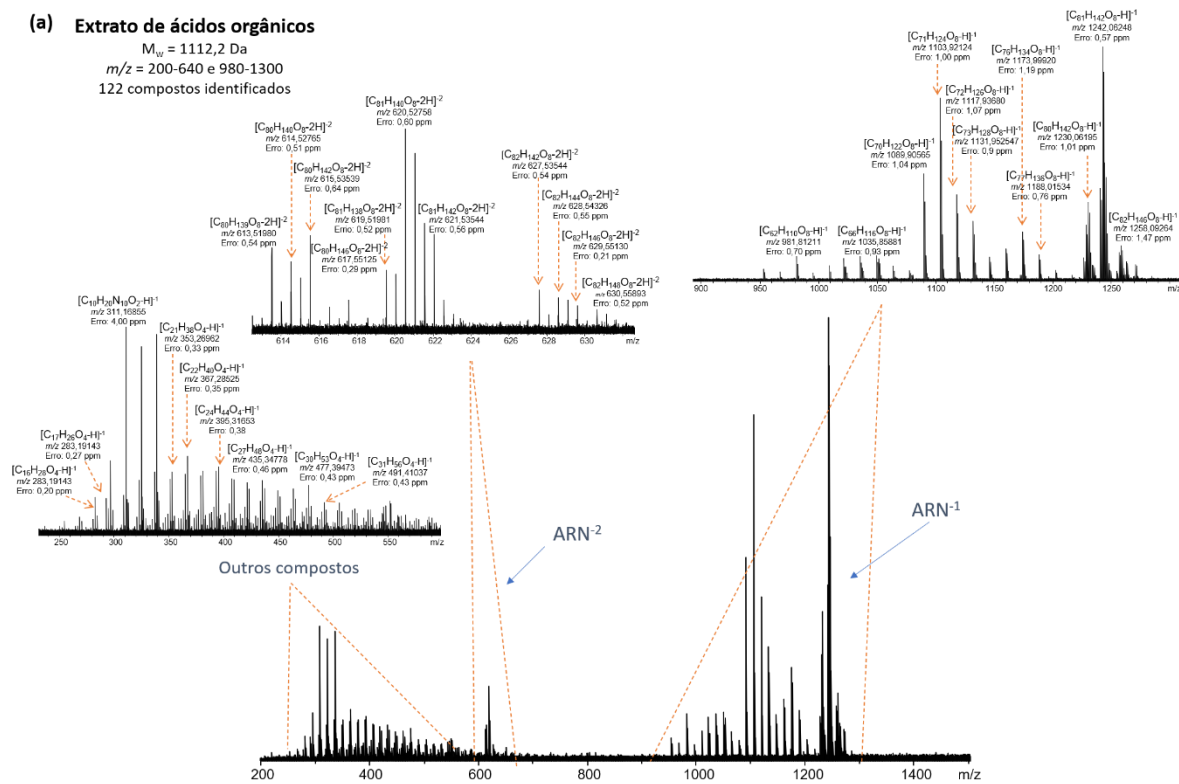
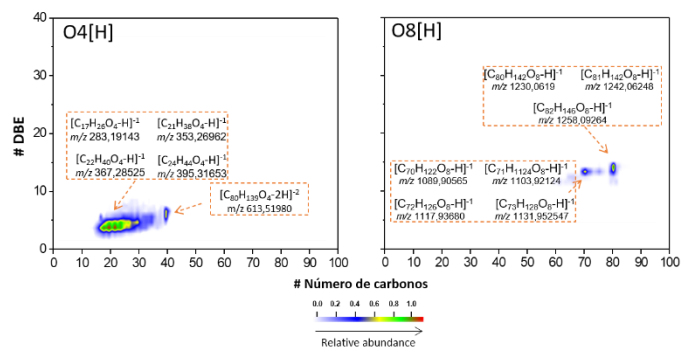
**(b)**

Figura 18. (a) Espectro ESI(-)FT-ICR MS do extrato de ácido orgânico obtido do depósito A. As expansões mostram os valores de m/z teórica e experimental, erro de massa (em ppm) e fórmula molecular das principais espécies de ANs identificadas. **(b)** DBE versus número de carbono de ESI(-)FT-ICR MS para as classes $O_4[H]$ e $O_8[H]$ presentes no extrato de ácido orgânico obtido a partir do depósito de nafenatos A.

- *Caracterização das frações ácidas*

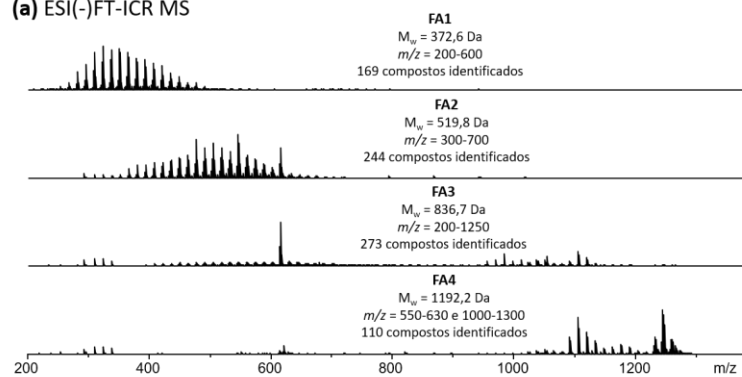
Apesar do depósito A ser constituído principalmente por ARN, estão presentes também espécies ácidas de menores M_w , principalmente ANs, que foram seletivamente acumuladas a partir de seus óleos de origem.^{22,23,151} Portanto, o presente estudo apresenta uma nova metodologia de separação para isolar os ARN das diferentes espécies ácidas que estão presentes no extrato de ácidos orgânicos obtido a partir do depósito de naftenatos. A técnica de SPE aqui empregada, a partir da adaptação do procedimento, é abordado por Barros *et al.*²¹

Assim, a **Figura 19a** exibe os espectros de ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap para as frações (FA1-FA4) obtidas do extrato de ácidos orgânicos do depósito A. Em geral, em ambas as técnicas, os espectros correspondentes às frações exibiram um aumento gradual de valores m/z (200 – 1300) em função da redução da polaridade do gradiente de eluição.

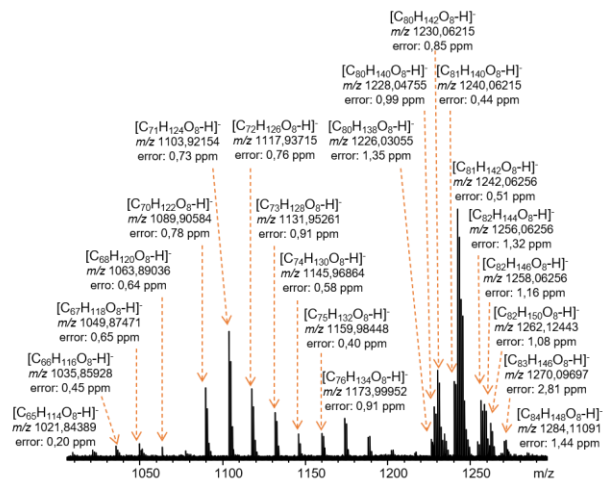
Os resultados ESI(-)FT-ICR MS mostraram um M_w médio de 372,6, 519,8, 836,7 e 1196,9 Da, e atribuíram fórmulas moleculares de 169, 244, 180 e 110 às frações FA1-FA4, respectivamente. Contudo, para ESI(-)Orbitrap MS os valores de M_w encontrados (375,6, 533,7, 544,4, 1194,8 Da) foram próximos aos mostrados por ESI(-)FT-ICR MS, mas com um número reduzido de atribuições de fórmulas moleculares (296, 79, 62, 66) na mesma ordem (FA1-FA4).

Os espectros das frações FA1 e FA2 (**Figura 19ab**) mostraram gaussianas separadas em função dos valores de M_w , com uma distribuição de m/z ~200-630. Por outro lado, os espectros das frações FA3 apresentaram uma faixa maior de distribuição de m/z ~460-1200. O espectro de massa da fração FA4 mostrou importantes sinais nos m/z 610-650 e 950-1300, que correspondem tipicamente a íons com carga dupla e mono carregados de espécies de ARN.²²

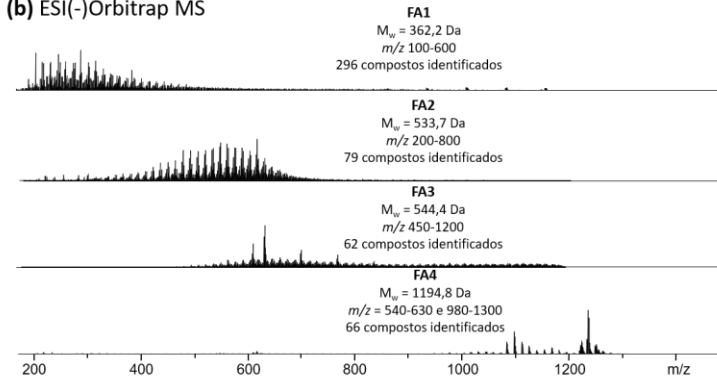
(a) ESI(-)FT-ICR MS



(c) ESI(-)FT-ICR MS para FA4
expansão m/z 1020 – 1300 (região de ARN⁻¹)



(b) ESI(-)Orbitrap MS



(d) ESI(-)Orbitrap MS para FA4
expansão m/z 1020 – 1300 (região de ARN⁻¹)

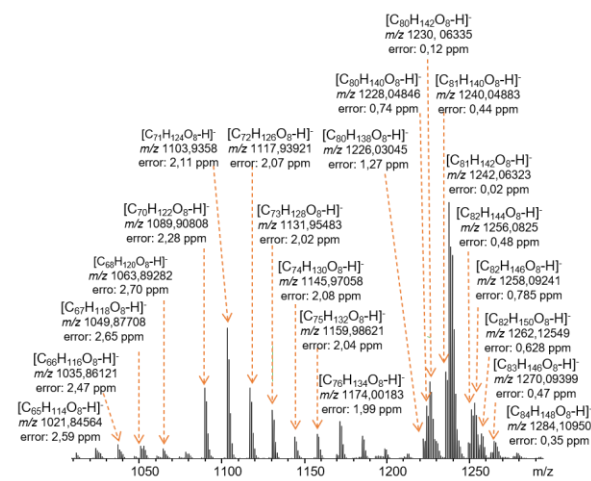


Figura 19. (a) Espectros de massa de extrato de ácido orgânico do depósito de naftenato A e suas principais frações (FA1-FA4) obtidos por ESI(-)FT-ICR MS, (b) ESI(-)Orbitrap MS e; (c) e (d) suas expansões, que mostram os valores de m/z experimental, a erro de massa (em ppm) e a fórmula molecular das principais espécies de ARN⁻¹ identificadas.

A alta resolução e a exatidão de massas fornecida pela ESI(-)FT-ICR MS mostrou identificação detalhada e a diferenciação das espécies presentes na amostra. **Tabela 4** apresenta atribuição de fórmula molecular, DBE e exatidão de massa para as espécies da classe O₈ presentes na fração de FA4, atribuídos por ESI(-)FT-ICR MS. Os íons de carga única mais abundantes são [C₈₁H₁₄₂O₈-H]⁻¹, [C₈₁H₁₄₄O₈-H]⁻¹ e [C₇₁H₁₂₄O₈-H]⁻¹ com os respectivos *m/z* 1242,062480, 1244,07806 e 1103,92154, e os íons duplamente carregados de maior abundância identificados são [C₈₁H₁₄₁O₈-2H]²⁻, [C₈₁H₁₄₃O₈-2H]²⁻ e [C₈₀H₁₄₁O₈-2H]²⁻ com *m/z* 620,52781, 621,53558 e 614,52782, respectivamente.

Tabela 4. Atribuição de fórmulas moleculares, erro de massa (em ppm) e *m/z* medido e teórico obtidos a partir de dados ESI(-)FT-ICR MS para espécies da classe O₈ presentes na quarta fração ácida (FA4) do depósito de naftenato A.

Íon	<i>m/z</i> _{medido}	<i>m/z</i> _{teórico}	DBE	Erro (ppm)	TIC	TIC (%)
[C ₇₀ H ₁₂₂ O ₈ -2H] ²⁻	544,44980	544,44971	11	0,16	1,7x10 ⁶	2,3
[C ₇₁ H ₁₂₄ O ₈ -2H] ²⁻	551,45745	551,45753	11	0,15	4,3x10 ⁶	5,7
[C ₇₃ H ₁₂₇ O ₈ -2H] ²⁻	565,47313	565,47318	11	0,09	2,1x10 ⁶	2,8
[C ₇₅ H ₁₃₁ O ₈ -2H] ²⁻	579,48857	579,48883	11	0,46	1,7x10 ⁶	2,3
[C ₈₀ H ₁₄₀ O ₈ -2H] ²⁻	613,52001	613,52013	12	0,20	4,0x10 ⁶	5,3
[C ₈₀ H ₁₄₁ O ₈ -2H] ²⁻	614,52782	614,52796	11	0,22	5,0x10 ⁶	6,6
[C ₈₁ H ₁₃₉ O ₈ -2H] ²⁻	619,52002	619,52013	13	0,18	4,6x10 ⁶	6,1
[C ₈₁ H ₁₄₂ O ₈ -2H] ²⁻	620,52781	620,52796	12	0,24	1,2x10 ⁷	15,9
[C ₈₁ H ₁₄₃ O ₈ -2H] ²⁻	621,53558	621,53578	11	0,34	7,6x10 ⁶	10,0
[C ₈₂ H ₁₄₃ O ₈ -2H] ²⁻	627,53604	627,53578	12	0,41	2,2x10 ⁶	3,0
[C ₈₂ H ₁₄₅ O ₈ -2H] ²⁻	628,54369	628,54361	11	0,13	2,2x10 ⁶	2,9
[C ₈₂ H ₁₄₉ O ₈ -2H] ²⁻	630,55897	630,55926	9	0,46	2,0x10 ⁶	2,7
[C ₈₃ H ₁₄₅ O ₈ -2H] ²⁻	634,54363	634,54361	12	0,03	1,3x10 ⁶	1,6
[C ₆₄ H ₁₁₄ O ₈ -H] ⁻	1009,84401	1009,84409	8	0,09	1,9x10 ⁶	2,4
[C ₆₅ H ₁₁₄ O ₈ -H] ⁻	1021,84389	1021,84409	9	0,20	2,9x10 ⁶	3,8
[C ₆₅ H ₁₁₆ O ₈ -H] ⁻	1023,85940	1023,85974	8	0,34	2,2x10 ⁶	2,9
[C ₆₆ H ₁₁₆ O ₈ -H] ⁻	1035,85928	1035,85974	10	0,45	4,3x10 ⁶	5,7
[C ₆₆ H ₁₁₈ O ₈ -H] ⁻	1037,87280	1037,87539	9	2,50	2,2x10 ⁶	3,0

[C ₆₇ H ₁₁₈ O ₈ -H] ⁻	1049,87471	1049,87539	9	0,65	4,9x10 ⁶	6,5
[C ₇₀ H ₁₂₂ O ₈ -H] ⁻	1089,90584	1089,90669	10	0,78	2,2x10 ⁷	27,8
[C ₇₁ H ₁₂₄ O ₈ -H] ⁻	1103,92154	1103,92234	10	0,73	3,9x10 ⁷	51,3
[C ₇₂ H ₁₂₆ O ₈ -H] ⁻	1117,93715	1117,93799	10	0,76	2,1x10 ⁷	28,4
[C ₇₃ H ₁₂₈ O ₈ -H] ⁻	1131,95261	1131,95364	10	0,91	1,4x10 ⁷	18,9
[C ₇₄ H ₁₃₀ O ₈ -H] ⁻	1145,96864	1145,96929	10	0,58	7,9x10 ⁶	10,5
[C ₇₅ H ₁₃₂ O ₈ -H] ⁻	1159,98448	1159,98494	10	0,40	8,1x10 ⁶	10,7
[C ₇₆ H ₁₃₄ O ₈ -H] ⁻	1173,99952	1173,00059	10	0,91	1,3x10 ⁷	16,6
[C ₈₀ H ₁₃₈ O ₈ -H] ⁻	1226,03055	1226,03189	12	1,10	4,4x10 ⁶	5,8
[C ₈₀ H ₁₄₀ O ₈ -H] ⁻	1228,04633	1228,04755	11	0,99	1,7x10 ⁷	20,5
[C ₈₀ H ₁₄₂ O ₈ -H] ⁻	1230,06215	1230,0632	10	0,85	2,7x10 ⁷	35,8
[C ₈₀ H ₁₄₆ O ₈ -H] ⁻	1243,40935	1234,0945	8	0,82	7,9x10 ⁶	10,4
[C ₈₁ H ₁₄₀ O ₈ -H] ⁻	1240,04700	1240,04755	12	0,44	2,4x10 ⁷	31,4
[C ₈₁ H ₁₄₂ O ₈ -H] ⁻	1242,06256	1242,0632	11	0,51	7,0x10 ⁷	92,8
[C ₈₁ H ₁₄₄ O ₈ -H] ⁻	1244,07806	1244,07885	10	0,63	4,7x10 ⁷	62,5
[C ₈₁ H ₁₄₈ O ₈ -H] ⁻	1248,10903	1248,11015	8	0,89	5,5x10 ⁶	7,3
[C ₈₂ H ₁₄₂ O ₈ -H] ⁻	1254,06196	1254,0632	12	0,98	5,6x10 ⁶	7,2
[C ₈₂ H ₁₄₄ O ₈ -H] ⁻	1256,07719	1256,07885	11	1,32	1,7x10 ⁷	22,2
[C ₈₂ H ₁₄₆ O ₈ -H] ⁻	1258,09304	1258,09450	10	1,16	1,6x10 ⁷	20,7
[C ₈₂ H ₁₅₀ O ₈ -H] ⁻	1262,12443	1262,1258	8	1,08	1,0x10 ⁷	13,2
[C ₈₃ H ₁₄₄ O ₈ -H] ⁻	1268,07820	1268,07885	12	0,51	2,0x10 ⁶	2,7
[C ₈₃ H ₁₅₂ O ₈ -H] ⁻	1276,14031	1276,14145	8	0,89	1,7x10 ⁶	2,3

É possível observar a série do ácido hexacíclico C₈₀, a qual corresponde às fórmulas empíricas de C₈₀H₁₃₈O₈, C₈₀H₁₄₀O₈, C₈₀H₁₄₂O₈, C₈₀H₁₄₄O₈ e C₈₀H₁₄₆O₈ e ainda os análogos C₈₁ e C₈₂, com uma variação de DBE de 7 a 11, devido à variação do número de unidades de ciclopentenil presente nas estruturas.^{16,125}

A especiação ácida detalhada revelou esqueletos de hidrocarbonetos entre C₆₅ e C₇₆ com DBE de 10 e 11, que são ARN de baixo M_w, como os íons [C₆₅H₁₁₄O₈-H]⁻, [C₆₆H₁₁₆O₈-H]⁻ e [C₆₇H₁₁₈O₈-H]⁻ (com os respectivos valores de *m/z* 1021,84508, 1035,85928 and 1049,87471) aos quais correspondem a série homóloga C₆₅H₁₁₃O₈, C₆₆H₁₁₅O₈ e C₆₇H₁₁₇O₈, separados por grupos CH₂ (14 Da) no esqueleto de hidrocarboneto. E ainda, os íons dicarregados, do tipo ARN⁻², como [C₇₀H₁₂₂O₈-2H]²⁻ e [C₇₁H₁₂₄O₈-2H]²⁻ (*m/z* 544,44980 e 551,45745) e monocarregados, do tipo ARN⁻¹, [C₇₀H₁₂₂O₈-H]⁻, [C₇₁H₁₂₄O₈-H]⁻ e [C₇₂H₁₂₆O₈-H]⁻ (*m/z* 1089,90584, 1103,92154 e 1117,93715) aos quais correspondem a série homóloga C₇₀H₁₂₁O₈, C₇₁H₁₂₃O₈ e C₇₂H₁₂₅O₈ identificada por Juyal *et al.*⁷⁴

Mapolelo *et al.*²² foram os primeiros a identificar ARN com baixa M_w e esclareceram que os depósitos de naftenato poderiam ser usados para identificar sua origem com base no tipo de classe e NC.²² Os autores apresentaram uma especiação química detalhada de depósitos de naftenato por FT-ICR MS, mostrando que as espécies de ARN são os principais constituintes de depósitos de naftenato de cálcio.

A expansão do espectro de massa ESI(-)Orbitrap (**Figura 19d**) para FA4 na região de *m/z* 1020-1300, referente aos íons ARN⁻¹, confirmou a presença de espécies ARN de baixa M_w (C₆₅₋₇₆), como previsto por ESI(-)FT-ICR MS (**Figura 19c**). Os dados do Orbitrap MS também foram capazes de identificar a série de homólogos C₇₀₋₇₂, o que foi confirmado por Juyal *et al.*⁷⁴ Os autores relataram que espécies de ARN com esqueletos de hidrocarbonetos C₆₀₋₇₇ (baixo M_w) foram encontrados em depósitos de campo na América do Sul, indicando similaridade molecular entre espécies de depósitos da África Ocidental^{22,74} e atribuindo a relação genética entre depósitos de campo em ambos os lados de o Oceano Atlântico.⁷⁴

Para facilitar a compreensão, foi construído um histograma de classe química que retrata a porcentagem relativa das classes de compostos presentes no extrato de ácidos orgânicos e de suas frações (FA1-FA4) identificadas por ESI(-)Orbitrap MS, **Figura 20b**. Os resultados mostram uma predominância de classes oxigenadas atestando a presença de ácido em todas as amostras. Observe que há diferenças na abundância de espécies entre os dados FT-ICR e Orbitrap. Isso pode ser atribuído ao funcionamento de cada analisador, como seus princípios eletrônicos e físicos que afetam a resolução e a exatidão da massa e, por consequência, discriminam medidas de valores *m/z*.¹⁶²

Porém, para o extrato ácido e as frações FA1, FA2 e FA3, há uma variedade de classes oxigenadas, com predominância da classe O₄, como o que foi previsto por ESI(-)FT-ICR MS e ressaltado na **Figura 20a**. Entretanto, a classe O₈ (classe dos ARN) foi observada apenas para o extrato ácido e fração FA4.

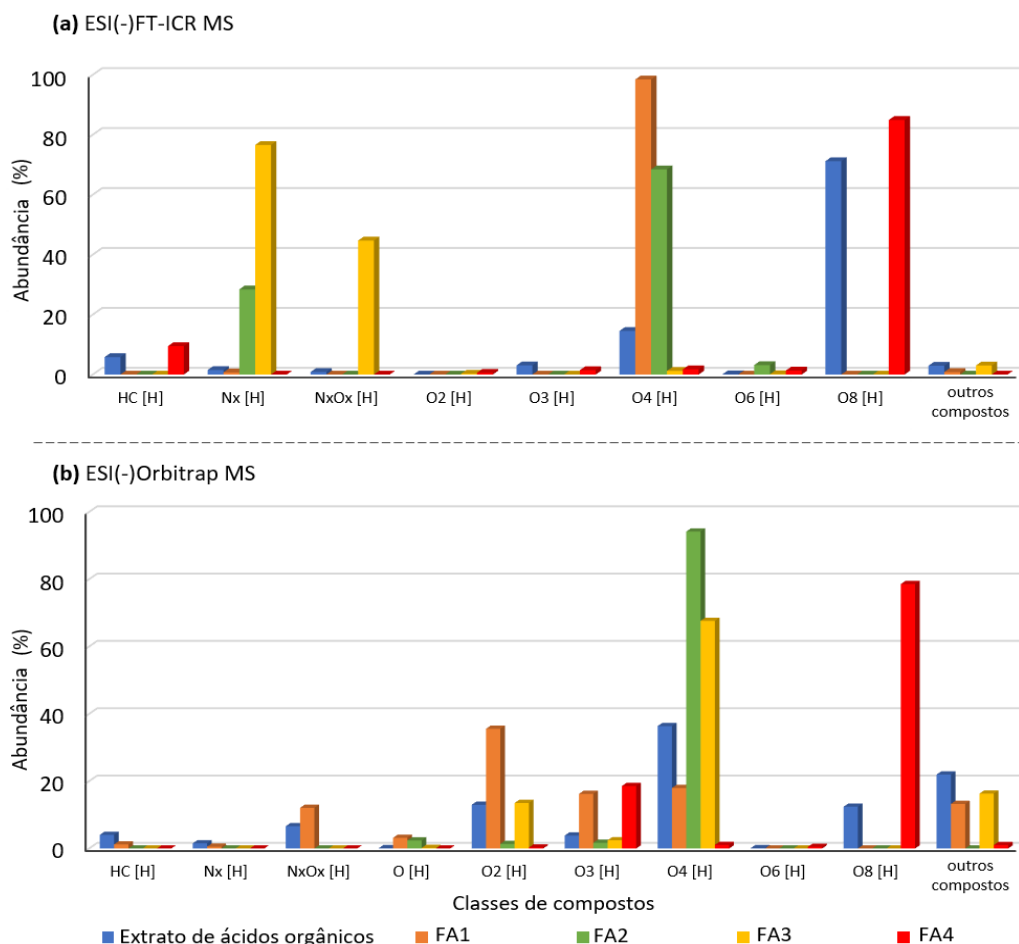


Figura 20. Heteroátomo contendo a distribuição de classe dos compostos presentes no extrato de ácidos orgânicos do depósito A e suas principais frações (FA1-FA4) identificadas por ESI(-)FT-ICR MS (a) e ESI(-)Orbitrap MS (b).

A **Figura 21** apresenta o diagrama de distribuição de abundância do DBE *versus* o NC, para as classes O₄[H] e O₈[H] do extrato de ácidos orgânicos a partir do depósito de naftenatos de cálcio e de suas principais frações identificadas por ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS. É possível notar uma significativa semelhança dos gráficos gerados para as duas técnicas analíticas. Notem que as duas primeiras frações (FA1 e FA2) apresentam majoritariamente compostos da classe O₄, enquanto a terceira fração (FA3) concentra-se compostos espécies duplamente carregadas, como por exemplo o íon $[C_{81}H_{140}O_8-2H]^{-2}$ de m/z 620,52758, decorrente da desprotonação de dois grupos dos quatro grupos carboxílicos dos ARN que o originou, $C_{81}H_{140}O_8$.

A quarta fração (FA4), além de apresentar estas espécies dicarregadas, se destaca por apresentar predominantemente cadeias carbônicas longa (acima de C₇₀) e sobretudo para a classe O₈ (classe dos ARN) com domínio para cadeias com C₈₀ e DBE próximo de 12.

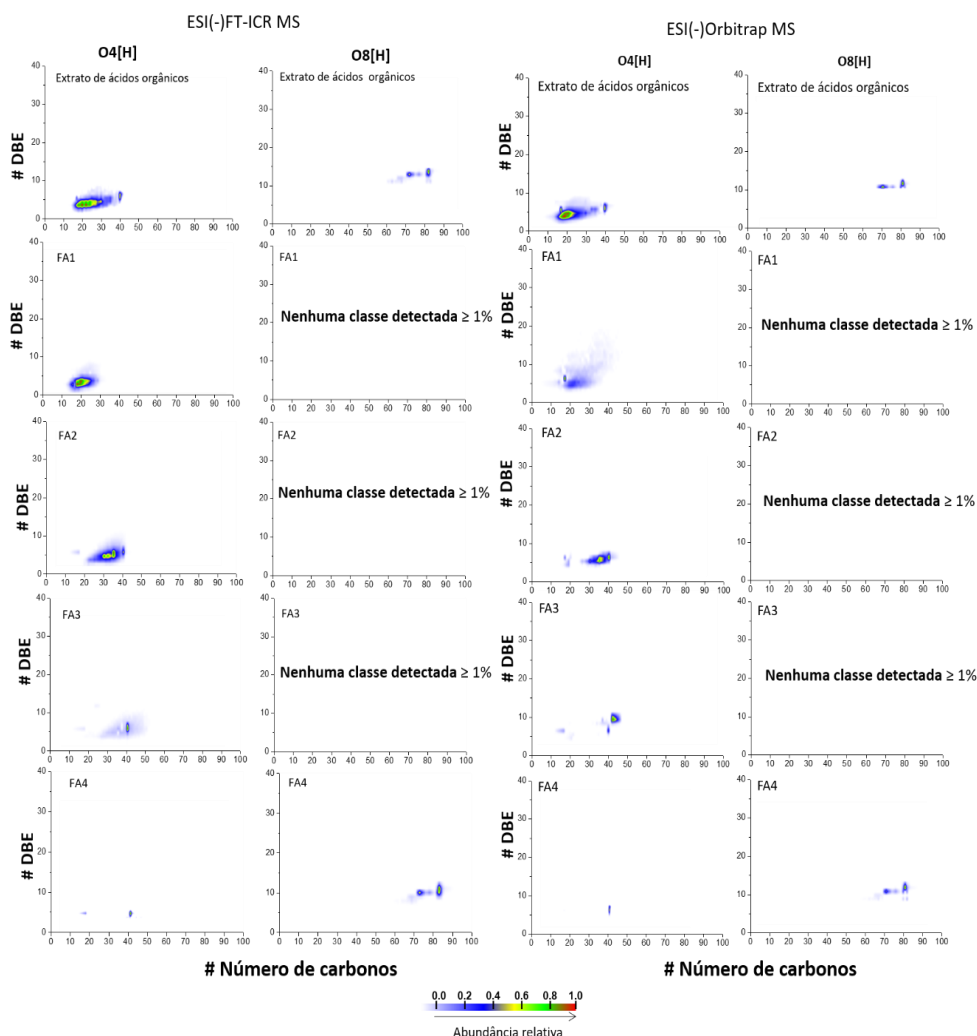


Figura 21. DBE versus número de carbonos do extrato de ácidos orgânicos do depósito A e suas principais frações (FA1-FA4) geradas por ESI(-)FT-ICR MS e ESI(-)Orbitrap MS.

Apesar do número de fórmulas e resolução oferecidas pelo Orbitrap MS serem menores, é importante observar as semelhanças entre os resultados obtidos pelo FT-ICR MS. Esses resultados indicam consistência entre os dados que garantem a eficácia do método de separação proposto em outro para gerar resultados reprodutíveis que separem as espécies ácidas, contidas no extrato de ácido orgânico do depósito de naftenato de cálcio, de acordo com seus diferentes valores de M_w e o isolamento de espécies ARN.

Por outro lado, a técnica tem seu diferencial na viabilidade econômica, conforme apresentado por Covas *et al.*¹⁶⁵ Eles abordaram a respeito da importância de desenvolver e aplicar métodos analíticos com analisadores de massa mais acessíveis que permitam caracterizações químicas menos onerosas.¹⁶⁵ Aqui, a ESI(-)Orbitrap MS demonstrou um elevado poder de resolução na discriminação dos ANs da mesma classe e massas semelhantes presentes nas frações ácidas, mostrando-se como uma técnica promissora para a caracterização destas matrizes.

A **Figura 22** mostra os espectros do extrato de ácido orgânico e da fração de interesse (FA4) obtida a partir do depósito B. Os espectros de massa forneceram perfis de assinatura característicos da presença de ARN, com uma faixa de massa típica⁷⁴ com m/z ~500-650 e ~950-1300, e cadeias carbônicas que variaram de C₇₁₋₈₃ e C₆₀₋₇₀, com o respectivo M_w = 1011,7 e 1181,4 Da para a fração FA4 (**Figura 22a**) e seu extrato de ácidos orgânicos (**Figura 22b**).

Mapolelo *et al.*¹³⁰ elucidam que os espectros ESI(-)FT-ICR MS de íons negativos obtidos de depósitos de naftenato de cálcio exibem dois picos estreitos devido à presença de ARN; íons individualmente carregados $[M - H]^-$ (ARN⁻¹) de m/z de 1225-1270 e íons duplamente carregados $[M - 2H]^{2-}$ (ARN⁻²) de m/z entre 615–630.^{22,130} Aqui, as expansões (**Figura 22**) revelaram que alguns sinais, como m/z de 614,52840, 620,52838, 627,53625, 1117,93904 e 1256,08002, tornaram-se mais intensos após SPE, na fração FA4, em comparação ao extrato de ácido orgânico devido à remoção de espécies ácidas com menor M_w , principalmente da classe O₄, que ioniza mais facilmente.

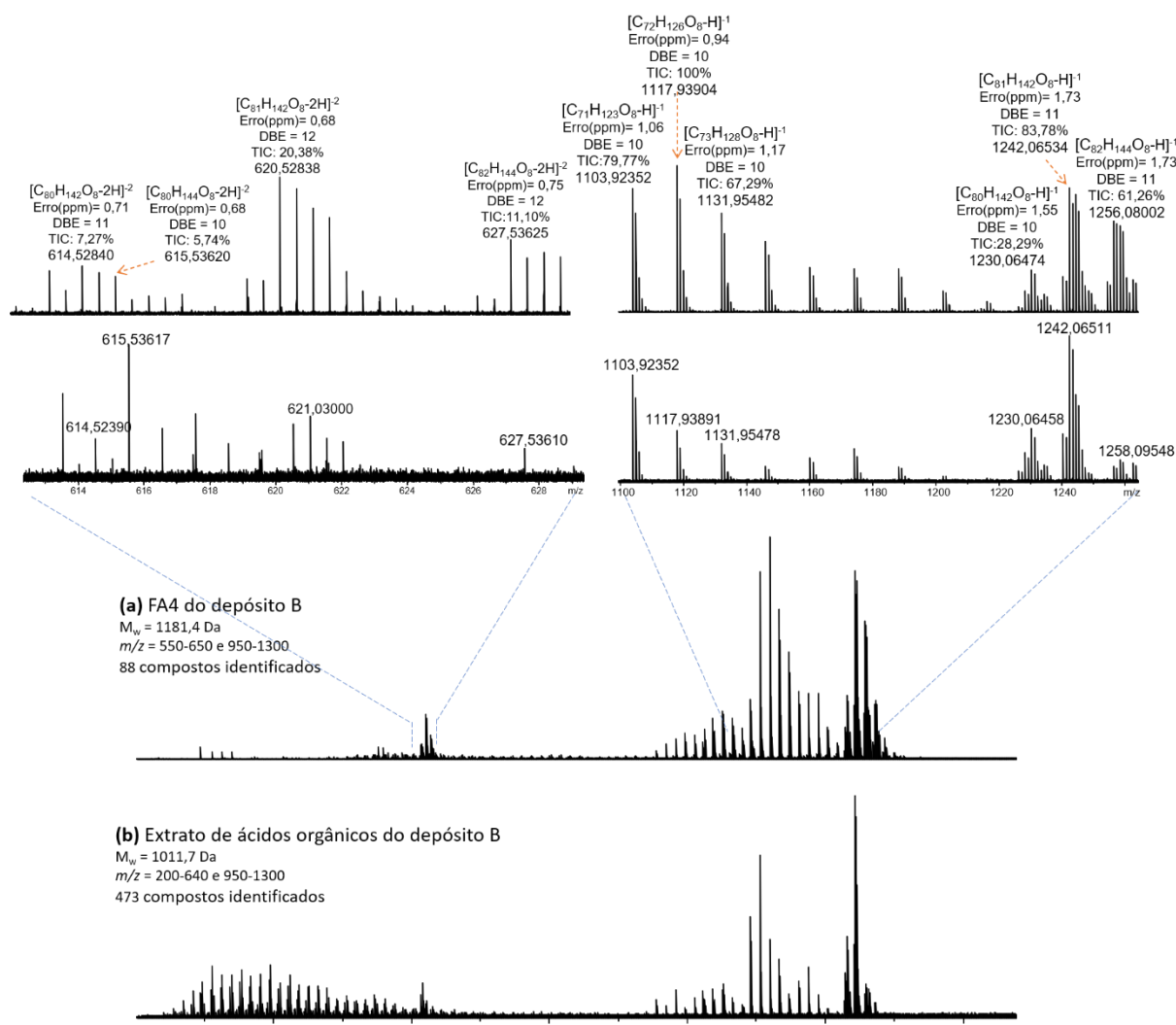
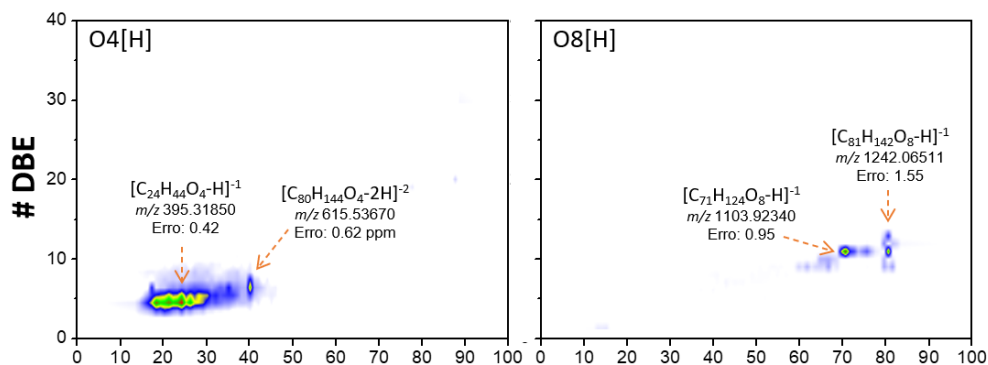


Figura 22. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS da fração de interesse, FA4 **(a)**; obtida do extrato de ácido orgânico **(b)** do depósito de naftenatos B.

A **Figura 23** enfatiza que o método de isolamento de ARN a partir de um depósito de naftenatos é eficiente, pois há uma redução acentuada de ácidos dicarboxílicos na fração de interesse. Para o extrato de ácido orgânico (**Figura 23a**), nota-se que na classe O_4 há abundância de espécies com NC variando entre C_{15} e C_{40} , sendo que a maioria das espécies apresentam menores M_w , classe dos ácidos dicarboxílicos, com destaque para as espécies m/z 395,31850 da fórmula $[C_{24}H_{44}O_4-H]^{-1}$. Porém, após o processo de extração, os sinais dos ácidos dicarboxílicos (classe O_4) foram observados apenas como íons duplamente carregados do tipo ARN^{-2} (**Figura 23b**). Isso prova a seletividade do método de purificação para as espécies ARN.

A **Figura 23b** também revela o aumento da intensidade dos sinais relacionados à classe O₈. Em geral, foram identificadas no extrato de ácido orgânico um total de 473 fórmulas moleculares (**Figura 23a**), sendo que 196 e 56 corresponderam, respectivamente, às classes de dicarboxílicos e tetracarboxílicos, com abundâncias de 36,0 e 35,0%, respectivamente. Por outro lado, foram identificadas 88 fórmulas moleculares na fração FA4 (**Figura 23b**), sendo que 62 corresponderam às classes ARN. Dentre eles, oito foram atribuídos a íons do tipo ARN⁻² e 54 atribuídos aos íons monocarregados do tipo ARN⁻¹, que juntos corresponderam a ~88,6 % das espécies de ARN na fração de interesse, o que comprova a seletividade do método.

(a) Extrato de ácidos orgânicos do depósito B



(b) FA4 do depósito B

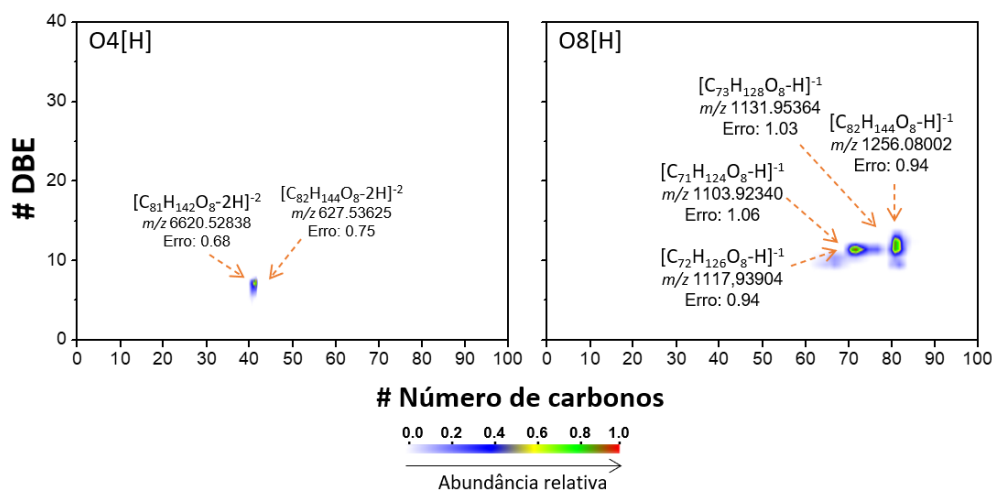


Figura 23. Gráficos DBE versus número de carbonos para as classes O₄ e O₈ gerados a partir dos dados ESI(-)FT-ICR MS do extrato de ácidos orgânicos (a) e sua fração principal FA4 (b) do depósito de naftenatos B.

- Caracterização das frações ácidas após SPE sem a etapa de limpeza

Os espectros das frações ácidas (FA1_{sl}-FA4_{sl}) obtidas a partir do extrato de ácidos orgânicos do depósito B, submetido a SPE sem a etapa de limpeza, estão mostrados na **Figura 24a**. É possível observar que o espectro da fração FA1_{sl} apresentou uma gaussiana como uma distribuição de m/z ~200-700, que se difere das demais frações que apresentaram intervalos de distribuições de m/z maiores FA2_{sl} (200-1110), FA3_{sl} (300-1300) e FA4_{sl} (550-650 e 950-1300).

Embora a fração FA4_{sl} apresente uma distribuição de m/z diferente das demais frações (FA1_{sl}-FA3_{sl}), muito se assemelha a distribuição de m/z , com a faixa de massa típica de assinatura característica dos ARN⁷⁴ (550-650 e 950-1300), observada para a fração FA4 (obtida por SPE com a etapa de limpeza) a partir do depósito B. Ademais analogamente foram observados para a fração FA4_{sl}, espécies da classe O₈ com cadeias carbônicas com NC entre C₆₀₋₈₃, com mesma M_w média (1181,7 Da) e sinais mais intensos de m/z 613,52024, 615,53598 e 620,52811 Da de íons do tipo ARN⁻² e m/z 1103,92235, 1230,06323 e 1242,06405 Da de ARN⁻¹ (**Figura 24**), os quais também foram revelados para FA4. Todavia, das 80 fórmulas moleculares encontradas na fração FA4_{sl}, 46 correspondem às classes ARN. Embora o método de isolamento dos ARN a partir do extrato de ácidos orgânicos do depósito, submetido a SPE sem a etapa de limpeza (sem *clean up*) ter se apresentado seletivo, a recuperação de ARN apresentada foi um pouco inferior a observada pelo isolamento das espécies com a etapa de limpeza (com *clean up*) por SPE.

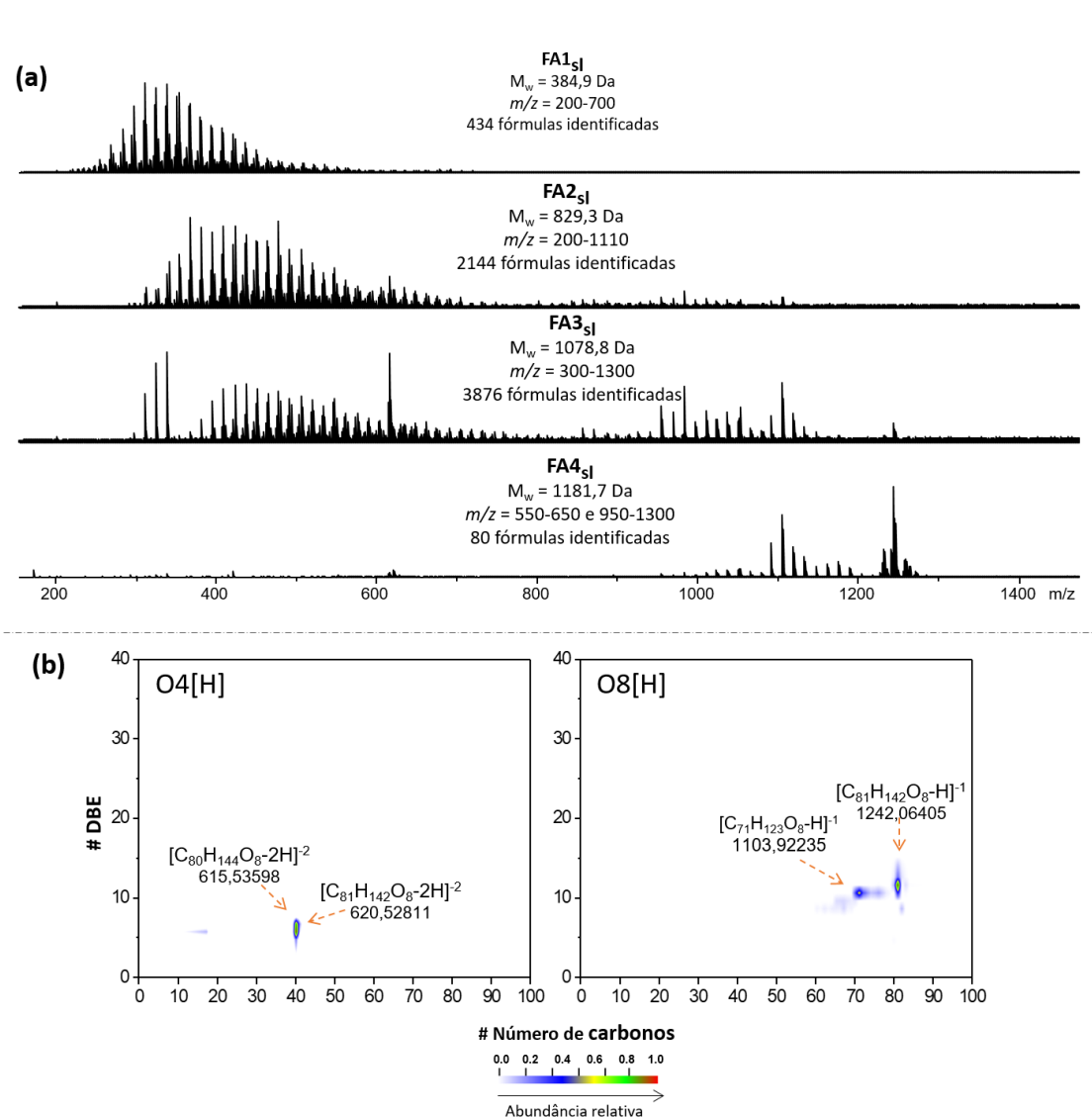


Figura 24. Espectro ESI(-)FT-ICR MS (a) e gráfico de DBE *versus* número de carbono para as classes O4[H] e O8[H] (b) da fração FA4_{sl} obtida a partir do extrato de ácidos orgânicos do depósito B, submetido a SPE sem a etapa de limpeza.

2.4.4. Determinação da pureza da fração concentrada de ácidos com ARN

Para determinar a pureza das amostras concentradas de ARN (extrato ácido orgânico e na fração de interesse, FA4, obtido do depósito B), aplicamos a proposta de Simon *et al.*¹⁵⁴ que consiste na adição de uma quantidade conhecida de um composto padrão, ácido benzóico, a uma solução de ARN em CDCl₃. Em seus estudos os autores encontraram 83 %m/m de pureza de ARN no extrato de ácido orgânico avaliado.¹⁵⁴ Semelhantemente, Bertelli *et al.*¹³⁶ encontraram 81,9 %m/m de ARN na amostra usada para o estudo a fim de avaliar a formação e inibição de naftenato de cálcio na interface água/óleo.

Assim, da mesma forma, tomamos as intensidades das áreas dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 25**) para ARN e ácido benzóico nas amostras, alcançando um teor de ARN de ~84 %m/m no extrato de ácidos orgânicos e ~95 %m/m na fração FA4.

Esses resultados indicam que o método aqui proposto contribuiu para o isolamento do ARN dos depósitos de naftenato, mostrando sua eficiência.

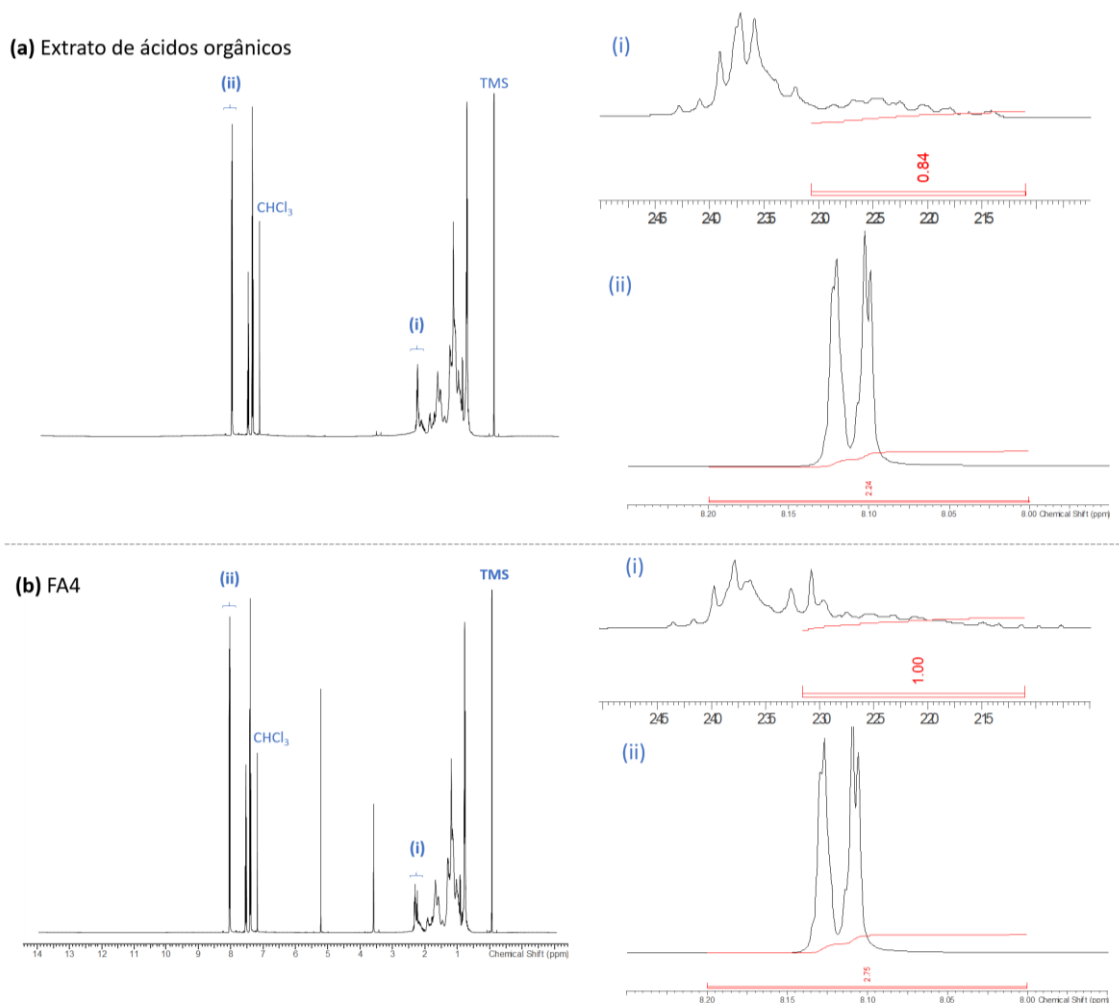


Figura 25. Espectros de RMN de ^1H do extrato de ácidos orgânicos do depósito de naftenatos **B** (a) e sua fração principal, FA4 (b). A expansão mostra as regiões de integração dos (i) sinais de ácido ARN (2,11 - 2,30 ppm) e (ii) ácido benzóico (~ 8,1 ppm).

2.4.5. ESI(-)MS/MS

Os experimentos de dissociação induzida por colisão para íons m/z 1090, 1104, 1118, 1174, 1230 e 1242, presentes no FA4 do depósito B, resultaram em desidratação (perdas neutras de H_2O) e descarboxilação (perdas neutras de CO_2) dos íons¹³⁰ $[C_{70}H_{121}O_8-H]^{-1}$, $[C_{71}H_{124}O_8-H]^{-1}$, $[C_{72}H_{126}O_8-H]^{-1}$, $[C_{76}H_{134}O_8-H]^{-1}$, $[C_{80}H_{142}O_8-H]^{-1}$ e $[C_{81}H_{142}O_8-H]^{-1}$, respectivamente, **Figura 26a-f**. A **Figura 26e** revela os mesmos fragmentos (1212, 1194, 1150 e 1106) observados por Sutton *et al.*²⁰ consistindo em fragmentação em massa com perda de H_2O e CO_2 do íon de m/z 1230, que corresponde ao ácido hexacíclico C_{80} .

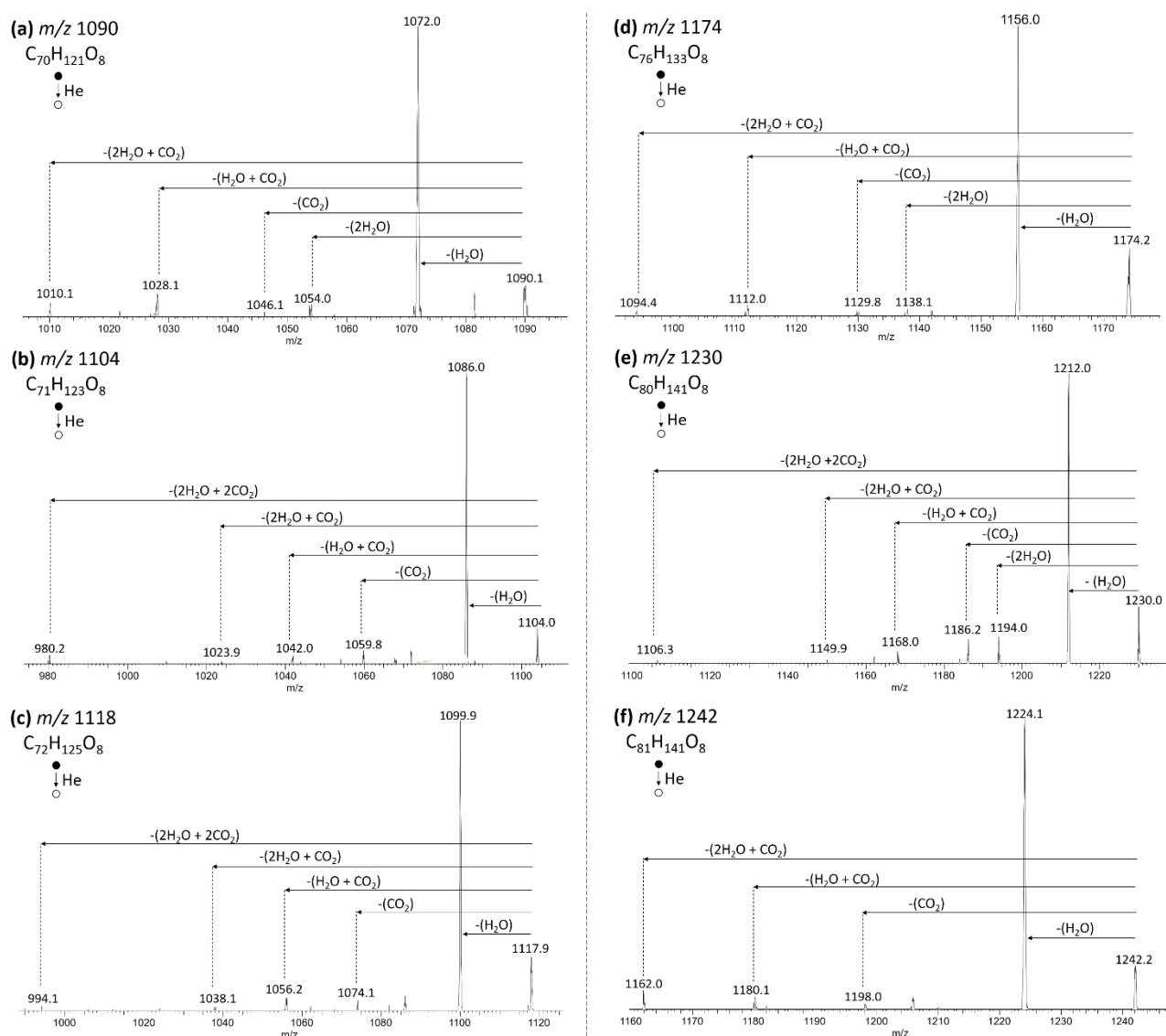


Figura 26. Espectros ESI(-)MS/MS de ácidos ARN de carga única encontrado na fração de interesse, FA4, obtido do depósito B.

Além disso, as perdas características confirmaram as estruturas químicas dos íons duplamente carregados¹³⁰ $[C_{71}H_{124}O_8-2H]^{-2}$, $[C_{80}H_{142}O_8-2H]^{-2}$ e $[C_{81}H_{142}O_8-2H]^{-2}$ com m/z 552, 615 e 621 em a fração de interesse (FA4), **Figura 27**.

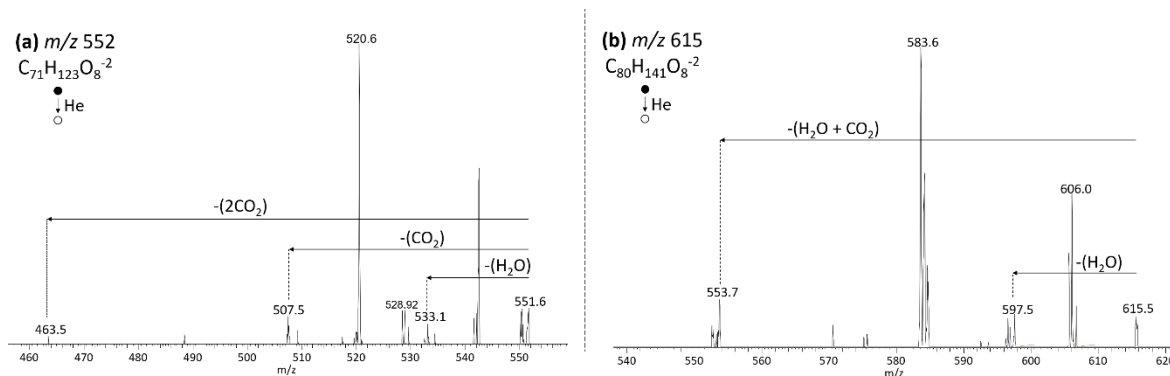


Figura 27. Espectros ESI(-)MS/MS de ácido ARN duplamente carregado encontrado na fração FA4, obtida do depósito B.

2.5. CONCLUSÃO

Este estudo apresentou uma nova metodologia para o isolamento de ARN de depósitos de naftenato de cálcio, por meio de uma sequência de eluição que proporcionou uma excelente separação devido às diferenças de polaridade e diferentes faixas de M_w . É importante ressaltar que o material sorvente previamente selecionado, AFS, funcionou muito bem na retenção de íons e na separação do ARN dos demais ANs presentes na amostra.

Os resultados RMN salientaram a ausência de hidrogênios aromáticos na fração FA4 e maiores de teores de H_β e H_α , que indica a existência de ramificações confirmando a complexidade das estruturas.

Os resultados de ES(-)FT-ICR MS mostraram que as classes $O_4[H]$ e $O_8[H]$ são predominantes no extrato de ácidos orgânicos obtido a partir do depósito de naftenatos. O espectro do extrato ácido revelou uma região (m/z 200-600) com sinais relacionados a presença de ANs clássicos e outras duas regiões com sinais que justificam a presença de íons $[M-H]^{-2}$ (m/z 610-640, devido à desprotonação de dois grupos dos quatro grupos carboxílicos do ácido tetraprótico, ARN^{-2}) e de íons monocarregados, do tipo $[M-H]^{-1}$ (m/z 950-1300, devido a desprotonação de apenas um dos grupos carboxílicos do ácido tetraprótico, ARN^{-1}).

A metodologia empregada possibilitou a separação das diferentes espécies presentes naquela amostra. As frações FA1 e FA2 apresentaram majoritariamente ácidos dicarboxílicos, enquanto a fração FA3 concentrou-se uma mistura de espécies ácidas. Entretanto, a fração FA4 concentrou-se no ARN que inclui espécies dicarregadas (ARN^{2-}) e especialmente ARN na forma de íons monocarregados (ARN^{-1}), que foram identificados a partir de seus padrões de fragmentação característicos por experimentos de ESI(-)MS/ MS.

Os dados do ESI(-)Orbitrap MS corroboraram com os dados obtidos pelo ES(-)FT-ICR MS, os quais indicam consistência entre os dados, garantindo que o método de separação proposto pode gerar resultados reprodutíveis.

O método aqui apresentado realizou a separação dos ANs, contidos no extrato de ácidos orgânicos do depósito de naftenato de cálcio, de acordo com seus diferentes valores de M_w e o isolamento do ARN, atingindo ~95% em peso de pureza dessas espécies na fração de interesse.

A transformação dos depósitos de naftenato, formados em unidades de produção, em uma amostra padrão de alto valor agregado, confere uma vantagem econômica ao conceito de tratamento de resíduos. Sendo um diferencial em relação aos processos de síntese química para produção de moléculas ARN padrão e de outros ANs de baixo M_w que possam estar presentes no depósito. O processo aqui descrito é inovador porque pode agregar valor aos resíduos do processo de produção e exploração de petróleo.

O capítulo 2 foi publicado na Fuel, 308,122065, 2022.

3. CAPÍTULO 3 – RASTREAMENTO DE ARN EM AMOSTRAS DE PETRÓLEO E DEPÓSITOS NAFTÊNICOS

3.1 INTRODUÇÃO

Durante a produção de petróleo bruto, é fundamental garantir um fluxo econômico e bem-sucedido.³⁸ Contudo, alguns componentes presentes no petróleo bruto ou na água produzida podem precipitar-se e, como resultado, causar irregularidades na produção.^{38,137}

Neste âmbito, os ARN são capazes de reticular com íons cálcio,⁴¹ mediante a alterações de pH na água co-produzida.^{15,39,128} O sal (naftenato de cálcio) formado insolúvel permanece como um filme interfacial,⁴¹ que devido a sua viscosidade pode se associar a areias e outros componentes do petróleo bruto¹⁵⁹ e gerar incrustações sólidas, (depósitos naftênicos) capazes de restringir os sistemas de produção, tornando-os inoperantes. Isso implica a prejuízos econômicos devido a necessidade de paradas não planejadas para remoção daqueles depósitos.¹³⁷

Em função disso, a literatura apresenta diversos estudos a respeito dos fenômenos que envolvem os mecanismos de formação, previsão e também de inibição da deposição de naftenato de cálcio em sistemas de produção de petróleo.^{37,38,41,126,136,149,159,160,172,173,174,175,176,177,178}

Por outro lado, Sjoblom *et al.*¹³⁷ explica que a detecção e determinação da concentração de ARN a partir de suas matrizes é útil para identificar a natureza do depósito e também estimar, em um estágio inicial, o potencial de incrustação e a necessidade de tratamento.

No entanto, o teor de ARN nos óleos crus é muito pequeno, os quais se encontram em concentrações não detectáveis a níveis de algumas dezenas de partes por milhão,⁴¹ o que dificulta a mensuração a partir de sua matriz, que possui ampla complexidade e variada composição.¹⁵⁵

A literatura apresenta algumas estratégias analíticas que envolvem a mensuração de ARN a partir do petróleo cru,^{108,114,132,140,141,142,179,180} as quais demandam de métodos de pré-preparo de amostra e extração laboriosos, que requerem um significativo consumo de solventes e que, por vezes, exigem cuidados extras devido a toxicidade dos reagentes químicos envolvidos no processo.

Em contrapartida, como abordamos nos capítulos 1 e 2, existe uma diversidade na instrumentação analítica que muito contribui para a caracterização de ANs, inclusive ARN, em petróleo e seus derivados. Ainda assim, o amplo uso de modernas técnicas instrumentais de determinação dessas espécies não elimina a necessidade de métodos de preparo, que é uma das etapas críticas do processo analítico e pode ser um obstáculo para a obtenção de resultados confiáveis.

A este respeito, a FT-ICR MS tem se mostrado uma importante ferramenta analítica na caracterização de ANs e com boas perspectivas de identificação de ARN diretamente no petróleo e derivados, com simplicidade no preparo e consumo mínimo de amostra e reagentes.

Além disso, como abordamos no capítulo 1, a aplicação bem-sucedida do FT-ICR MS em petroleômica depende dos métodos de processamento de dados. Em consoante, para relacionar dados medidos a parâmetros específicos podemos utilizar a calibrações do tipo uni e multivariada, que são especialmente úteis com parâmetros difíceis de medir diretamente.^{17,181} De modo que a estatística multivariada (isto é, a quimiometria) possa ser útil na extração de um maior número de informações e reconhecimento de padrões entre as amostras.^{182,183}

Diante disso, neste capítulo foram construídos alguns modelos de regressão uni e multivariadas, como o método Mínimos Quadrados Parciais (PLS), e avaliados com aplicações em amostras testes para determinação de ARN em amostras de petróleo a partir de diferentes técnicas analíticas. Por consequência, a FT-ICR MS por ESI(-) não convencional foi empregada na caracterização e identificação de espécies ARN em amostras de depósitos de naftenatos e petróleo por metodologias que permitam dispensar ou requerer um preparo mais simples de amostra.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação de alguns modelos de regressão na determinação ARN em amostras em petróleo e propor o emprego da FT-ICR MS por ESI(-) não convencional na caracterização e identificação de espécies ARN em amostras de depósitos de naftenatos e em petróleo.

3.2.2 Objetivos específicos

- Construir alguns modelos de calibração multivariada a partir de dados oriundos das técnicas de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), espectroscopia na região do infravermelho médio (MIR), FT-ICR MS e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H) em petróleo de acidez diferentes;
- Avaliar a aplicação destes modelos em amostras de petróleo com relatos de deposição de naftenato;
- Propor uma metodologia por FT-ICR MS para a identificação de ARN a partir da caracterização de naftenatos e petróleo com mínimo preparo de amostra.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1. Materiais e reagentes

Todos os produtos químicos empregados eram de grau analítico (pureza superior a 99,5%). Tolueno e diclorometano (DCM), sendo fornecido pela Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Brasil. Metanol pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Indaiatuba, Brasil. O ácido fórmico e o hidróxido de amônio foram adquiridos na Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

3.3.2. Amostras

Neste estudo, foram selecionadas duas amostras de petróleo (petróleo A e petróleo B), as quais não apresentavam relatos de deposição de naftenato, para construção das curvas de calibração.

Outras duas amostras de petróleo com relatos de deposição de naftenato, referenciados como petróleo 1 e petróleo 2, foram utilizadas como amostras testes (amostras reais) para validação dos modelos de calibração.

As propriedades de caracterização dos petróleos A e B foram então determinadas (**Tabela 5**) de acordo com cada método padrão da ASTM pelo Laboratório de Caracterização de Petróleo da Universidade Federal do Espírito Santo (LabPetro, UFES, Brasil). O número de acidez total (NAT) foi determinado em conformidade com a norma ASTM D664 por titulação potenciométrica (titulador automático Metrohm 836) da amostra, usando uma solução alcoólica de KOH. A gravidade API foi obtida de acordo com ASTM D1250 (ASTM *International*, 2008). O teor de água foi determinado por titulação potenciométrica Karl Fischer, de acordo com ASTM D4377 (ASTM *International*, 2006). A densidade foi determinada em conformidade com a norma ISO 12185 (*International Organization for Standardization*, 1996) através da injeção da amostra no analisador automático digital Stabinger SVM 3000 (Anton Paar). O solvente utilizado durante a análise foi uma mistura de metanol e clorofórmio a 20% (v/v). Para a padronização do reagente de KF, a água destilada foi solubilizada nos solventes. Um titulador Metrohm KF (modelo 836 Titrando) equipado com um eletrodo de platina dupla foi empregado durante os testes de determinação do teor de água.

Por outro lado, características dos petróleos 1 e 2 (**Tabela 5**) foram fornecidas pelo CENPES/PETROBRAS (Rio de Janeiro, Brasil), sendo que o método para a determinação do NAT estava em conformidade com a norma ASTM D664, a gravidade API e a densidade a 20 °C com a norma ISO 12185 e o teor de água, determinado por titulação potenciométrica Karl Fischer, de acordo com a norma ASTM E-203/01.

Tabela 5. Propriedades físico-químicas dos petróleos utilizados neste trabalho.

Propriedades	Petróleo A	Petróleo B	Petróleo 1	Petróleo 2
Número de acidez total (mg de KOH g^{-1})	2,139	0,398	1,84	2,05
Gravidade API a 15,6°C	13,2	27,9	19,0	19,2
Densidade a 20°(g cm $^{-3}$)	0,9739	0,8830	0,9366	0,9350
Teor de água (% m/m)	0,395	0,20	1,97	1,25
Relatos de deposição de naftenato	Não	Não	Sim	Sim

Foi estudada uma amostra de depósito de naftenato de cálcio, referenciada como depósito B, mencionada no capítulo 2, a qual foi submetida à remoção de petróleo residual por extração sólido-líquido via *Soxhlet* conforme mostrado na **Figura A1**.

O extrato de ácidos orgânicos e o padrão de ARN (quarta fração ácida, FA4, obtida conforme descrito no capítulo 2), aqui utilizados, foram extraídos a partir do depósito de naftenato B.

Todas as amostras de petróleo foram fornecidas pelo CENPES/PETROBRAS (Rio de Janeiro, Brasil) e pertenciam a campos de produção localizados na bacia sedimentar da costa brasileira.

3.3.3. Determinação dos modelos de calibração

3.3.3.1. Com adição do padrão ARN (FA4) em petróleo e a partir de dados obtidos de FT-ICR MS

Dois petróleos de diferente número de acidez, petróleo A (ácido, 2,139 mgKOH g⁻¹) e petróleo B (baixa acidez, 0,398 mgKOH g⁻¹), foram enriquecidos com um padrão de ARN (fração FA4, descrita no capítulo 2). As adições foram realizadas de forma decrescente de concentração, até que não fosse observado, visualmente, sinais na região de *m/z* entre 900-1300. Deste modo, as concentrações resultantes e que foram utilizadas para a construção dos modelos são: **(i)** petróleo A: 22,5; 17,5; 10,0; 2,5; 1,25; 0,63; 0,14; 0,07 µg L⁻¹ e; **(ii)** petróleo B: 25,00; 10,00; 17,50; 12,50; 5,00; 2,50; 1,25 µg L⁻¹. As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque do padrão de ARN contendo 2 mg mL⁻¹.

As dosagens da solução estoque do padrão de ARN foram realizadas de modo que a solução final mantivesse uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹ do petróleo em tolueno:metanol (1:1) a 0,1% m/v de NH₄OH em todos os ensaios para o petróleo A e de 2,0 mg.mL⁻¹ do petróleo em tolueno:metanol (1:1) a 0,1% m/v de NH₄OH em todos os ensaios para o petróleo B.

As soluções resultantes do petróleo A foram injetadas na fonte ESI(-) a um fluxo de 8,0 µL min⁻¹. As condições de operação da fonte de ESI(-) foram: voltagem no capilar de 3600 V, temperatura e fluxo do gás de secagem de 180°C e 4 L.min⁻¹, pressão de gás nebulizador de 1,0 bar, placa final *offset* 500 V, *collision voltage* 35,0 V, *skimmer* de -40,0 V. Os espectros foram adquiridos por meio de 200 varreduras de sinais transientes de domínio de tempo de 512 K com um tempo de acumulação de íons de 0,080 s e tempo de voo (TOF) = 0,9 ms.

Para o petróleo B, as condições de operação foram: fluxo de injeção da amostra de $10,0 \mu\text{L min}^{-1}$, voltagem no capilar de 3600 V, temperatura e fluxo do gás de secagem de 180°C e 4 L.min^{-1} , pressão e temperatura de gás nebulizador de 1,0 bar e 350°C , vazão de gás de secagem de 4 L.min^{-1} , placa final *offset* 500 V, *collision voltage* 35,0 V, *skimmer* de -40,0 V. Os espectros foram adquiridos por meio de 200 varreduras de sinais transientes de domínio de tempo de 512 K com um tempo de acumulação de íons de 0,120 s e tempo de voo (TOF) = 0,9 ms.

Antes da aquisição, o equipamento foi calibrado externamente a partir de uma solução de L-arginina (m/z 200-2000). Os espectros obtidos foram recalibrados no software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics) utilizando um conjunto de compostos alquilados homólogos mais abundantes para cada amostra.

Para a construção dos modelos de regressão univariada e multivariada pelo PLS os espectros foram configurados no *software* DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics) com exatidão de massa igual a 3 e exportados para o *software* Matlab R2013a (The Mathworks, Natick, USA). Sinais com intensidades relativas inferiores a 5% foram desconsiderados e os espectros foram centralizados na média. Foram utilizadas 9 e 8 amostras na construção dos modelos de regressão para o petróleo A e B, respectivamente. Os parâmetros de desempenho mais importantes, definidos segundo¹⁸⁴ foram utilizados para avaliar cada modelo, são eles: raiz quadrada do erro médio (RMSE), coeficiente de determinação (R^2), limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ) e variáveis latentes (nvl) para o modelo PLS.

3.3.3.2. Com adição do extrato de ácidos orgânicos em petróleo e a partir de dados obtidos de diferentes técnicas analíticas

Outras curvas de calibração foram construídas para os petróleos A (ácido) e B (baixa acidez) a partir da dosagem do extrato de ácidos orgânicos (descrito no capítulo 2) empregando as técnicas de FT-ICR MS, RMN de ^1H , MIR e NIR. Primeiramente, foram misturadas 2 soluções em diclorometano (CH_2Cl_2): uma solução 5 mg mL^{-1} de extrato de ácidos orgânicos (solução estoque ARN) e outra a 10 mg.mL^{-1} de um petróleo ácido ($2,139 \text{ mgKOH g}^{-1}$), denominado de petróleo A.

De modo que a proporção de extrato e petróleo das misturas (A0 – A7) se encerrem em 0%, 1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 30% e 50% (%m/m), como detalhado na **Tabela 6**. Cada mistura A0 – A7 foi preparada em triplicata, totalizando 24 misturas a serem analisadas.

Em seguida, deixou-se as misturas sob pressão e temperatura ambiente para a evaporação do solvente. De maneira análoga preparamos as misturas (B0 – B7), em triplicata (24 misturas) para um petróleo de baixa acidez (0,398 mgKOH g⁻¹), denominado de petróleo B.

Tabela 6. Concentrações de extrato de ácidos orgânicos no petróleo A*.

Mistura	%m/m ARN	μL 5 mg.mL ⁻¹ ARN (μL)	μL 10 mg.mL ⁻¹ petróleo	ARN (mg)	Petróleo (mg)
A0	0	0	1000	0	1,0
A1	1	20	990	0,1	9,9
A2	2	40	980	0,2	9,8
A3	5	100	950	0,5	9,5
A4	10	200	900	1	9
A5	20	400	800	2	8
A6	30	600	700	3	7
A7	50	1000	500	5	5

*Aplica-se de maneira semelhante ao petróleo B.

Foram empregadas 7 amostras de calibração para construção de modelos preditivos para os petróleos A e B, utilizando o algoritmo de regressão linear PLS e o *software* Matlab R2013a (The Mathworks, Natik, USA). Antes da construção de cada PLS, os conjuntos de dados foram pré-tratados com os seguintes métodos: centralização na média e normalização para FT-ICR MS e derivada e padronização normal de sinal (SNV)¹⁸⁵ para RMN de ¹H, MIR e NIR. O número ótimo de variáveis latentes de cada modelo foi determinado pelo método de validação cruzada *Venetian Blind* k-fold, com k igual a 5. A qualidade dos modelos foi avaliada por meio do coeficiente de determinação, R² e da raiz do erro quadrático médio, RMSE.

Para as medidas de ESI(-)FT-ICR MS, para as adições que envolvem o teor do extrato de ácidos orgânicos nas misturas do petróleo A, utilizamos a concentração de 0,5 mg mL⁻¹ em tolueno:metanol (1:1) a 0,1% m/v de NH₄OH, sob um fluxo de 8,0 μL h⁻¹ para injeção na fonte de ESI(-).

As condições de operação do espectrômetro foram: voltagem capilar de 4,3 kV, temperatura e vazão do gás de secagem de 200 °C e 3 L min⁻¹, respectivamente, pressão do gás nebulizador de 1,5 bar, *collision voltage* 30,0 V e *skimmer* -35,0 V. Os espectros foram adquiridos usando 200 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo de 512 K, tempo de acumulação de íons no hexapolo de 0,140 s e tempo de voo (TOF) = 1,0 ms.

Para as misturas do petróleo B, concentrações foi 2,5 mg.mL⁻¹ em tolueno:metanol (1:1) a 0,1% m/v de NH₄OH foram injetadas na fonte ESI(-)FT-ICR MS sob um fluxo de 2,0 µL min⁻¹. As condições de operação da fonte de ESI(-) foram: voltagem no capilar de 3,6 kV, temperatura e fluxo do gás de secagem de 180°C e 4 L min⁻¹, respectivamente, pressão de gás nebulizador de 1,0 bar, placa final *offset* de 500 V, *collision voltage* 2,0 V, *skimmer* -25,0 V. Os espectros foram adquiridos usando 200 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo de 512 K, tempo de acumulação de íons no hexapolo de 0,140 s e tempo de voo (TOF) = 1,0 ms.

Todas as análises de FT-ICR MS foram realizadas em um espectrômetro de massas da marca *Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha, modelo 9.4 T *Solarix*, configurado para operar em uma faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR com *m/z* 200-2000.

Antes da aquisição, o FT-ICR MS foi calibrado externamente a partir de uma solução de L-arginina (*m/z* 200-1500).¹⁶⁷ Os espectros obtidos foram recalibrados no software *Compass DataAnalysis* 4,0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) utilizando um conjunto de compostos alugados homólogos mais abundantes para cada amostra.^{21,80,162,167}

Para construir os modelos de PLS, os espectros de FT-ICR MS foram configurados no software *DataAnalysis* 4.0 (Bruker Daltonics) com exatidão de massa igual a 3 e exportados para o software *Matlab* R2013a.

Os ensaios de RMN de ¹H foram realizados em um espectrômetro da Varian-Agilent (VNMR400) operado sob um campo magnético de 9,4 T, por meio de uma sonda de 5 mm *Broad Band* ¹H/¹⁹F/X. Aproximadamente 10 mg da amostra foram diluídas em 600 µL de diclorometano-*d*₂ (CD₂Cl₂). Foi usado o tetrametilsilano (TMS) como referencial das mudanças químicas nos espectros.

As análises de RMN de ^1H foram realizadas sob os parâmetros: frequência de 399,73 MHz, janela espectral de 6410,3 Hz, sequência de pulso S2pul, tempo de aquisição de 3,4 s, tempo de espera 1,2 s e 128 *scans*.¹³⁶

Após os experimentos de RMN de ^1H , o solvente das misturas foi evaporado a temperatura ambiente e em seguida foram resolubilizadas em tolueno nas concentrações de 1,0 mg.mL⁻¹ e 5,0 mg.mL⁻¹ para as respectivas misturas dos petróleos A e B. Estas novas soluções foram utilizadas para as medidas de NIR e MIR.

As análises de MIR foram realizadas em um espectrômetro FTIR, Cary 630, da Agilent Technologies (Santa Clara, EUA), com acessório de refletância total atenuada (ATR - Smart Golden Gate) e janela de reflexão de diamante. A região do número de onda foi definida de 4000 a 650 cm⁻¹, sendo obtida com 32 acumulações e 4 cm⁻¹ de resolução. O espaço em branco da análise foi preenchido com ar atmosférico.

As medidas de NIR foram realizadas usando o MicroNIR miniatura Pro1700 da Viavi Solutions Inc. (anteriormente JDSU Corporation, Santa Rosa, CA) e software 2.1 da Viavi Solutions Inc. Os espectros foram adquiridos na faixa de 1676 a 908 nm, com 400 varreduras, tempo de integração de 14,1 ms, 125 pontos por varredura e aumento de 6,20 nm de um ponto a outro, totalizando um tempo de medição de aproximadamente 5,6 s.

As amostras de petróleo (petróleos 1 e 2) com relatos de deposição de naftenato foram analisadas nas mesmas concentrações e condições descritas nas obtenções das curvas de calibração de acordo com cada técnica mencionada acima.

3.3.4 Identificação e caracterização de espécies ARN em amostras de petróleo e naftenato por FT-ICR MS com preparo mínimo de amostra

As análises FT-ICR MS foram realizadas em um espectrômetro de massas FT-ICR (Bruker Daltonics Bremen, Alemanha, modelo 9,4 T *Solarix*) equipado com uma fonte ESI comercialmente disponível (Bruker Daltonics).

Os espectros de massa foram adquiridos usando 200 varreduras de sinais transitórios no domínio do tempo de 4M. Os dados foram processados pelo software Composer (Serra Analytics, Pesadena, CA, EUA) e as composições elementares foram determinadas através dos valores de m/z .

O equipamento foi calibrado externamente a partir de uma solução calibrante otimizada, que foi empregada para se obter um maior número de sinais na região de interesse ($\sim m/z$ 980 – 1300, região dos íons ARN^{-1}) e assim aumentar a exatidão de massa. Na **Figura A2** estão plotados os espectros de ESI(-)FT-ICR MS dos calibrantes individuais L-arginina (solução de 500 μ L H₂O, 500 μ L acetonitrila e 10 μ L L-arginina) (**Figura A2a**) e tunnig mix (**Figura A2b**) e o espectro da solução calibrante otimizada (**Figura A2c**) que resultou em uma solução constituída de 10 μ L L-arginina, 150 μ L tunnig mix, 500 μ L H₂O, 500 μ L acetonitrila e cerca de 1 μ L de NH₄OH. Desta forma, antes das aquisições, o equipamento foi calibrado externamente a partir de uma solução calibrante otimizada com L-arginina e tunnig mix (m/z 200-1500).

As amostras de petróleo, com relatos de deposição de naftenato (petróleos 1 e 2) foram diluídas em tolueno: metanol (1:1) contendo 0,1% m/v de NH₄OH para ESI(-) e a 0,1% v/v de ácido fórmico para ESI($\pm$).

O depósito de naftenato (livre de óleo residual conforme relatado na literatura) foi diluído a 0,5 mg mL⁻¹ em tolueno:metanol (1:1) contendo 0,1% m/v de ácido fórmico para medições em ESI(-). As análises das amostras no ESI(-) não convencional, que ocorre pela adição de ácido fórmico, discriminamos pela representação ESI(-)_{AF}.

As diferentes condições de aquisição dos espectros encontram-se na **Tabela 7**.

Tabela 7. Parâmetros na utilizados na aquisição dos espectros de FT-ICR MS das amostras investigadas.

Parâmetros	ESI(+)	ESI(-)	ESI(-) _{AF}
Fluxo de injeção (mL min)	12,0	7,0	12,0
Voltagem no capilar (kV)	4,5	3,7	3,7
Pressão de gás nebulizador (bar)	2	1,5	1,5
TOF (ms)	1	1	1
Temperatura de transferência de íons (°C)	250	250	250
Skimmer (V)	50,0	-35,0	-50,0
Collision voltage (V)	-45,0	30,0	45,0
Tempo de acumulação dos íons no hexapolo (s)	0,050	0,060	0,150

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Determinação dos modelos de calibração e validação em amostras testes

3.4.1.1 Com adição do padrão ARN (FA4) em petróleo e a partir de dados obtidos de FT-ICR MS

Observando a **Figura 28**, que apresenta os espectros de ESI(-)FT-ICR MS do petróleo A (petróleo de menor acidez, NAT 2,139 mgKOH g⁻¹) enriquecido com diferentes concentrações do padrão ARN é possível notar que houve uma diminuição dos sinais de *m/z* entre 981 a 1308 em função da redução da concentração do padrão de ácidos ARN no petróleo A.

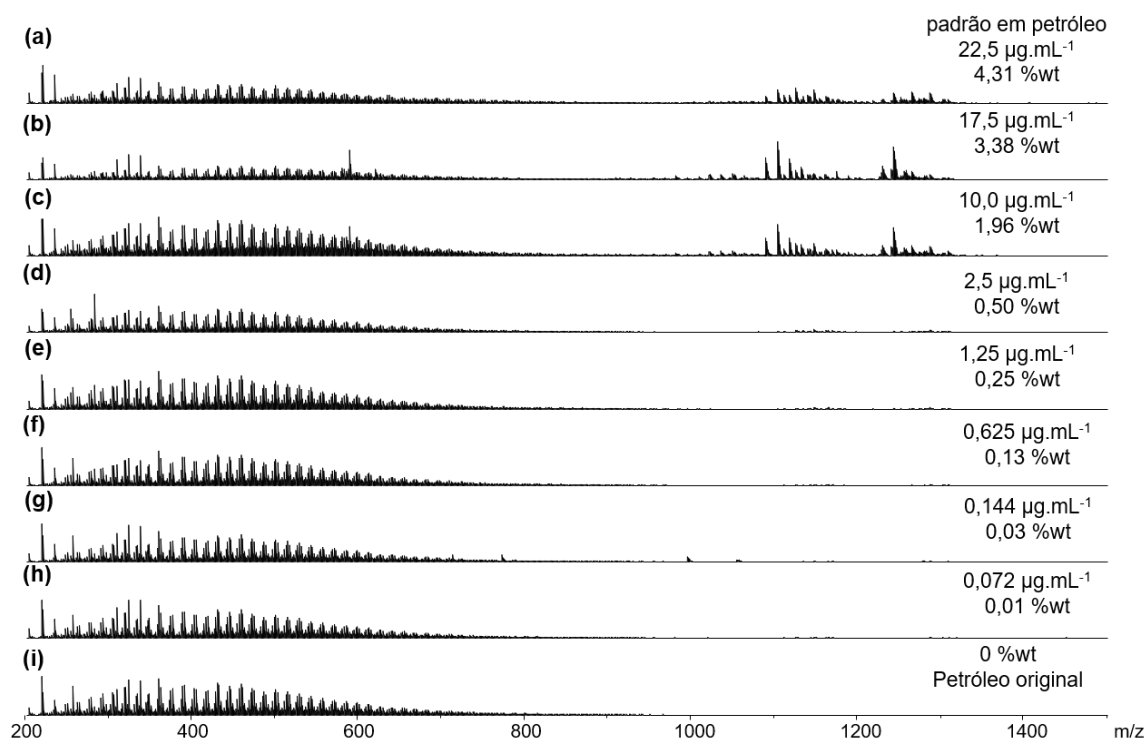


Figura 28. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS do padrão de ácidos ARN dosado no petróleo A (a-i).

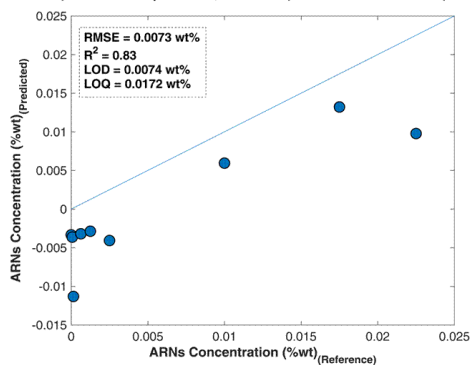
A partir dos dados obtidos na **Figura 28**, foi possível a construção de uma matriz de dados, dos quais construiu-se modelos de regressão univariado e multivariado, conforme detalhados na **Figura 29a-e**. Para os modelos multivariados, o método de seleção de variáveis foi aplicado para produzir modelos mais simples, robustos e interpretáveis.¹⁷ Isto é, foram identificadas as principais espécies químicas responsáveis pela relação e vincular a composição do petróleo bruto.

O modelo PLS sem seleção de variáveis, **Figura 29c**, foi construído utilizando 4 variáveis latentes. Dessas, as variáveis com maior importância apareceram na região de sinal do petróleo e dos ARNs (m/z de 981 a 1308). Com o resultado das variáveis mais importante no modelo utilizando todo o espectro, **Figura 29c**, usou-se a região de importância dos ARNs (m/z de 981 a 1308) para construção de um modelo PLS, **Figura 29d**, e essa mesma região dividida por um sinal exclusivo do petróleo (m/z 459) para construção de outro modelo PLS, **Figura 29e**. Já, para os modelos univariados, um modelo foi criado somando a região de importância dos ARNs (m/z de 981 a 1308), **Figura 29b**, e somando essa mesma região dividindo pelo sinal exclusivo do petróleo (m/z 459), **Figura 29a**.

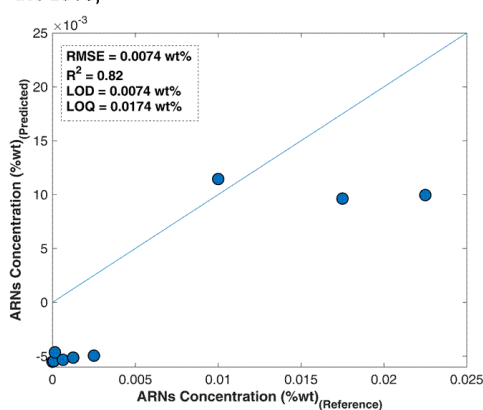
Dentre os modelos construídos, observa-se uma excelente performance analítica para os modelos multivariados, destacando-se o da **Figura 29d** com erro médio de previsão (RMSE) de 0,0003442 %m/m, coeficiente de determinação para previsão ($R^2 = 0,99$) e valores de LOD e LOQ de 0,000181 %m/m e 0,000605 %m/m, respectivamente. Estes parâmetros mostraram uma boa relação entre os valores previstos pelo modelo PLS. Com isso, têm-se que a região de importância dos ARNs (m/z de 981 a 1308) são as variáveis mais importante para a quantificação do mesmo, produzindo melhores parâmetros de desempenho. Observa-se a perda expressiva de robustez do modelo quando há divisão dos sinais de importância na região dos ARNs (m/z de 981 a 1308) pelo sinal exclusivo do petróleo (m/z 459).

Regressão Univariada

(a) Soma das IR das variáveis dos ARNs (m/z 981 até 1308) dividido pelo m/z 459 (sina do Petróleo)

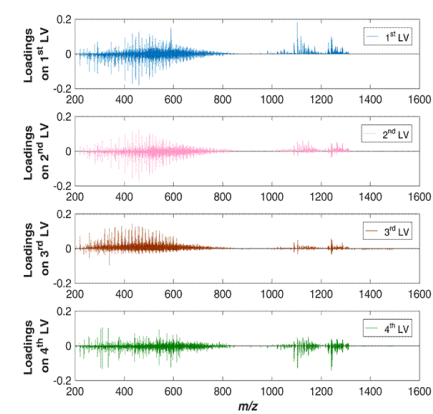
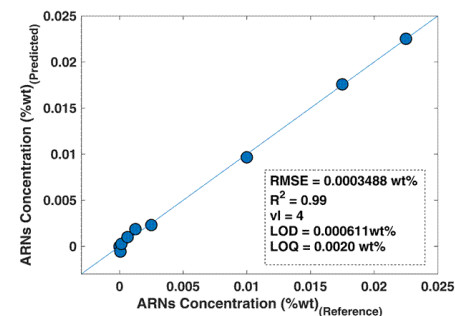


(b) Soma das IR das variáveis selecionadas na região dos ARNs de importância no modelo PLS (m/z = 981 até 1308)

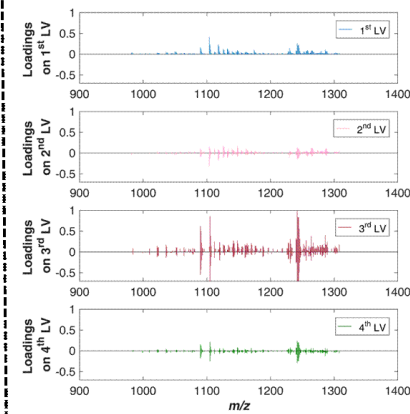
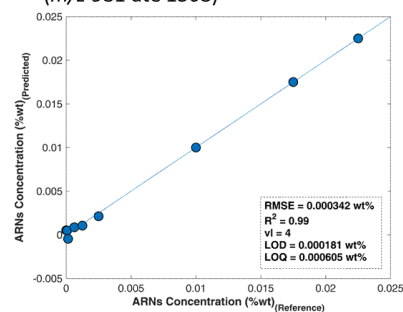


Regressão Multivariada

(c) PLS – Todas as Variáveis



(d) PLS - Variáveis na região dos ARNs (m/z 981 até 1308)



(e) PLS - Variáveis na região dos ARNs (m/z 981 até 1308) divididas por m/z 459

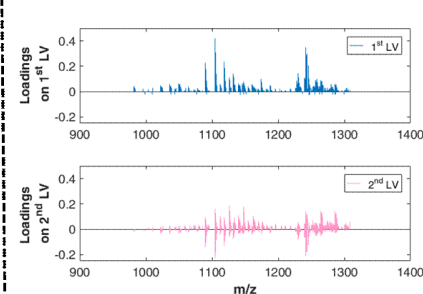
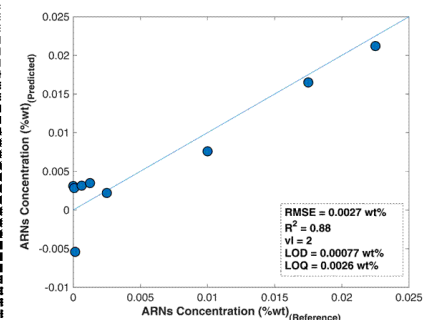


Figura 29. Construção de modelos de regressão Univariado ((a) e (b)) e multivariado (PLS) usando todas as variáveis (c), as variáveis na região dos ARNs (d) e as variáveis na região dos ARNs normalizadas pelo sinal de m/z 459 (e) para as misturas de ARNs com o petróleo A. Os modelos foram construídos a partir dos dados da **Figura 28**, notando-se uma melhor performance analítica para os modelos multivariados.

A **Figura 30** mostra os espectros de ESI(-)FT-ICR MS do petróleo B (petróleo de menor acidez, NAT 0,398 mgKOH g⁻¹) enriquecido com diferentes concentrações do padrão de ácidos ARN. De maneira semelhante ao petróleo A, nos espectros obtidos por ESI(-)FT-ICR MS foi observado uma diminuição dos sinais de *m/z* entre 1060 a 1302 em função da redução da concentração do padrão de ácidos ARN.

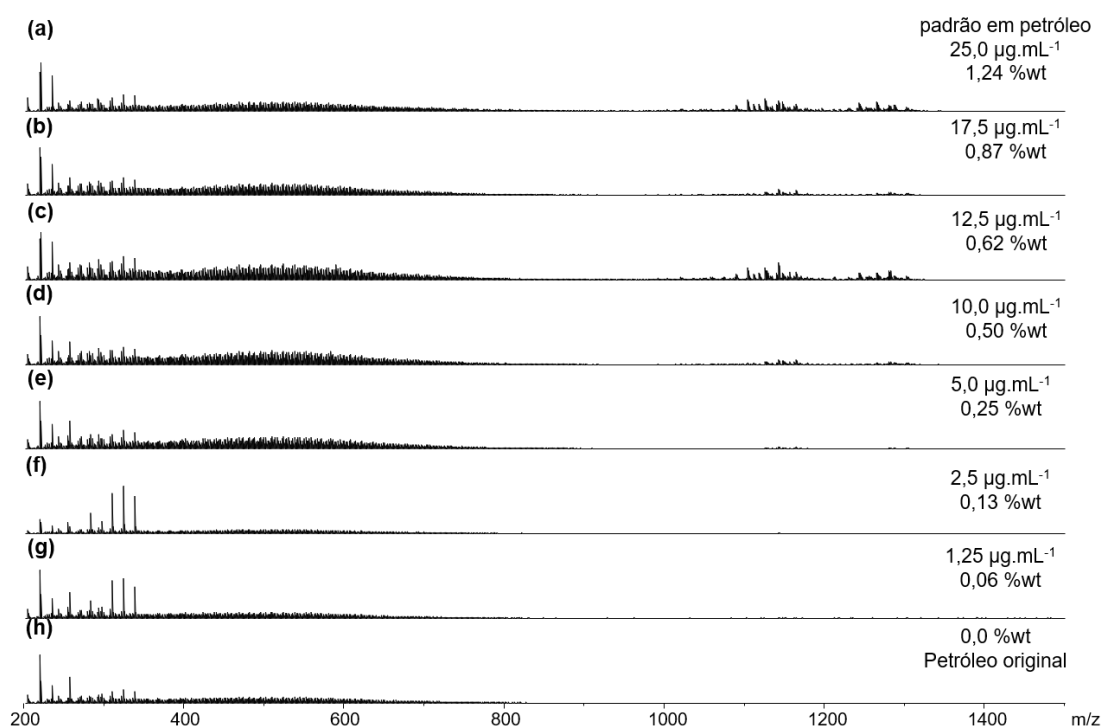


Figura 30. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS do padrão de ácidos ARN dosado no petróleo B (baixa acidez) (a-h).

Para o petróleo B, de maneira análoga ao petróleo A, **Figura 29**, construiu-se modelos univariados e PLS, os resultados são descritos na **Figura 31a-e**.

Nota-se que novamente, o PLS, **Figura 31c-e**, apresentou uma performance superior aos modelos univariados testados, **Figura 31a-b**. O modelo PLS utilizando todas as variáveis, **Figura 31c**, obteve os melhores parâmetros de desempenho, sendo RMSE de 0,0019 %m/m, LOD = 0,00072 %m/m; LOQ = 0,0024 %m/m, R² = 0,95 e utilizando 3 variáveis latentes. Estes parâmetros mostraram boa relação entre os valores previstos pelo modelo PLS. O PLS utilizando a região de importância dos ARNs (*m/z* 981 a 1308) dividido pelo sinal exclusivo do petróleo (*m/z* 459), **Figura 31e**, foi o segundo melhor modelo de regressão, apresentando parâmetros de desempenho próximos ao PLS feito a partir de todo espectro, **Figura 31c**, e superiores ao PLS utilizando a região de importância dos ARNs (*m/z* 981 a 1308), **Figura 31d**.

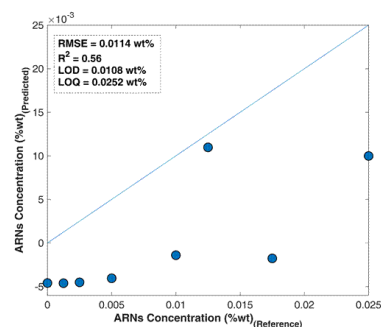
Para o petróleo A, o modelo PLS, **Figura 29d**, utilizando a região de importância dos ARNs gerou os melhores parâmetros de desempenho. Todavia, o petróleo B mostrou melhores resultados com o modelo PLS utilizando todo o espectro, **Figura 31c**. A diferença entre esses resultados pode ser explicada pela distinção de variáveis latentes usadas (2 e 4 para o petróleo A e B, respectivamente) em cada modelo PLS utilizando a região de ARNs, diferenças na conformação dos petróleos (NAT igual a 2,139 mgKOH g⁻¹ e 0,398 mgKOH g⁻¹ para o petróleo A e B, respectivamente), e assim, nos sinais espectrais. Além disso, comparando o melhor resultado para o petróleo A e B, tem-se o petróleo A possui parâmetros de desempenho muito superiores. Ou seja, as respostas espectrais e a quantificação dos ARNs estão mais correlacionadas ao petróleo A. Indicando que a metodologia empregada para o petróleo A apresentou maior robustez para prever ARNs.

As concentrações de ARN, previstas pelo modelo PLS contruído através das amostras de calibração do petróleo A (ácido), foram de 5,4 ppm ($8,7 \times 10^{-2}$) e 5,8 ppm ($1,3 \times 10^{-1}$) para os petróleos 1 e 2 (amostras de petróleo com relatos de deposição de naftenato, amostras reais), respectivamente. Enquanto que o teor de ARN nos petróleos 1 e 2 foram foram de 12,6 ppm ($2,0 \times 10^{-1}$) e 12,4 ppm ($4,9 \times 10^{-2}$) obtidos pelo modelo construído com o petróleo B. Esses resultados não estão em conformidade com a literatura, uma vez que ARN ocorrem em baixa concentração (0,6 – 3,6 ppm) no petróleo cru.^{74,149,150}

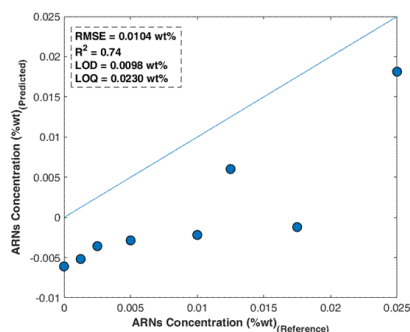
Diante disso, apesar de ambos os modelos PLS apresentarem boa performance analítica indicada pelos parâmetros de R², RMSE, LOQ e LOD, compreende-se que as curvas de calibração não representaram a realidade. Uma vez que os teores das amostras reais foram totalmente divergentes da literatura.

Regressão Univariada

(a) Soma das IR das variáveis dos ARNs (m/z 981 até 1308) dividido pelo m/z 459 (sina do Petróleo)

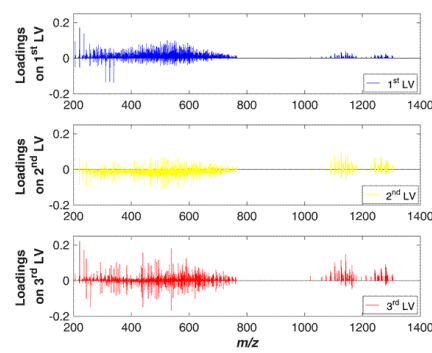
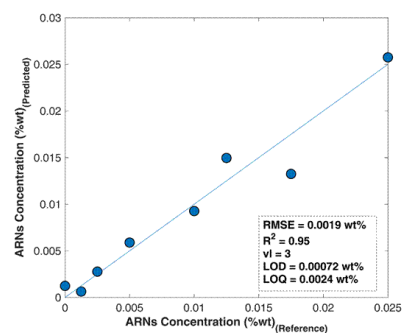


(b) Soma das IR das variáveis selecionadas na região dos ARNs de importância no modelo PLS (m/z = 981 até 1308)

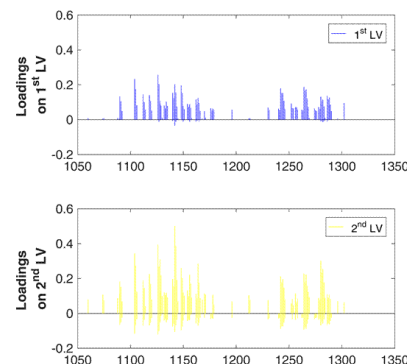
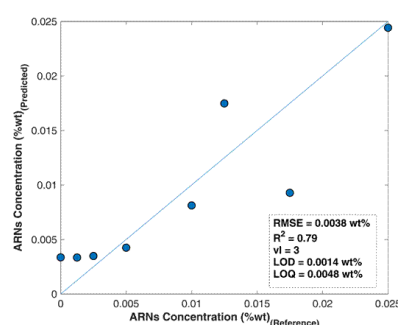


Regressão Multivariada

(c) PLS – Todas as Variáveis



(d) PLS - Variáveis na região dos ARNs (m/z 981 até 1308)



(e) PLS - Variáveis na região dos ARNs (m/z 981 até 1308) divididas por m/z 459

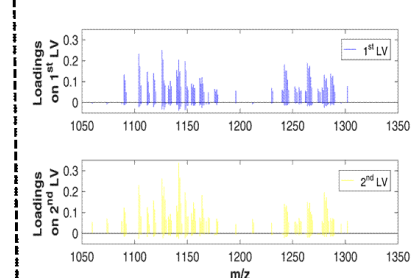
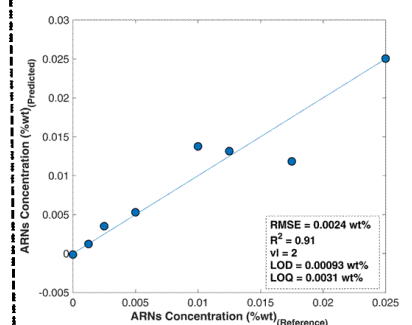


Figura 31. Construção de Modelos de regressão Univariado ((a) e (b)) e multivariado (PLS) usando todas as variáveis (c), as variáveis na região dos ARNs (d) e as variáveis na região dos ARNs normalizadas pelo sinal de m/z 459 (e) para as misturas de ARNs com o petróleo B. Os modelos foram construídos a partir dos dados da **Figura 30**, notando-se uma melhor performance analítica para os modelos multivariados.

3.4.1.2 Com adição do extrato de ácidos orgânicos em petróleo e a partir de dados obtidos de diferentes técnicas analíticas

Modelos de calibração multivariados PLS foram construídos para quantificar os ácidos ARN nos petróleos A (ácido) e B (baixa acidez), por meio de dados de ESI(-)FT-ICR MS, RMN de ^1H , MIR e NIR.

Os espectros de ESI(-)FT-ICR MS do petróleo A (petróleo ácido, NAT 2,139 mgKOH g $^{-1}$) e do petróleo B (petróleo de menor acidez, NAT 0,398 mgKOH g $^{-1}$) enriquecidos com o extrato de ácidos orgânicos estão mostrados na **Figura A3**. De maneira semelhante a observada nas **Figuras 28 e 30**, é possível notar, que há uma alteração do perfil gaussiano em função da adição de extrato de ácidos orgânicos.

O modelo de PLS para as amostradas de calibração do petróleo A, obtido a partir dos dados de ESI(-)FT-ICR MS, foi construído utilizando 3 variáveis latentes. O modelo apresentou um erro médio de previsão (RMSEC) igual a 4,74 %m/m e coeficiente de determinação (R^2 c) igual a 0,959, ambos referentes às amostras de calibração, conforme detalhado na **Figura 32(a-c)** e **Tabela A1**. Em geral, esses parâmetros indicam uma boa sensibilidade do modelo para detectar o teor de ARN no petróleo A.

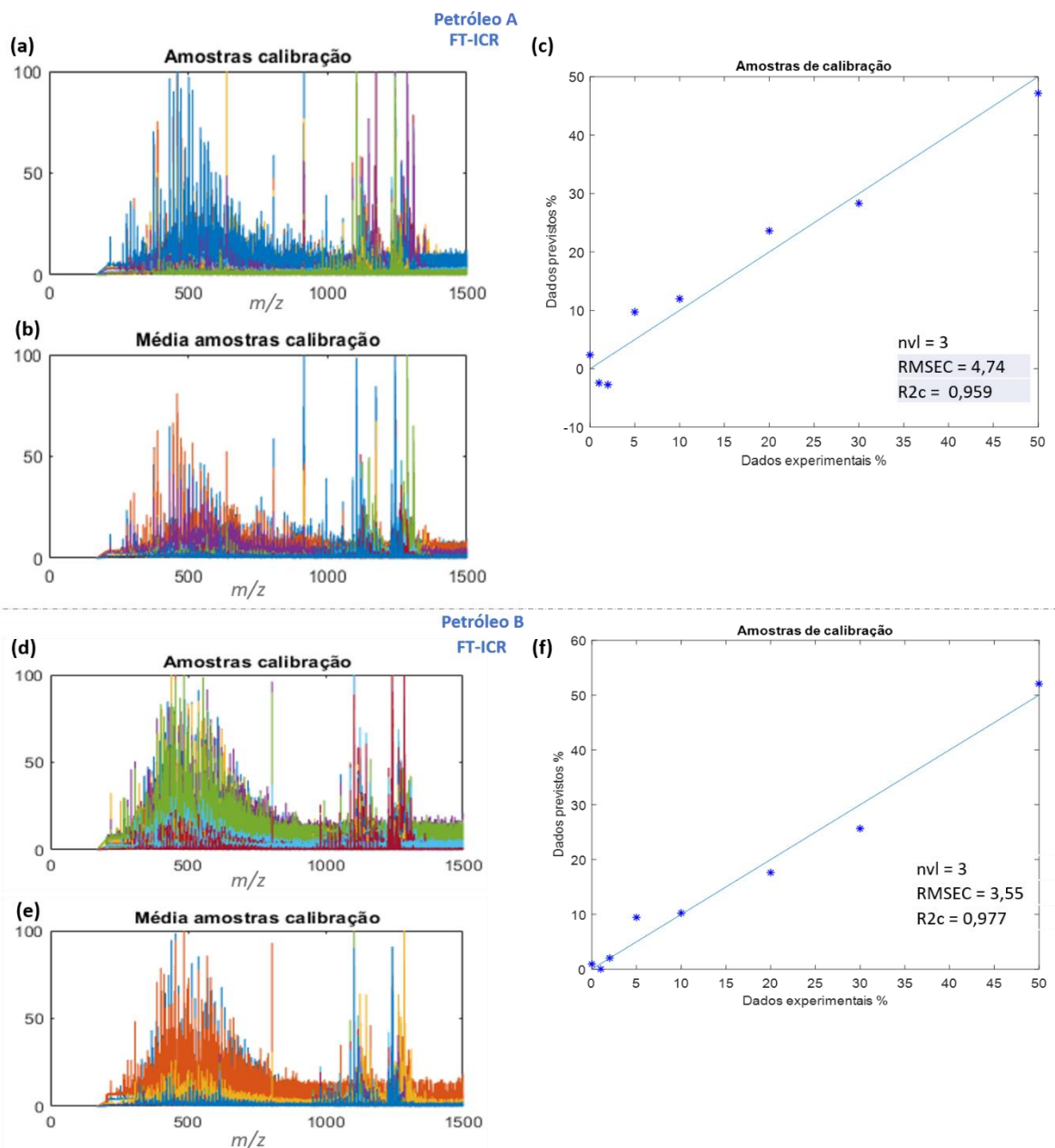


Figura 32. Construção de Modelos de regressão multivariado para a técnica de ESI(-)FT-ICR MS: **(a)(d)** gráficos dos espectros das amostras de calibração; **(b)(e)** gráficos dos espectros médios das amostras de calibração; **(c)(f)** gráfico dos dados previstos vs. dados experimentais das amostras de calibração dos modelos PLS construído a partir dos petróleos A e B, respectivamente.

O modelo contruído para as amostras de calibração do petróleo B, a partir dos dados de ESI(-)FT-ICR MS, apresentou número ótimo de variáveis latentes igual a 3, RMSEC igual a 3,55 %m/m e R^2c igual a 0,977, conforme mostra a **Figura 32(d-f)** e a **Tabela A1**. Esses resultados indicam uma ótima eficiência do modelo a partir dos dados de ESI(-)FT-ICR MS para quantificar ARN.

Na **Figura A4** estão apresentados os espectros de RMN de ^1H obtidos a partir da dosagem do extrato de ácidos orgânicos no petróleo A e do petróleo B. Em geral, nota-se uma similaridade qualitativa entre os espectros, já que não é possível perceber visualmente diferenças relevantes entre eles. É possível observar que região dos hidrogênios alifáticos totais ($\delta = 0 - 4$ ppm) apresenta sinais mais intensos. Sendo que a sobreposições de grupamentos metílicos e metilênicos aparecem na região entre 0,7 a 1,4 ppm.¹⁶⁶ Os sinais atribuídos à hidrogênios de ácidos carboxílicos deveriam estar na faixa de 10,0 a 12,0 ppm.^{58,166} No entanto, não foi possível visualizá-los devido o alargamento do sinal provocadas por ligações de hidrogênio.⁵⁷

Um modelo PLS para cada tipo de petróleo, A e B, foi construído. Para o petróleo A (ácido), enriquecido com extrato de ácidos orgânicos, o modelo apresentou um número ótimo de 3 variáveis latentes, RMSEC igual a 0,0785 %m/m e R^2 igual a 1,0, como mostra a **Figura A5a-d**. Um modelo menos acurado foi obtido para o petróleo B (baixa acidez), também enriquecido com ácido, com RMSEC igual a 1,13 %m/m e R^2 igual a 0,997, como mostra a **Figura A5e-h**. Em geral, esses parâmetros indicam uma boa sensibilidade do método para detectar o teor de ARN em petróleo.

Também foram construídos modelos de calibração PLS, para amostras do petróleo A e B, a partir de dados das técnicas de MIR (**Figura A6**) e NIR (**Figura A7**). Da mesma forma, os modelos apresentaram, em geral, bons parâmetros de desempenho, os quais estão mostrados na **Tabela A1**.

- Avaliação das amostras de petróleo com relatos de deposição de naftenato

Os modelos de previsão gerados pelas diferentes técnicas analíticas foram empregados na determinação do teor de ARN (%m/m) em duas amostras de petróleo com relatos de deposição de naftenato (petróleos 1 e 2).

As concentrações de ARN previstas pelo modelo PLS contruído através das amostras de calibração do petróleo A (ácido) por ESI(-)FT-ICR MS foram de 10,71%_{m/m} ($\sim 1,071 \times 10^5$ ppm) e 9,09 %_{m/m} ($\sim 9,09 \times 10^4$) para os petróleos 1 e 2, respectivamente, **Tabela A1**.

Esses resultados não estão em conformidade com o que é esperado, uma vez ARN ocorrem em baixa concentração (0,6 – 3,6 ppm) no petróleo cru.^{74,149,150} Semelhantemente ao observado para o petróleo A, os espectros das amostras reais não apresentaram na região dos ARN (m/z ~950 – 1300) e indicaram que as concentrações previstas pelo modelo de calibração (PLS) construído para o petróleo B (baixa acidez) por ESI(-)FT-ICR MS são de 10,71% e 9,09% para os petróleos 1 e 2, respectivamente, (**Tabela A1**), mostrando-se inconsistentes com o que é relatado na literatura.^{74,149,150}

Da mesma maneira que observamos para a técnica ESI(-)FT-ICR MS em ambos os petróleos A e B, as concentrações previstas nos modelos construídos pelas técnicas analíticas de RMN de ^1H (**Figura A5**) MIR (**Figura A6**) e NIR (**Figura A7**), **Tabela A1**, foram ruins.

Diante disso, apesar dos modelos PLS apresentarem boa performance analítica, indicada pelos parâmetros de R^2_c e RMSEC, compreende-se que as curvas de calibração não representaram a realidade. Uma vez que os teores das amostras reais foram totalmente discrepantes do que era esperado. Isso faz sentido ao comparar os espectros das amostras reais com os espectros das amostras de calibração, obtidos pelas diferentes técnicas aqui empregadas, **Figura 33**, os quais apresentam perfis muito diferentes das amostras de calibração. Em vista disso, buscamos a compreensão dos fatos.

Claramente ao observarmos os espectros de ESI(-)FT-ICR MS das amostras reais (**Figura 33c**), não observamos visivelmente sinais de m/z entre 950 e 1300, característicos dos ARN. Por outro lado, quando ionizamos as amostras reais com ácido fórmico (CHOOH) para as medidas, ainda no ESI(-), de maneira inusitada, percebemos uma alteração no espectro com sinais na região dos ARN (**Figura 33d**). Este fato foi um tanto quanto surpreendente, mas com potencial de explicação para a frustração aqueles resultados, o que nos motivou as próximas discussões.

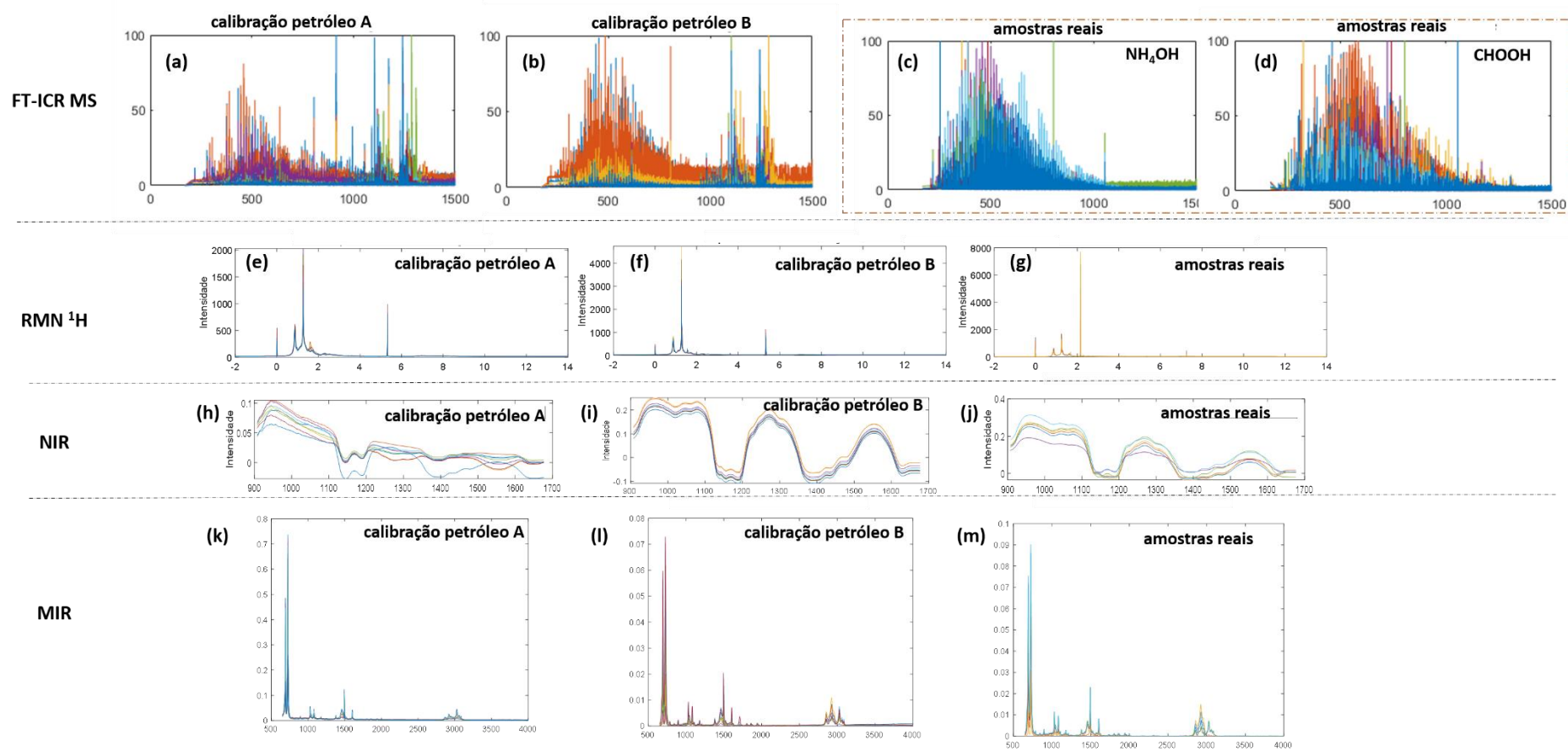


Figura 33. Espectros médios das amostras de calibração para o petróleo A (a, e, h, k) e B (b, f, i, l); espectros médios das amostras reais (c, d, g, j, m) obtidos pelas técnicas de FT-ICR MS, RMN de ^1H , MIR e NIR. Destaque para os espectros de massa obtidos no ESI(-) com adição de NH_4OH e CHOOH .

3.4.2. Identificação e caracterização de espécies ARN em amostras de petróleo e naftenato por FT-ICR MS com preparo mínimo de amostra

Para iniciar as discussões a respeito do comportamento molecular das amostras de petróleo com relatos de precipitação de naftenato de cálcio, denominados de petróleos 1 e 2, ionizados pela adição de HCOOH (ácido fórmico, AF), foi plotado na **Figura 34a** os espectros de FT-ICR MS dos petróleos (1 e 2) no modo convencional de ionização no ESI(+), com adição de AF. Enquanto que na **Figura 34b** os espectros de massa dos petróleos ionizados de forma não convencional no modo negativo, com ionização pela adição de AF, que discriminamos pela representação ESI(-)_{AF}. Os gráficos de classes dos petróleos a partir dos dados obtidos por ESI(+) e ESI(-)_{AF} estão mostrados **Figuras 34c e 34d**, respectivamente. Foi visto que em ambos os petróleos, apesar de apresentarem gaussianas típicas de petróleo, com mesmo intervalo de m/z (200-1200) e M_w com valores próximos (entre ~659 e 680 Da), os perfis espectrais mostraram-se alterados em função do modo de ionização, porém com uma amplitude maior para os espectros no ESI(-)_{AF}, ionizado com AF (**Figura 34**).

Destarte, para os petróleos 1 e 2, as espécies mais abundantes identificadas pelo FT-ICR MS no ES(+) foram N[H] e O₃[H]. Em alternativa, na ESI(-)_{AF} se destacaram as classes O₂[H], N[H], N₂[H], O₃[H] e O₄[H]. É importante ressaltar que foi observado a classe O₈[H] no petróleo 2 no ESI(+) e em ambos os petróleos no ESI(-)_{AF}, porém somente a indicada no modo negativo pode ser correlacionada a ácidos tetraméricos (ARN). Em virtude da ionização *eletrospray* no modo negativo fornecer a composição de espécies polares mais ácidas em suas formas desprotonadas [M-H]⁻, enquanto que no modo positivo apenas a de componentes polares e básicos.^{72,162,186,187}

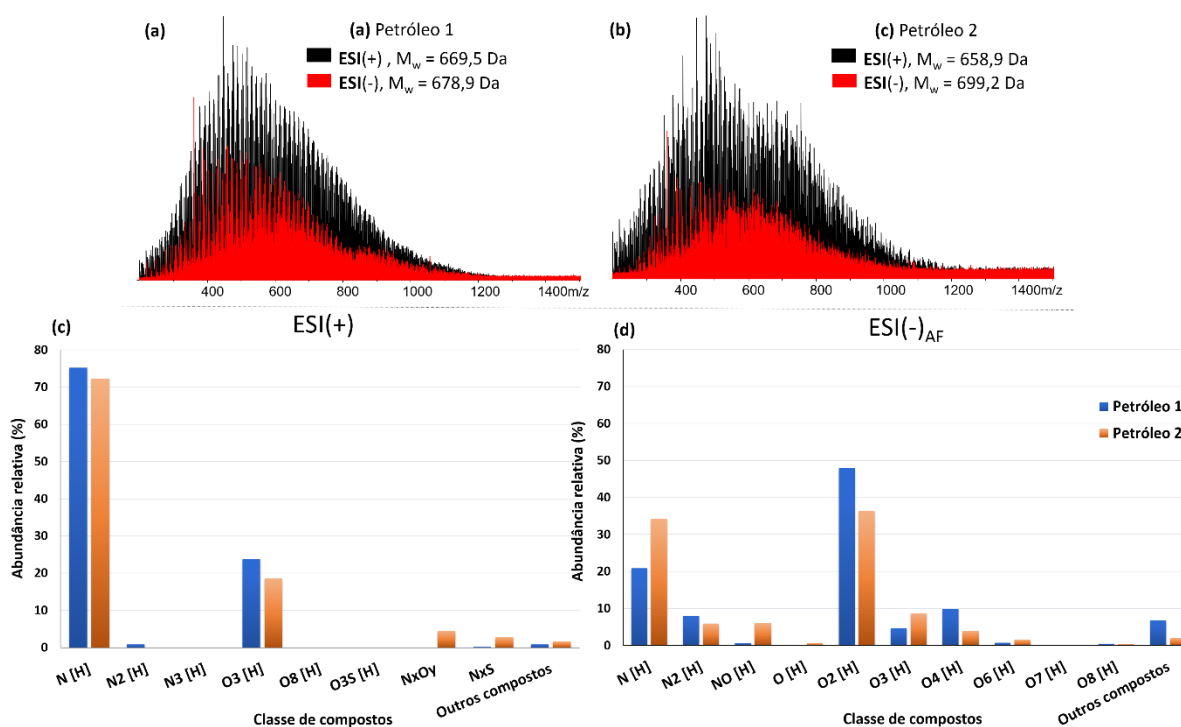


Figura 34. Espectros de FT-ICR MS das amostras de petróleo (a) 1 e (b) 2 e; seus respectivos gráficos de distribuição de classes de heteroátomos contendo compostos presentes, obtidos por ESI no modo positivo, ESI(+) (c) e negativo com adição de ácido fórmico, ESI(-)_{AF} (d).

Estão apresentados na **Figura 35** os espectros de FT-ICR MS das amostras de petróleo 1 e 2 ionizadas no modo negativo pela adição de NH_4OH (ESI(-)) e AF (ESI(-)_{AF}) nas concentrações de 0,1; 0,5; e 1,0 %m/v. É possível observar que no modo convencional de ionização no ESI(-), com adição de base, os petróleos 1 e 2 apresentaram um perfil gaussiano típicos com m/z entre 200-1000, que praticamente se mantém independente da concentração de NH_4OH adicionada (**Figura 35a-f**). Os resultados de ESI(-)FT-ICR MS (**Figura 35m**) revelaram que as classes mais abundantes nos petróleos 1 e 2 são $\text{O}_4[\text{H}]$, $\text{O}_2[\text{H}]$ e $\text{N}[\text{H}]$.

Em alternativa, observamos na **Figura 35** que os espectros de FR-ICR MS, por ionização não convencional no modo negativo, ESI(-)_{AF}, dos petróleos 1 e 2 apresentaram perfis gaussianos típicos de petróleo apenas para 0,1 %v/v de ácido fórmico (**Figura 35g e 35j**, respectivamente). Em concentrações mais altas, os espectros de massa mostraram apenas sinais de aglomerados sinais típicos de cluster de formiatos (**Figura 35h, 35i e 35k, 35l**). Isso norteou os experimentos no uso da concentração de 1 %v/v de ácido fórmico no ESI(-)_{AF} para a identificação de ARN nas amostras.

Diante disso, foi possível compreender o porquê dos modelos de calibração para a quantificação de ARN em petróleo, desenvolvidos e discutidos anteriormente (item **3.4.1** deste capítulo), não se aplicam aos petróleos investigados (petróleos 1 e 2), amostras testes. Resultados de FT-ICR MS com ESI(-)_{AF} indicaram que as espécies ARN, presentes nas amostras de petróleo com relatos de precipitação de naftenato de cálcio (petróleos 1 e 2), podem estar na forma de seu sal conjugado (naftenatos), diferente do padrão adicionado de ARN (extrato de ácidos orgânicos ou fração FA4) que está em sua forma ácida. Desta maneira, não obtivemos resultados promissões na quantificação, mas que nos direcionou para o desenvolvimento de uma metodologia identificação e caracterização de espécies ARN em amostras de petróleo e também em depósitos de naftenatos residuais formados em unidades de produção, que serão apresentadas posteriormente.

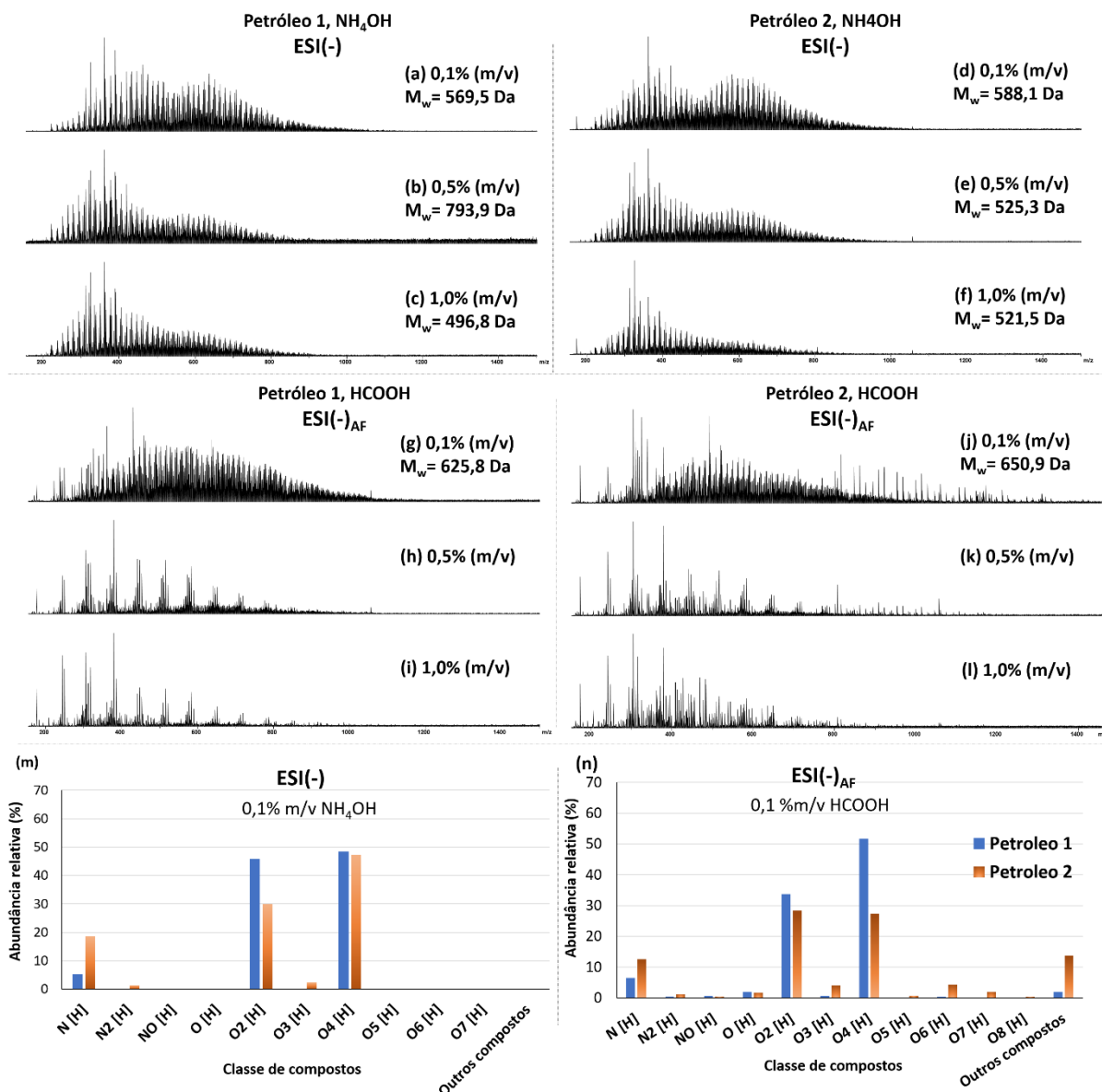


Figura 35. Espectros de FT-ICR MS das amostras de petróleo 1 e 2 ionizadas no modo negativo pela adição de NH_4OH (ESI(-)) (a-f) e AF (ESI(-)_{AF}) (g-l) nas concentrações de 0,1; 0,5; e 1,0 %m/v e seus respectivos gráficos de distribuição de classes de heteroátomos contendo os compostos presentes (m, n).

A fim de avaliar a reprodutibilidade dos resultados, no que diz respeito a ionização de amostras de petróleo pela adição de ácido fórmico no *elektrospray* negativo (ESI(-)_{AF}), construímos a **Figura 36**, na qual estão apresentados os espectros de FT-ICR MS no ESI(-)_{AF} dos petróleos 1 e 2, em triplicata (**Figura 36a-f**), e o gráfico da média das classes com seus desvios padrões relativos (**Figura 36g**). Na média (a partir das triplicatas) foram identificadas no petróleo 1 um total de ~ 2780 fórmulas moleculares, sendo que cerca de 24 corresponderam a classe $\text{O}_8[\text{H}]$. Enquanto para o petróleo 2, foram identificados uma média de ~ 2192 de compostos, dentre os quais e 11 pertencem a classe O_8 (classe dos ARN).

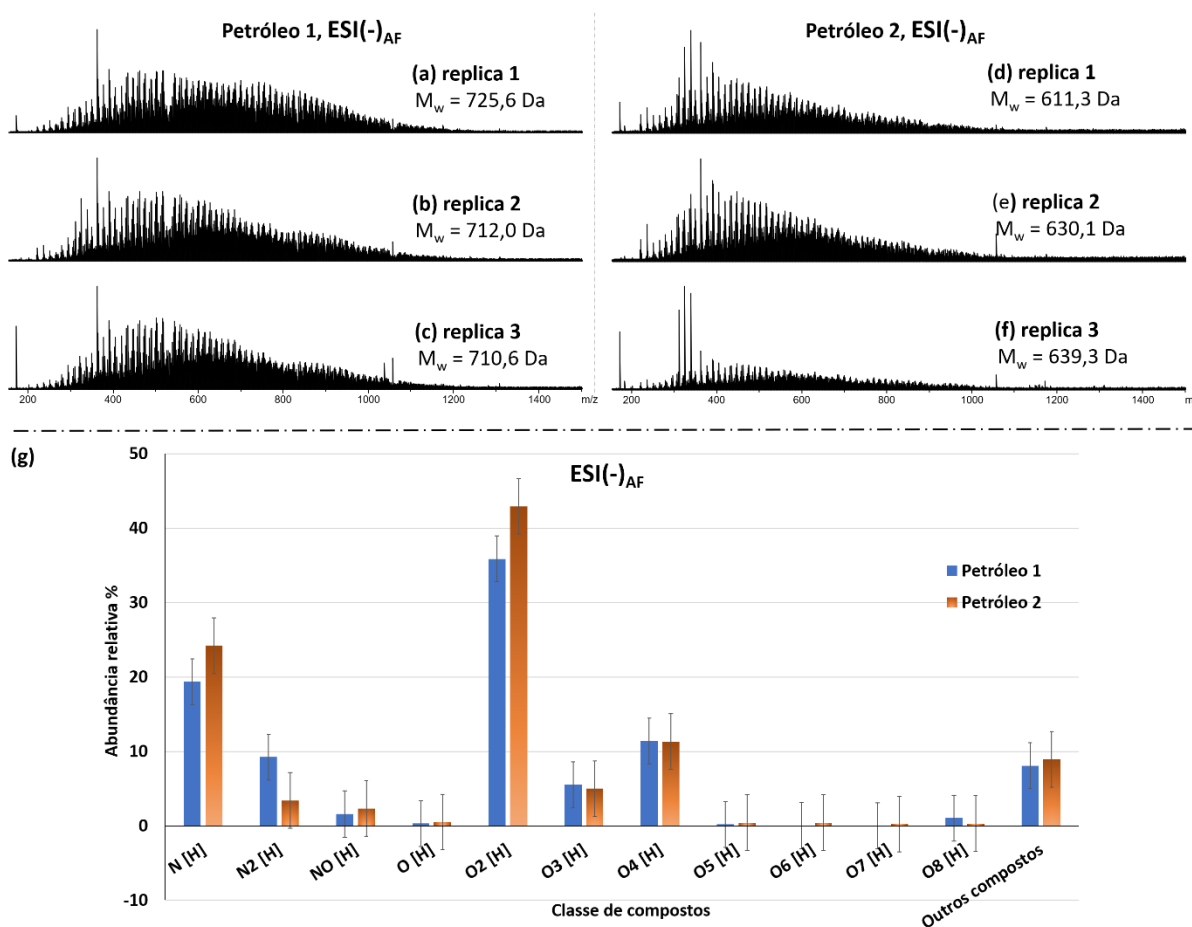


Figura 36. Réplica dos espectros de FT-ICR MS ionizados no modo negativo pela adição de AF dos petróleos 1 (a-c), 2 (d-f) e; gráfico de distribuição média das classes de heteroátomos contendo os compostos presentes (g).

Em geral,  ions podem ser produzidos através de vários mecanismos diferentes, dependendo da fonte de ionização e da polaridade.⁷² Convencionalmente na ESI a adição de AF favorece os mecanismos de protonação que geram espécies do tipo $[M+H]^+$, que somente são observadas no modo positivo. No entanto, para as amostras de petróleo com relatos de precipitação de naftenato de cálcio (petróleos 1 e 2), a adição do AF provocou a conversão dos sais conjugados (naftenatos) em seus ácidos, tetraméricos (ARN). Em outras palavras, os sais destes ácidos foram imediatamente convertidos a  ions do tipo $[M-H]^-$, com a adição de ácido no ESI(-)AF que permitiu a detecção no FT-ICR MS.

De fato, a metodologia de adição de ácidos orgânicos para inibir a formação de naftenato já é empregada no campo petrolífero através da injeção de ácidos orgânicos como: ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido glicólico, ácido sulfônico, ácido mirístico, ácido láurico, na cadeia produtiva. Além destes, também pode-se lançar mão do uso de agentes complexantes, para sequestrar os íons metálicos da água produzida.¹³³

Como foi abordado no capítulo 2, convencionalmente os ARN são recuperados a partir de sua matriz, por extração acidificada, de modo que a manipulação do equilíbrio químico do para extração e purificação de sais de ARN já está implementada em laboratório.⁶⁶ Assim, conforme a equação (14), capítulo 2, os ARN quimicamente ligados como naftenatos, são convertidos em monômeros ácidos livres.^{40,66} Sendo assim, é pertinente a possibilidade da conversão *in situ* do sal de ARN para sua forma ácida, com posterior análise direta da amostra, sem qualquer tipo de extração ou fracionamento.

Esta discussão tornou-se concreta, quando obtivemos um espectro no FT-ICR MS pela injeção direta de uma solução do depósito de naftenato (isento de óleo residual, **Figura A1h**), diluído apenas em tolueno:metanol (1:1) e AF 0,1 %m/v, na ESI(-)_{AF}, **Figura 37a**. Os resultados atestam que a classe O₈ é majoritária no depósito, com distribuição da média de M_w de 1185,5 Da e sinais concentrados nas três regiões específicas, com destaque a região de entre *m/z* 475-650 e 950 -1300, as quais correspondem aos ácidos tetraméricos di (ARN⁻²) e monocarregados (ARN⁻¹), respectivamente.

A expansão espectro (**Figura 37**) desvendou as que principais espécies presentes no depósito são constituídas de ARN com esqueletos de hidrocarbonetos de NC entre C₆₀₋₈₃, e indicou que dentre os íons mais abundantes identificados estão inclusive os monocarregados [C₇₁H₁₂₄O₈-H]⁻¹, [C₈₀H₁₄₂O₈-H]⁻, e [C₈₁H₁₄₂O₈-H]⁻¹, de respectivos *m/z* 1103,92404, 1230,06537 e 1242,06619 e; os íons duplamente carregados [C₈₀H₁₄₀O₈-H]⁻², [C₈₀H₁₄₄O₈-2H]² e [C₈₁H₁₄₂O₈-H]⁻² com *m/z* 613,52104, 615,53667 e 620,52893, respectivamente. A **Tabela A2** apresenta as atribuições de fórmula molecular, DBE e o erro de massa das espécies ARN⁻ presentes no depósito, obtido a partir dos dados de FT-ICR MS com ionização pela adição de AF no ESI(-).

(a) Depósito de naftenato de cálcio

$M_w = 1185,5$ Da
 $m/z = 475-650$ e $950-1300$
 39 fórmulas da classe O_8 identificadas

ESI(-)_{AF}

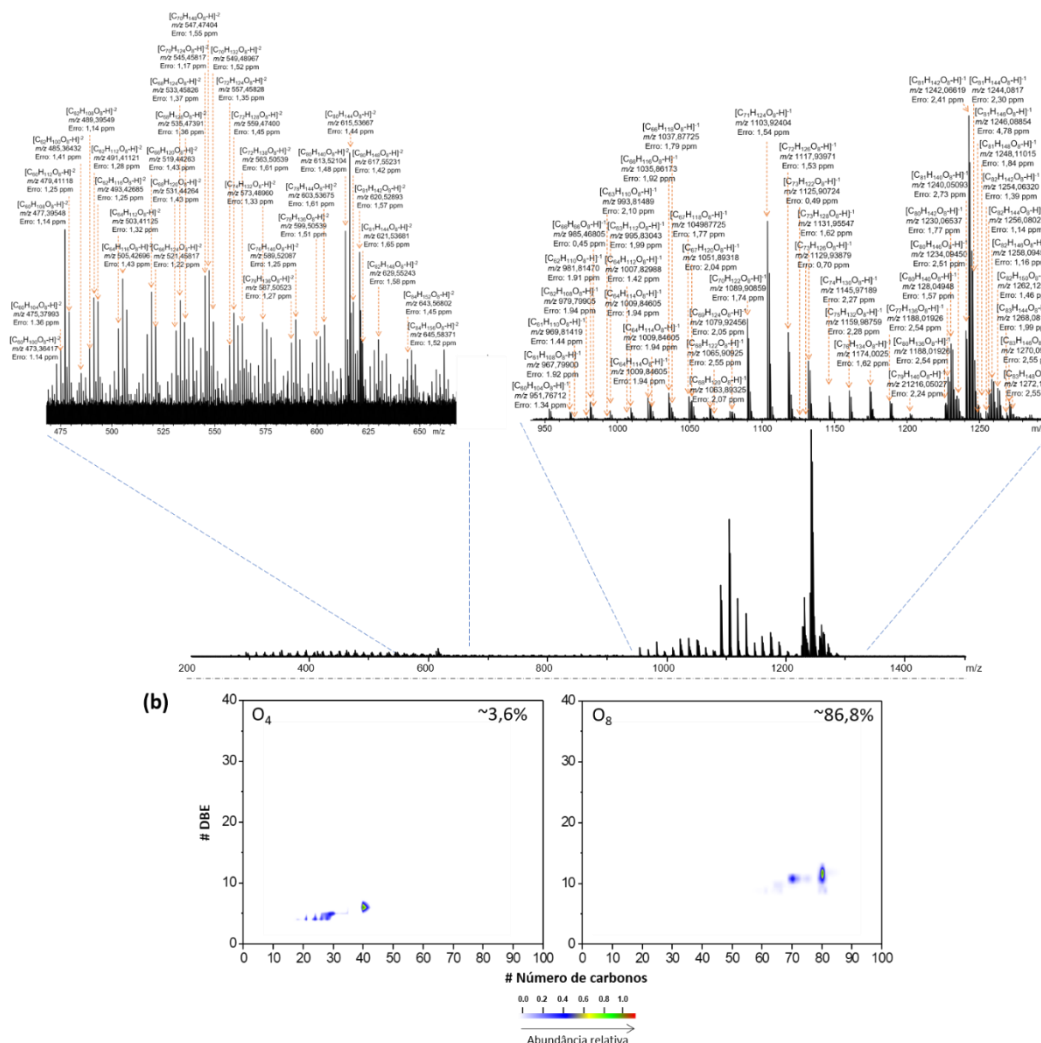


Figura 37. Espectro de FT-ICR MS obtido da injeção direta do depósito de naftenatos, ionizados no modo negativo pela adição de AF, ESI(-)_{AF} **(a)**. As expansões mostram os valores de m/z experimental, erro de massa (em ppm) e fórmula molecular das principais espécies de ARN identificadas. **(b)** DBE versus número de carbono de ESI(-)FT-ICR MS para as classes $O_4[H]$ e $O_8[H]$ presentes do depósito de naftenato.

Por meio das atribuições de dados fornecidas pelo software Composer®, foi possível identificar 39 espécies pertencentes à classe O_8 (classe ARN) dentre as 80 fórmulas moleculares identificadas no depósito por ionização direta na ESI(-)_{AF}. Apesar de um número reduzido de atribuições de fórmula moleculares, os dados de FT-ICR MS obtidos da injeção direta do depósito de naftenato na ESI(-)_{AF} mostraram-se semelhante aos dados de ESI(-)FT-ICR MS obtidos a partir dos extratos ácidos dos depósitos, descrito no capítulo 2.

Tratando-se da mesma origem, a literatura discorre, que apesar dos depósitos de naftenatos universalmente serem constituídos predominantemente de ARN,²² sua especiação detalhada pode ser usada na identificação de sua origem,^{66,74,130} com base na composição de classe e NC.²²

Em consideração ao que foi exposto, a metodologia de identificação e caracterização de ARN em amostras de petróleo e em depósitos de naftenatos *in situ* por FT-ICRMS com ionização na ESI(-)_{AF} mostra-se bastante promissora. Uma vez que requer um preparo mais simples de amostra, apresentando-se ainda vantajosa, no que diz respeito a redução de consumo de reagentes e tempo de análise.

3.5 CONCLUSÃO

Neste capítulo empregamos alguns modelos de regressão uni e multivariada, para a quantificação de ARN em amostras por diferentes técnicas analíticas. Em geral, os modelos de calibração para os petróleos de diferentes valores de acidez, apresentaram boa performance analítica, indicada pelos parâmetros de R², RMSE, LOQ e LOD. No entanto, as curvas de calibração não se aplicavam aos petróleos investigados (petróleos 1 e 2), amostras testes ou amostras reais.

Contudo, o emprego articulado e minucioso da FT-ICR MS permitiu compreender que as espécies ARN, presentes nas amostras de petróleo com relatos de precipitação de naftenato de cálcio (petróleos 1 e 2), poderiam estar na forma de seu sal conjugado (naftenatos), diferente do padrão adicionado de ARN (extrato de ácidos orgânicos ou fração FA4) que está em sua forma ácida.

Apesar dos resultados de quantificação não serem promissores, o estudo nos direcionou para o desenvolvimento de uma metodologia de identificação e caracterização de ARN em amostras de petróleo e em depósitos de naftenatos *in situ* por FT-ICRMS com ionização de amostras pela adição de ácido fórmico no *eletrospray* negativo, que discriminamos pela representação ESI(-)_{AF}.

A metodologia aqui proposta mostra-se promissora. Uma vez que requer um preparo mais simples de amostra, apresentando-se também vantajosa, no que diz respeito a redução de consumo de reagentes e tempo de análise.

Com boa viabilidade de aplicação para identificar a natureza de depósitos e também estimar em um estágio inicial do potencial de incrustação e a necessidade de tratamento do petróleo em unidades de produção.

4. APÊNDICE

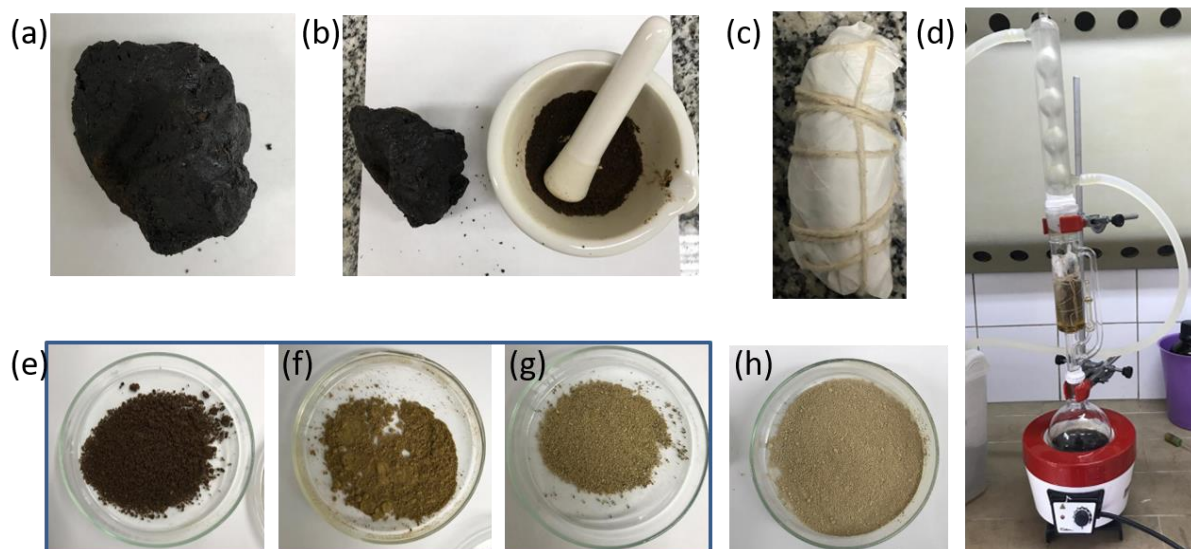


Figura A1. (a) Depósito de naftenato de cálcio impregnado com óleo residual, (b) depósito triturado com auxílio de almofariz e pistilo; (c) depósito envolvido no papel de filtro, (d) sistema utilizado na extração sólido-líquido via *soxhlet*; (e) depósito triturado antes da limpeza; (f) depósito após a limpeza com tolueno; (g) depósito após a limpeza com diclorometano; (h) depósito após a limpeza com metanol. Nota: as fotos estão fora da escala de proporcionalidade.

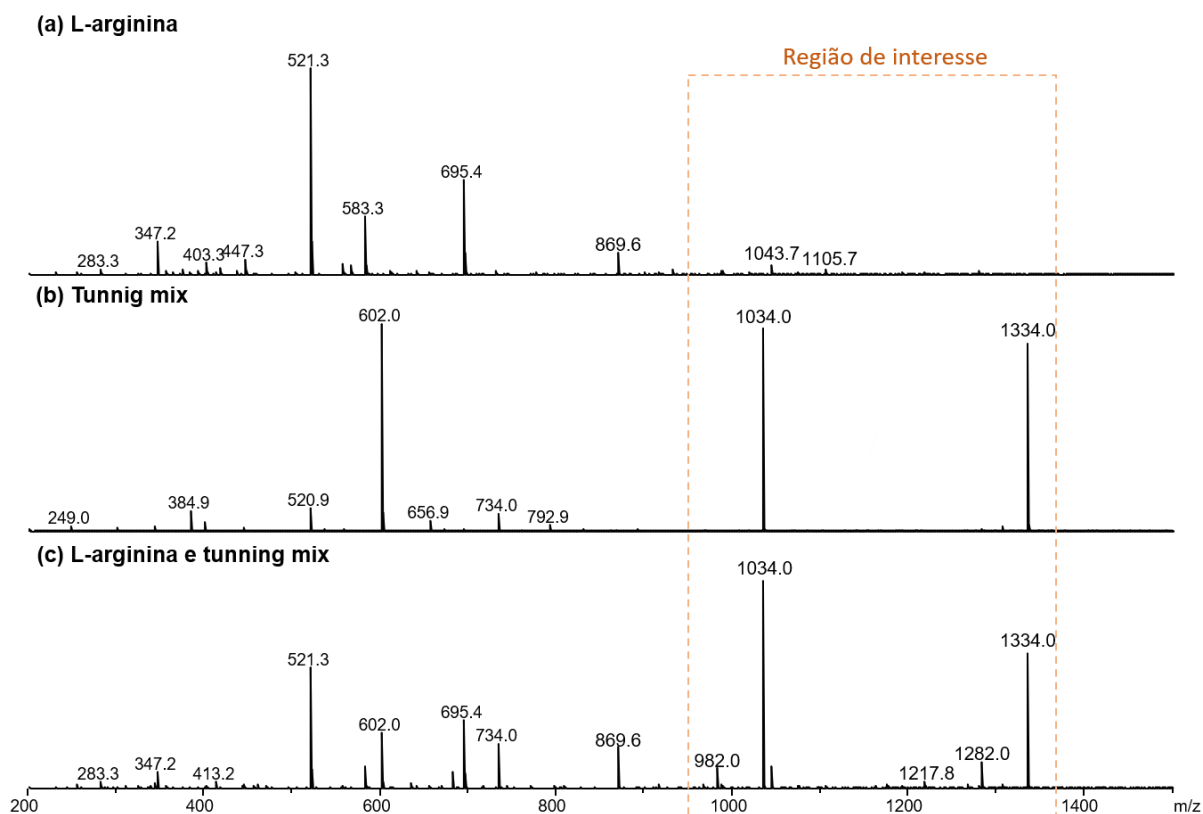


Figura A2. Espectros de ESI(-)FT-ICR MS dos calibrantes (a) L-arginina, (b) tunnig mix e (c) L-arginina e tunnig mix (solução calibrante otimizada).

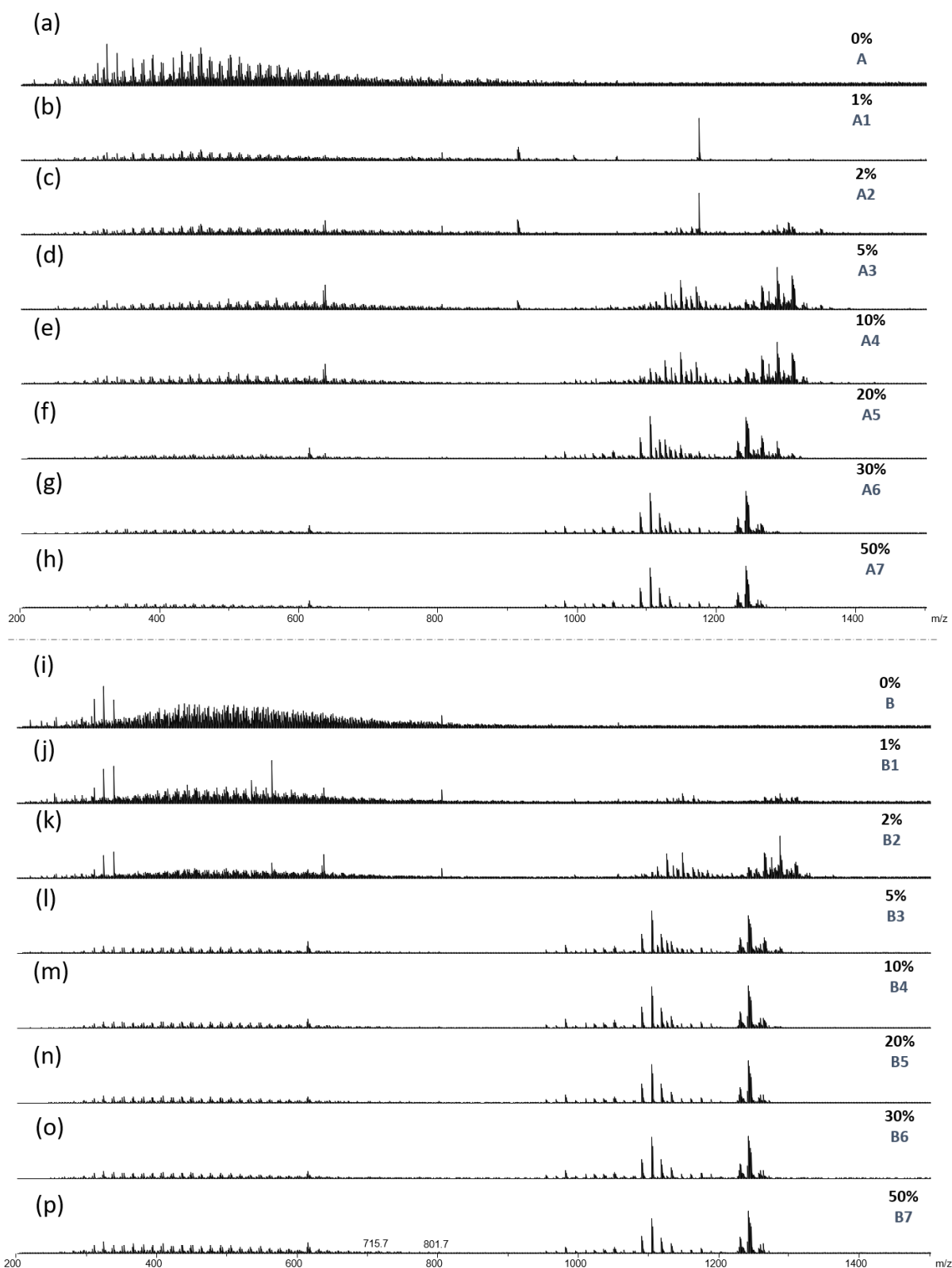


Figura A3. ESI(-)FT-ICR MS dos petróleos A (a-h) e B (i-p) enriquecidos com extrato de ácidos orgânicos em diferentes concentrações: 0,00 %m/m; 1,0 %m/m; 2,0 %m/m; 5,0 %m/m; 10,0 %m/m; 20,0 %m/m; 30 %m/m e 50 %m/m.

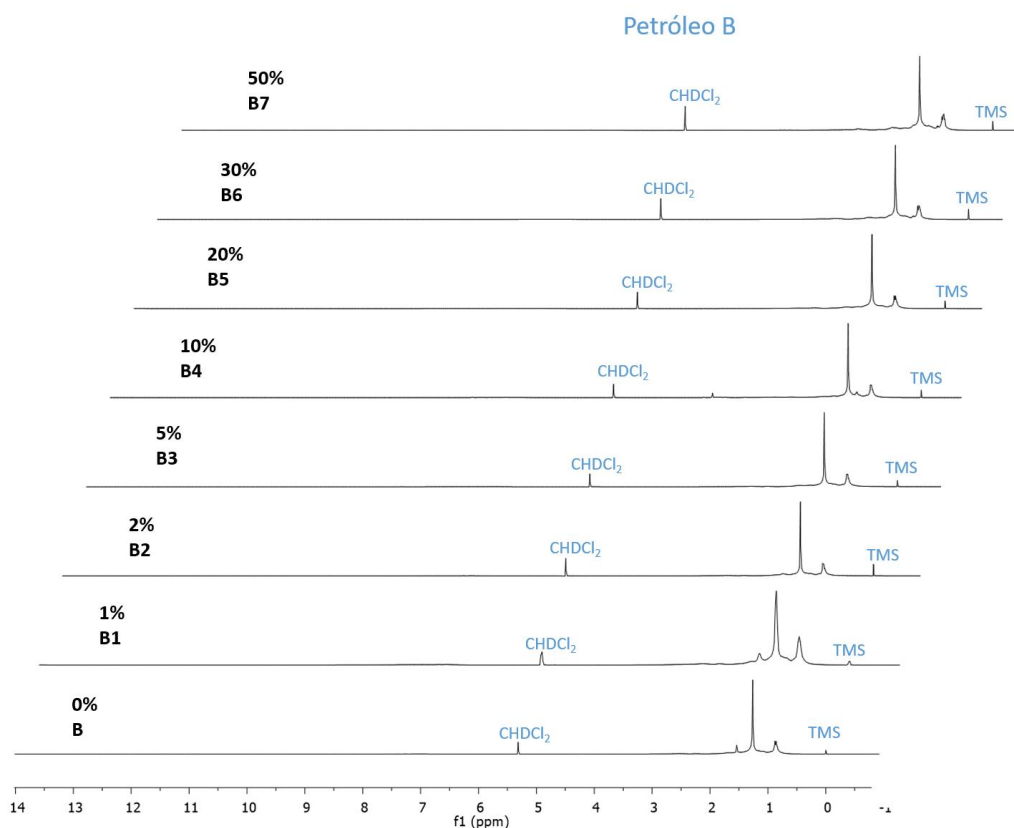
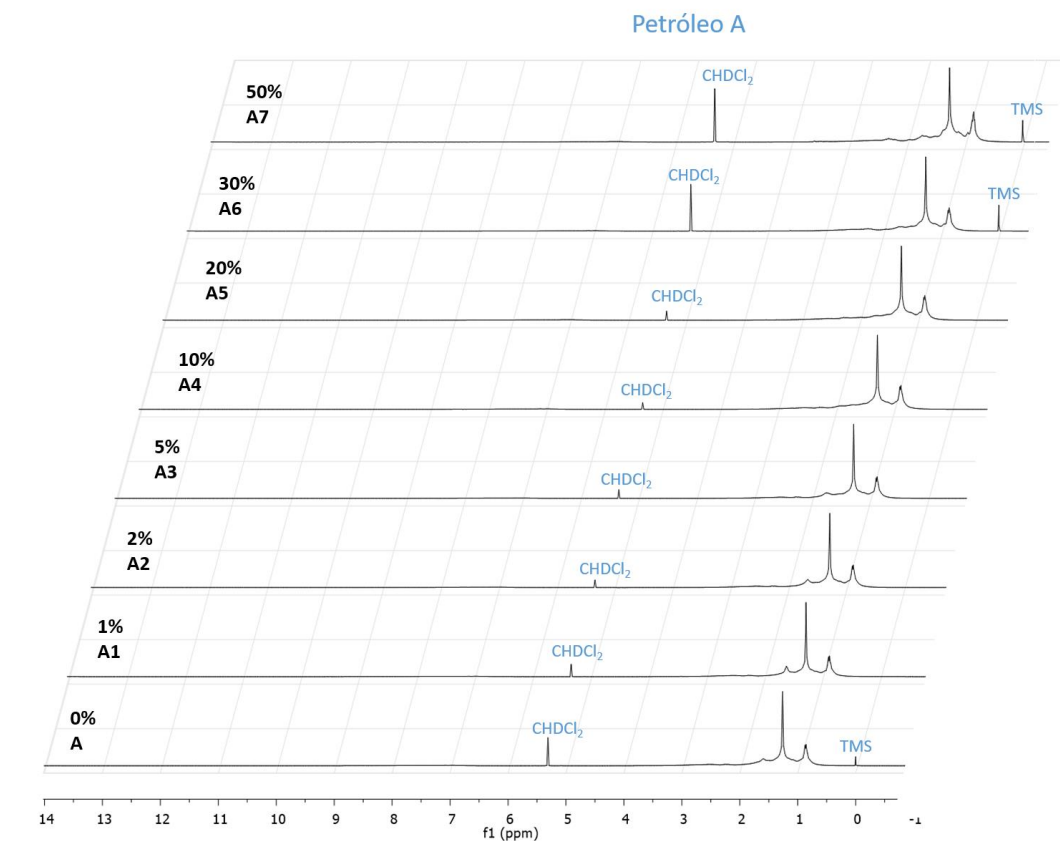


Figura A4. Espectro de RMN de ^1H dos petróleos A e B enriquecidos com extrato de ácidos orgânicos em diferentes concentrações: 0,00 %m/m; 1,0 %m/m; 2,0 %m/m; 5,0 %m/m; 10,0 %m/m; 20,0 %m/m; 30 %m/m e 50 %m/m.

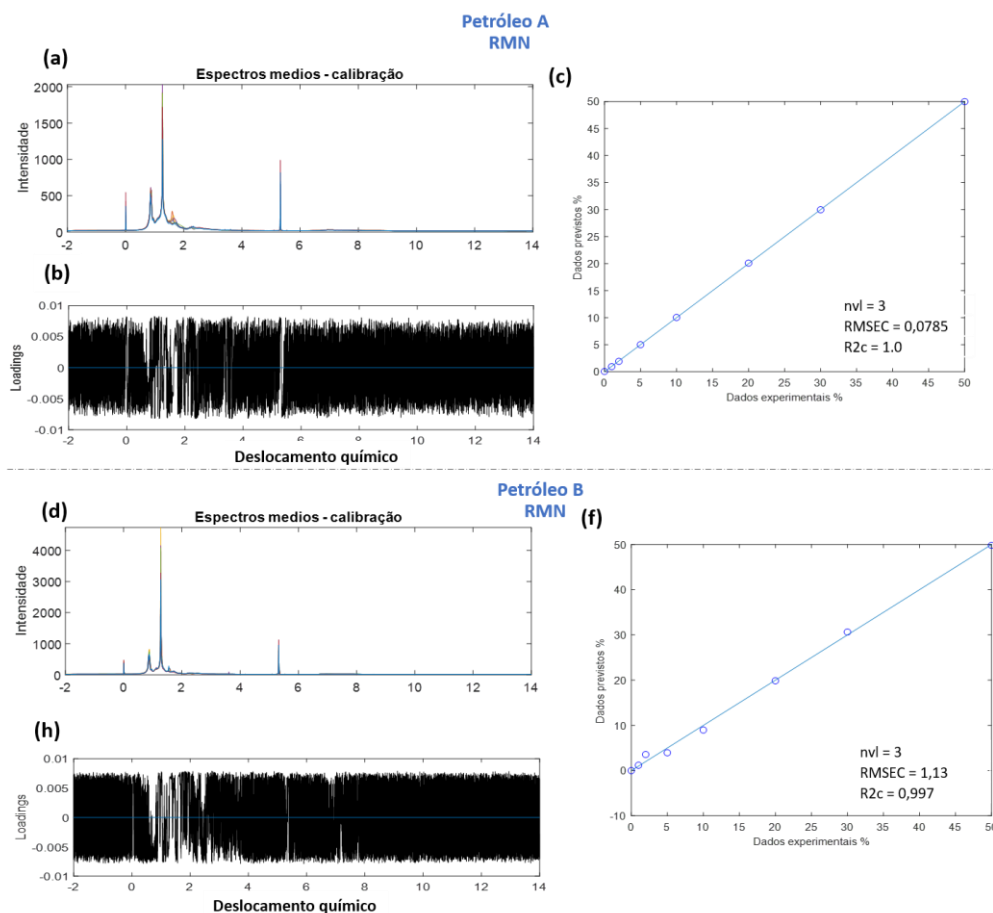


Figura A5. Construção de Modelos de regressão multivariado para RMN de ^1H : gráficos dos espectros médios de calibração **(a)(d)**; gráficos dos *loadings* **(b)(e)** e; gráficos dos dados previstos vs. dados experimentais **(c)(f)** por PLS construído a partir dos petróleos A e B, respectivamente.

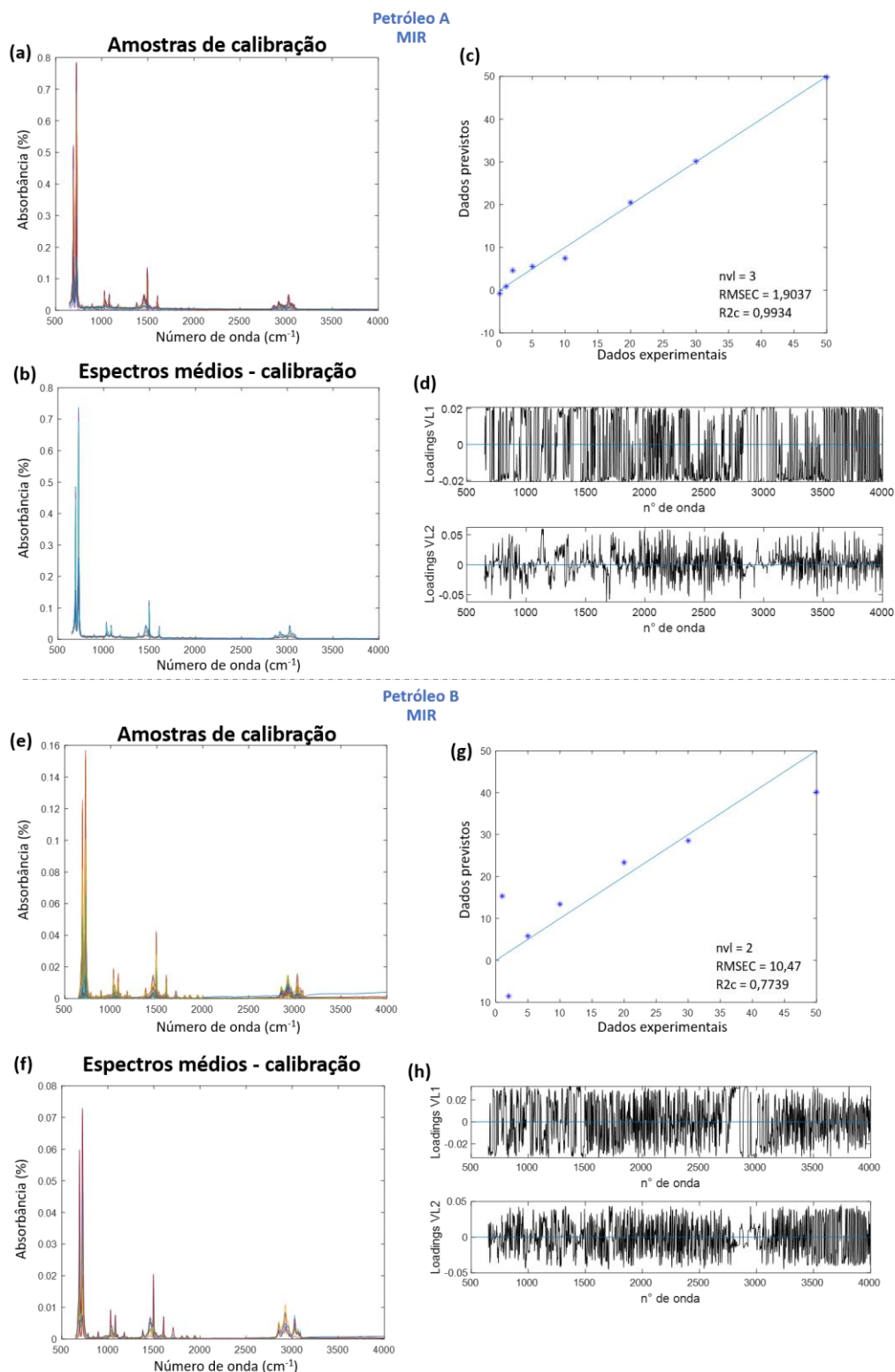


Figura A6. Construção de Modelos de regressão multivariado para a técnica de MIR: **(a)(e)** gráficos dos espectros de calibração; **(b)(f)** gráficos dos espectros médios de calibração; **(c)(g)** gráficos dos dados previstos vs. dados experimentais e; **(d)(h)** gráficos dos *loadings* dos modelos PLS construído a partir dos petróleos A e B, respectivamente.

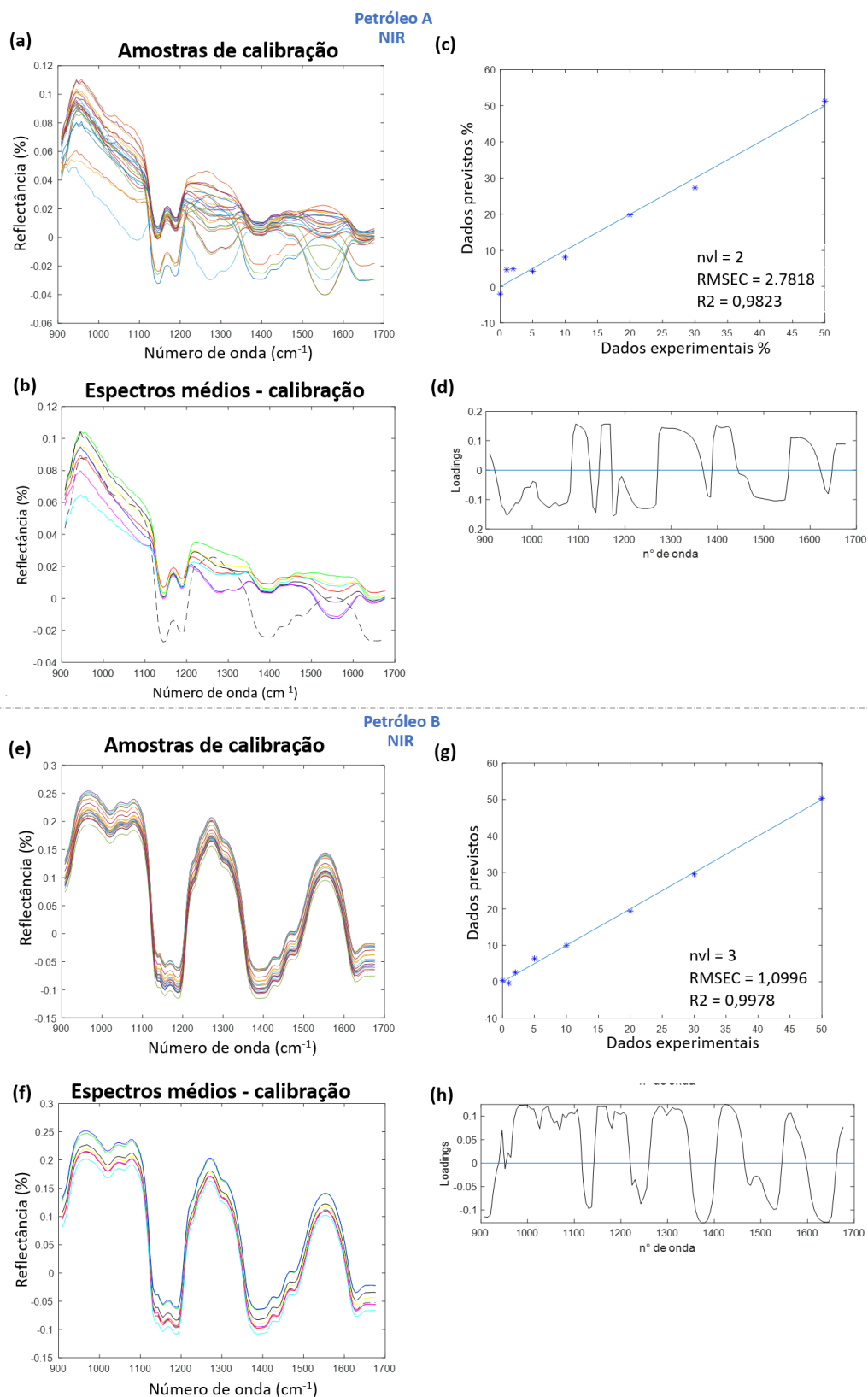


Figura A7. Construção de Modelos de regressão multivariado para a técnica de NIR: **(a)(e)** gráficos dos espectros; **(b)(f)** gráficos dos espectros médios; gráficos dos dados previstos vs. dados experimentais **(c)(g)** e; **(d)(h)** gráficos dos *loadings* dos modelos PLS construído a partir dos petróleos A e B, respectivamente

Tabela A1. Parâmetros de desempenho da construção dos modelos de regressão e teores de ARN valores previstos nas amostras reais.

	Petróleo A			Petróleo B			ARN (%) previstos no PLS (Petróleo A)		ARN (%) previstos no PLS (Petróleo B)	
	nvl	RMSEC	R ²	nvl	RMSEC	R ²	Petróleo 1	Petróleo 2	Petróleo 1	Petróleo 2
NIR	2	2,7818	0,9823	3	1,0996	0,9978	-56,6	-48,1	225,8	172,8
MIR	3	1,9037	0,9934	2	10,47	0,7739	21,8	41,8	24,9	10,3
RMN de ¹H	3	0,0785	1	3	1,13	0,997	15	53	120,3	71,4
FT-ICR MS	3	4,74	0,959	3	3,55	0,977	17,31	16,43	10,71	9,09

Tabela A2. Atribuição das fórmulas, erro de massa (em ppm), m/z medido e teórico obtido dos íons ARN-
presentes no depósito, obtido a partir dos dados de FT-ICR MS com ionização no ESI(-)_{AF}.

Íon	m/z_{medido}	$m/z_{\text{teórico}}$	DBE	Erro (ppm)	TIC	TIC (%)
$[\text{C}_{60}\text{H}_{108}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	477,39549	477,39493	8	1,17	$3,1 \times 10^6$	2,88
$[\text{C}_{62}\text{H}_{112}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	491,41132	491,41058	8	1,50	$2,3 \times 10^6$	2,12
$[\text{C}_{64}\text{H}_{116}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	505,42694	505,42623	8	1,40	$2,2 \times 10^6$	2,03
$[\text{C}_{66}\text{H}_{120}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	519,44258	519,44188	8	1,34	$2,2 \times 10^6$	2,06
$[\text{C}_{68}\text{H}_{124}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	533,45828	533,45753	8	1,39	$2,2 \times 10^6$	2,05
$[\text{C}_{68}\text{H}_{116}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	529,42706	529,42623	12	1,55	$1,0 \times 10^6$	0,95
$[\text{C}_{68}\text{H}_{120}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	531,44266	531,44188	10	1,45	$1,6 \times 10^6$	1,48
$[\text{C}_{70}\text{H}_{120}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	543,44274	543,44188	10	1,57	$1,5 \times 10^6$	1,07
$[\text{C}_{70}\text{H}_{124}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	545,45836	545,45753	10	1,52	$2,1 \times 10^6$	1,98
$[\text{C}_{70}\text{H}_{128}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	547,47398	547,47318	8	1,45	$2,2 \times 10^6$	2,07
$[\text{C}_{72}\text{H}_{120}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	555,44272	555,44188	14	1,50	$7,0 \times 10^5$	0,68
$[\text{C}_{72}\text{H}_{124}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	557,45833	557,45753	12	1,43	$1,0 \times 10^6$	0,96
$[\text{C}_{74}\text{H}_{124}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	569,45839	569,45753	14	1,51	$7,1 \times 10^5$	0,66
$[\text{C}_{73}\text{H}_{128}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	571,47402	571,47318	12	0,09	$1,0 \times 10^6$	0,97
$[\text{C}_{74}\text{H}_{132}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	573,48974	573,48883	10	1,57	$1,3 \times 10^6$	1,23
$[\text{C}_{74}\text{H}_{136}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	575,50522	575,50522	8	1,28	$1,9 \times 10^6$	1,73
$[\text{C}_{76}\text{H}_{128}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	583,47405	583,47405	14	1,49	$6,6 \times 10^5$	0,61
$[\text{C}_{76}\text{H}_{132}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	585,48962	585,48883	12	1,34	$1,0 \times 10^6$	0,93
$[\text{C}_{76}\text{H}_{136}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	587,50531	587,50448	10	1,41	$1,2 \times 10^6$	1,14
$[\text{C}_{76}\text{H}_{140}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	589,52103	589,52013	8	1,51	$1,2 \times 10^6$	1,14
$[\text{C}_{78}\text{H}_{132}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	597,48950	597,48883	14	1,12	$9,4 \times 10^5$	0,87
$[\text{C}_{78}\text{H}_{136}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	599,50536	599,50448	12	1,52	$9,8 \times 10^5$	0,90
$[\text{C}_{78}\text{H}_{140}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	601,52105	601,52013	10	1,52	$1,3 \times 10^6$	1,19
$[\text{C}_{80}\text{H}_{136}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	611,50536	611,50448	14	1,42	$5,3 \times 10^5$	0,53
$[\text{C}_{80}\text{H}_{140}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	613,52105	613,52013	12	1,50	$2,6 \times 10^6$	2,36
$[\text{C}_{80}\text{H}_{144}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	615,53675	615,53578	10	1,58	$4,0 \times 10^6$	3,73
$[\text{C}_{80}\text{H}_{148}\text{O}_8\text{-2H}]^{2-}$	617,55244	617,55143	8	1,62	$2,1 \times 10^6$	1,94

$[\text{C}_{81}\text{H}_{142}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	620,52890	620,52796	12	1,52	$1,5 \times 10^7$	1,35
$[\text{C}_{82}\text{H}_{136}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	623,505560	623,50448	16	1,73	$6,0 \times 10^5$	0,55
$[\text{C}_{82}\text{H}_{140}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	625,52110	625,52013	14	1,67	$7,6 \times 10^5$	0,70
$[\text{C}_{82}\text{H}_{144}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	627,53683	627,53683	12	1,67	$9,3 \times 10^5$	0,86
$[\text{C}_{82}\text{H}_{148}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	629,55251	629,55251	10	1,72	$1,1 \times 10^6$	1,00
$[\text{C}_{84}\text{H}_{148}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	641,55272	641,55143	12	2,01	$7,4 \times 10^5$	0,66
$[\text{C}_{84}\text{H}_{152}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	643,56826	643,56708	10	1,83	$8,6 \times 10^5$	0,79
$[\text{C}_{84}\text{H}_{156}\text{O}_8\text{-H}]^{2-}$	645,58388	645,58273	8	1,78	$1,1 \times 10^6$	1,00
$[\text{C}_{60}\text{H}_{106}\text{O}_8\text{-H}]^-$	953,78332	953,78149	9	1,91	$4,5 \times 10^6$	4,13
$[\text{C}_{61}\text{H}_{108}\text{O}_8\text{-H}]^-$	967,79884	967,79714	9	1,75	$3,4 \times 10^6$	3,12
$[\text{C}_{62}\text{H}_{110}\text{O}_8\text{-H}]^-$	981,81462	981,81279	9	1,86	$7,4 \times 10^6$	6,83
$[\text{C}_{63}\text{H}_{112}\text{O}_8\text{-H}]^-$	995,83068	995,82844	9	2,25	$2,8 \times 10^6$	2,56
$[\text{C}_{64}\text{H}_{114}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1009,84584	1009,84409	8	1,73	$2,7 \times 10^6$	2,56
$[\text{C}_{65}\text{H}_{114}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1021,84647	1021,84409	10	2,32	$8,3 \times 10^6$	7,73
$[\text{C}_{65}\text{H}_{116}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1035,86181	1023,85974	10	2,0	$9,1 \times 10^6$	8,44
$[\text{C}_{67}\text{H}_{118}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1049,87726	1049,87539	10	1,78	$8,2 \times 10^6$	7,63
$[\text{C}_{68}\text{H}_{120}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1063,89315	1063,89104	10	1,98	$4,5 \times 10^6$	4,18
$[\text{C}_{69}\text{H}_{122}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1077,90911	1077,90669	10	2,24	$3,0 \times 10^6$	2,56
$[\text{C}_{70}\text{H}_{122}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1089,90862	1089,90669	11	1,77	$3,4 \times 10^7$	31,68
$[\text{C}_{71}\text{H}_{124}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1103,92408	1103,92234	11	1,57	$6,5 \times 10^7$	60,49
$[\text{C}_{72}\text{H}_{126}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1117,93968	1117,93799	11	1,51	$2,8 \times 10^7$	25,94
$[\text{C}_{73}\text{H}_{128}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1131,95558	1131,95364	11	1,71	$2,1 \times 10^7$	19,4
$[\text{C}_{74}\text{H}_{130}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1145,97201	1145,96929	11	2,37	$6,9 \times 10^6$	6,39
$[\text{C}_{75}\text{H}_{132}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1159,98770	1159,98494	11	2,37	$9,7 \times 10^6$	8,99
$[\text{C}_{76}\text{H}_{132}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1171,98751	1171,98494	12	2,18	$1,1 \times 10^6$	0,99
$[\text{C}_{76}\text{H}_{134}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1174,00253	1173,00059	11	1,65	$1,1 \times 10^7$	10,64
$[\text{C}_{77}\text{H}_{136}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1188,01931	1188,01624	11	2,58	$7,0 \times 10^6$	6,48
$[\text{C}_{78}\text{H}_{138}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1202,03419	1202,03189	11	1,91	$2,7 \times 10^6$	2,48
$[\text{C}_{79}\text{H}_{140}\text{O}_8\text{-H}]^-$	1216,04982	1216,04755	11	1,87	$1,3 \times 10^6$	1,25

[C ₈₀ H ₁₃₈ O ₈ -H] ⁻	1226,03369	1226,03189	13	1,46	5,2x10 ⁶	4,86
[C ₈₀ H ₁₄₀ O ₈ -H] ⁻	1228,04954	1228,04755	12	1,63	1,3x10 ⁷	11,72
[C ₈₀ H ₁₄₂ O ₈ -H] ⁻	1230,06533	1230,06320	11	1,74	2,9x10 ⁷	26,18
[C ₈₀ H ₁₄₆ O ₈ -H] ⁻	1234,09749	1234,09450	9	2,14	8,4x10 ⁶	7,80
[C ₈₀ H ₁₄₈ O ₈ -H] ⁻	1236,10470	1236,11015	8	4,41	6,7x10 ⁶	6,16
[C ₈₁ H ₁₄₀ O ₈ -H] ⁻	1240,05100	1240,04755	13	2,79	3,1x10 ⁷	28,38
[C ₈₁ H ₁₄₂ O ₈ -H] ⁻	1242,06623	1242,0632	12	2,44	1,1x10 ⁸	100,00
[C ₈₁ H ₁₄₄ O ₈ -H] ⁻	1244,08170	1244,07885	11	2,29	5,9x10 ⁷	55,02
[C ₈₀ H ₁₄₆ O ₈ -H] ⁻	1246,08853	1246,09450	10	4,79	1,9x10 ⁷	17,84
[C ₈₁ H ₁₄₈ O ₈ -H] ⁻	1248,11265	1248,11015	9	2,101	6,0x10 ⁶	5,54
[C ₈₂ H ₁₄₂ O ₈ -H] ⁻	1254,06521	1254,06320	13	1,60	3,3x10 ⁵	3,06
[C ₈₂ H ₁₄₄ O ₈ -H] ⁻	1256,08047	1256,07885	12	1,29	9,9x10 ⁶	9,13
[C ₈₂ H ₁₄₆ O ₈ -H] ⁻	1258,09608	1258,09450	11	1,26	1,5x10 ⁷	14,22
[C ₈₂ H ₁₅₀ O ₈ -H] ⁻	1262,12785	1262,12580	9	1,63	1,2x10 ⁷	10,95
[C ₈₃ H ₁₄₄ O ₈ -H] ⁻	1268,08185	1268,07885	13	2,37	1,9x10 ⁶	1,76
[C ₈₃ H ₁₄₆ O ₈ -H] ⁻	1270,09794	1270,09450	12	2,71	6,5x10 ⁶	6,00
[C ₈₃ H ₁₄₈ O ₈ -H] ⁻	1272,11357	1272,11015	11	2,69	2,1x10 ⁶	1,95
[C ₈₄ H ₁₄₈ O ₈ -H] ⁻	1284,11332	1284,11015	12	2,47	1,7 x10 ⁶	1,55

5. REFERÊNCIAS

- ¹ BERTHEUSSEN, A.; SIMON, S.; SJÖBLOM, J. Equilibrium partitioning of naphthenic acids and bases and their consequences on interfacial properties. *Colloids and Surfaces A*. **529**, 45–56, 2017.
- ² HSU, C. S.; DECHERT, G. J.; ROBBINS, W. K.; FUKUDA, E. K. Naphthenic acids in crude oils characterized by mass spectrometry. *Energy Fuels*. **14**, 217–223, 2000.
- ³ BARROW, M. P.; HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; DERRICK, P. J. Data visualization for the characterization of naphthenic acids within petroleum samples. *Energy Fuels*. **23**, 2592–2599, 2009.
- ⁴ CLEMENTE, J. S.; FEDORAK, P. M. A review of the occurrence, analyses, toxicity, and biodegradation of naphthenic acids, *Chemosphere*, **60**, 585–600, 2005.
- ⁵ HEADLEY, J. V.; MCMARTIN, D. W. A Review of the occurrence and fate of naphthenic acids in aquatic. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, **39(8)**, 1989–2010, 2004.
- ⁶ MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **Compendium of Chemical Terminology** . International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2014, 979p.
- ⁷ BARROW, M.; PERU, K. M.; MCMARTIN, D. W.; HAEDLEY, J. V. Effects of Extraction pH on the Fourier TrAnsform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Profiles of Athabasca Oil Sands Process Water. *Energy Fuels*, **30**, 3615–3621, 2016.
- ⁸ GREWER, D. M.; YOUNG, R. F.; WHITTAL, R. M.; FEDORAK, P. M. Naphthenic acids and other acid-extractables in water samples from Alberta: what is being measured? *Sci. Total Environ.*, **408**, 5997–6010, 2010.
- ⁹ SPEIGHT, J. G. **High Acid Crudes**, Gulf Professional Publishing, Oxford, United Kingdom, 2014, 19p.
- ¹⁰ HEADLEY, J. V.; , PERU, K. M.; MOHAMED, M. H.; FRANK, R. A.; MARTIN, J. W.; HAZEWINKEL, R. R. O.; HUMPHRIES, D.; GURPRASAD, N. P.; HEWITT, L. M.; MUIR, D. C. G.; LINDEMAN, D.; STRUB, R.; YOUNG, R. F.; GREWER, D. M.; WHITTAL, R. M.; FEDORAK, P. M.; BIRKHOLZ, D. A.; HINDLE, R.; REISDORPH, R.; WANG, X.; KASPERSKI, K L.; HAMILTON, C.; WOUDNEH, M.; WANG,

G.; LOESCHER, B.; FARWELL, A.; DIXON, D. G.; ROSS, M.; PEREIRA, A. S.; KING, E.; BARROW, M. P.; FAHLMAN, B.; BAILEY, J.; MCMARTIN, D. W.; BORCHERS, C. H.; RYAN, C. H.; TOOR, N. S.; GILLIS, H. M.; ZUIN, L.; BICKERTON, G.; MCMASTER, M.; SVERKO, E.; SHANG, D.; WILSON, L. D.; WRONA, F. J. Chemical fingerprinting of naphthenic acids and oil sands process waters - a review of analytical methods for environmental samples. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, **48**, 1145-63, 2013.

¹¹ BERTHEUSSEN, A.; SIMON, S.; SJÖBLOM. Equilibrium partitioning of naphthenic acid mixture, part 2: oil-extracted naphthenic acids. *Energy Fuels*, **32**, 9142-9158, 2018a.

¹² QIAN, K.; ROBBINS, W. K.; HUGHEY, C. A.; COOPER, H. J.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. Resolution and identification of elemental compositions for more than 3000 crude acids in heavy petroleum by negative-ion microelectrospray high-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*, **15**, 6, 1505-1511, 2001.

¹³ LEE, D. D. Thermosetting resin reaction product of furfural with an oxynaphthenic acid. US 2207624A. 17/06/1938.

¹⁴ KANNEL, P. R.; GAN, T. Y. Naphthenic acids degradation and toxicity mitigation in tailings wastewater systems and aquatic environments: a review. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, **47**, 1–21, 2012.

¹⁵ BAUGH, T. D.; WOLF, N. O.; MEDIAAS, H.; VINSTAD, J. E.; GRANDE, K. V. The discovery of high-molecular-weight naphthenic acids (ARN acid) responsible for calcium naphthenate deposits. SPE 93011, 2005.

¹⁶ LUTNAES, B. F.; BRANDAL, O.; SJÖBLOM, J.; KRANE, J. Archaeal C₈₀ isoprenoid tetraacids responsible for naphthenate deposition. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **4**, 616-620, 2006.

¹⁷ TERRA, L. A.; FILGUEIRAS, P. R.; TOSE, L.; ROMÃO, W.; SOUZA, D. D. S.; CASTRO, E. V. R.; OLIVEIRA, M. S. L.; DIAS, C. M.; POPPI, R. J. Petroleomics by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry coupled to partial least squares with variable selection methods: prediction of the total acid number of crude oils. *Analyst*, **139**, 4908-4916, 2014.

-
- ¹⁸ FRANK, R.; FISCHER, K.; KAVANAGH, R.; BURNISON, B. K.; ARSENAULT, G.; HEADLEY, J. V.; PERU, K. M.; KRAAK, G. V. D.; SOLOMON, K. R. Effect of carboxylic acid content on the acute toxicity of oil sands naphthenic acids. *Environmental Science & Technology*, **43**(2), 266-271, 2009.
- ¹⁹ SUTTON, P. A.; SMITH, B. E.; WATERS, D.; ROWLAND, S. J. Identification of a novel ester obtained during isolation of C₈₀ (ARN) tetraprotic acids from an oilfield pipeline deposit. *Energy Fuels*. **24**, 5579-5585, 2010a.
- ²⁰ SUTTON, P. A.; SMITH, B. E.; ROWLAND, S. J. Mass spectrometry of polycyclic tetracarboxylic ('ARN') acids and tetramethyl esters. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **24**, 3195-3204, 2010b.
- ²¹ BARROS, E. V.; DIAS, H. P.; PINTO, F. E.; GOMES, A. O.; MOURA, R. R.; NETO CUNHA, A.; FREITAS, J. C. C.; AQUIJE, G. M. F. V.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. Characterization of naphthenic acids in thermally degraded petroleum by ESI(-)-FT-ICR MS and ¹H NMR after solid-phase extraction and liquid/liquid extraction. *Energy Fuels*, **32**, 3, 2878-2888, 2018.
- ²² MAPOLELO, M. M.; SATANFORD, L. A.; RODGERS, R. P.; YEN, A. T.; DEBORD, J. D.; ASOMANING, S.; MARSHALL, A. G. Chemical speciation of calcium and sodium naphthenate deposits by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Energy Fuels*, **23**, 349-355, 2009.
- ²³ NORDGARD, E. L.; AHMAD, J.; SIMON, S.; SJÖBLOM, J. Oil-water partitioning of a synthetic tetracarboxylic acid as a function of pH. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **33**, 871-880, 2012a.
- ²⁴ BATAINEH, M.; SCOTT, A. C.; FEDORAK, P. M.; MARTIN, J. W. Capillary HPLC/QTOF-MS for characterizing complex naphthenic acid mixtures and their microbial transformation. *Analytical Chemistry*, **78**, 8354-8361, 2006.
- ²⁵ CRUZ, G. F. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. *Química Nova*. **35**(8), 1628-1634, 2012.
- ²⁶ AITKEN, C. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. R. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Letters to nature*, **431**, 291-294, 2004

-
- ²⁷ FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. **Aerobic degradation by microorganisms**. In: Klein, J. (Ed.), *Biotechnology Environmental Processes II – Soil Decontamination*, 2nd ed. Germany: Wiley-VCH, Weinheim, 2000, 147–152p.
- ²⁸ ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, **11**(10), 2477–2490, 2009.
- ²⁹ FAFET, A.; KERGALL, F.; SILVA, M.; BEHAR, F. Characterization of acidic compounds in biodegraded oils. *Organic Geochemistry*, **38**, 1235-1242, 2008.
- ³⁰ HUGHEY, C. A.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G.; QIAN, K.; ROBBINS, W. K. Identification of acidic NSO compounds in crude oils of different geochemical origins by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, **33**, 743-759, 2002.
- ³¹ NASCIMENTO, L. R.; REBOUÇAS, L. M. C.; KOIKE, L.; REIS, F. A. M.; SOLDAN, A. L.; CERQUEIRA, J. R.; MARSAIOLI, A. J. Acid biomarkers from Albacora oils, Campos Basin, Brazil. *Organic Geochemistry*, **30**, 9, 1175-1191, 1999.
- ³² MARTINS, L.; PUDENZI, M. A.; CRUZ, G. F.; NASCIMENTO, H. D. L.; ERBELIN, M. N. Assessing biodegradation of Brazilian crude oils via characteristic profiles of O₁ and O₂ compound classes: petroleomics by negative-ion mode electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*, **31**, 7, 6649-6657, 2017.
- ³³ REILLY, T.; MEDINA, B.; LEHAMANN, T.; ALVARADO, V. Select naphthenic acids beneficially impact oil-water dynamics during smart waterflooding. SPE 191455, 2018.
- ³⁴ DIAS, H. P.; BARROS, E. V.; SAD, C. M. S.; YAPUCHURA, E. R.; GOMES, A. O.; MOURA, R. R.; PINTO, F. E.; DOMINGOS, D. V.; AQUÍJE, G. M. F. V.; LACERDA JUNIOR, V.; ROMÃO, W. Study of the corrosive behavior of the AISI 1020 steel in acid crude oil by microscopic techniques (LM, AFM and SEM/EDX) and Raman spectroscopy. *J. Braz. Chem. Soc.*, **29**(8), 1690-1700, 2018.
- ³⁵ BERTHEUSSEN, A.; SIMON, S.; SJÖBLOM, J. Equilibrium partitioning of naphthenic acid mixture, part 1: commercial naphthenic acid mixture. *Energy Fuels*, **32**, 7519–7538, 2018b.

-
- ³⁶ HAVRE, T. E.; SJÖBLOM, J.; VINDSTAND, J. E. Oil/water-partitioning and interfacial behavior of naphthenic acids. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **24**, 2003.
- ³⁷ SIMON, S.; REISEN, C.; BERSAS, A.; SJÖBLOM, J. Reaction between tetrameric acids and Ca^{2+} in oil/water system. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **51**, 5669–5676, 2012.
- ³⁸ SIMON, S.; SUBRAMANIAN, S.; GAO, B.; SJÖBLOM, J. Interfacial shear rheology of gels formed at the oil/water interface by tetrameric acid and calcium ion: influence of tetrameric acid structures and oil composition. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **54**, 25, 8713-8722, 2015.
- ³⁹ SIMON, A.; BLANCO, E.; GAO, B.; SJÖBLOM, J.; PASSADE-BOUPAT, N.; PALERMO, T.; RONDON-GONZALEZ, M. Rheological properties of gels formed at the oil-water interface by the reaction between tetrameric acid and calcium ion under flow conditions and at the batch scale. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**, 34, 15516-15525, 2019.
- ⁴⁰ BRANDAL, Ø.; HANNESETH, A. M.; HEMMINGSEN, P. V.; SJÖBLOM, J.; KIM, S.; RODGERS, R.; MARSHALL, A. G. Isolation and characterization of naphthenic acids from a metal naphthenate deposit: molecular properties at oil-water and air-water interfaces. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **27**, 295–305, 2006.
- ⁴¹ SIMON, S.; GAO, B.; TOFTE, S.; SJÖBLOM, J.; PASSADE-BOUPAT, N.; PALERMO, T.; RONDON-GONZALEZ, M. Influence of asphaltenes on gelation of tetrameric acid with calcium ion at the oil/water interface under flow-model condition. *Energy Fuels*, **34**, 5, 5846-5855, 2020a.
- ⁴² BRIENT, J. A.; WESSNER, P. J.; DOLY, M. N. **Encyclopedia of Chemical Technology**: Naphthenic acid. 4^a Ed. John Wiley & Sons: New York, 2000, 1-10p.
- ⁴³ SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**, 4th Ed. CRC Press, Boca Raton, 2006, 225p.
- ⁴⁴ FERNANDES, H. A.; FREITAS, R. R.; RIBEIRO, D. C.; VICENTE, M. A.; SANTOS, M. F. P. Total acidity in petroleum: a bibliometric analysis. *Research, Society and Development*. **8(1)**, e281505, 2019.

-
- ⁴⁵ BALDAM, R. Science mapping (bibliometria) with r studio, bibliometrix and international indexes. Ufes: Vitória, 2020.
- ⁴⁶ ARIA, M.; CUCCUTULLO, C. Bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *Journal of Informetrics*. **11**(4), 959-975.
- ⁴⁷ ASTM D664-17. Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration. ASTM International: West Conshohocken, PA. 2017.
- ⁴⁸ DAMASCENO, F. C.; GRUBER, L. D. A.; GELLER, A. M.; CAMPOS, M. C. V.; GOMES, A. O.; GUIMARÃES, R. C. L.; PÉRES, V. F.; JACQUES, R. A.; CAMARÃO, E. B. Characterization of naphthenic acids using mass spectroscopy and chromatographic techniques: study of technical mixtures. *Analytical Methods*, **6**, 807-816, 2014.
- ⁴⁹ GRUBER, L. D. A.; DAMASCENO, F. C.; CAMARÃO, E. B.; JACQUESI, R. A.; GELLER, A. M.; CAMPOS, M. C. V. Ácidos naftênicos no petróleo. *Química Nova*, **35**, 7, 1423-1433, 2012.
- ⁵⁰ PARISOTTO, G.; FERRÃO, M. F.; MÜLLER, A. L. H.; MÜLLER, E. I.; SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; DIAS, J. C. M.; FLORES, E. M. M. Total acid number determination in of crude oil distillation using ATR-FTIR and variable selection by chemometric methods. *Energy Fuels*, **24**, 5474-5478, 2010.
- ⁵¹ YEN, T. W.; MARSH, W. P.; MACKINNON, M. D.; FEDORAK, P. Measuring naphthenic acids concentrations in aqueous environmental samples by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1033**, 83-90, 2004.
- ⁵² BARBOSA, L. L.; SAD, C. M.; MORGAN, V. G., FILGUEIRAS, P. R.; CASTRO. Application of low field NMR as an alternative technique to quantification of total acid number and sulphur content in petroleum from Brazilian reservoirs. *Fuel*, **176**, 146-152, 2016.
- ⁵³ RUDZINSKI, W., E.; OEHLERS, L.; ZHANG,Y. Tandem mass spectrometric characterization of commercial naphthenic acids and a maya crude oil. *Energy Fuels*, **16**, 1178-1, 2002.
- ⁵⁴ QUIROGA-BACERRA, H.; MIRANDA-MEJIA, C.; LAVERDE-CASTAÑO, D.; HERNNADEZ-LOPEZ, M; GOMEZ-SANCHEZ, M. A kinetic study of esterification of

naphthenic acids from a colombian heavy crude oil. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. **4**(5), 21-31, 2012.

⁵⁵ TOMCZYK, N. A.; WINANS, R. E. On the nature and origin of acidic species in petroleum. 1. detailed acid type distribution in a California crude oil. *Energy Fuels*. **15**, 1498-1504, 2001.

⁵⁶ SAAB, J, MOKBEL, AC, RAZZOUK, NA, ZYDOWICZ, N, JOSE, J. Quantitative extraction produce of naphthenic acids contained in crude oils. Characterization with different spectroscopic methods. *Energy Fuels*, **19**, 525-531, 2005.

⁵⁷ PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Química orgânica experimental**: técnicas de escala pequena. 2 Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 780 p.

⁵⁸ POVEDA, J. C.; MOLINA, D. R. Average molecular parameters of heavy crude oils and their fractions using NMR spectroscopy. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **84-85**, 1-7, 2012.

⁵⁹ OLIVEIRA, E. C. S.; CUNHA NETO, A. ; LACERDA JR, V. L.; CASTRO, E. V. R., MENEZES, S. M. C. Study of Brazilian asphaltene aggregation by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Fuel*, **117**, 146-151, 2014.

⁶⁰ NASCIMENTO, P. T.; SANTOS, A. F.; YAMAMOTO, C. I.; TOSE, L. V.; BARROS, E. V.; GONÇALVES, G. R.; SCHEER, A. P. Fractionation of asphaltene by adsorption onto silica and chemical characterization by atmospheric pressure photoionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, fourier transform infrared spectroscopy coupled to attenuated total reflectance, and proton nuclear magnetic resonance. *Energy Fuels*, **30(7)**, 5439-5448, 2016.

⁶¹ PINTO, F. E.; BARROS, E. V.; TOSE, L. V.; SOUZA, L. M.; TERRA, L. A.; POPPI, R. J.; ROMÃO, W. Fractionation of asphaltenes in n-hexane and on adsorption onto CaCO₃ and characterization by ESI(+)-FT-ICR MS: Part I. *Fuel*, **210**, 790-802, 2017.

⁶² HAUSER, A.; ALHUMAIDAN, F.; AL-RABIAH, H.; HALABI, MA. Study on thermal cracking of Kuwaiti heavy oil (vacuum residue) and its SARA fractions by NMR spectroscopy. *Energy Fuels*, **28(7)**, 4321-4332, 2014.

-
- ⁶³ MOLINA, D.; UURIBE, U. N.; MURGICH, J. Correlations between SARA fractions and physicochemical properties with ¹H NMR spectra of vacuum residues from Colombian crude oils. *Fuel*, **89**(1), 185-192, 2010.
- ⁶⁴ HAUSER, A.; ALHUMAIDAN, F.; AL-RABIAH, H. NMR investigations on products from thermal decomposition of Kuwaiti vacuum residues. *Fuel*, **113**, 506-515, 2013.
- ⁶⁵ LUTNAES, B. F.; KRANE, J.; SMITH, B. E.; ROWLAND, S. J. Structure elucidation of C80, C81 and C82 isoprenoid tetraacids responsible for naphthenate deposition in crude oil production. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5**(12), 1873-1877, 2007.
- ⁶⁶ BARROS, E. V.; SOUZA, L. M.; MADEIRA, N. C. L.; CHINELATTO, L. S.; BERTELLI, J. N.; CARVALHO, R. M.; VAZ B. G.; SIMAS, R. C.; NETO, A. C.; LACERDA, V.; ROMÃO, W. Isolation of tetrameric acids from naphthenates deposits and characterization by high-resolution analytical techniques. *Fuel*, **308**, 122065, 2022.
- ⁶⁷ JAFFÉ, R.; GALLARDO, M. T. Application of carboxylic acid biomarkers as indicators of biodegradation and migration of crude oils from the Maracaibo Basin, western Venezuela. *Organic Geochemistry*, **20**(7), 973-984, 1993.
- ⁶⁸ ROWLAND, S. J.; WEST, C. E.; SCARLETT, A. G.; JONES, D. Identification of individual acids in a commercial sample of naphthenic acids from petroleum by two-dimensional comprehensive gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25**, 1741-1751, 2011.
- ⁶⁹ ROWLAND, S. M.; ROBBINS, W. K.; CORILO, Y. E.; MARSHALL, A. G. RODGERS, R. P. Solid-phase extraction fractionation to extend the characterization of naphthenic acids in crude oil by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*, **28**, 5043-5048, 2014.
- ⁷⁰ SMITH, D. F.; RODGERS, R. P.; RAHIMI, P.; TECLEMARIAM, A.; MARSHALL, A. Effect of thermal treatment on acidic organic species from Athabasca bitumen heavy vacuum gas oil, analyzed by negative-ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometry. *Energy Fuels*, **23**, 314-319, 2009.
- ⁷¹ MARSHALL, A.G.; RODGERS, R.P. Petroleomics: the next grand challenge for chemical analysis. *Accounts of Chemical Research*, **37**(1), 53-59, 2004.

-
- ⁷² LOZANO, D. C. P.; THOMAS, M. J.; JONES, H. E.; BARROW, M. P. Petroleomics: tools, challenges, and developments. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **13**(1), 405-430, 2020.
- ⁷³ BARROW, M. P.; MCDONNELL, L. A.; FENG, X.; WALKER, J.; DERRICK, P. J. Determination of the nature of naphthenic acids present in crude oils using nanospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: the continued battle against corrosion. *Analytical Chemistry*, **75**, 860-866, 2003.
- ⁷⁴ JUYAL, P.; MAPOLELO, M. M.; YEN, A.; RODGERS, R. P.; ALLESON, S. J. Identification of calcium naphthenate deposition in south american oil fields. *Energy Fuels*, **29**, 2342–2350, 2015.
- ⁷⁵ ISLAM A.; CHO, Y.; AHMED, A.; KIM, S. Data interpretation methods for petroleomics. *Mass Spectrometry Letters*, **3**(3), 63-67, 2012.
- ⁷⁶ CHO, Y. AHMED; ISLAM, A.; KIM, S. Developments in FT-ICR MS instrumentation, ionization techniques, and data interpretation methods for petroleomics. *Mass spectrometry reviews*, n.34, p. 248-263, 2015 KOKAL, S.; ARAMCO, S. SPE 77497 Crude Oil Emulsions: A State-Of-The-Art Review. SPE Annual Technical Conference and Exhibition held in San Antonio, Texas. 2002.
- ⁷⁷ SMITH, D.F.; RAHIMI, P.; TECLEMARIAM, A.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. Characterization of Athabasca bitumen heavy vacuum gas oil distillation cuts by negative/positive electrospray ionization and automated liquid injection field desorption ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*, **22**(5), 3118-3125, 2008.
- ⁷⁸ DALMASCHIO, G. P.; MALACARNE, M. M.; ALMEIDA, V M. D. L.; PEREIRA, T. M. C.; GOMES, A. O.; 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.
- ⁷⁹ DIAS, H. P.; PEREIRA, T. M. C.; VANINI, G.; DIXINI, P. V.; CELANTE, V. G.; CASTRO, E. V. R.; VAZ, B. G.; FLEMING, F. P.; GOMES, A. O.; AQUIJE, G. M. F. V.; ROMÃO, W. Monitoring the degradation and the corrosion of naphthenic acids by electrospray

ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and atomic force microscopy. *Fuel*, **126**, 85–95, 2014.

⁸⁰ BARROS, E. V.; DIAS, H. P.; GOMES, A. O.; RODRIGUES, R. R. T.; MOURA, R. R.; SAD, C. M. S.; FREITAS, J. C. C.; NETO, A. C.; AQUIJE, G. M. F. V.; ROMÃO, W. Study of degradation of acid crude oil by high resolution analytical techniques. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **154**, 194-203, 2017.

⁸¹ RUDZINSKI, W., E.; OEHLERS, L.; ZHANG, Y. Tandem mass spectrometric characterization of commercial naphthenic acids and a maya crude oil. *Energy Fuels*, **16**, 1178-1, 2002.

⁸² COLATI, K. A. P.; DALMASCHIO, G. P.; 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.

⁸³ QU, D. R.; ZHENG, Y. G.; JIANG, X.; KE, W. Correlation between the corrosivity of naphthenic acids and their chemical structures. *Ant-iCorros. Methods Mater*, **54**(4), 211–218, 2007.

⁸⁴ RIVERA-BARRERA, D.; RUEDA-CHACÓN, H.; MOLINA, D. Prediction of the total acid number (TAN) of colombian crude oils via ATR–FTIR spectroscopy and chemometric methods. *Talanta*. **206**, 120186, 2020

⁸⁵ CAMPO, R.; BARROW, M. P.; SHEPHERD, A. G.; SALISBURY, M. DERRICK, P. J. Characterization of naphthenic acid singly charged noncovalent dimers and their dependence on the accumulation time within a hexapole in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*. **23**, 5544–5549, 2009

⁸⁶ BORGUND, A. E.; ERSTAD, K. BARTH, T. Fractionation of crude oil acids by HPLC and characterization of their properties and effects on gas hydrate surfaces. *Energy Fuels*. **21**, 2816-2826, 2007.

⁸⁷ SMITH, B. E.; SUTTON, P. A.; LEWIS, C. A.; DUNSMORE, B.; FOWLER, G.; KRANE, J.; LUTNAES, B. F.; BRANDAL, O.; SJÖBLOM, J.; ROWLAND, S. J. Analysis of ‘ARN’ naphthenic acids by high temperature gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal Separation Science*, **30**, 375 – 380, 2007

-
- ⁸⁸ GREEN, J. B.; STIERWALT, B. K.; THOMSON, J. S.; TREESE, C. A. Rapid isolation of carboxylic acids from petroleum using high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **57**, 2207-2211, 1985
- ⁸⁹ JONES, D. M.; WATSON, J. S.; MEREDITH, W.; CHEN, M.; BENNETT, B. Determination of naphthenic acids in crude oils using nonaqueous ion exchange solid-phase extraction. *Energy Fuels*, **73**, 703-707, 2001.
- ⁹⁰ DZIDIC, I.; SOMERVILLE, A. C.; RAAIA, J. C.; HART, H. V. Determination of naphthenic acids in california crudes and refinery wastewaters by fluoride ion chemical ionization. *Analytical Chemistry*, **60**(13), 1318-1323 1988
- ⁹¹ CAMPOS, M. C. V.; OLIVEIRA, E. C.; SANCHES FILHO, P. J.; PIATNICKI, C. M. S.; CAMARÃO, E. B. Analysis of tert-butyldimethylsilyl derivatives in heavy gas oil from Brazilian naphthenic acids by gas chromatography coupled to mass spectrometry with electron impact ionization. *Journal of Chromatography A*. **1105**, 95–105, 2006.
- ⁹² ZHU, G. T.; HE, S.; HE, X. M.; ZHU, S. K.; FENG, Y. Q. A micro-solid phase extraction in glass pipette packed with amino-functionalized silica for rapid analysis of petroleum acids in crude oils. *RSC advances*, **7**(64), 40608-40614, 2017.
- ⁹³ SHEPHERD, A. G.; SORBIE, K. S.; THOMSON, G. B.; WESTACOTT, R. E. Sensitivity study of naphthenic acids from flow assurance deposits characterized by low-resolution mass spectrometry. *Energy & Fuel*. **24**, 4387–4395, 2010
- ⁹⁴ LALLI, P. M.; JARVIS, J. M.; MARSHALL, A. G.; RODGERS, R. P. Functional isomers in petroleum emulsion interfacial material revealed by ion mobility mass spectrometry and collision-induced dissociation. *Energy Fuels*. **31**, 311–318, 2017
- ⁹⁵ VALENCIA-DÁVILA, J. A.; BLANCO-TIRADO, C.; COMBARIZA, M. Y. Analysis of naphthenic acids by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Fuel*. **193**, 168-177, 2017
- ⁹⁶ QIAN, K.; EDWARDS, K. E.; DECHERT, G. J.; JAFFE, S. B.; GREEN, L. A.; OLMSTEAD, W. N. Measurement of total acid number (TAN) and TAN boiling point distribution in petroleum products by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **80**, 849-855, 2008

-
- ⁹⁷ MARTINS, L. L.; ANGOLINI, C. F. F.; DA CRUZ, G. F.; MARSAIOLI, A. J. Characterization of acidic compounds in Brazilian tar sand bitumens by LTQ Orbitrap XL: assessing biodegradation using petroleomics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **28**, 848-57, 2017B.
- ⁹⁸ SHAH, S. N.; LETHESH, K. C.; MUTALIB, M. I. S. Extraction and recovery of naphthenic acid from acidic oil using supported ionic liquid phases (SILPs). *Chem. Prod. Process Model.*, **10(4)**, 221–228, 2015.
- ⁹⁹ BARROW, M. P.; MCDONNELL, L. A.; FENG, X.; WALKER, J.; DERRICK, P. J. Determination of the nature of naphthenic acids present in crude oils using nanospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: the continued battle against corrosion. *Analytical Chemistry*, **75**, 860-866, 2003
- ¹⁰⁰ SMITH, D. F.; SCHAUB, T. M.; KIM, S.; RODGERS, R. P.; RAHIMI, P.; TECLEMARIAM, A.; MARSHALL, A. G. Characterization of acidic species in athabasca bitumen and bitumen heavy vacuum gas oil by negative-ion ESI FT-ICR MS with and without acid-ion exchange resin prefractionation. *Energy Fuels*, **22**, 2372–2378, 2008.
- ¹⁰¹ Headley, J. V.; Peru, K. M. Characterization of naphthenic acids from athabasca oil sands using electrospray ionization: the significant influence of solvents. *Analytical Chemistry*, **79**, 6222-6229, 2007
- ¹⁰² CLINGENPEEL, A. C.; ROWLAND, S. M.; CORILO, Y. E.; ZITO, P.; RODGERS, R. P. Fractionation of interfacial material reveals a continuum of acidic species that contribute to sTabela emulsion formation. *Energy Fuels*, **31**, 5933–5939, 2017
- ¹⁰³ CLINGENPEEL, A. C.; FREDRIKSEN, T. R.; QIAN, K.; HARPER, M. R. Comprehensive characterization of petroleum acids by distillation, solid phase extraction separation, and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*, **32**, 9271–9279, 2018
- ¹⁰⁴ SHI, Q.; ZHAO, S.; XU, Z.; CHUNG, K. H.; ZHANG, Y.; XU, C. Distribution of acids and neutral nitrogen compounds in a chinese crude oil and its fractions: characterized by negative-ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels*, **24**, 4005–4011, 2010.

-
- ¹⁰⁵ VALENCIA-DÁVILA, J. A.; WITT, M.; BLANCO-TIRADO, C.; COMBARIZA, M. Y. Molecular characterization of naphthenic acids from heavy crude oils using MALDI FT-ICR mass spectrometry. *Fuel*, **231**, 126–133, 2018
- ¹⁰⁶ FAN, T. P. Characterization of naphthenic acids in petroleum by fast atom bombardment mass spectrometry. *Energy Fuels*. **5**, 371-375, 1991.
- ¹⁰⁷ QI, B.; FEI, X.; WANG, S.; CHEN, L. Study on distribution and composition of carboxylic acids of Bohai crude oil in China. *Petroleum science and technology*, **22(3-4)**, 463-473, 2004
- ¹⁰⁸ SUTTON, P. A.; ROWLAND, S. J. Determination of the content of C₈₀ tetraacids in petroleum. *Energy Fuels*, **28**, 9, 5657–5669, 2014
- ¹⁰⁹ MEDIAAS, H.; GRANDE, K. V.; HUSTAD, B. M.; RASCH, A.; RUESLATTEN, H. G.; VINDSTAD, J. E. The Acid-IER Method-A method for selective isolation of carboxylic acids from crude oils and other organic solvents. SPE 80404, 2003
- ¹¹⁰ SEIFERT, W. K.; HOWELLS, W. G. Interfacially active acids in a California crude oil. Isolation of carboxylic acids and phenols. *Analytical Chemistry*, 41, 4, 554-562, 1969
- ¹¹¹ HEMMINGSEN, P. V.; SUNGHWAN, K.; PETTERSEN, H. E.; RODGERS, R. P.; SJÖBLOM, J.; MARSHALL, A. G. Structural Characterization and Interfacial Behavior of Acidic Compounds Extracted from a North Sea Oil. *Energy Fuels*. **20**, 1980-1987, 2006
- ¹¹² BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*, 1a ed., LTC: Rio de Janeiro, 2015, 63-67p.
- ¹¹³ NI, W.; ZHU, G.; LIU, F.; LI, Z.; XIE, C.; HAN, Y.). Carboxylic Acids in Petroleum: Separation, Analysis, and Geochemical Significance. *Energy Fuels*, **35(16)**, 12828-12844, 2021.
- ¹¹⁴ PUTMAN, J. C.; MARSHALL, A. G. Screening petroleum crude oils for ARN tetraprotic acids with molecularly imprinted polymers. *Energy & Fuels*. **30(7)**, 5651–5655, 2016
- ¹¹⁵ FERREIRA, S. L. C.; ANDRADE, J. B.; KORN, M. G.; PEREIRA, M. G.; LEMOS, V. A.; SANTOS, W. N. L.; RODRIGUES, F. M.; SOUZA, A. S.; FERREIRA, H. S.; SILVA, E. G. P. Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination

of cadmium using spectrometric techniques. *Journal of Hazardous Materials*, **145**, 358–367, 2007.

¹¹⁶ MAGNUSSON, H, HANNESETH, AD, SJÖBLOM, J. Characterization of C₈₀ naphthenic acid and its calcium naphthenate. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **29**, 464–473, 2008

¹¹⁷ TURNBULL, A.; SLAVCHEVA, E.; SHONE, B. Factors controlling naphthenic acid corrosion. *Corrosion*, **54**, 922-930, 1998

¹¹⁸ DIAS, H. P.; DIXINI, P. V.; ALMEIDA, L. C. P.; VANINI, G. CASTRO, E. V. R.; AQUIJE, G. M. F. V.; GOMES, A. O.; MOURA, R. R.; LACERDA JUNIOR, V.; VAZ, B. G.; ROMÃO, W. Evidencing the crude oil corrosion by Raman spectroscopy, atomic force microscopy and electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Fuel*, **139**, 328-336, 2015a.

¹¹⁹ SLAVCHEVA, E.; SHONE, B.; TURNBULL, A. Review of naphthenic acid corrosion in oil refining. *British Corrosion Journal*, **34**(2), 125-131, 1999.

¹²⁰ JIN, P.; ROBBINS, W.; BOTA, G. Effect of sulfur compounds on formation of protective scales in naphthenic acid corrosion in non-turbulent flow. *Corrosion Science*. **131**, 223-234, 2018

¹²¹ DIAS, H. P.; BARROS, E. V.; GOMES, A. O.; MOURA, R. R.; PINTO, F. E.; GONÇALVES, A. S.; AQUIJE, G. M. F. V.; XU, Z.; ROMÃO, W. Corrosion rate studies of AISI 1020 steel using linear, cyclic, and aromatic naphthenic acid standards. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, **184**, 106474, 2020.

¹²² LAREDO, G. C.; LÓPEZ, C. R.; ÁLVAREZ, R. E.; CASTILLO, J. J.; CANO, J. L. Identification of naphthalenic acids and the corrosivity related characteristics in crude oil and vacuum gas oils from a Mexican refinery. *Energy Fuels*, **18**, 1687-1694, 2004.

¹²³ DEYAB, M. A.; DIEF, H. A. A.; EISSA, E. A.; TAMAN, A. R. Electrochemical investigations of naphthenic acid corrosion for carbon steel and the inhibitive effect by some ethoxylated fatty acids. *Electrochimica Acta*, **52**, 8105-8110 2007.

¹²⁴ MORADI, M.; TOPCHYIY, E.; LEHMANN, T. E.; ALVARADO, V. Impact of ionic strength on partitioning of naphthenic acids in water–crude oil systems – Determination through high-field NMR spectroscopy. *Fuel*, **112**, 236–248, 2013.

-
- ¹²⁵ NORDGARD, E. L.; SIMON, S.; SJÖBLOM, J. Interfacial shear rheology of calcium naphthenate at the oil/water interface and the influence of pH, calcium, and in presence of a model monoacid. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **33**, 1083–1092, 2012b.
- ¹²⁶ TURNER, M. S.; SMITH, P. C. Controls on soap scale formation, including naphthenate soaps - drivers and mitigation. SPE 94339, 2005
- ¹²⁷ OLIVEIRA, M. C. K.; ROSARIO, F. F.; BERTELLI, J. N.; PEREIRA, R. C. L.; ALBUQUERQUE, F. C.; MARQUES, L. C. C. Flow assurance solutions to mitigate naphthenates problems in crude oil production. SPE 166235, 2013.
- ¹²⁸ SIMON, S.; RUWOLDT, J.; SJÖBLOM, J. A critical update of experimental techniques of bulk and interfacial components for fluid characterization with relevance to well fluid processing and transport. *Advances in colloid and interface Science*, **277**, 102120, 2020b.
- ¹²⁹ VINDSTAD, J. E.; BYE, A. S.; GRANDE, K. V.; HUSTAD, B. M.; HUSTVEDT, E.; NERGARD, B. Fighting naphthenate deposition at the Heidrun field. SPE 80375, 2003
- ¹³⁰ 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
- ¹³¹ ROUSSEAU, G, ZHOU, H, HURTEVENT, C. Calcium carbonate and naphthenate mixed scale in deep-offshore fields. SPE 68307, 2001
- ¹³² BROCARD, B.; BOURREL, M.; HURTEVENT, C.; VOLLE, J. L.; ESCOFFIER, B. ARN-type naphthenic acids in crudes: analytical detection and physical properties. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **28**, 331-337, 2007
- ¹³³ GALLUP, D. L.; CURIALE, J. A. SMITH, P. C. Characterization of sodium emulsion soaps formed from production fluids of Kutei Basin, Indonesia. *Energy Fuels*, **21**, 1741-1759, 2007
- ¹³⁴ KNUDESEN, A.; NORDGARD, E. L.; DIOU, O.; SJÖBLOM, J. Methods to study naphthenate formation in w/o emulsions by the use of a tetraacid model compound. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **33**, 1514–1524, 2012

-
- ¹³⁵ LAWAL, O.; ADEKOLA, S. A.; AKINLUA, A. Occurrence of naphthenate deposition in crude oil production field offshore Niger Delta. *Journal of Petroleum Exploration and Production*, **11(1)**, 531-537, 2021.
- ¹³⁶ BERTELLI, J. N.; DIP, R. M. M.; PIRES, R. V.; ALBUQUERQUE, F. C.; LUCAS, E. F. Shear rheology using de noüy ring to evaluate formation and inhibition of calcium naphthenate at the water/oil interface. *Energy Fuels*, **28**, 1726-1735, 2014.
- ¹³⁷ SJÖBLOM, J.; SIMON, S.; XU, Z. The chemistry of tetrameric acids in petroleum. *Advances in Colloid and Interface Science*, **205**, 319-338, 2014.
- ¹³⁸ GALLUP, D. L.; STAR, J. Soap sludges: aggravating factors and mitigation measures. In: SPE International Symposium on Oilfield Scale. OnePetro, 2004.
- ¹³⁹ SMITH, B. E.; SUTTON, P. A.; LEWIS, C. A.; DUNSMORE, B.; FOWLER, G.; KRANE, J.; LUTNAES, B. F.; BRANDAL, O.; SJÖBLOM, J.; ROWLAND, S. J. Analysis of 'ARN' naphthenic acids by high temperature gas chromatography and highperformance liquid chromatography. *J Separation Sci.*, **30**, 375-380, 2007.
- ¹⁴⁰ MARSHALL, A. G.; JUYAL, P.; MAPOLELO, M. M.; RODGERS, R. P. Method for identifying naphthenates in a hydrocarbon containing liquid. US 8084264B2. 27/12/2011.
- ¹⁴¹ MEDIAAS, H.; GRANDE, K.; KUMMERNES, H.; VINDSTAD, J. Method for isolation and quantification of naphthenate forming acids ("ARN-acids"). US 8674161B2. 18/03/2014.
- ¹⁴² MEDIAAS, H.; GRANDE, K.; KUMMERNES, H.; VINDSTAD, J. Método para isolamento e quantificação de ácidos de ARN em uma amostra de petróleo cru. BR PI1011451B1. 07/08/2018.
- ¹⁴³ ALBUQUERQUE, F. C.; BRITO, R. S. N.; LOPES, M. A. System for extracting precursor acids from calcium naphthenate deposits and method. US 20160153956A1. 02/06/2016a.
- ¹⁴⁴ ALBUQUERQUE, F. C.; BRITO, R. S. N.; LOPES, M. A. Sistema de extração de ácidos percussores de depósitos de naftenatos de cálcio e método. BR 1020140297707A2. 31/05/2016b.

-
- ¹⁴⁵ ALBUQUERQUE, F. C.; BRITO, R. S. N.; LOPES, M. A. Method for extracting precursor acids from calcium naphthenate deposits. US 9983187B2. 29/05/2018.
- ¹⁴⁶ PAEK, C, MENNITO, AS. Selective isolation of ARN from crude oils. US 2017/0269042 A1. 21/09/2017.
- ¹⁴⁷ ROWLAND, S. J.; SMITH, B. E. Isoprenoid compounds, their isolation and use. US 8624057B2. 07/01/2014.
- ¹⁴⁸ LEE, W.; MIN, J.; AHN, YH.; BAEK, S.; KOH, C. A.; LEE, J. W. Effect of naphthenate formation on the anti-adhesive behavior of clathrate hydrates at a water–oil interface. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **58**, 5064–5070, 2019.
- ¹⁴⁹ NICHOLS, D. A.; ROSARIO, F. F.; BEZERRA, M. C. M.; GORRINGE, S. E.; WILLIAMS, H. L.; GRAHAM, G. M. Calcium naphthenates in complex production systems—evaluation and chemical inhibition challenges. SPE 169756, 2014.
- ¹⁵⁰ EKE, W. I.; VICTOR-OJI, C.; AKARANTA, O. Oilfield metal naphthenate formation and mitigation measures: a review. *J. Petrol. Explor. Prod. Technol.* **10**, 805–819, 2020.
- ¹⁵¹ MOHAMMED, M. A.; SORBIE, K. S. Spectroscopic determination of naphthenic acid composition from various calcium naphthenates fiels deposits. SPE 121633, 2009a.
- ¹⁵² MOHAMMED, M. A.; SORBIE, K. S. Naphthenic acid extraction and characterization from naphthenate field deposits and crude oils using ESMS and APCI-MS. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* **349**, 1–18, 2009b.
- ¹⁵³ LEVINE, S. W.; FRANCISCO, M. A.; FEILLER, S. A.; WALTERS, C. C. Process for the extraction of high molecular weight naphthenic acids from calcum naphthenate salts. US 8329941B2. 11/12/2012.
- ¹⁵⁴ SIMON, S.; NORDGARD, E.; BRUHEIM, P.; SJÖBLOM, J. Determination of C₈₀ tetracid content in calcium naphthenate deposits. *Journal of Chromatography A.* **1200**, 136-143, 2008.
- ¹⁵⁵ SUBRAMANIAN, S.; SIMON, S.; SJÖBLOM, J. Interfacial dilational rheology properties of films formed at the oil/water interface by reaction between tetrameric acid and calcium ion. *J Dispersion Sci Technol.*, **38**, 1110-1116, 2017.

-
- ¹⁵⁶ SIMON, S.; REISEN, C.; BERSAS, A.; SJÖBLOM, J. Reaction between tetrameric acids and Ca^{2+} in oil/water system. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **51**, 5669–5676, 2012
- ¹⁵⁷ FONTANALS, N.; BORRUL, F.; MARCÉ, R. M. Mixed-mode sorbents in solid-phase extraction. In: **Advanced Separations by Specialized Sorbents**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2014, 242-243p.
- ¹⁵⁸ SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J.; VEGA, V. Comparison of solid phase extraction sorbents for cleanup of pesticide residue analysis in fresh fruit and vegetables. *Journal of Separation Science*, **25**, 883-890, 2002.
- ¹⁵⁹ NORDGARD, E. L.; HANNESETH, A. M. D.; SJÖBLOM, J. Inhibition of calcium naphthenate. experimental methods to study the effect of commercially available naphthenate inhibitors. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **31**, 668–675, 2010.
- ¹⁶⁰ SIMON, S.; KNUDSEN, A.; NORDGARD, E.; REISEN, C.; SJÖBLOM, J. Aggregation of tetrameric acids in aqueous media studied by small-angle neutron scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, **394**, 277-283, 2013.
- ¹⁶¹ LUTNAES, B. F.; KRANE, J.; SMITH, B. E.; ROWLAND, S. J. Structure elucidation of C_{80} , C_{81} and C_{82} isoprenoid tetraacids responsible for naphthenate deposition in crude oil production. *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 1873–1877, 2007.
- ¹⁶² VANINI, G.; BARRA, T. A.; SOUZA, L. M.; MADEIRA, N. C. L.; GOMES, A. O.; ROMÃO, W.; AZEVEDO, D. A. Characterization of nonvolatile polar compounds from Brazilian oils by electrospray ionization with FT-ICR MS and Orbitrap-MS. *Fuel*, **282**, 118790-118790, 2020.
- ¹⁶³ POMERANTZ, A. E.; MULLINS, O. C.; PAUL, G.; RUZICKA, J.; SANDERS, M. Orbitrap mass spectrometry: a proposal for routine analysis of nonvolatile components of petroleum. *Energy Fuels*, **25**(7), 3077–3082, 2011.
- ¹⁶⁴ ZHUROV, K. O.; KOZHINOV, A. N.; TSYBIN, Y. O. Evaluation of high-field orbitrap Fourier transform mass spectrometer for petroleomics. *Energy Fuels*, **27**, 2974–2983, 2013.

-
- ¹⁶⁵ COVAS, T. R.; FREITAS, C. S.; TOSE, L. V.; VALENCIA-DÁVILA, J. A.; ROCHA, Y. S.; RANGEL, M. D.; SILVA, R. C.; VAZ, B. G. Fractionation of polar compounds from crude oils by hetero-medium pressure liquid chromatography (H-MPLC) and molecular characterization by ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Fuel*, **267**, 117289, 2020.
- ¹⁶⁶ JAMEEL, A. G. A.; ELBAZ, A. M.; EMWAS, A.; ROBERTS, W. L.; SARATHY, S. M. Calculation of average molecular parameters, functional groups, and a surrogate molecule for heavy fuel oils using ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Energy Fuels*, **30**, 3894–3905, 2016.
- ¹⁶⁷ DIAS, H. P.; GONÇALVES, G. R.; FREITAS, J. C. C.; GOMES, A. O.; CASTRO, E. V. R.; VAZ, B. G.; AQUÍJE, G. M. F. V.; ROMÃO, W. Catalytic decarboxylation of naphthenic acids in crude oils. *Fuel*, **158**, 113-121, 2015a.
- ¹⁶⁸ ALBUQUERQUE, F. C. **Comunicação Técnica - QM 369/2011**: Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES): 8 p. 2011.
- ¹⁶⁹ ALBUQUERQUE, F. C.; LOPES, M. A. **Determinação de ácidos naftênicos ARN em amostras de depósito - CT QM 017/2011**. Rio de Janeiro: Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES): 51 p. 2011.
- ¹⁷⁰ MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; AANDRADE, J. B. D. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, **36(8)**, 1248-1255, 2013.
- ¹⁷¹ VASCONCELOS, G. A.; PEREIRA, R. C.; SANTOS, C. D. F.; CARVALHO, V. V.; TOSE, L. V.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G. Extraction and fractionation of basic nitrogen compounds in vacuum residue by solid-phase extraction and characterization by ultra-high resolution mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, **418**, 67-72, 2017.
- ¹⁷² GE, L.; SIMON, S.; GRIMES, B.; NORDGARD, E.; XU, Z.; SJÖBLOM, J. Formation of vesicles and micelles in aqueous systems of tetrameric acids as determined by dynamic light scattering. *Journal of dispersion science and technology*, **32(11)**, 1582-1591, 2011.
- ¹⁷³ MOHAMMED, M. A.; SORBIE, K. S. Thermodynamic modelling of calcium naphthenate formation: Model predictions and experimental results. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **369(1-3)**, 1-10, 2010.
- ¹⁷⁴ MOHAMMED, M. A.; SORBIE, K. S.; SHEPHERD, A. G. Thermodynamic modeling of naphthenate formation and related pH change experiments. *SPE Production & Operations*, **24(03)**, 466-472, 2009.

-
- ¹⁷⁵ Nordgård, E. L. K., & SJÖBLOM, J. Model compounds for asphaltenes and C80 isoprenoid tetraacids. Part I: synthesis and interfacial activities. *Journal of dispersion science and technology*, 29(8), 1114-1122, 2008.
- ¹⁷⁶ DIP, R. M.; COSTA, M. F.; LUCAS, E. F. Interfacial Films of Calcium Naphthenate: Influence of Polycardanol Structures. *Energy Fuels*, **31(9)**, 9275-9282, 2017.
- ¹⁷⁷ BRETHERTON, N.; SMITH, R.; KEILTY, G.; UBBELS, S. Napthenate Control: Is Acetic Acid Injection the Answer?. SPE 95115. 2005.
- ¹⁷⁸ GOLDSZAL, A., HURTEVENT, C.; ROUSSEAU, G. Scale and naphthenate inhibition in deep-offshore fields. SPE 74661, 2002..
- ¹⁷⁹ BROCARD, B.; BOURREL, M., HURTEVENT, C.; VOLLE, J. L.; ESCOFFIER, B. ARN-Type Naphthenic Acids in Crudes: Analytical Detection and Physical Properties. *Journal of dispersion science and technology*, **28(3)**, 331-337, 2007.
- ¹⁸⁰ NENNINGSLAND, A. L. Extraction, quantification and study of interfacially active petroleum compounds. PhD thesis Trondheim, Norwegian University of Science and Technology, Norway, 2012, p.
- ¹⁸¹ VAZ, B. G.; ABDELNUR, P. V.; ROCHA, W. F. C.; GOMES, A. O.; PEREIRA, R. C. L. Predictive Petroleomics: Measurement of the Total Acid Number by Electrospray Fourier Transform Mass Spectrometry and Chemometric Analysis. *Energy Fuels*, **27**, 1873 – 1880, 2013.
- ¹⁸² BRERETON, R. G. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical, John Wiley & Sons, 2003.
- ¹⁸³ WOLD, S.; SJOSTROM, M. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 44, 1998, 3p.
- ¹⁸⁴ PORTELA, N. A; OLIVEIRA, E. C.; NETO, A. C.; RODRIGUES, R. R.; SILVA, S. R.; CASTRO, E. V.; FILGUEIRAS, P. R. Quantification of biodiesel in petroleum diesel by ¹H NMR: Evaluation of univariate and multivariate approaches. *Fuel*, **166**, 12-18, 2016.
- ¹⁸⁵ BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LEISTER, S. J. Standard Normal Variate Transformation and De-trending Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.* 43 (1989), p.772-777.

¹⁸⁶ VAZ, B. G.; SILVA, R. C.; KLITZKE, C. F.; SIMAS, R. C.; NASCIMENTO, H. D. L.; PEREIRA, R. C. L. *et al.* Assessing biodegradation in the Llanos Orientales crude oils by electrospray ionization ultrahigh resolution and accuracy Fourier transform mass spectrometry and chemometric analysis. *Energy Fuels*, **27**, 1277–84, 2013.

¹⁸⁷ FENN, J. B.; MANN, M.; MENH, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246(4926)**, 64-71, 1989.