RODRIGO RICARDO RAMOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) PARA
ANÁLISE SARA DE PETRÓLEO

São Paulo

2014

RODRIGO RICARDO RAMOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) PARA
ANÁLISE SARA DE PETRÓLEO

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

São Paulo

2014

RODRIGO RICARDO RAMOS

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) PARA
ANÁLISE SARA DE PETRÓLEO.

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientadora: Dr.^a Maria Anita Mendes

São Paulo

2014

Este exemplar foi revisado e alterado em relação a versão original, sob responsabilidade única do autor e com anuência de seu orientador

São Paulo, 07 de agosto de 2014

Assinatura do autor

Assinatura do orientador

Ramos, Rodrigo Ricardo

**Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia
líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo /
R.R. Ramos. -- São Paulo, 2014.**

84 p.

**Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade
de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.**

**1.Cromatografia líquida (Metodologia; Desenvolvimento)
2.Petróleo I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica.
Departamento de Engenharia Química II.t.**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à família por permitir que esse sonho fosse concretizado. A vida começa e termina na família. Por isso a família é a maior fortuna.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dr^a Maria Anita Mendes, pela orientação e por todos momentos de paciência, compreensão, dedicação e grata amizade. Sua orientação e auxílio permitiram-me concretizar este estudo.

A família que me deu suporte, apoio e incentivo para seguir em frente, não medindo esforços para tornar possível a minha formação.

A Tamara pelo apoio e ajuda nos finais de semana que passamos juntos no laboratório.

Aos amigos da pós graduação e laboratório, Leidi, Andre, Fernando, Jeahn, Katia, Lidiane, Barbara, Meriellen, Paulo e Denis, com quem compartilhei grandes momentos de intenso aprendizado, expresso aqui minha gratidão por me ajudarem e incentivarem .

Aos amigos do CEPEMA-USP pela colaboração e companherismo no desenvolvimento deste trabalho em especial, Rafa, Elen, Luciano, Marcela, Loise .

Aos Professores do Departamento de Engenharia Química da USP que fizeram parte desta minha trajetória acadêmica, que instigaram a busca do conhecimento. Suas contribuições foram valiosas para meu crescimento intelectual e pessoal em especial, a Rita, Reinaldo, Claudio e Darci.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química da USP pela parceria, comprometimento e solicitude. Em especial para Carminha, Juvenal, Silvia, Alexandre, Tadeu, Elisete, Graça e Osmar .

Agradeço a todos que de uma forma ou outra colaboraram para realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para a análise SARA de amostras de petróleo. As amostras de petróleo foram separadas em frações contendo saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. Para se obter êxito no desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida em escala preparativa, o primeiro passo foi o desenvolvimento da técnica em escala analítica. Os parâmetros encontrados foram então extrapolados para escala preparativa.

Através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvida, foi possível obter uma separação eficaz das frações SARA de amostras de petróleo, resultado que não se mostra tão eficiente quando se trabalha com cromatografia líquida clássica. As comparações entre as metodologias por cromatografia clássica de coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência desenvolvida no trabalho mostram que a cromatografia líquida possui enorme vantagem em relação à metodologia clássica. Dentre elas podemos destacar a grande reprodutibilidade já que os parâmetros de análise são altamente controlados o que não ocorre em cromatografia de coluna aberta, além da capacidade de automação e menor risco ocupacional.

As frações separadas foram caracterizadas por espectrometria de massas, espectroscopia de fluorescência e infravermelho. Através da espectrometria de massas foi possível observar uma distribuição de massas entre o intervalo de massa que vai do íon de m/z 100 Da até o íon de m/z 800 Da, com esta distribuição centrada em 350 Da. A espectrometria de massa aliada a software de identificação de componentes de frações de petróleo através de massas moleculares permitiu determinar a fórmula molecular dos compostos presentes nas frações de asfaltenos das amostras de petróleo analisadas. A análise realizada pelo programa gerou os seguintes resultados: o programa encontrou estrutura molecular para aproximadamente 60% dos picos contidos no espectro de massas, destes, 6,05% dos compostos encontrados possuíam enxofre, 45,2% dos compostos possuem N e 32,1% possuem oxigênio em sua composição.

A análise dos espectros de emissão de fluorescência mostrou que petróleos mais leves apresentam emissão de fluorescência mais intensas isso

se deve ao fato de que petróleos mais pesados, de menor API, possuem mais espécies propensas a desativar o estado excitado, justificando assim a diminuição da emissão de fluorescência com aumento do API.

ABSTRACT

This work had as main objective the development of the technique of high performance liquid chromatography for SARA analysis of oil samples. The oil samples were separated into fractions containing saturates, aromatics, resins and asphaltenes. To achieve successful development of the technique for preparative scale liquid chromatography, the first step was the development of the technique in analytical scale. The parameters obtained were then extrapolated to preparative scale.

Through the technique of high performance liquid chromatography developed, it was possible to obtain an effective separation of SARA fractions of oil samples, a result that does not show as efficient when working with classical liquid chromatography. Comparisons between both methodologies, classical and HPLC has showed that HPLC has huge advantage over classical methods. The separated fractions were characterized by mass spectrometry, fluorescence spectroscopy and infrared. Through mass spectrometry was possible to observe a distribution of masses between the mass range that goes from the ion m/z 100 Da to the ion m/z 800 Da, with this distribution centered at 350 Da.

The analysis of the fluorescence emission spectra showed that lighter oils exhibit more intense fluorescence emission that is due to the fact that heavier oils, smaller API, have more likely species to disable the excited state, thus justifying the reduction of emissions fluorescence with an increased API.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de fracionamento SARA de amostra de petróleo.....	14
Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando o processo de eluição cromatográfica e a correlação entre processo de eluição e a formação do pico	18
Figura 3: Esquema de classificação da cromatografia com ênfase em cromatografia líquida	20
Figura 4: Diagrama esquemático de um detector UV-VIS.....	23
Figura 5: Diagrama ilustrativo de um detector por índice de refração	25
Figura 6: Exemplos de possíveis grupos de compostos encontrados em produtos de petróleo	27
Figura 7: Esquema geral do fracionamento SARA.....	28
Figura 8: Modelo de dispersão de uma molécula de asfalto por moléculas de resina.....	32
Figura 9: Estrutura molecular de compostos asfaltenicos. As moléculas possuem massa em média de 750Da, e com um único sistema de anéis aromáticos fundidos por molécula.....	34
Figura 10: Representação das principais partes de um espectrômetro de massas	35
Figura 11: : Analisador de massa TOF linear: 1- Fonte de íons pulsada; 2- Pacote de íons próximos a fonte; 3 – Detector; 4-Amplificador de sinais; 5- Computador; e 6-Espectro de massas	36
Figura 12: Diagrama de Jablonski ilustrando processo de emissão por fluorescência	37
Figura 13: Esquema ilustrando o procedimento de precipitação dos asfaltenos e preparo da solução maltenica	39
Figura 14: Cromatografo utilizado para separação dos componentes SAR em escala Analítica: 1- Reservatório de solvente; 2- Unidade degaseificadora; 3- Bombas de alta pressão; 5- Injetor automático; 6- Forno de coluna; 7- Detector por ultravioleta-visível; 8- Detector por índice de refração; e 9- Controladora..	41
Figura 15: Cromatografo Shimadzu escala Preparativa, 1- Reservatório de solventes; 2- Unidade degaseificadora; 3- Controladora; 4- Bombas; 5- Injetor automático; 6- Coletor de frações; 7- Forno de coluna; 8- Detector por ultravioleta-visível; e 9- Detector por índice de refração.....	42
Figura 16: Aparato utilizado para realização de cromatografia clássica de coluna aberta.....	44
Figura 17: Esquema empregado na geometria front face.	44
Figura 18: Procedimento de montagem de uma placa de MALDI.....	46
Figura 19: Processo de precipitação mostrando o rendimento de asfalto em função no número de carbonos do precipitante (Andersen e Speight, 2001)...	47
Figura 20: Efeito taxa de solvente no rendimento de asfalto precipitado. (Andersen, 1994; Andersen e Speight, 2001)	48

Figura 21: Influência do tempo de contato no rendimento de precipitação dos asfaltenos. (Ancheyta <i>et al.</i> , 2009)	49
Figura 22: Espectro infravermelho de uma amostra de asfalto	52
Figura 23: Espectros LDI-TOF-MS amostra de asfalto. 1- modo linear, 2- modo reflectron e 3- comparação resolução obtida em modo Linear (vermelho) e Reflectron (Azul)	55
Figura 24 Espectro de massas LDI-TOF-MS mostrando a série homologa encontrada para uma amostra de asfalto analisada.....	57
Figura 25: Estrutura hipotética de uma molécula presente nas amostras de asfaltenos.	57
Figura 26: Representação ilustrativa das interações que ocorrem em cromatografia: 1- Interação dispersiva do tipo London; 2- Interação dipolo dipolo de Kenesom e Debie e Interações do tipo ligação de hidrogênio	60
Figura 27: Perfil cromatográfico de uma amostra de maltenos: a cor azul representa o cromatograma utilizando o detector por índice de refração e a cor preto representa o cromatograma utilizando detector por ultravioleta-visível leitura foi efetuada em comprimento de onda de 254nm.....	63
Figura 28: Comparação entre cromatogramas mostrando o tempo de retenção dos compostos aromáticos benzeno, naftaleno, antraceno, fenantreno	64
Figura 29: Perfil cromatográfico de injeções em triplicata de amostra de maltenos.....	65
Figura 30: Perfil do cromatograma em escala preparativa da amostra de maltenos, área hachurada, indicam as frações coletadas nos frascos de coleta de 50mL.	67
Figura 31: Diagrama tipo caixa “box plot” dos dados experimentais obtidos no fracionamento SARA.	69
Figura 32: Eluição dos compostos SAR em cromatografia clássica de coluna aberta: 1- Após aplicação SAR ao topo da coluna; 2- Após eluição dos compostos saturados com hexano; 3- Eluição dos compostos aromáticos; 4- Após eluição dos aromáticos e início eluição das resinas; 5- Eluição das resinas; 6- Aluição das resinas e 7- Aspecto da coluna após eluição dos compostos SAR.....	70
Figura 33: Espectros de fluorescência das amostras 2, 3, 14, 03 e 04 em ordem crescente de grau API.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Desempenho dos detectores de cromatografia líquida de alta eficiência. (Skoog, West e Holler, 1988).....	22
Tabela 2: Comprimento de onda de absorção de cromóforos típicos de compostos orgânicos.....	24
Tabela 3: Análise SARA correlacionada à propriedades físicas do petróleo...	29
Tabela 4: Quantidade de asfaltenos precipitada em fração mássica m/m média e desvio padrão para amostra 1.....	49
Tabela 5: Resultado obtidos na precipitação dos asfaltenos em fração massica com interfalo de confiança de 95%.	51
Tabela 6: Grupos funcionais presentes em amostras de asfaltenos analisados por espectroscopia de infravermelho.	52
Tabela 7: Série eluotrópica de solventes utilizados em cromatografia.....	61
Tabela 8: Quantidade de produto que devem ser purificado para diferentes objetivos em cromatografia líquida de escala preparativa. (Snyder <i>et al.</i> , 2010)	66
Tabela 9: Resultados obtidos para as sete replicatas da análise SARA da amostra 1	67
Tabela 10: Resultados obtidos no fracionamento SARA em coluna aberta para a amostra 1	71
Tabela 11: Teste T pareado entre as metodologias SARA clássica e HPLC, valores de $p < 0,05$ indicam que existe diferença estatística entre os dois métodos com confiança de 95%	72
Tabela 12: Comparação entre metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia clássica de coluna aberta	72
Tabela 13: Resultados obtidos no fracionamento SARA.....	74
Tabela 14: Resultados obtidos no fracionamento SARA e °grau API das amostras em fração massica m/m.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API	Densidade American Petroleum Institute
APPI	Fotoionização a pressão atmosférica
ASTM	American Society for Testing and materials
ATR	Refletância total atenuada
BPC	cromatografia em fase ligada
CG	cromatografia a gás
ESI	Ionização "Electrospray"
FT	Transformada de Fourier
GFC	Cromatografia de Filtração em Gel
GLC	Cromatografia Gás Sólido
GPC	Cromatografia por Permeação em Gel
GSC	Cromatografia Gás Líquido
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICR	Ressonância Ciclotrônica de Íons
IEC	Cromatografia de Troca Iônica
IR	Espectroscopia de Infravermelho
LDI	Dessorção a Laser
LSC	Cromatografia Líquido Sólido
LSCP	Laboratório Simulação e Controle de Processos
MALDI	Dessorção a laser assistida por matriz
MS	Espectrometria de massas
NP	Fase Normal
PC	Cromatografia em Papel
RID	Detector por Índice de Refração
RP	fase reversa
SARA	Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos
SEC	Cromatografia de Exclusão por Tamanho
TLC	Cromatografia em Camada Delgada
TOF	Tempo de voo
UV-VIS	Ultravioleta visível

SUMARIO

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2.OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo do Projeto:	16
3.REVISÃO BIBLIOGRAFICA	17
3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	17
3.1.1 Sistemas de Detecção.....	21
3.1.2 Cromatografia líquida na análise de produtos de petróleo	25
3.2 Fracionamento SARA.....	27
3.2.1 Saturados	30
3.2.2 Aromáticos.....	31
3.2.3 Resinas	31
3.2.4 Asfaltenos	32
3.3 Espectrometria de Massas.....	34
3.3.1 Espectrometria de Massas por tempo de voo.....	36
3.4 Espectroscopia de Fluorescência Molecular	36
4. MÉTODOLOGIA.....	38
4.1.Origem das Amostras.....	38
4.2.Instrumentação e Procedimento Experimental	38
4.2.1 Precipitação dos asfaltenos e preparo solução maltênica	38
4.2.2 Sistema Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em escala analítica	39
4.2.2 Sistema Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), escala preparativa	40
4.2.3 Espectroscopia de Fluorescência.....	43
4.2.4 Espectrômetria de Massas.....	44
4.2.6 Análise Infravermelho:.....	45
5.DISSCUSSÃO DE RESULTADOS	47
5.1 Precipitação e caracterização dos compostos Asfaltenicos	47
5.2 Identificação de componentes de frações do petróleo através de massas moleculares.....	57
5.3 Desenvolvimento da metodologia analítica para separação dos maltenos.....	58
5.3.1 Coluna.....	58
5.3.2 Sistema de detecção e calibração	59

5.3.3 Solventes	60
5.3.4 Resultados Obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	61
5.4 Cromatografia em escala preparativa	65
5.4.1. Comparação entre metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida clássica de coluna aberta.	69
5.5 Espectros de fluorescência amostra de petróleo.....	76
6.CONCLUSÕES	78
8.REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Petróleo é, sem sombra de dúvida uma das substâncias de maior importância para vida da sociedade moderna. Este composto não prove somente energia combustível para transporte sendo também utilizado como fonte de matéria prima para diversos produtos tais como: plásticos, tintas, fertilizante, inseticidas entre outros. De acordo com a ASTM –American Society for Testin and Materials: “ O petróleo é uma mistura de ocorrência natural, constituído predominantemente de hidrocarbonetos e derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados e/ou oxigenados, o qual é, ou pode ser removido da terra no estado líquido”. Esta mistura possui enorme complexidade sendo que foram encontrados mais de 60.000 compostos com composição elementar distinta ^{12}C ^{1}H ^{14}N ^{16}O ^{32}S em amostras de óleo cru, através da técnica de ESI e APPI FT-ICR-MS (Marshall e Rodgers, 2008).

Devido à grande complexidade composicional de amostras de petróleos crus, a caracterização total de seus compostos individuais se torna muito difícil e a caracterização elementar não é atrativa, pois fornece apenas uma informação limitada sobre a constituição do petróleo devido à baixa variação nesta propriedade. Assim sendo a separação em grupos/classes de compostos traz informações mais relevantes para o controle do processo e qualidade da indústria petroquímica, a separação em grupos pode gerar as seguintes informações (Kaminski *et al.*, 2005b):

- Determinação da melhor tecnologia de refinamento;
- Otimização das melhores condições do processo de refinamento e controle de processo;
- Em controle de qualidade avaliação dos requisitos de compatibilidade para produção de produtos com qualidade satisfatória;
- Informação a respeito da poluição ambiental que pode ser gerada a partir do produto de petróleo.

O fracionamento SARA é o exemplo de separação em grupo mais importante para indústria do petróleo sendo capaz de separar o óleo cru em quatro frações principais, baseado nas diferenças de solubilidade e polaridade destas frações. As quatro frações SARA são: Saturados (S), Aromáticos (A), Resinas (R) e Asfaltenos (A). A **Figura 1** ilustra um fracionamento em grupo

SARA típico, como descrito por Aske et al. (Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001; Aske et al., 2002)

Figura 1: Esquema de fracionamento SARA de uma amostra de petróleo. (Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001)

De acordo com esquema apresentado na **Figura 1**, o primeiro passo do fracionamento consiste na precipitação dos asfaltenos. Os asfaltenos são compostos aromáticos de grande cadeia molecular, que se encontram dispersos na emulsão do petróleo através da ação das resinas como agente pepitizante (Andersen e Speight, 2001). Estes compostos são insolúveis em solvente parafínicos e, dessa forma, a primeira etapa da separação consiste na precipitação dos asfaltenos em excesso de solvente parafínico e filtração. As frações que permaneceram solubilizadas denominam-se maltenos, são posteriormente separadas em saturados, aromáticos e resinas devido à diferença de polaridade através de técnicas cromatográficas. (Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001; Woods et al., 2008)

Os saturados são constituídos de moléculas apolares, incluindo hidrocarbonetos saturados lineares, ramificados e cíclicos. Os aromáticos são compostos que possuem pelo menos um anel aromático em sua composição e

as resinas são compostos que são retidos por matérias polares. (Fan e Buckley, 2002)

O fracionamento e análise SARA são de grande importância na caracterização do petróleo, sendo que a metodologia empregada atualmente, ASTM D2007-93, emprega como procedimento a utilização de cromatografia clássica de coluna aberta, tornando as análises irreprodutíveis e dispendiosas. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode ser empregada com o intuito de resolver os problemas que ocorrem na análise SARA clássica, pois possui alto grau de reprodutibilidade, suas análises são rápidas, automatizadas e a eficiência de separação é muito maior que a da cromatografia clássica.

O presente trabalho visa o desenvolvimento de uma metodologia de fracionamento SARA através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e posterior caracterização molecular destas frações, com intuito de fornecer dados para modelagem e simulação da unidade de coqueamento retardado da Refinaria Presidente Bernardes (RPBC).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivos do Projeto:

Este trabalho tem por objetivo:

- Desenvolver uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência para análise SARA de petróleo.
- Comparar as metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência com cromatografia líquida clássica de coluna aberta.
- Realizar a caracterização molecular das frações através de técnicas espectroscópicas.

3.REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é uma técnica de separação na qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fixa e de grande área superficial denominada fase estacionária, e outra denominada fase móvel, um fluido que percola através da fase estacionária. (Lanças, 2009)

O desenvolvimento desta técnica é atribuído ao botânico Mikhael Tswett por realizar no início do século XX, a separação de pigmentos coloridos presentes no extrato de plantas, utilizando para isso um tubo recheado com carbonato de cálcio. Tswett foi o primeiro a interpretar e compreender o processo cromatográfico para então descrever o fenômeno responsável pelo movimento das zonas coloridas dentro do tubo de vidro. (Carol, 2006; Lanças, 2009)

No processo de cromatografia a separação dos compostos ou mistura de compostos está fundamentada na migração diferencial dos componentes desta mistura, o que ocorre devido a diferentes interações do analito e as duas fases: móvel/estacionária. A **Figura 2** mostra a separação hipotética de três componentes, por meio de cromatografia líquida em coluna.

Figura 2: Diagrama esquemático ilustrando o processo de eluição cromatográfica e a correlação entre o processo de eluição e a formação do pico. (Madison Area Technical College)

A fase estacionária está acondicionada dentro da coluna (tubo geralmente de vidro ou metal), através da qual a fase móvel, denominada eluente, flui continuamente. As moléculas irão se distribuir diferencialmente entre as fases. Os analitos que apresentarem maior interação com a fase estacionária irão permanecer por menor tempo na fase móvel, consequentemente se deslocarão mais lentamente através da coluna. Caso seja encontrada uma fase estacionária na qual a interação seja seletiva os compostos poderão ser separados conforme apresentado na **Figura 2a**, onde é possível observar a separação de três componentes distintos através do processo de eluição.

A **Figura 2b**, ilustra o registro gráfico do processo de separação, denominado cromatograma, que é um gráfico obtido através da plotagem da resposta de um detector ou pesagem das frações em função do tempo ou volume de eluição. De acordo com esta figura, o componente verde permanece menos tempo retido por apresentar menor interação com a fase estacionária, deixando a coluna em tempo inferior ao componente azul.

Existem vários critérios para classificação de modalidades distintas de cromatografia, que podem ser categorizados em função de:

- a. quanto ao mecanismo de separação: (processos físicos, químicos” ou mecânicos;
- b. quanto à técnica empregada;
- c. em relação ao tipo de fase utilizada;

Quanto ao mecanismo, o processo de separação pode ocorrer através de processos físicos de “sorção” tais como: adsorção ou absorção. Através de processos químicos como o processo de troca de íons que ocorre em cromatografia de troca iônica ou através de processos mecânicos no caso da cromatografia de permeação em gel, em que os analitos são separados de acordo com o tamanho por percorrem distâncias diferentes.

Quanto à técnica na qual a forma física define a técnica geral: a fase estacionária pode ser colocada em um tubo cilíndrico (Cromatografia em coluna) ou disposta em uma placa (Cromatografia em camada delgada).

Quanto ao estado físico, a cromatografia pode ser gasosa, líquida ou em fluido supercrítico.

O esquema apresentado na **Figura 3** mostra a classificação dos diferentes tipos de cromatografia dando ênfase a cromatografia líquida por ser o método escolhido neste trabalho, para o desenvolvimento da técnica de separação SARA dos componentes do petróleo. Apesar da capacidade de separação por cromatografia gasosa ser maior que por cromatografia líquida, aquela tem como grande limitação o fato de que os compostos a serem analisados devem ser voláteis e termicamente estáveis, restringindo a utilização de cromatografia gasosa a análise de petróleos leves. O processo de separação por cromatografia gasosa (CG) ocorre basicamente de acordo com a volatilidade dos compostos, o que limita a utilização de CG para análise de algumas classes de compostos.

Figura 3: Esquema de classificação da cromatografia com ênfase em cromatografia líquida (Lanças, 2009), onde:

- GLC= cromatografia gás líquido, GSC=cromatografia gás sólido;
- TLC=cromatografia em camada delgada, PC=cromatografia em papel;
- LSC=cromatografia líquido sólido;
- BPC=cromatografia em fase ligada;
- IEC= cromatografia de troca iônica;
- SEC=cromatografia de exclusão por tamanho;
- RP=fase reversa;
- NP= fase normal;
- GPC= cromatografia por permeação em gel;
- GFC=cromatografia de filtração em gel.

Os dois tipos principais de cromatografia líquida são: - cromatografia em fase normal e - cromatografia em fase reversa:

- Na cromatografia em fase reversa, a coluna é responsável por interações do tipo apolar (e.g., C18), e a fase móvel é uma mistura de água e solvente orgânico (e.g., acetonitrila). Este modo de cromatografia é o mais utilizado. Na cromatografia de fase normal, a coluna é responsável por interação polar (e.g., sílica) e a fase móvel é uma mistura de solventes orgânicos pouco polares como, por exemplo, hexano e cloreto de metileno.

A escolha entre os dois métodos de cromatografia baseia-se principalmente na solubilidade dos analitos na fase móvel, pois os compostos a serem analisados devem, necessariamente, ser solúveis na fase móvel escolhida. A cromatografia em fase normal é ideal para análise de compostos apolares insolúveis em água como, por exemplo, os compostos encontrados em amostras de petróleo. Devido a este critério de solubilidade, a cromatografia de fase normal foi escolhida para o desenvolvimento do método de separação SARA dos componentes do petróleo.

3.1.1 Sistemas de Detecção

O primeiro detector utilizado em cromatografia líquida foi o olho humano utilizado nos experimentos clássicos conduzidos por Tswett. Por muito tempo, utilizou-se o método de coleta das frações eluídas da coluna, seguido de outras análises “off-line”, utilizando-se química analítica clássica tal como, gravimetria, titrimetria dentre outras, para a análise das frações separadas. Hoje em dia, um detector é acoplado ao sistema cromatográfico, gerando desta forma uma resposta analítica em tempo real. O detector cromatográfico é um transdutor capaz de converter uma propriedade física ou química de um analito em um sinal elétrico que pode ser relacionado à concentração deste analito.

Os detectores em cromatografia para serem eficientes devem apresentar um volume morto pequeno de forma a minimizar o alargamento de banda extra da coluna. sendo que o volume morto é definido como o volume de tubulações e conexões do sistema onde pode ocorrer diluição da amostra com a fase móvel. O volume morto pode ocasionar problemas como alargamento de banda picos divididos dificultando a obtenção de dados reprodutíveis. O detector deve ser pequeno e compatível com a vazão de líquido. Infelizmente, não existe no mercado nenhum detector universal de alta sensibilidade, como os detectores encontrados para cromatografia gasosa. Assim, a escolha do detector a ser empregado depende da natureza da amostra. A **Tabela 1** lista alguns detectores e suas propriedades e desempenho. (Skoog, West e Holler, 1988)

Tabela 1: Desempenho dos detectores de cromatografia líquida de alta eficiência. (Skoog, West e Holler, 1988)

Detector	Disponibilidade Comercial	Limite de detecção em Massa	Faixa linear
Absorbância	Sim	10 pg	3-4
Fluorescência	Sim	10 fg	5
Eletroquímico	Sim	100 pg	4-5
Índice de Refração	Sim	1 ng	3
Condutividade	Sim	100pg – 1ng	5
Espectrometria de massas	Sim	< 1 pg	5
FTIR	Não	1 ug	3
Espalhamento de Luz	Sim	1 ug	5
Atividade Óptica	Não	1 ng	4
Seletivo a Elementos	Não	1 ng	4-5
Fotoionização	Não	< 1pg	4

O detector mais amplamente utilizado está baseado na absorção da radiação ultravioleta ou visível, e pode ser utilizado se a amostra possuir grupos cromóforos. Em amostras de petróleo este detector é indicado na detecção de compostos aromáticos, resinas e asfaltenos. Já os compostos saturados não podem ser detectados por este tipo de detector, o que leva a utilização de mais de um sistema para a visualização de todos os grupos de compostos. Neste trabalho foram utilizados dois sistemas de detecção ultravioleta- visível (UV-Vis) e índice de refração, os quais terão seus funcionamentos discutidos nos próximos itens.

3.1.1.1 Detector UV-VIS

O detector por absorbância no Uv-Vis representado na **Figura 4** tem seu funcionamento baseado na absorção da luz por parte da amostra, ao passar através desta radiação eletromagnética na faixa do Uv-Vis, a absorção de luz por moléculas orgânicas na região de comprimento de onda entre 180 e 780nm resulta das interações entre fótons e elétrons que estão participando diretamente da formação das ligações. O comprimento de onda em que uma molécula absorve o fóton depende do quão fortemente seus elétrons estão

ligados. Os elétrons compartilhados em ligações simples estão tão fortemente ligados que necessitam de energias correspondente a ultravioleta de vácuo, abaixo de 180nm. Em razão das dificuldades de se trabalhar abaixo de 180nm devido a absorção de substâncias presentes na atmosfera e dos materiais utilizados na construção dos espectrofotômetros (Skoog, West e Holler, 1988), os compostos que possuem somente ligações simples (Saturados) não são usualmente detectados por este tipo de detector, justificando o emprego de outro detector para classe dos compostos saturados .

Os elétrons envolvidos em ligações duplas ou triplas de moléculas orgânicas não estão tão fortemente ligados, sendo mais suscetíveis a serem excitados pela radiação em uma faixa de comprimentos útil. Assim, espécies insaturadas apresentam picos de absorção convenientes. Dá-se o nome de cromóforo aos grupamentos orgânicos presentes na molécula responsáveis pela absorção de luz. Na Tabela 2, estão listados os principais grupos cromóforos de compostos orgânicos e as transições apresentadas podem ser utilizadas como indicativo da presença de grupamentos orgânicos presentes nas moléculas (Skoog, West e Holler, 1988). Como os compostos aromáticos e as resinas possuem grupos cromóforos, o detector escolhido para detecção destes compostos foi o UV-Vis.

Figura 4: Diagrama esquemático de um detector UV-Vis.

Tabela 2: Comprimento de onda de absorção de cromóforos típicos de compostos orgânicos

Absorções Ultravioleta visível características de grupos funcionais			
Grupo funcional	Transição	Comprimento de onda máximo (nm)	Absorvidade molar (cm ⁻¹ mol ⁻¹ L)
C=C	$\pi \rightarrow \pi^*$	170–178	10.000–20.000
	$n \rightarrow \pi^*$	185–205	100–12.000
C≡C	$\pi \rightarrow \pi^*$	172–178	6.000–10.000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	185–195	2.100
	$\pi \rightarrow \pi^*$	223	150
$\pi \rightarrow \pi^*$	200–210	2.000–8.000
		250–265	150–250
R–OH	$n \rightarrow \sigma^*$	180–185	500
R–SH	$n \rightarrow \sigma^*$	190–200	1.500
	$n \rightarrow \sigma^*$	170–175	300
R ₁ O	$n \rightarrow \sigma^*$	180–185	3.000
R ₁ S	$n \rightarrow \sigma^*$	210–215	1.200
	$n \rightarrow \sigma^*$	235–240	100
RSSR	$n \rightarrow \sigma^*$	250	400
$n \rightarrow \sigma^*$	150–160	–
	$\pi \rightarrow \pi^*$	180–195	1.000–10.000
	$n \rightarrow \pi^*$	270–295	15
$n \rightarrow \pi^*$	195–210	20–100

3.1.1.2 Detector por Índice de Refração

A velocidade da luz depende do meio em que ela se propaga, ao mudar o meio de propagação como, por exemplo, luz se propagando no ar e mudando o meio para água, a velocidade da luz diminui e sua direção muda: Diz-se, então, que luz foi refratada. O índice de refração é uma propriedade

física útil na caracterização e identificação de substâncias e é definido pela **Equação 1**. (Lanças, 2009; Snyder *et al.*, 2010)

$$n = \frac{c}{v} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

- c: é a velocidade luz no vácuo
- v: a velocidade da luz no meio

O detector por índice de refração (**Figura 5**) compara o índice de refração de uma substância de referência, geralmente o eluente da coluna, com o eluato, ou seja o composto a ser analisado. À medida que a amostra é eluída da coluna, o ângulo de refração varia, movendo o feixe luminoso. Isto é, traduzido na forma de uma mudança no sinal que vai ao detector, e o desequilibra. O grau de desequilíbrio pode ser relacionado com a concentração da amostra, sendo registrado pelo sistema de aquisição de dados (Lanças, 2009).

Figura 5: Diagrama ilustrativo de um detector por índice de refração.

Este tipo de detector é conhecido como “universal” pois é possível ajustar um sistema de eluente/eluato com diferentes índices de refração.

3.1.2 Cromatografia Líquida na Análise de Produtos de Petróleo

A Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC), particularmente de fase normal, tem sido utilizada extensivamente na análise de produtos de

petróleo (Jewell *et al.*, 1972; Ali, 2003; Akmaz *et al.*, 2011; Rodgers e Mckenna, 2011). Este método é capaz, de separar e identificar hidrocarbonetos de acordo com os grupos/classes de compostos encontrados em amostras de petróleo (Rodgers e Mckenna, 2011). A **Figura 6** ilustra as principais classes de compostos em amostras de petróleo. Kaminski (Kaminski *et al.*, 2005a) em sua revisão analisou, criticamente, aproximadamente 64 metodologias de análise de petróleos/produtos de petróleo por cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal.

As maiores vantagens associadas à metodologias de HPLC são:

- amostras podem ser analisadas com baixo nível de manipulação de amostra;
- a faixa de ebulição é praticamente irrelevante;
- o tempo de análise por amostra é usualmente da ordem de minutos, e
- o método pode ser adaptado para análise em linha. (Vase, 2007).

Figura 6: Exemplos de possíveis grupos de compostos encontrados em produtos de petróleo (Kaminski *et al.*, 2005a).

3.2. Fracionamento SARA

O fracionamento SARA é um método de separação cromatográfico de compostos/produtos de petróleo em grupos/classes de compostos. Este fracionamento é responsável pela separação das frações em saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. O método SARA foi primeiramente descrito nos trabalhos de Jewell em 1972, nos quais foram utilizadas três técnicas cromatográficas, sendo elas: cromatografia de troca iônica, cromatografia de

coordenação e de adsorção, e foi empregada para realizar o fracionamento de resíduos pesados de destilação de petróleo (Jewell *et al.*, 1972).

Desde então as técnicas cromatográficas têm sido utilizadas extensivamente na determinação de grupos de compostos de petróleo, sendo que existem dois métodos padrão ASTM para separação SARA, são eles:

1- ASTM (D2007-11 Standard Test Method for Characteristic Groups in Rubber Extender and Processing Oils and Other Petroleum-Derived Oils by the Clay-Gel Absorption Chromatographic Method) .

2- ASTM (D4124-09 Standard Test Method for Separation of Asphalt into Four Fractions).

Estas técnicas são baseadas em procedimentos de cromatografia clássica, sendo, portanto, lentas, laboriosas e caras para serem utilizadas em rotina de laboratório. Neste sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência tem se mostrado uma alternativa eficiente aos métodos padrões ASTM.

Não existe uma metodologia HPLC que possa ser aplicada a todos os tipos de produtos de petróleo. No entanto, métodos específicos devem ser desenvolvidos e/ou empregados para diferentes tipos de amostra.

O funcionamento da metodologia de separação SARA está embasado na interação diferencial dos compostos presentes nas frações com uma coluna de fase normal. O esquema apresentado na **Figura 7** ilustra as etapas de um procedimento de separação SARA típico.

Figura 7: Esquema geral do fracionamento SARA.(Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001)

Usualmente, o primeiro passo da metodologia consiste na precipitação dos asfaltenos, geralmente realizada com adição de n-Heptano, e, em seguida são separados por filtração. À solução resultante dá-se o nome de maltenos ou petrolenos, que consiste na mistura de resinas e óleos solúveis obtidos de uma filtração de precipitados de asfaltenos (Andersen e Speight, 2001).

Os maltenos são separados através de cromatografia de fase normal, na qual os compostos saturados e aromáticos são eluídos primeiramente utilizando-se como solvente um alcano, em seguida, as resinas são eluídas através do aumento da força de eluição cromatográfica (aumento da polaridade da fase móvel). Devido a enorme complexidade de uma amostra de petróleo e a falta de uma coluna seletiva para compostos aromáticos/resinas, é praticamente impossível obter uma clara distinção entre aromáticos e resinas, portanto cada método SARA especifica uma definição de aromáticos/resinas (Andersen e Speight, 2001; Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001).

As propriedades físicas do petróleo, como: viscosidade, densidade, ponto de ebulição e cor, dentre outras, variam de acordo com a quantidade de componentes SARA. A **Tabela 3** ilustra a modificação das propriedades do petróleo de acordo com a composição SARA de cada amostra de petróleo.

Tabela 3: Análise SARA correlacionada à propriedades físicas do petróleo. (Ancheyta, 2011)

Portanto, os resultados obtidos no fracionamento SARA podem ser utilizados na predição de propriedades do petróleo através da elaboração de modelos matemáticos.

3.2.1 Saturados

Por definição, a fração dos saturados consiste em compostos parafínicos e cicloparafínicos, também chamados de naftênicos. Estes hidrocarbonetos são altamente apolares, e todos os átomos estão ligados através de ligações simples do tipo σ (Sigma), não possuindo ligações duplas entre os átomos de carbono.

As parafinas mais leves e de cadeia linear encontram-se em gases e ceras parafínicas. Os isômeros, de cadeias ramificadas, são encontrados mais comumente em frações mais pesadas retiradas dos óleos brutos. Em relação ao estado físico:

- são gases os compostos parafínicos que contêm entre 1 a 4 átomos de carbonos;
- líquidos quando possuem de 5 a 17 átomos de carbonos e
- sólidos os que possuem cadeias ainda maiores.

Os compostos parafínicos são pouco propensos a participar das principais reações químicas de interesse industrial, sendo aproveitados principalmente em reações de oxidação e isomerização ou sulfurização catalítica.

Os naftenos também são hidrocarbonetos saturados, muito abundantes nos óleos brutos (25 a 75%). Diferenciam-se das parafinas por serem compostos cíclicos. Os naftenos monocíclicos são os mais investigados, pois são os que estão em maior quantidade nas frações leves do petróleo. Na gasolina, por exemplo, estão presentes tanto ciclopentano quanto ciclohexano substituídos, geralmente, com grupos alquila de cadeia pequena como metila, etila e isopropila. O aumento do peso molecular dos naftênicos ocorre através

de um aumento no número de anéis condensados, com predomínio de seis anéis. A reatividade dessas substâncias é semelhante à das parafinas. Dessa forma, os naftenos sofrem reações de quebra da ligação C-C, desidrogenação ou aromatização.

Em metodologias de cromatografia líquida de fase normal estes compostos são eluidos empregando-se solventes parafínicos de cadeia pequena tais como o hexano.

3.2.2 Aromáticos

A fração aromática dos componentes do petróleo consiste em compostos que possuam ao menos um anel aromático, variando entre monoaromáticos (contendo um anel benzênico), diaromáticos (naftaleno substituído) e triaromáticos (fenantreno substituído). Compostos aromáticos com mais de quatro anéis são menos frequentes que os compostos aromáticos condensados com menos anéis.

Óleos crus contêm uma grande variedade de compostos aromáticos, partindo de benzeno, com apenas um anel, até hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) com vários anéis fundidos. Como exemplo, pode-se citar o naftaleno, que é uma substância formada por dois anéis de benzeno condensados. Já os compostos que possuem sua estrutura três ou mais anéis são encontrados principalmente nas frações mais pesadas do petróleo bruto. Mais de 85% dos compostos aromáticos encontrados no petróleo possuem um substituinte alquila em seus anéis aromáticos (Wang, Fingas e Li, 1994; Frysinger e Gaines, 1999). Por apresentarem ligações insaturadas entre carbonos, sua reatividade é maior que as das parafinas e naftenos. A quantidade de aromáticos nos óleos crus varia de 15% a 50%, de forma que se apresenta em maior quantidade nas frações do petróleo com altas temperaturas de ebulição.

3.2.3 Resinas

Resinas são componentes solúveis em solventes parafínicos. Estes compostos estão presentes no óleo desasfaltado, e são fortemente adsorvidas na superfície de materiais polares, tais como silicato de alumina, alumina, sílica

ou sílica modificada, sendo desorvidas com uso de piridina, clorofórmio ou tolueno e metanol (Bollet *et al.*, 1981; Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001; Goual e Firoozabadi, 2002). Estruturalmente, as resinas são componentes policíclicos aromáticos que possuem cadeias alifáticas grandes que são responsáveis pela sua solubilidade em solventes parafínicos (Speight, J.G., *The Chemistry and technology of Petroleum*, Marcel Dekker, New York(1999)). Contêm em sua composição carbono $85\pm 3\%$ wt, hidrogênio $10\pm 1\%$ wt, oxigênio $1\pm 0,2\%$ wt, nitrogênio $0,5\pm 0,15$ e enxofre em composição variável $0,4-5\%$ wt.(Speight, 1999)

A quantidade de resinas é extremamente importante para estabilidade do petróleo. Elas atuam como agentes estabilizantes que mantêm a dispersão coloidal dos asfaltenos presentes no petróleo. Geralmente, as micelas de asfaltenos (agregados de moléculas de asfaltenos) encontram-se rodeadas por resinas atuando como agente peptizante. Este modelo de dispersão está representado na **Figura 8**.

Figura 8: Modelo de dispersão de uma molécula de asfaleno rodeada por moléculas de resina. (Andersen e Speight, 2001)

3.2.4 Asfaltenos

Os compostos asfaltênicos, são classificados através de sua insolubilidade em excesso de solventes parafínicos de cadeia pequena tais

como pentano, hexano ou heptano. O precipitado asfáltico é gerado através da adição de um solvente parafínico à um óleo cru, e é solúvel em solventes aromáticos tais como benzeno e tolueno.(Smaniotto *et al.*, 2009) Os asfaltenos possuem estruturas semelhantes às resinas, com ramificações alifáticas menores, o que causa a sua precipitação em solventes parafínicos. A composição elemental de asfaltenos de diferentes origens varia em uma estreita faixa contendo aproximadamente 82 ± 3 %massa de carbono e $8,1\pm 0,7$ %massa de hidrogênio (Speight e Moschopedis, 1981). A **Figura 9** ilustra as estruturas mais prováveis para esta classe de compostos. As moléculas possuem massa média 750 Da, com um único sistema de anéis aromáticos fundidos por molécula.

O método mais empregado na precipitação dos asfaltenos é o que utiliza heptano como solvente, pois o emprego de alcanos de maior número de carbonos não altera significativamente a propriedade dos asfaltenos precipitados. (Andersen,1994) A proporção de solvente óleo cru utilizada é de 1:40 (v/w) com tempo de precipitação variando entre 16 à 24h. A qualidade da composição asfáltica varia com o solvente utilizado em sua precipitação. Através dos trabalhos de (Hu e Guo, 2001) e (Pillon, 2001), foi possível concluir que a quantidade de asfaltenos precipitada aumenta com a diminuição do número de átomos do solvente precipitante, e a modificação também pode provocar precipitação de espécies com morfologia e cor diferentes.

Figura 9: Estrutura molecular de compostos asfálticos. As moléculas possuem massa em média, de 750 Da, e com um único sistema de anéis aromáticos fundidos por molécula (Mullins, 2011)

3.3 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas nas últimas décadas tem se tornado uma das técnicas de análise molecular mais importantes devido ao seu grande potencial em fornecer informações exatas sobre a massa molecular, bem como informações estruturais a respeito de um composto desconhecido.

Um espectrômetro de massas é um equipamento sofisticado constituído basicamente de três partes: a fonte de ionização onde os íons são formados podem ser do tipo: impacto de elétrons, ionização química, electrospray, MALDI dentre outras. O analisador massas, onde os íons formados na fonte de ionização são separados de acordo com sua razão massa/carga podem ser do tipo quadrupolo, iontrap, tempo de voo, ressonância ciclotronica de íons dentre outros. E detector/sistema de aquisição de dados. Um modelo esquemático de um espectrômetro de massas pode ser visualizado na **Figura 10**.

Figura 10: Representação das principais partes que compõe um espectrômetro de massas (Watson, Sparkman e Editors, 2007)

A fonte de ionização é responsável por ionizar e transferir para fase gasosa os compostos de interesse. O analisador de massa/carga faz a separação dos íons de acordo com sua razão massa/carga. O sistema de detecção identifica os íons de acordo com sua razão massa/carga e abundância. As análises são realizadas em alto vácuo que, garante o livre caminho médio para que os íons em análise não colidam até a chegada ao sistema de detecção. Uma colisão pode fragmentar ou impedir que o íon ao chegue ao sistema de detecção.

Toda espectrometria de massas está baseada no seguinte conceito: íons são partículas carregadas, portanto, são suscetíveis a ter suas posições no espaço controladas e ou manipuladas, através do uso de campos elétricos ou magnéticos. Quando somente íons individuais estão presentes, estes podem ser agrupados de acordo com sua única propriedade (massa e número de cargas) e movimentados para um detector. Para análise de íons individuais livres de matéria interferente, é necessário que a análise seja efetuada sob vácuo. Isto significa que os íons devem estar em fase gasosa. A espectrometria de massas é capaz de separar os íons em fase gasosa e detectá-los com base em sua razão massa/carga (m/z). Um gráfico da razão m/z em função da

abundância relativa ou absoluta de íons é chamado de espectro de massas. Todas as partículas que não estão na forma iônica devem ser removidas do espectrômetro de massas pelo sistema de vácuo com intuito de diminuição do ruído. (Watson, Sparkman e Editors, 2007)

3.3.1 Espectrometria de Massas por Tempo de voo

O princípio do analisador de massa por tempo de voo (TOF-Time of Flight) representado na **Figura 11**, envolve a medição do tempo necessário para um íon viajar da fonte de íons até o detector localizado, usualmente, entre 1 a 2 metros da fonte. Todos os íons recebem a mesma energia cinética durante um curto período inicial de aceleração. Como os íons possuem diferentes valores de m/z , eles adquirem diferentes velocidades. Íons maiores possuem velocidades menores, enquanto íons menores viajam a uma velocidade maior. A velocidade adquirida pelos íons é função da razão m/z . Devido a diferentes velocidades adquiridas os íons se separam em pacotes de acordo com sua razão m/z e atingem o detector em tempos diferentes, gerando assim o espectro de massas. (Mamyryn, 2001)

Figura 11: Analisador de massa TOF linear: 1- Fonte de íons pulsada; 2- Pacote de íons próximos a fonte; 3 – Detector; 4-Amplificador de sinais; 5- Computador; e 6-Espectro de massas (Mamyryn, 2001)

3.4. Espectroscopia de Fluorescência Molecular

A fluorescência é um processo de emissão de luz de qualquer substância, que ocorre de um estado eletrônico excitado. O processo ocorre através da absorção da radiação eletromagnética por átomos ou moléculas, gerando espécies eletronicamente excitadas. As espécies excitadas então relaxam ao estado fundamental, liberando seu excesso de energia como fótons. O diagrama representado na **Figura 12** é conhecido como diagrama de Jablonski e ilustra um processo de emissão de fluorescência típico.

Figura 12: Diagrama de Jablonski ilustrando processo de emissão por fluorescência (Albrecht, 2008)

A emissão por fluorescência de amostras de petróleo é produzida principalmente pelo sistema aromáticos dos compostos insaturados. A excitação destas moléculas por radiação eletromagnética causa uma transição $\pi-\pi^*$, e emissão devido à rigidez estrutural do anel aromático. A energia desta transição está relacionada com o tamanho do sistema aromático, e quão maior o sistema, menor a energia da transição. Este fato pode ser utilizado para caracterização de petróleos e suas frações (Groenzin *et al.*, 2003). Os principais responsáveis pela fluorescência da amostra de petróleo são os compostos aromáticos, resinas e asfaltenos. (Riveros *et al.*, 2006)

4. METODOLOGIA

4.1. Origem das Amostras

Um total de 21 amostras de petróleo com API variando entre 23 a 35, provenientes da Refinaria Presidente Bernardes (RPBC-Petrobrás) Cubatão-SP, foram coletadas após o processo de desalgação, armazenadas em garrafas de vidro âmbar de 1L, seladas, identificadas e transportadas para Laboratório de Simulação e Controle de Processos (LSCP), do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-POLI- USP, onde permaneceram sob refrigeração à 5°C para minimizar a perda de componentes leves e a degradação natural.

4.2. Instrumentação e Procedimento Experimental

Instrumentação utilizada:

- MALDI-TOF Shimadzu Axima Confidende™ com Laser de N₂ de 50Hz e software Lauchpad™;
- HPLC Shimadzu Prominence UFPLC modular com software Lab Solutions;
- HPLC preparativo Shimadzu Prominence Preparative modular com software Lab Solutions;
- Infravermelho Shimadzu IR Prestigie 21;
- Sonda de ATR PIKE MIRacle™;
- Espectrofotômetro de Fluorescência Edinburgh Instruments FLS 920;

Reagentes utilizados:

- n-Hexano 95% Lichrosolv para HPLC MERCK, clorofórmio 99,8% Lichrosolv para HPLC MERCK, 2-Propanol 99,8% HPLC JT Baker, tolueno 99,8% para HPLC Chromasolv Sigma-Aldrich, ácido alfa ciano 4hidroxinaminico 98% Sigma-Aldrich, acetonitrila 99,8% Sigma-Aldrich, ácido trifluoracético 0,1% Sigma-Aldrich e padrões para calibração P14R, bradiginina 1-7, ACTH 18-39 ProteoMass™ Sigma-Aldrich.

4.2.1 Precipitação dos Asfaltenos e Preparo da Solução Maltênica

A metodologia de precipitação dos asfaltenos pode ser esquematizada de acordo com apresentado na Figura 13.

Figura 13: Esquema ilustrando o procedimento de precipitação dos asfaltenos e preparo da solução maltenica.

Este procedimento consistiu na adição de n-heptano à uma amostra de petróleo, na razão de 1:40 m/v óleo cru/heptano, sob agitação. Posteriormente, a amostra permaneceu em repouso por 12 horas em um ambiente escuro. O precipitado asfáltico resultante foi removido por filtração a vácuo, através de uma membrana de celulose de 0,45µm, sendo então lavado até não observância de coloração escura no solvente de lavagem. O precipitado foi seco em um dessecador sob vácuo, e pesado até obtenção de massa constante.

Os compostos maltênicos foram obtidos através da evaporação do solvente proveniente da filtração e lavagem dos asfaltenos. A evaporação foi realizada com auxílio de um evaporador rotativo à temperatura e pressão de 40°C e 50mmHg respectivamente. O óleo resultante foi então pesado e dissolvido em hexano para obtenção de uma solução na concentração de 50mg/mL maltenos/hexano que foi utilizada para o desenvolvimento dos protocolos de separação SARA por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.2.2 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em Escala Analítica

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (**Figura 14**), modular, equipado com os seguintes módulos: duas bombas LC 20AD, forno de coluna CTO 20AC, auto injetor SIL, detector UV-vis SPD 20 A, detector por índice de refração RID 10 A, controladora CBM 20 A e software Lab-Solutions versão 3.60. O sistema analítico incluiu uma coluna μ Bondapak-NH₂ com tamanho de partícula de 10 μ m, tamanho de poros de 125 Å, comprimento 300mm e diâmetro interno 3,9mm. As separações foram realizadas a 30°C com fluxo de fase móvel de 1mL/min, as leituras realizadas em comprimento de onda de 254 nm. Foi injetado o volume de 20 μ L de uma solução 50mg/mL de maltenos em hexano. Antes do início das análises o detector por índice de refração foi balanceado com sua cela de referência preenchida com hexano. Para eluição dos maltenos, utilizou-se uma programação com seguintes solventes: hexano por 35 minutos. E ao término deste período o solvente foi alterado em um salto para clorofórmio permanecendo por mais 35 minutos. Após este tempo, alterou-se o solvente em um salto para hexano por 7 minutos com intuito de restabelecer as condições iniciais de injeção, gerando um tempo total de análise de 77 minutos.

Figura 14: Cromatógrafo utilizado para separação dos componentes SARA em escala Analítica: 1- Reservatório de solvente; 2- Unidade degaseficadora; 3- Bomba de alta pressão; 4 Bomba de alta pressão; 5- Injetor automático; 6- Forno de coluna; 7- Detector por ultravioleta-visível; 8- Detector por índice de refração; e 9- Controladora.

4.2.2 Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Em Escala Preparativa

As análises cromatográficas em escala preparativa foram realizadas em um cromatografo Shimadzu modular representado na **Figura 15**, equipado com os seguintes módulos: Duas bombas preparativas LC 20AT, auto injetor SIL 10 AF, coletor de fração FRC 10 A, detector por índice de refração RID 10A, detector Uv-vis SPDM 20A por arranjo de diodos, controladora CBM 20 A e software Lab Solutions versão 3.60. O sistema analítico incluiu uma coluna

μ Bondapak NH2 com tamanho de partícula de 10 μ m, tamanho de poros de 125 Å, comprimento 250mm e diâmetro interno 10mm. As separações foram realizadas a temperatura ambiente com fluxo de fase móvel 5mL/min, comprimento de onda de leitura de 254 à 800nm, volume de injeção de 1mL de uma solução 50mg/mL de maltenos em hexano. Para eluição dos maltenos, utilizou-se uma programação com seguintes solventes: hexano por 35 minutos, ao término deste período o solvente foi mudado em um salto para clorofórmio permanecendo por mais 35 minutos, após este tempo alterou-se o solvente em um salto novamente para hexano por 7 minutos, com intuito de restabelecer as condições iniciais de injeção, gerando assim um tempo total de análise de 77 minutos. As frações foram coletadas através do coletor de frações em frascos de 50mL.

O solvente das frações foi evaporado em um evaporador rotativo Buchi R-215, a 40°C sob pressão de 246mmHg. Após evaporação do solvente as amostras foram pesadas até peso constante.

Figura 15: Cromatografo Shimadzu escala Preparativa, 1- Reservatório de solventes; 2- Unidade degaseificadora; 3- Controladora; 4- Bombas; 5- Injetor

automático; 6- Coletor de frações; 7- Forno de coluna; 8- Detector por ultravioleta-visível; e 9- Detector por índice de refração.

4.2.3 Cromatografia Clássica de Coluna Aberta

Para análise de cromatografia clássica de coluna aberta (**Figura 16**), utilizou-se como coluna uma bureta de 100mL. Esta coluna foi empacotada através da adição de uma suspensão de 30g de sílica gel 80 mesh em hexano. Após empacotamento aplicou-se 250mg de maltenos ao topo da coluna. A eluição dos saturados se deu com a adição de 100mL de hexano no topo da coluna. Com o término da eluição dos saturados, procedeu-se a adição de 100mL de tolueno para eluição dos compostos aromáticos. A classe de compostos restante, as resinas, foram eluídas com 200mL de uma mistura clorofórmio etanol 1:1.

Os compostos eluídos foram coletados em balões previamente pesados. E o solvente foi removido até peso constante por evaporação em um evaporador rotativo a 40°C e pressão de 246mmHg.

Figura 16: Aparato utilizado para realização de cromatografia clássica de coluna aberta.

4.2.3 Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em um espectrômetro Edinburgh Instruments FLS 920 equipado com software F900 versão 7.0.4, com comprimento de onda de excitação de 335nm, fenda de excitação e emissão de 1nm. Os espectros foram adquiridos na faixa de comprimentos de onda entre 350 e 650 nm. Utilizando-se geometria front face (**Figura 17**), com uma cuveta triangular de quartzo preenchida com amostra de petróleo puro.

Figura 17: Esquema da geometria front face. (Albrecht, 2008)

4.2.4 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro de massas, Shimadzu: MALDI-TOF-MS Axima Confidence equipado com um laser pulsado de N_2 com comprimento de onda 337,1nm e calibrado na faixa de operação. Operando no modo linear e refletron positivos entre 100-3000 Da, e seguintes parâmetros:

Modo de operação linear:

- Potência do laser 72% da potência máxima 120 μJ ;
- Taxa de repetição de 20Hz;
- Voltagem de aceleração 19,9944 kV;
- Voltagem das lentes 6,035kV e
- Extração pulsada otimizada para 500 Da.

Modo de operação Reflectron:

- Potência do laser 72% da potência máxima 120μJ;
- Taxa de repetição de 20Hz;
- Voltagem de aceleração 19,9944 Kv;
- Voltagem das lentes 6,035kV;
- Voltagem do Reflectron 24,374kV e
- Extração pulsada otimizada para 500 Da.

Para cada modo foram adquiridos 400 perfis de espectro em quadruplicata.

4.2.5 Preparo de Amostra Para MALDI/LDI TOF

Para calibração do instrumento na faixa de massa utilizada, preparou-se uma mistura de concentração 10pmol/μL em solução 50% v/v acetonitrila/0,1% ácido trifluoroacético em H₂O, dos seguintes peptídeos: Bradicinina fragmento 1-7 massa molecular (756,3997 Da), P14R massa molecular (1532,8582 Da) e ACTH fragmento 18-39 massa molecular (2465,1989 Da) gerando uma mistura de peptídeos de calibração. Em seguida adicionou-se 0,5μL da mistura de peptídeos calibrantes em uma placa de MALDI (**Figura 18**), após secagem em temperatura ambiente, adicionou-se 0,5μL de matriz ácido α-cyano-4-hidroxycinâmico 10mg/mL em solução 50% v/v acetonitrila/0,1% ácido trifluoroacético em H₂O. A placa foi deixada em repouso à temperatura ambiente para secagem da amostra e posterior análise por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Figura 18: Procedimento de montagem de uma placa de MALDI.

As amostras de asfalto foram preparadas através da adição de 0,5 μ L de uma solução 1mg/mL de asfalto em tolueno nos “spot” de uma placa de MALDI. A placa foi deixada em repouso à temperatura ambiente até completa secagem da amostras. Após a secagem as amostras foram analisadas por espectrometria de massas LDI-TOF.

4.2.6 Análise Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram adquiridos em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, Shimadzu IR Prestige 21, utilizando-se sonda de reflectância total atenuada (ATR) Miracle Pike®. Foram adquiridos 32 espectros entre 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

4.2.8 Identificação de Componentes de Frações do Petróleo Através de suas Massas Moleculares

Para determinação das fórmulas moleculares dos compostos presentes nas frações de petróleo foi utilizado um programa desenvolvido pelo Laboratório de Simulação e Controle de Processos (LSCP), utilizando o Microsoft Excel em uma rotina computacional desenvolvida em VBA (Visual Basic for Applications), gerando macros que foram utilizadas para processar os dados dos espectros de massas.

5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

5.1 Precipitação e Caracterização dos Compostos Asfáltênicos

A primeira etapa do fracionamento SARA das amostras de petróleo consistiu na precipitação dos asfaltenos. A definição mais aceita para esta classe de composto está baseada em parâmetros de solubilidade (Pillon, 2001; Ancheyta *et al.*, 2009; Mullins, 2011). Asfaltenos são insolúveis em solventes parafínicos tais como n-pentano, n-hexano, n-heptano e solúveis em solventes aromáticos tais como o benzeno. Para realização da precipitação dos asfaltenos o solvente escolhido foi n-heptano, pois dados da literatura mostram que a partir de nC7 não ocorre variação significativa no rendimento de precipitação como pode ser observado na **Figura 19** (Andersen e Speight, 2001; Ancheyta *et al.*, 2009). Já a precipitação de asfaltenos com solventes menores que nC7 causa precipitação de resinas. Pillon (2001) obteve mais de 30% (m/m) de material adsorvido sobre asfaltenos ao efetuar a precipitação utilizando n-pentano(Pillon, 2001).

Figura 19: Processo de precipitação mostrando o rendimento de asfalteno em função no número de carbonos do solvente precipitante. (Andersen e Speight, 2001)

A razão óleo cru-solvente utilizada para a precipitação dos asfaltenos foi de 1:40 (w/v). De acordo com a **Figura 20**, é necessária a utilização de uma quantidade maior que 30 mL/mg para precipitação efetiva total desta classe de compostos (Speight, Long e Trowbridge, 1982; 1984; Hu e Guo, 2001).

Figura 20: Efeito taxa de solvente no rendimento de asfalto precipitado. (Andersen, 1994; Andersen e Speight, 2001)

O tempo de contato entre solvente e amostra escolhido foi um intervalo entre 10 e 12 horas, pois este é o tempo necessário para que a cinética de precipitação total ocorra de forma completa como mostrado na **Figura 21**. (Andersen, 1994; Andersen e Stenby, 1996)

Figura 21: Influência do tempo de contato entre solvente e amostra no rendimento de precipitação dos asfaltenos. (Ancheyta *et al.*, 2009)

Os asfaltenos foram precipitados de acordo com os procedimentos descritos. Com intuito de verificar a reprodutibilidade e robustez do método de precipitação, realizou-se a precipitação da amostra 1 por sete vezes. Os resultados em % mássica de asfaltenos, média e desvio padrão estão mostrados na **Tabela 4**.

Para o cálculo do resultado final com intervalo de confiança de 95% as seguintes equações foram utilizadas:

Média dos valores medidos

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad \text{(Equação 2)}$$

Desvio padrão dos dados medidos

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \text{(Equação 3)}$$

Resposta calculada com intervalo de confiança estipulado.

$$Resposta = \bar{x} \pm t \frac{S}{\sqrt{N}} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde:

N: número de medidas;

x_i : i medida;

$\bar{x}$: média;

t: Valor da distribuição t Student bicaudal com intervalo de confiança de 95%

Os cálculos foram efetuados para a amostra 1, e o resultado obtido foi 3,46±0,34% m/m com 95% de intervalo de confiança.

Tabela 4: Quantidade de asfaltenos precipitada em fração mássica m/m média e desvio padrão para amostra 1.

Replicata	% asfaleno
1	3,44
2	3,26
3	2,95
4	4,07
5	3,40

6	3,43
7	3,60
Média	3,45
Desvio Padrão	0,341
Resultado IC 95%	3,46±0,34

*resultado expresso como $Resposta = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$

Um dado analítico só deve ser rejeitado quando o analista identifica um erro evidente durante a realização da análise, como, por exemplo, a perda de um precipitado derramado durante o procedimento. Em qualquer outra situação deve-se efetuar testes estatísticos para verificar se algum dado deve ser rejeitado. O Teste Q é uma ferramenta estatística que pode ser utilizada para o propósito, de remoção estatística de dados extremos, comumente denominados “outliers”. A verificação de outliers foi, então realizada com, base no Teste Q, para rejeição de dados **Equação 5**, e intervalo de confiança de 95%.

$$Q_{exp} = \frac{X_N - X_{N-1}}{X_N - X_1} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

Q_{exp} : Valor do teste Q calculado para os dados experimentais

X_N : valor suspeito

X_{N-1} : valor mais próximo “vizinho” ao valor suspeito

X_1 : maior ou menor valor

Para aplicação do teste, os dados são ordenados de forma crescente $X_1 < X_2 < \dots < X_N$, e o valor Q_{exp} é calculado como apresentado pela **Equação 4**. O dado obtido neste cálculo é comparado com o valor de Q tabelado e se o valor de Q_{exp} for maior que o valor de Q tabelado, o dado pode ser rejeitado. Caso contrário o dado é considerado como sendo estatisticamente válido.

Os dados suspeitos de serem outliers são dados extremos. Às replicatas 3 e 4. O teste Q, foi aplicado para ambas as medidas, resultando em valor, de Q_{exp} igual a 0,2838 e 0,5625. O valor de Q tabelado com intervalo de confiança de 95% é de 0,625. Portanto é possível afirmar, com 95% de confiança, que não existem outliers no conjunto de dados, o que indica precisão e robustez no processo de precipitação, já que não há dados extremos.

O procedimento desenvolvido foi, então, utilizado para precipitação dos asfaltenos das amostras de petróleo.

A determinação foi realizada em triplicata e utilizou-se o teste Q para detecção de outliers. Em caso de detecção de outlier, o dado foi descartado e a precipitação repetida. A **Tabela 5** apresenta os dados obtidos para precipitação dos asfaltenos com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5: Resultado obtidos na precipitação dos asfaltenos em fração mássica m/m com intervalo de confiança de 95%.

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A		4,53	3,60	1,60	4,19	3,38	3,99	1,06	1,13	4,51	3,30
B		4,26	3,51	1,40	3,81	3,19	4,04	0,98	1,43	4,38	3,31
C		4,58	3,56	1,28	3,85	3,47	4,06	0,99	1,35	4,15	3,13
Média	3,46	4,46	3,55	1,43	3,95	3,35	4,03	1,01	1,30	4,35	3,25
Desvio	0,34	0,17	0,05	0,16	0,21	0,14	0,04	0,04	0,16	0,19	0,10
Resultado	3,46±0,3	4,46±0,17	3,55±0,14	1,43±0,49	3,95±0,63	3,35±0,43	4,03±0,11	1,01±0,13	1,30±0,47	4,35±0,57	3,25±0,32
Amostra	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
A	3,61	4,48	5,50	2,77	3,02	3,86	3,41	1,07	3,85	5,28	3,21
B	3,69	3,95	5,61	3,03	3,06	3,87	3,44	1,10	3,80	5,47	3,20
C	3,69	4,00	5,42	3,14	3,20	3,76	3,36	1,11	4,01	5,52	3,37
Média	3,66	4,14	5,51	2,98	3,09	3,83	3,40	1,09	3,89	5,42	3,26
Desvio	0,05	0,29	0,09	0,19	0,09	0,06	0,04	0,02	0,11	0,13	0,10
Resultado	3,66±0,15	4,14±0,89	5,51±0,26	2,98±0,58	3,09±0,29	3,83±0,18	3,40±0,13	1,09±0,07	3,89±0,34	5,42±0,39	3,26±0,30

*resultado expresso como $Resposta = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$

A porcentagem dos asfaltenos nas amostras variou de 1,01±0,13 à 5,51±0,26% (m/m), e os asfaltenos resultantes foram analisados por espectroscopia de infravermelho para verificação dos grupos funcionais presentes nesta classe de composto. A **Figura 22** mostra o espectro de infravermelho da amostra 3.

Figura 22: Espectro infravermelho da amostra de asfalto

Através da comparação das bandas de infravermelho das amostras, com a as bandas contidas na **Tabela 6**, é possível observar que no espectro de infravermelho das amostras estão presentes os estiramentos ν -OH e ν -NH banda larga centrada em 3445 cm^{-1} , ν -H aromático 3000 cm^{-1} , estiramento ν -CH e ν -CH₃ 2956 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , estiramento ν -CH₂ 2920 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} (Ancheyta *et al.*, 2009). Não foi possível observar variação significativa nos espectros de infravermelho das amostras de asfalto, o que indica que os asfaltos precipitados de diferentes amostras de petróleo são semelhantes estruturalmente entre si.

Tabela 6: Grupos funcionais presentes em amostras de asfaltos analisados por espectroscopia de infravermelho. (Ancheyta *et al.*, 2009)

Grupo Funcional	Banda de Absorção (cm^{-1})
-OH, -NH estiramento	3600-3300

OH contribuição de diferentes ligações de hidrogênio ^a	3600-3300
OH- π ligação de hidrogênio	3530
OH- éter O ligação de hidrogênio	3280
OH ligado fortemente a tetrâmeros	3150
OH-N (estruturas ácido/base)	2940
COOH dímeros	2640
Hidrogênio aromático	3050
Hidrogênio alifático	2993,2920
-CH, CH ₂ , CH ₃ região de estiramento	3000-2800
-SH região de estiramento	~2500
C=O	1800-1600
Cetona (C=O estiramento)	1735-1705
Aldeído(C=O estiramento)	1740-1730
Conjugada C=C	1650,1600
Aromática C=C	1602
-CH, CH ₂ , CH ₃ região de deformação	1450-1375
Vibrações associadas a deformação da metila	1377
Grupamento Éter ou Ester	1306
Ligação ester	1032
Grupo sulfoxido	1030
C-S, C-O, C-N região de deformação	~1000
C-H deformação aromático	900-700
Dois H adjacentes	810
1 H adjacente	900-860
2 H adjacentes	860-800
3 H adjacentes	810-750
4 H adjacentes	770-735
5 H adjacentes	710-690 (ou 770-730)
Cadeia alquílica maior que 4 grupos metilênicos	725-720
^a Obtido por refletância difusa	
Fonte: Dados obtidos de múltiplas referências	

Os asfaltenos foram analisados por espectrometria de massas por desorção a laser LDI-TOF-MS. O modo por desorção a laser foi escolhido ao invés de MALDI desorção a laser assistida por matriz, pois os asfaltenos possuem em sua estrutura características que permitem a absorção da energia do laser e ionização sem a utilização de matriz. Verificou-se que o uso de matriz para análise dos asfaltenos gera uma interferência no espectro de massas, pois a matriz possui sinal na região de massa/carga que corresponde a dos asfaltenos analisados. Foi verificado que a ausência de matriz não afeta a forma da distribuição apresentada no espectro. A **Figura 23** mostra os espectros de massas dos asfaltenos resultantes da precipitação com nC7.

Nesta figura é possível observar uma distribuição de massas entre os intervalo de massa que vai do íon de m/z 100 Da até o íon de m/z 800 Da, com esta distribuição centrada em 350 Da (**Figura 23**).

Figura 23: Espectros LDI-TOF-MS amostra de asfalto. 1- modo linear, 2- modo reflectron e 3- comparação resolução obtida em modo Linear (vermelho) e Reflectron (Azul).

Os asfaltenos foram analisados em dois modos: Modo Linear (**Figura 23-1**) e Modo Reflectron (**Figura 23-2**). A mudança entre os dois modos não altera significativamente o perfil dos espectros. A única mudança significativa que pode ser observada, e que já era esperada, foi uma melhora acentuada na resolução dos espectros, quando os mesmos foram adquiridos no modo reflectron. O modo Reflectron foi, então, escolhido por apresentar maior resolução (**Figura 23-3**). Na comparação entre dois espectros da mesma amostra, foi possível observar que no modo Reflectron os picos são mais resolvidos, com resolução de aproximadamente 5000. Trabalhando neste modo, os picos são mais estreitos o que leva maior precisão na massa observada, enquanto no modo linear a resolução é de aproximadamente 1000, o que ocasiona alargamento nos picos. O modo Reflectron possui maior resolução, pois possui um espelho de potencial com a capacidade de corrigir dispersões na velocidade inicial dos íons, gerados (Albaiges, 2008). Isso ocorre através da desaceleração dos íons, seguida de uma re-aceleração no sentido contrário, fazendo com que os íons com velocidade maior voem à uma distância maior dentro do tubo de voo, permitindo assim que todos os íons de mesma massa, mas com alguma dispersão de velocidade, cheguem ao mesmo tempo ao detector. Uma expansão na região entre 170 à 230 Da representado na **2**, mostra as séries homólogas (espécies diferindo pela unidade de massa molecular de um grupo como $-\text{CH}_2$). A série inicia no íon de m/z 179 e tem além disto, os íons de m/z 193, 207, 221 que diferem entre si por 14 unidades de massa representando ao grupamento CH_2 .

Figura 24: Espectro de massas LDI-TOF-MS mostrando a série homologa encontrada para uma amostra de asfalto analisada.

A **Figura 25** ilustra as estruturas hipotéticas para a série homóloga apresentada no espectro de massas que inicia com o íon de m/z 179 e contém os íons m/z 193, 207 e 221.

Figura 25: Estruturas hipotéticas de moléculas presentes nas amostras de asfaltos.

5.2 Identificações de Componentes de Frações do Petróleo Através de suas Massas Moleculares

Para determinação das fórmulas moleculares dos componentes das frações de petróleo, foi utilizado um programa desenvolvido pelo LSCP, para análise dos espectros de massas dos asfaltos. Este programa está baseado no conceito de séries homólogas, para os quais foi gerado um banco de dados,

contendo aproximadamente 20 mil compostos de fórmula molecular $C_cH_hN_nO_oS_s$. Neste programa; a massa de um íon presente no espectro de massas de um determinado composto é comparada com a massa dos compostos presentes no banco de dados, se a diferença entre os resultados estiver dentro de uma faixa adequada, que é uma diferença menor que o erro instrumental, determinado pela resolução dos instrumento, o programa gera uma possível fórmula molecular.

A análise realizada pelo programa gerou os seguintes resultados: o programa encontrou estrutura molecular para aproximadamente 60% dos picos contidos no espectro de massas, destes, 6,05% dos compostos encontrados possuíam enxofre, 45,2% dos compostos possuem N e 32,1% possuem oxigênio em sua composição.

5.3. Desenvolvimento da Metodologia Analítica para Separação dos Maltenos

Para o desenvolvimento de uma metodologia analítica adequada os seguintes parâmetros foram avaliados para realizar a separação dos compostos do petróleo através da técnica de cromatografia líquida de alta resolução.

5.3.1. Coluna

Para o desenvolvimento da metodologia de separação dos maltenos em saturados, aromáticos e resinas optou-se por uma coluna de fase normal do tipo amina NH_2 , devido ao fato do petróleo ser uma amostra de grande complexidade. A interação seletiva com grupos de compostos presentes no petróleo por esta coluna pode gerar uma separação por grupos. Existem diversas metodologias descritas na literatura (Radke, Willsch e Welte, 1980; Islas-Flores, Buenrostro-Gonzalez e Lira-Galeana, 2005b; Kaminski *et al.*, 2005b) que utilizam este tipo de coluna na separação de petróleos e produtos de petróleo em grupo ou classes de compostos. A vazão da fase móvel foi

ajustada de maneira a se obter a maior eficiência da coluna. Depois de vários testes a vazão mais adequada foi a de 1 mL/min. A escolha da vazão adequada é muito importante, pois vazões muito rápidas podem não separar os compostos, e ao contrário, vazões muito lentas, fazem com que os compostos se arrastem pela coluna.

5.3.2 Sistema de Detecção e Calibração

Um grande problema na aplicação da técnica de HPLC na separação de compostos de petróleo está na escolha do sistema de detecção adequado, pois existe uma grande dificuldade em se obter seletividade na separação. Este é o problema da detecção e calibração, obter uma resposta analítica do detector de todos os grupos que seja proporcional à quantidade de compostos presentes e um método de calibração que proporcione resultados exatos e precisos (Kaminski *et al.*, 2005b). Devido à ausência de um detector que se enquadre nestas condições, o método gravimétrico é comumente utilizado como método de determinação da quantidade de grupos de compostos não voláteis em amostras de petróleo/produtos de petróleo (Jewell *et al.*, 1972; Bollet *et al.*, 1981; Islas-Flores, Buenrostro-Gonzalez e Lira-Galeana, 2005b; a; Kaminski *et al.*, 2005a; Vase, 2007; Melendez *et al.*, 2012). O método gravimétrico consiste na pesagem da fração obtida em escala preparativa, após a evaporação do solvente. E tem entre suas limitações a de não poder ser aplicado a compostos voláteis, ser laborioso e caro, pois usa grandes quantidades de solventes (Kaminski *et al.*, 2005a).

No presente trabalho, devido a falta de um detector que respondesse de maneira satisfatória a todas as classes de compostos que seriam separadas, optamos pela escolha de dois detectores. Foram escolhidos os seguintes detectores: UV-VIS e índice de refração (RID). O detector por UV-VIS é o mais disponível comercialmente, barato, de fácil operação e sensível aos compostos aromáticos e resinas (Aske, Kallevik e Sjoblom, 2001; Fan e Buckley, 2002; Woods *et al.*, 2008; Lanças, 2009; Melendez *et al.*, 2012). Sua limitação é não ser sensível a compostos que não contenham grupos cromóforos, consequentemente não é capaz de detectar os compostos

saturados presentes na amostra, o que leva a necessidade da utilização de um segundo detector. O segundo detector escolhido foi o detector por índice de refração, por ser considerado universal com capacidade de detectar compostos saturados. Sua limitação está em não permitir alterações na fase móvel, requerendo eluição isocrática que é procedimento onde não ocorre a mudança da composição da fase móvel durante a eluição. Outro ponto negativo deste detector é que ele possui baixa sensibilidade. (Carol, 2006; Lanças, 2009).

O método de calibração escolhido foi o método da pesagem das frações. Em seguida as frações obtidas foram utilizadas para obtenção de um fator de resposta.

5.3.3 Solventes

O sucesso da técnica de HPLC também depende muito da escolha correta do sistema de solventes. Para escolha dos solventes, levou-se em consideração os seguintes fatores: a solubilidade dos compostos presentes na amostra; a força de eluição cromatográfica; a volatilidade da fase móvel. É muito importante o solvente apresentar baixo ponto de ebulição, para que seja evaporado facilmente, além de ser compatível com os detectores utilizados. As fases móveis que apresentaram as melhores características foram hexano e clorofórmio. (Carol, 2006; Lanças, 2009; Snyder *et al.*, 2010)

A força de eluição cromatográfica mede a capacidade da fase móvel de interagir com os componentes da amostra. Esta interação pode ser por meio de interações do tipo dispersivas ou de London (**Figura 26-1**), interações do tipo dipolo-dipolo de Keesom e Debye (**Figura 26-2**), além de ligações de hidrogênio ou forças dielétricas (**Figura 26-3**). (Carol, 2006; Vitha e Carr, 2006)

Figura 26: Representação ilustrativa das interações que ocorrem em cromatografia: 1- Interação dispersiva do tipo London; 2- Interação dipolo

dipolo de Kenesom e Debie e interações do tipo ligação de hidrogênio. (Vitha e Carr, 2006)

Todos os tipos de interação descritos acima podem ser agrupados em um parâmetro de polaridade dos solventes, o qual é denominado série eluotrópica. As séries eluotrópicas encontram-se tabeladas. A **Tabela 7** fornece os valores de força eluotrópica dos solventes utilizados em cromatografia de fase normal e fase reversa.

Tabela 7: Série eluotrópica de solventes utilizados em cromatografia líquida.

Solvente	Fator força-peso (S)	
	Fase reversa	Fase normal
Acetonitrila	3,2	5,8
Água	0	10,2
Metanol	2,6	5,1
Tetrahidrofurano	4,5	4,0
Clorofórmio		4,1
Diclorometano		3,1
Eter Etilico		2,8
Eter metil terc-butilico		2,5
Hexano		0

A retenção de um componente é determinada pela força do solvente (S). Solventes fortes possuem fator força-peso maiores, e diminuem a retenção enquanto solventes fracos aumentam a retenção. Para garantir a eluição dos compostos saturados que possuem interação desprezível com a coluna, escolheu-se o solvente de menor fator força-peso em cromatografia de fase reversa que é o hexano. Para eluição das resinas que possuem alta interação com a coluna o solvente de maior força peso foi escolhido Cloroformio, garantindo assim a eluição completa de todas as resinas.

5.3.4. Resultados Obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após a realização de vários experimentos, com diferentes condições de trabalho, como, por exemplo, variação de fluxo, variação de fase móvel, solventes, entre outros, chegou-se as condições ideais para a separação dos compostos de petróleo contidos na amostra.

A **Figura 27** apresenta o cromatograma obtido que apresentou as melhores condições de separação dos maltenos. Os compostos saturados possuem baixa interação com a coluna cromatográfica devido a sua baixa polaridade. A coluna possui em sua fase estacionária grupos $-NH_2$, que geram uma interação polar. Portanto os compostos saturados eluem primeiro como um pico estreito, com tempo de retenção de aproximadamente 2,6 minutos e são detectados pelo detector de índice de refração (cor azul no cromatograma), não gerando nenhum sinal no detector por UV-vis por não possuírem grupos cromóforos.

Após a eluição dos compostos saturados, tem início a eluição dos aromáticos inicia devido à polarizabilidade da nuvem eletrônica deslocalizada. As moléculas aromáticas são mais polares, gerando interações do tipo dispersivas mais fortes que os compostos saturados (Vitha e Carr, 2006), ocasionando uma maior interação com a coluna e consequente aumento na retenção destes compostos. A eluição dos aromáticos gera um sinal no detector de UV-VIS, tendo o início do tempo de retenção em aproximadamente 2,7 minutos sendo eluída por um tempo aproximado de 28 min. A **Figura 27-2** mostra uma expansão do cromatograma, onde é possível observar claramente a separação dos compostos saturados (detector IR representado pela cor azul) e aromáticos (detector Uv-VIS representado pela cor preta). Deste modo, é possível afirmar que a separação destes compostos foi efetuada com êxito. O perfil do cromatograma da fração aromática não está de forma muito definida, o que se deve ao fato da presença de um grande número de compostos. Como o objetivo do trabalho é a quantificação da fração total, a falta de definição não tem influência sobre o resultado final. Após a eluição das frações saturadas e aromáticos o solvente é alterado em um salto para clorofórmio, aumentando desta maneira, a força de eluição cromatográfica, permitindo, a eluição dos compostos que ainda se encontram mais retidos na coluna. A

elução destes compostos inicia-se no tempo de retenção em torno de 35 minutos terminando por volta de 60 minutos.

Figura 27: Perfil cromatográfico de amostras de maltenos: em azul, representa o cromatograma utilizando o detector por índice de refração e, em preto, o cromatograma utilizando detector por ultravioleta-visível com comprimento de onda de 254nm.

Após a obtenção das condições ideais para separação das frações de petróleo, foi realizado um estudo para que fosse possível verificar a ordem de eluição dos compostos aromáticos em relação ao número de anéis aromáticos apresentados por estes compostos. Para isso, foi injetando uma solução contendo os seguintes compostos: benzeno, naftaleno, antraceno e fenantreno. E o perfil cromatográfico está representado na **Figura 28**. A partir deste experimento, foi possível analisar o aumento do tempo de retenção em função do aumento do número de anéis aromáticos. Portanto, a coluna utilizada elui os compostos aromáticos de acordo com o número de anéis. Sharma (Sharma *et al.*, 2002; Sharma, Sarowha e Bhagat, 2003) observou que

o tempo de eluição dos compostos aromáticos aumenta de acordo com o tamanho da cadeia lateral alquílica, e que isoparafinas e cicloparafinas eluem antes dos compostos monoaromáticos.

Figura 28: Comparação dos perfis cromatográficos comparando o tempo de retenção dos compostos aromáticos benzeno, naftaleno, antraceno, fenantreno com a amostra de petróleo.

Com objetivo de verificar a reprodutibilidade do método cromatográfico, as amostras foram injetadas em triplicatas e os perfis cromatográficos comparados. A **Figura 29** mostra os três perfis sobrepostos e através da qual é possível observar que não ocorre variação significativa no cromatograma das triplicatas, indicando assim a reprodutibilidade do método.

Figura 29: Comparação dos perfis cromatográfico de injeções em triplicata de amostra de maltenos.

Os parâmetros otimizados para o fracionamento SARA foram adaptados para a escala preparativa, onde os compostos saturados, aromáticos e resinas foram coletados e usados como padrão em escala para construção de fatores de resposta cromatográfico. Os quais podem ser construídos dividindo a área dos picos dos compostos presentes nas frações SARA, pela concentração em mg/mL destes compostos. Os fatores cromatográficos podem ser utilizados na quantificação dos compostos, em escala analítica, que consiste em um método menos laborioso que a cromatografia preparativa, uma vez que esta envolve a evaporação de solvente (Kaminski *et al.*, 2005a).

5.4 Cromatografia em Escala Preparativa

O objetivo da cromatografia preparativa é a coleta de um ou mais compostos puros de uma mistura. A escala da cromatografia preparativa pode variar de miligramas (para identificação de compostos) ou toneladas (produção de fármacos). A Tabela 8 mostra a quantidade necessária de substância para diferentes fins.

Tabela 8: Quantidade de produto que devem ser purificado para diferentes objetivos em cromatografia líquida de escala preparativa. (Snyder *et al.*, 2010)

Objetivo	Massa requerida
Tentativa de identificação por métodos instrumentais	~1mg
Identificação positiva e confirmação da estrutura	1-100mg
Uso como padrão analítico	0,1-2g
Teste toxicológico	10-100g
Teste clínico-1 paciente	0,2-2kg

Com intuito de realizar a caracterização molecular e a calibração para cromatografia em escala analítica, os maltenos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa. A transferência da metodologia desenvolvida em escala analítica para a escala preparativa envolve apenas um simples cálculo. Se a fase estacionária e o comprimento da coluna forem idênticos, o aumento no fluxo deve ser efetuado proporcionalmente à área da secção transversal da coluna (Snyder *et al.*, 2010). O cálculo foi efetuado para a vazão, determinando uma vazão para escala preparativa de 5mL/min. O esquema de coleta das frações foi efetuado da seguinte maneira: entre 1-8 minutos, coletam-se compostos saturados, de 8 a 38 minutos coletam-se os compostos aromáticos e de 38 a 68 – coletam-se as resinas. O perfil cromatográfico é apresentado na **Figura 30**.

Figura 30: Perfil cromatográfico em escala preparativa da amostra de maltenos. As áreas hachuradas indicam as frações coletadas nos frascos de coleta de 50mL.

O volume de injeção foi de 1mL de uma solução 50mg/mL de maltenos em hexano. Ao final da evaporação do solvente esperava-se encontrar um valor próximo a 50mg de composto para fechamento do balanço de massa na cromatografia em escala preparativa.

A reprodutibilidade da metodologia SARA, em escala preparativa foi verificada através da análise de sete replicatas da amostra 1. Os resultados encontrados estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Resultados obtidos para as sete replicatas da análise SARA da amostra 1.

Replicata	Massa amostra Inicial maltenos (mg)	Saturados (mg)	Aromáticos (mg)	Resinas (mg)	Balanço mássico (%)
1	48,96	23,93	15,91	9,65	101,08
2	50,59	23,67	16,12	9,83	98,08

3	49,64	22,26	16,53	9,53	97,34
4	50,02	24,11	16,08	9,12	98,58
5	49,46	23,10	15,26	9,21	96,17
6	49,83	24,58	17,04	9,09	101,76
7	49,90	24,41	16,14	8,99	99,27
Média		23,72	16,15	9,34	98,90
Desvio Padrão		0,80	0,54	0,32	1,98
$ts/\sqrt{N}$		0,75	0,51	0,29	1,84
Resultado		23,72±0,75	16,15±0,51	9,34±0,29	98±2

*resultado expresso como $Resposta = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$

A análise dos dados contidos na **Tabela 9** mostram o fechamento do balanço mássico através da recuperação média de 98% da massa inicialmente injetada. Fator este de grande importância para a metodologia SARA, já que o fechamento do balanço é uma das dificuldades encontradas em análises cromatográficas de petróleo/produtos de petróleo (Kaminski *et al.*, 2005a). Os dados contidos na **Tabela 9** foram utilizados na construção de um gráfico do tipo caixa chamado usualmente como “box plot”, representado pela **Figura 31**. Este tipo de figura é utilizado principalmente para detecção de valores atípicos extremamente altos ou baixos, denominados “outliers”. A visualização da **Figura 30**, não mostra a presença de nenhum valor atípico que seria indicado através de um ponto fora do “box plot. O valor atípico é um valor X tal que:

$$X < Q1 - 1,5 \times AIQ$$

$$X > Q3 + 1,5 \times AIQ$$

Onde:

AIQ: intervalo interquartil/comprimento da caixa

Q1: Primeiro quartil (25%percentil)

Q3: Terceiro quartil (75% percentil)

Foi possível observar que os dados para maioria das frações se distribuem simetricamente em torno da mediana e que os dados possuem baixa dispersão por possuírem baixo intervalo interquartil.

A reprodutibilidade do método foi verificada também através dos baixos desvios encontrados e estimados com 95% de confiança, apresentando $\pm 0,75\text{mg}$, $\pm 0,51\text{mg}$ e $\pm 0,29\text{mg}$ para saturados, aromáticos e resinas respectivamente .

Figura 31: Diagrama tipo caixa “box plot” dos dados experimentais obtidos no fracionamento SARA.

5.4.1. Comparação Entre Metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Líquida Clássica de Coluna Aberta

A cromatografia clássica de coluna aberta é usada comumente para realização do procedimento de separação SARA. A **Figura 17**, ilustra um aparato típico para realização da cromatografia líquida clássica, no qual a amostra é adicionada no topo da coluna e eluída por gravidade através da adição gradativa de solvente ao topo da coluna.

O processo de eluição pode ser acompanhado de acordo com a **Figura 31**, na qual é possível observar (**Figura 32-1**) a amostra de maltenos adicionada inicialmente no topo da coluna. A **Figura 32-2** mostra a aparência da coluna após a eluição dos compostos saturados com 100mL de hexano. Na

qual é possível observar que a amostra inicial está um pouco mais dispersa. Os compostos saturados não são coloridos portanto não é possível observar seu deslocamento durante a eluição. A **Figura 32-3** mostra a eluição após a adição de tolueno, que é o solvente responsável pela eluição dos compostos aromáticos. Neste caso, é possível observar os compostos percolando através da coluna, indicado pela banda de cor castanha. Já as resinas permanecem no topo da coluna, pois este solvente possui baixa força de eluição, não sendo capaz, de eluir as resinas. A **Figura 32-4** mostra o fim da eluição dos aromáticos e início da adição da mistura diclorometano/etanol no topo da coluna, esta mistura é responsável pela eluição das resinas. As **Figuras 32-5 e 32-6** ilustram o processo de eluição das resinas onde é possível observar uma banda negra eluindo através da coluna. Já a **Figura 32-7** mostra a característica da coluna após o procedimento SARA, onde se observa que a coluna retorna a sua coloração inicial, indicando que os compostos foram eluídos com sucesso.

Figura 32: Eluição dos compostos SARA em cromatografia clássica de coluna aberta: 1- após adição de maltenos no topo da coluna; 2- após eluição dos compostos saturados com hexano; 3- eluição dos compostos aromáticos; 4- após eluição dos aromáticos e início de eluição das resinas; 5- eluição das resinas; 6- eluição das resinas e 7- aspecto da coluna após eluição dos compostos SAR.

Os resultados das metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia clássica foram comparados. O resultado obtido para cromatografia clássica está apresentado na **Tabela 10**. Analisando os resultados, é possível observar uma grande variação nas massas encontradas para mesma amostra, e um desvio de 14% no fechamento do balanço de massa, enquanto que o método de cromatografia líquida de alta eficiência este desvio é de apenas 2%. O grande desvio e a variação nas massas ocorrem devido ao baixo controle de parâmetros aplicados na cromatografia clássica tais como: fluxo, temperatura, empacotamento de coluna, dentre outros. Já nas análises através da cromatografia líquida de alta eficiência, estes parâmetros são devidamente controlados durante a análise, o que leva ao aumento da reprodutibilidade do método, fato que pode ser comprovado através da análise dos dados da **Tabela 9**.

Tabela 10: Resultados obtidos no fracionamento SARA em coluna aberta para a amostra 1.

Massa amostra inicial (mg)	Saturados (mg)	Aromáticos (mg)	Resinas (mg)	Balanço (%)
252,67	131,12	50,17	63,38	96,8
249,50	140,56	36,89	70,43	99,3
251,79	136,01	32,41	58,35	90,1
Média	135,90	39,82	64,05	95,4
Desvio	4,72	9,23	6,07	4,75
$\bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$	135±14	39±28	64±18	95±14

*resultado expresso como $Resposta = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$

Para verificar se as metodologias de cromatografia clássica e HPLC fornecem resultados estatisticamente semelhantes, aplicou-se um teste T pareado ao conjunto de amostras. Este teste compara as variâncias e médias de duas populações e gera um valor de “p”, que é a probabilidade de que a amostra seja de uma população diferente, um valor de $p < 0,05$ indica que as

diferenças entre os resultados medidos pelos diferentes métodos são estatisticamente diferentes, com uma confiança de 95%. O teste T apresentado na **Tabela 11**, mostrou que as metodologias são estatisticamente diferentes, o que pode ser explicado devido a diferença de interação gerada por colunas e solventes diferentes. É conhecido que cada metodologia SARA define frações SARA distintas. (Fan e Buckley, 2002)

Tabela 11: Teste T pareado entre as metodologias SARA clássica e HPLC

Fração	Valores p
Saturados	0,041
Aromáticos	0,022
Resinas	0,036

* valores de $p < 0,05$ indicam que existe diferença estatística entre os dois métodos com confiança de 95%

A **Tabela 12**, abaixo, sumariza as características entre as duas metodologias apresentando suas vantagens e desvantagens. As principais vantagens referentes ao método de HPLC, são grande reprodutibilidade já que os parâmetros de análise são altamente controlados o que não ocorre em cromatografia de coluna aberta, a metodologia de HPLC também apresenta como vantagem capacidade de automação e menor risco ocupacional. Suas principais desvantagens são elevado custo do equipamento e a necessidade de um operador altamente especializado.

Tabela 12: Comparação entre metodologias de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia clássica de coluna aberta

Característica	HPLC	Cromatografia Clássica
Reprodutibilidade	Alta reprodutibilidade	Baixa reprodutibilidade
Quantidade amostra	Baixa/são necessários (mg) de amostra	Alta, são necessários (g) de amostra
Tempo análise	Por volta de 1,5 horas	Por volta de 3 horas

Geração de Resíduos	Menor geração pois a coluna pode ser reutilizada e utiliza-se menor quantidade de amostra	A coluna não pode ser reutilizada, gerando maior quantidade de resíduos
Equipamento empregado	Complexo e caro	Comumente encontrado no laboratório
Custo Operacional	Alto custo de equipamento e coluna/ de consumíveis e manutenção são caros	Baixo custo/ utiliza equipamentos comumente encontrados em laboratório
Operador	Altamente especializado, devendo possuir grande conhecimento do equipamento da técnica e do procedimento analítico	Operador treinado para realizar o procedimento de análise
Risco ocupacional	Menor contato com solvente, devido à automação	Operador permanece em contato com solventes durante toda análise
Automatização	Possível equipamento pode ser automatizado	Necessita de operador durante todo tempo de análise

Após verificação da reprodutibilidade, 22 amostras foram analisadas através do método desenvolvido. Os resultados estão descritos na **Tabela 13**, ora qual é possível observar o fechamento do balanço mássico para todas as amostras.

Tabela 13: Resultados obtidos no fracionamento SARA.

Amostra	Massa inicial (mg)	Saturados (mg)	Aromáticos (mg)	Resinas (mg)	Balanço (%)
2	49,74	24,67	15,24	10,04	100,4
2	51,78	24,5	17,08	9,71	99,053689
2	52,46	25,1	16,12	9,92	97,483797
3	51,15	22,97	14,8	12,42	98,123167
3	50,77	23,02	15,91	11,14	98,621233
3	50,61	22,58	15,89	12,27	100,25687
4	50,92	22,37	13,89	12,5	95,758052
4	49,43	23,23	14,19	11,43	98,826624
4	51,46	23,95	13,79	12,33	97,298873
5	48,91	18,46	16,62	13,19	98,691474
5	50,22	19,98	16,02	13,14	97,849462
5	49,68	18,7	15,95	13,57	97,061192
6	49,63	22,09	16,04	10,53	98,045537
6	50,23	23,71	16,38	10,69	101,09496
6	50,23	23,05	16,42	11,84	102,15011
7	49,17	23,19	14,11	11,12	98,47468
7	48,97	22,25	14,98	10,32	97,100265
7	49,43	23,76	14,33	10,1	97,491402
8	52,02	30,82	13,99	6,52	98,673587
8	48,09	29,81	12,44	6,03	100,39509
8	50,2	30,12	13,56	6,02	99,003984
9	49,98	21,36	13,61	13,93	97,839136
9	51,36	20,81	14,68	15,04	98,383956
9	50,67	20,21	14,11	14,2	95,756858
10	51,28	22,47	12,27	14,56	96,138846
10	50,86	21,97	12,51	14,87	97,031066
10	50,2	21,27	12,88	14,05	96,015936
11	50,59	20,33	14,41	14,33	96,995454
11	49,95	20,02	13,74	14,02	95,655656
11	50,02	20,55	14,75	14,55	99,660136
12	49,75	20,94	13,17	14,57	97,849246
12	50,57	21,66	14,41	14,53	100,05932
12	49,26	21,8	13,25	13,69	98,944377
13	50,71	19,87	15,87	15,31	100,67048
13	51,16	19,15	17,15	15,78	101,79828
13	50,91	18,32	16,32	16,14	99,744647
14	49,07	14,97	12,29	20,74	97,819442
14	50,37	14,25	14,62	19,66	96,347032

14	50,56	14,61	13,84	20,25	96,321203
15	50,81	23,96	15,38	12,78	102,57823
15	49,13	23,64	14,52	11,92	101,93365
15	50,65	23,86	14,39	12,53	100,25666
16	52,66	23,16	15,55	12,84	97,892138
16	50,97	21,97	16,9	14,04	103,80616
16	51,45	22,85	16,49	13,97	103,61516
17	52,15	25,96	11,56	12,82	96,529243
17	51,99	24,64	13,26	13,66	99,172918
17	52,44	25,68	13,42	13,33	99,980931
18	49,82	21,73	16,13	11,22	98,514653
18	50,49	19,75	16,32	13,49	98,158051
18	49,82	20,53	17,96	11,64	100,62224
19	52,27	25,82	13,23	12,36	98,339646
19	50,29	23,69	14,06	11,79	98,496898
19	50,68	26,14	13,48	11,03	99,936861
20	50,15	25,59	10,22	14,75	100,81755
20	50,64	26,94	9,43	14,44	100,3357
20	51,15	25,26	11,19	14,13	98,88563
21	48,77	18,41	16,16	14,03	99,651425
21	50,12	18,27	15,91	14,21	96,548284
21	49,54	19,28	15,63	13,62	97,961243
22	50,4	20,18	14,52	14,34	97,301587
22	50,58	20,52	15,22	14,61	99,545275
22	51,35	20,43	14,31	15,2	97,254138

Os resultados obtidos foram utilizados no cálculo das porcentagens SARA de cada amostra, através das quais, com auxílio da **Equação 13**(Fan e Buckley, 2002), foi possível calcular °API conforme apresentado na **Tabela 14**. O °API (medido) aproxima-se do °API (calculado), a partir dos dados obtidos pelo fracionamento SARA, para a maioria das amostras analisadas, indicando que os resultados obtidos no fracionamento SARA por HPLC são confiáveis.

$^{\circ}\text{API}(\text{calculado}) = 74,5 - 0,306 \times S - 0,385 \times A - 1,08 \times R - 0,763 \times \text{As}$ (**Equação 13**) (Fan e Buckley, 2002)

Onde:

S: % de saturados

A: % de aromáticos

R: % de resinas

As: % de asfaltenos

Tabela 14: Resultados obtidos no fracionamento SARA e °API das amostras em fração mássica m/m.

AMOSTRA	SATURADOS (%)	AROMÁTICOS (%)	RESINAS (%)	ASFALTENOS (%)	°API medido	°API calculado
2	53,8±3	25,4±4	15,5±1	4,5±0,5	25,03	25,15
3	50,0±5	25,8±4	19,8±3	3,6±0,1	25,54	25,09
4	49,0±5	25,3±3	21,9±1	1,4±0,5	25,35	22,91
5	43,9±3	27,6±3	22,7±1	3,9±0,6	23,95	26,16
6	52,2±6	26,7±2	18,1±3	3,3±0,4	26,10	26,97
7	51,9±4	24,4±3	17,8±3	4,0±0,1	31,81	33,63
8	65,1±4	22,7±2	10,6±1	1,0±0,1	25,73	23,35
9	48,3±4	23,8±2	24,3±2	1,3±0,5	24,75	23,70
10	50,5±2	19,6±2	22,7±1	4,3±0,6	23,58	23,06
11	47,8±2	23,4±3	23,4±2	3,2±0,3	24,74	23,53
12	51,9±3	21,3±2	22,3±2	3,7±0,1	24,74	20,25
13	45,0±3	26,3±3	25,2±2	4,1±0,9	23,93	16,06
14	39,3±2	21,2±5	31,5±3	5,5±0,3	25,96	26,50
15	55,2±4	19,7±1	19,7±1	3,0±0,6	24,24	24,47
16	53,7±4	24,3±4	20,3±4	3,1±0,3	23,73	24,98
17	54,6±5	19,8±4	20,6±2	3,8±0,2	26,10	25,80
18	50,6±5	26,3±5	19,0±5	3,4±0,1	23,95	26,35
19	54,7±4	23,2±4	20,0±3	1,1±0,1	24,34	23,62
20	58,0±4	15,9±4	22,3±2	3,9±0,3	29,64	21,47
21	42,3±3	27,0±3	23,7±2	5,4±0,4	23,73	21,70
22	45,6±4	23,7±4	23,7±2	5,4±0,4	24,39	28,08

*resultado expresso como $Resposta = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{N}}$

5.5 Espectros de Fluorescência Amostra de Petróleo

A análise dos espectros de emissão de fluorescência mostrou que petróleos mais leves apresentam emissão de fluorescência mais intensas como observado na **Figura 33**, isto ocorre devido a fenômenos de supressão de fluorescência. Este processo pode ocorrer por diversos mecanismos. A supressão colisional ocorre através da desativação do estado excitado do fluoróforo através de contatos com outras moléculas em solução (Albrecht, 2008). Petróleos mais pesados, de menor API, possuem mais espécies propensas a desativar o estado excitado, justificando assim a diminuição da emissão de fluorescência com aumento do API.

Figura 33: Espectros de fluorescência das amostras 2, 51, 14, 4 e 3 em ordem crescente de grau API.

Os espectros de fluorescência devem ser utilizados em etapas posteriores para construção de um modelo de correlação entre quantidade de compostos obtidos no fracionamento SARA e os espectros de fluorescência.

6.CONCLUSÕES

Os resultados encontrados após o desenvolvimento deste trabalho mostraram que a metodologia de precipitação dos asfaltenos foi realizada com êxito, uma vez que foi encontrada uma quantidade mássica de 1,01-5,51%w/w, para as amostras analisadas, o que está de acordo com dados encontrados na literatura.

Os espectros de massas das amostras de asfaltenos mostraram uma distribuição de massa no intervalo de 100 a 850 Da centrada em 350 Da. Estes resultados obtidos para os asfaltenos estão diferentes dos resultados obtidos por outros métodos. O valor de peso molecular médio determinado através da técnica MALDI ou LDI foi inferior por um fator de 10. Isso pode ser explicado devido ao fato de que medidas de peso molecular feitas através da técnica de MALDI possuem ionização mais branda do que a de LDI. Não quebrando as interações do tipo “ π - π stack” preexistentes das moléculas de asfaltenos, e consequentemente, é determinado o peso molecular de uma associação de moléculas. Através da análise dos espectros de massas destes asfaltenos por um software desenvolvido no próprio LSCP gerou os seguintes resultados: o programa encontrou-se a estrutura molecular para aproximadamente 60% dos picos contidos no espectro de massas, 6,05% dos compostos encontrados possuíam enxofre, 45,2% dos compostos possuem nitrogênio e 32,1% possuem oxigênio em sua composição.

A partir da análise de infravermelho destas amostras, conclui-se que as mesmas apresentam semelhança estrutural entre os compostos precipitados de diferentes óleos, uma vez que todas as amostras apresentaram espectros de infravermelho bastante semelhantes. A análise dos espectros de emissão de fluorescência mostrou que petróleos mais leves apresentam emissão de fluorescência mais intensas devido ao fato de que petróleos mais pesados, de menor API, possuem mais espécies propensas a desativar o estado excitado, justificando assim a diminuição da emissão de fluorescência com aumento do API

A etapa seguinte do trabalho que consistiu na separação das frações saturadas, aromáticos e resinas também foi desenvolvida com sucesso. Os compostos saturados eluíram como um pico estreito por volta de 2,6 minutos. Após a eluição dos compostos saturados, tem início a eluição dos aromáticos inicia. Verificou-se que o tempo de retenção dos compostos aromáticos aumenta de acordo com aumento do número de anéis. A eluição dos aromáticos gera um sinal no detector de UV-VIS, tendo o início do tempo de retenção em aproximadamente 2,7 minutos, sendo eluída por um tempo aproximado de 28 minutos. Com a alteração do solvente para clorofórmio, inicia-se a eluição das resinas, no tempo de retenção em torno de 35 minutos, terminando por volta de 60 minutos.

O balanço mássico a partir das amostras separadas por cromatografia em escala preparativa fechou, o que indica que o método é bastante promissor. Além disso, o método desenvolvido mostrou ser altamente reprodutível. A comparação entre as metodologias por cromatografia clássica de coluna aberta e cromatografia líquida de alta eficiência mostram que a cromatografia líquida de alta eficiência possui enorme vantagem em relação a metodologia clássica.

8.REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKMAZ, S. et al. The Structural Characterization of Saturate, Aromatic, Resin, and Asphaltene Fractions of Batiraman Crude Oil. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, n. 2, 2011 2011. ISSN 1091-6466. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284890600005 >.

ALBAIGES, J. **Mass Spectrometry: Principles and Applications by Edmond de Hoffmann and Vincent Stroobant**. 2008. 368 ISBN 0306-7319.

ALBRECHT, C. **Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition, Joseph R. Lakowicz, editor**. 2008. 1223-1224 ISBN 1618-2642.

ALI, M. A. Resolution and quantification of ring type aromatics by HPLC method using n-hexane elution. **Petroleum Science and Technology**, v. 21, n. 5-6, 2003 2003. ISSN 1091-6466. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000183309800017 >.

ANCHEYTA, J. **Modeling and Simulation of Catalytic Reactors for Petroleum Refining**. 1 edition. Wiley; 1 edition (April 19, 2011), 2011. 528 pages.

ANCHEYTA, J. et al. **Asphaltenes: Chemical Transformation During Hydroprocessing of Heavy Oils**. 2009. 450 pp.

ANDERSEN, S. I. DISSOLUTION OF SOLID BOSCAN ASPHALTENES IN MIXED-SOLVENTS. **Fuel Science & Technology International**, v. 12, n. 11-12, 1994 1994. ISSN 0884-3759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PR88600006 >.

ANDERSEN, S. I.; SPEIGHT, J. G. Petroleum resins: Separation, character, and role in petroleum. **Petroleum Science and Technology**, v. 19, n. 1-2, 2001 2001. ISSN 1091-6466. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169904200002 >.

ANDERSEN, S. I.; STENBY, E. H. Thermodynamics of asphaltene precipitation and dissolution investigation of temperature and solvent effects. **Fuel Science & Technology International**, v. 14, n. 1-2, 1996 1996. ISSN 0884-3759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TV13800014 >.

ASKE, N. et al. Asphaltene aggregation from crude oils and model systems studied by high-pressure NIR spectroscopy. **Energy & Fuels**, v. 16, n. 5, Sep-Oct 2002. ISSN 0887-0624. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178122100037 >.

ASKE, N.; KALLEVIK, H.; SJOBLUM, J. Determination of saturate, aromatic, resin, and asphaltenic (SARA) components in crude oils by means of infrared and near-infrared spectroscopy. **Energy & Fuels**, v. 15, n. 5, Sep-Oct 2001. ISSN 0887-0624. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000171300000043 >.

BOLLET, C. et al. RAPID SEPARATION OF HEAVY PETROLEUM-PRODUCTS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY. **Journal of Chromatography**, v. 206, n. 2, 1981 1981. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1981LE61300010 >.

CAROL, H. C., GILBERTO L. BRAGA E PIERINA S. BONATO. **Fundamentos de cromatografia**. Editora da Unicamp, 2006.

FAN, T. G.; BUCKLEY, J. S. Rapid and accurate SARA analysis of medium gravity crude oils. **Energy & Fuels**, v. 16, n. 6, Nov-Dec 2002. ISSN 0887-0624. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179454700033 >.

FRYSINGER, G. S.; GAINES, R. B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection (GC x GC/MS) applied to the analysis of petroleum. **Hrc-Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 5, May 1999. ISSN 0935-6304. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080064100001 >.

GEMPERLINE, P.; EDITOR. **Practical Guide to Chemometrics, Second Edition**. 2006. 541 pp.

GOUAL, L.; FIROOZABADI, A. Measuring asphaltenes and resins, and dipole moment in petroleum fluids. **Aiche Journal**, v. 48, n. 11, Nov 2002. ISSN 0001-1541. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179203600022 >.

GROENZIN, H. et al. Molecular size of asphaltene solubility fractions. **Energy & Fuels**, v. 17, n. 2, Mar-Apr 2003. ISSN 0887-0624. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181723800036 >.

HU, Y. F.; GUO, T. M. Effect of temperature and molecular weight of n-alkane precipitants on asphaltene precipitation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 192, n. 1-2, Dec 1 2001. ISSN 0378-3812. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000172953300002 >.

ISLAS-FLORES, C. A.; BUENROSTRO-GONZALEZ, E.; LIRA-GALEANA, C. Comparisons between open column chromatography and HPLC SARA fractionations in petroleum. **Energy & Fuels**, v. 19, n. 5, Sep-Oct 2005a. ISSN 0887-0624. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232067300042 >.

JEWELL, D. M. et al. ION-EXCHANGE, COORDINATION, AND ADSORPTION CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF HEAVY-END PETROLEUM DISTILLATES. **Analytical Chemistry**, v. 44, n. 8, 1972 1972. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1972M784400010 >.

KAMINSKI, M. et al. High-performance liquid chromatography in group-type separation and technical or process analytics of petroleum products. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 193-216, 2005 2005a. ISSN 1040-8347. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233304300002 >.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Editora Atomo, 2009. 382.

MAMYRIN, B. A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 206, n. 3, Mar 22 2001. ISSN 1387-3806. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167823400008 >.

MARSHALL, A. G.; RODGERS, R. P. Petroleomics: Chemistry of the underworld. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, Nov 25 2008. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261489300013 >.

MARTENS, H.; NAES, T. Multivariate calibration. **NATO ASI Ser., Ser. C**, v. 138, n. Chemometrics, p. 147-56, 1984. ISSN 0258-2023.

MELENDEZ, L. V. et al. Prediction of the SARA analysis of Colombian crude oils using ATR-FTIR spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 90-91, Jul 2012. ISSN 0920-4105. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307615200008 >.

MULLINS, O. C. The Asphaltenes. **Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 4**, v. 4, 2011 2011. ISSN 1936-1327. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293148400018 >.

PILLON, L. Z. Effect of experimental conditions and solvents on the precipitation and composition of asphaltenes. **Petroleum Science and Technology**, v. 19, n. 5-6, 2001 2001. ISSN 1091-6466. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170842900016 >.

RADKE, M.; WILLSCH, H.; WELTE, D. H. PREPARATIVE HYDROCARBON GROUP TYPE DETERMINATION BY AUTOMATED MEDIUM PRESSURE LIQUID-CHROMATOGRAPHY. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 3, 1980 1980. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980JG67900013 >.

RIVEROS, L. et al. Determination of asphaltene and resin content in Venezuelan crude oils by using fluorescence spectroscopy and partial least squares regression. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 1, Jan-Feb 2006. ISSN 0887-0624. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234818200032 >.

RODGERS, R. P.; MCKENNA, A. M. Petroleum Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, Jun 15 2011. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291499800016 >.

SHARMA, B. K.; SAROWHA, S. L. S.; BHAGAT, S. D. Chromatographic characterization of high-boiling petroleum fractions. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 18, Dec 2003. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187212700009 >.

SHARMA, B. K. et al. Characterization of high-boiling petroleum fractions using HPLC and HTGC. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 224, Aug 18 2002. ISSN 0065-7727. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177422202920 >.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of Analytical Chemistry. 5th Ed.** 1988. 894 pp.

SMANIOTTO, A. et al. Laser desorption/ionization mass spectrometric study on asphaltenes from different heavy crude oils and products originating from their thermal treatment. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 5, Mar 2009. ISSN 0951-4198. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263795000024 >.

SNYDER, L. R. et al. **Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition.** 2010. 912 pp.

SPEIGHT, J. G. The chemical and physical structure of petroleum: effects on recovery operations. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 22, n. 1-3, p. 3-15, Jan 1999. ISSN 0920-4105. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078665200002 >.

SPEIGHT, J. G.; LONG, R. B.; TROWBRIDGE, T. D. ON THE DEFINITION OF ASPHALTENES. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 184, n. SEP, 1982 1982. ISSN 0065-7727. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1982QG97900943 >.

JG Speight, RB Long. FACTORS INFLUENCING THE SEPARATION OF ASPHALTENES FROM HEAVY PETROLEUM FEEDSTOCKS. **Fuel**, v. 63, n. 5, 1984 1984. ISSN 0016-2361. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1984SR25100008 >.

SPEIGHT, J. G.; MOSCHOPEDIS, S. E. OBSERVATIONS ON THE NATURE OF PETROLEUM ASPHALTENES. **Erdol & Kohle Erdgas Petrochemie**, v. 34, n. 4, 1981 1981. ISSN 0014-0058. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1981LP97300015 >.

VASE, E. J. **The Chemistry and Technology of Petroleum, 4th Ed. by J. G. Speight.** 2007. 299 ISBN 0009-5893.

VITHA, M.; CARR, P. W. The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, n. 1-2, p. 143-194, Sep 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240385200012 >.

WANG, Z. D.; FINGAS, M.; LI, K. FRACTIONATION OF A LIGHT CRUDE-OIL AND IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF ALIPHATIC, AROMATIC, AND BIOMARKER COMPOUNDS BY GC-FID AND GC-MS .1. **Journal of Chromatographic Science**, v. 32, n. 9, Sep 1994. ISSN 0021-9665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PN83500002 > .

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D.; EDITORS. **Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, Fourth Edition**. 2007. 818 pp.

WOODS, J. et al. Canadian crudes: A comparative study of SARA fractions from a modified HPLC separation technique. **Oil & Gas Science and Technology-Revue D Ifp Energies Nouvelles**, v. 63, n. 1, Jan-Feb 2008. ISSN 1294-4475. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253925400013 > .