2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fracionamento isotópico dos gases C₁-C₅

Os isótopos estáveis estão presentes nos ecossistemas e sua distribuição natural reflete, de forma integrada, a história dos processos físicos e metabólicos no ambiente (Pereira, 2007). A utilização das razões isotópicas em estudos geoquímicos baseia-se na existência de diferenças detectáveis na composição isotópica dos compostos que participam no processo em estudo. Estas diferenças ocorrem na natureza e são resultado de processos bioquímicos e geológicos que envolvem a discriminação de um dos isótopos. A partição ou discriminação de isótopos entre duas substâncias ou duas fases de uma mesma substância é conhecida como fracionamento isotópico (Schutz e Zabel, 2000). O fracionamento pode ser resumido como um enriquecimento ou empobrecimento do isótopo pesado da amostra em estudo em relação a sua fonte ou substrato (Pereira, 2007).

Em geral, o fracionamento isotópico ocorre durante vários tipos de processos físicos e reações químicas: a) reações de intercâmbio onde ocorre uma redistribuição de isótopos de um elemento entre moléculas diferentes que contêm esse elemento b) efeitos cinéticos, os quais estão associados com processos unidirecionais incompletos como condensação ou evaporação, cristalização ou fusão, adsorção ou desorção, reações mediadas biologicamente e difusão. Normalmente, isótopos leves são mais móveis e mais susceptíveis aos processos que os isótopos pesados. O fracionamento isotópico que ocorre durante estes processos é indicado pelo fator de fracionamento α o qual é definido como a razão isótopo pesado / isótopo leve do composto na fase A (R_A) dividido pela correspondente razão isotópica do composto na fase B (R_B) (Schutz e Zabel, 2000).

$\alpha_{A-B} = R_A / R_B$

O carbono está presente em uma ampla variedade de compostos na Terra, desde espécies orgânicas altamente reduzidas na biosfera até espécies inorgânicas oxidadas como CO₂ e carbonatos. A presença de uma mesma espécie química, em diferentes estados de oxidação, em um sistema geológico, representa um exemplo ideal da ocorrência natural de fracionamento. Os dois principais reservatórios terrestres de carbono, matéria orgânica e carbonatos sedimentários, apresentam diferentes características isotópicas devido à operação de dois diferentes mecanismos de reação: a) o equilíbrio isotópico em reações de intercambio dentro do sistema carbono inorgânico ($CO_{2(g)} \leftrightarrow HCO_3^{-1}$ (aq) $\leftrightarrow CaCO_{3(s)}$) resulta no enriquecimento do ¹³C nos carbonatos; b) durante a fotossíntese, efeitos isotópicos cinéticos produzem a concentração do isótopo leve ¹²C no material orgânico sintetizado (Hoefs, 2004).

A composição isotópica dos C1-C5 em gás natural fornece informação importante sobre a fonte precursora de gás, o processo geológico de formação de gás (herança isotópica) e o fracionamento isotópico devido a fenômenos físicos e bioquímicos. A figura 2 demonstra a sucessão de processos envolvidos na geração de gás. Após a diagênese que gera o querogênio a partir da matéria orgânica sedimentada, a degradação térmica pode promover a formação de moléculas gasosas de acordo com duas rotas diferentes: a) geração direta de gás desde o querogênio por craqueamento primário, ou b) geração de gás por craqueamento do petróleo gerado a partir do querogênio (craqueamento secundário). Após a formação na rocha geradora, o gás é expulso e migra até o reservatório. No processo de migração e no reservatório, podem ocorrer vários fenômenos pós-genéticos, tais como perda de gás por vazamento através dos arenitos ou oxidação (bacteriana ou química) dos hidrocarbonetos. Em qualquer destas etapas, gás biogênico (metano) pode ser incorporado e se misturar com o gás termogênico, além disso, o reservatório pode sofrer descarga de misturas complexas de gases termogênicos vindos de diferentes rochas geradoras e com diferente maturidade (Prinzhofer e Hue, 1995).

Assim, a caracterização do gás natural pode se tornar complexa devido aos vários processos que afetam a composição química e isotópica. Durante os primeiros estágios da diagênese, o gás biogênico produzido é principalmente C₁ com um δ^{13} C aproximado de -55‰ ou menor. Nos primeiros estágios da catagênese, gás e óleo são produzidos concomitantemente a partir do querogênio nas rochas geradoras, enquanto, no final da catagênese, é gerado gás por craqueamento térmico do querogênio residual e do óleo. Este gás termogênico contém quantidades de hidrocarbonetos C₂-C₅ quase ausentes no gás biogênico, embora a geração de gás proceda através da janela de óleo em estágios avançados de catagênese, o gás torna-se progressivamente mais seco e isotopicamente mais positivo (Rooney *et al.*, 1995). O gás natural que contém

21

menos metano (normalmente inferior a 85% de metano) e mais etano e outros hidrocarbonetos mais complexos é chamado de gás úmido. O gás natural que ocorre na ausência de hidrocarbonetos condensados ou líquidos (C_2 - C_5), ou que teve hidrocarbonetos condensáveis removidos, é conhecido como gás seco (Head *et al.*, 2003). As mudanças em composição molecular, no final da catagênese, presumivelmente são devidas à instabilidade dos C_2 - C_5 em altas temperaturas. O metano se mantém estável em condições de alta pressão e temperatura, embora possa ser alterado por bactérias sulfato redutoras em ambientes mais raros.



Figura 2 Diagrama esquemático demonstrando os fatores controladores do fracionamento isotópico dos gases C_1 - C_5 (Prinzhofer e Hue, 1995) Modificado.

Embora o metano biogênico seja enriquecido em ¹²C e ¹H comparado com o metano associado à alteração térmica de matéria orgânica, alguns processos como migração difusiva e adsorção/dessorção podem induzir o fracionamento. O enriquecimento no isótopo leve ¹²C pode ser causado pela mistura entre gases biogênicos e termogênicos ou por processos difusivos. Assim, os processos de migração, mistura e alteração oxidativa de gases geram complicações na avaliação de fontes e estágios de geração de hidrocarbonetos. A identificação e separação das contribuições destes processos requerem um entendimento de como estes processos alteram quantitativamente a composição química e isotópica do gás natural (Prinzhofer e Pernaton, 1997).

2.2. Ciclos dos Hidrocarbonetos C₁-C₅

Gases hidrocarbonetos incluindo metano (CH₄, C₁), etano (C₂H₆, C₂), propano (C₃H₈, C₃), iso-butano (i-C₄H₁₀, i-C₄) e n-butano (n-C₄H₁₀, n-C₄) são produzidos naturalmente em ambientes profundos, em sistemas petrolíferos ativos, e representam os componentes majoritários do gás natural. Os hidrocarbonetos que compõem o gás natural são produzidos primariamente a partir da decomposição de matéria orgânica. Quando a decomposição ocorre mediante uma ação biológica, o produto predominante é C₁ (gás biogênico), e os outros hidrocarbonetos (C₂-C₅) estão presentes somente em níveis traço. Quando a produção de gás é devida à decomposição térmica (gás termogênico) os C₂-C₅ são mais abundantes, geralmente representam em média até 10% do gás. O gás biogênico pode ser distinguido do termogênico mediante a composição isotópica do carbono e hidrogênio (Figura 3).





Um gás bacteriano apresenta um δ^{13} CH₄ menor do que -50‰, δ D-CH₄ menor do que -250‰ e uma razão C₁/(C₂+C₃) maior do que 100. Um gás termogênico tem um δ^{13} CH₄ maior do que -50‰, δ D-CH₄ maior do que -250‰ e uma razão C₁/(C₂+C₃) menor do que 100 (Baldassare e Laughrey,1997). O gás natural está amplamente distribuído no subsolo devido a sua alta mobilidade e é

acumulado em armadilhas geológicas. O C₁ tem recebido maior atenção que os C₂-C₅, devido a sua importância energética, e seu efeito na mudança climática e na química atmosférica (Kinnaman *et al.*, 2007).

Os ciclos atmosféricos dos hidrocarbonetos C₂-C₅ são similares ao ciclo do C1, onde as emissões são principalmente terrestres e as perdas são majoritariamente atmosféricas. Assim como o C1, os níveis atmosféricos dos hidrocarbonetos C2-C5 são elevados no hemisfério norte e podem ser alterados pela presença de radicais hidroxila (OH•). No entanto, as concentrações dos hidrocarbonetos C2-C5 são muito menores que a concentração do metano (diferença de mais de três ordens de magnitude) e os tempos de residência dos C₂-C₅ na atmosfera são da ordem de alguns dias (o tempo de residência do C₁ é 8,4 anos). A fonte principal de C_2 é a queima de biomassa, enquanto as maiores fontes de C₁ (pântanos naturais, gado bovino e cultivos de arroz) não são fontes significativas de C2-C5. Rudolph (1995) apresenta uma revisão bibliográfica sobre estudos de fontes biogênicas e antropogênicas de C2. A perda de gás natural (a partir de reservatórios no subsolo) durante operações especiais como perfuração de poços, exploração de carvão mineral, construção de gasodutos e oleodutos, ocasiona emissões importantes de C2 estimadas em 6 Tg por ano (Rudolph, 1995). As fontes de C_3 e C_4 não são muito conhecidas, mas geralmente são as mesmas do C2 incluindo a queima de biomassa, emissões de oceanos, solos e vazamento de gás natural. A quantidade de C_1 livre na atmosfera é superior à quantidade estimada pela perda de gás natural e pelas emissões antropogênicas, aumentando a possibilidade de emissões geológicas significativas de gases C₁-C₅ através de falhas permeáveis e rochas fraturadas.

Emissões naturais e antropogênicas de hidrocarbonetos C_2 - C_5 contribuem para a poluição da atmosfera como resultado de reações fotoquímicas que envolvem o radical hidroxila e óxidos de nitrogênio NO_x (Kinnaman *et al.*, 2007). Estes hidrocarbonetos são precursores de ozônio e de outros foto-oxidantes. O potencial de geração de ozônio para os C_2 - C_5 em processos químicos atmosféricos depende não somente das suas concentrações, mas também das suas reatividades. A velocidade de reação com o radical hidroxila é uma boa indicação para conhecer a reatividade destas espécies (Qin *et al.*, 2007).

Alguns microorganismos podem alterar a distribuição de hidrocarbonetos, principalmente pelo consumo destes em presença de um oxidante. O consumo microbiano de C_1 é conhecido como metanotrofia, este processo apresenta uma bioquímica interessante e logicamente altera o ciclo do C_1 . As enzimas responsáveis pela oxidação de C_1 (que ocorre em ambientes oxidativos e

2. Revisão Bibliográfica

anóxicos) são duas formas primárias de metano monooxigenase (MMO), particulada (pMMO) e solúvel (sMMO). Ambas as enzimas são capazes de ativar substratos com múltiplos carbonos incluindo alcanos de cadeia curta e alquenos, e a sMMO é conhecida pela ativação de éteres, alicíclicos, aromáticos e heterocíclicos. Alguns metanotrofos aeróbicos têm mostrado crescimento com o consumo simultâneo de C₁ e substratos orgânicos, um exemplo é a adição de acetato em cultivos para estimular a oxidação do C₁. No entanto, o efeito da adição de outros substratos sobre a absorção de C₁ não está estabelecido, especialmente na presença de outros hidrocarbonetos (Kinnaman *et al.*, 2007).

O consumo microbiano dos hidrocarbonetos C_2 - C_5 tem sido estudado em menor extensão que o consumo do C_1 . Alguns organismos que tem apresentado oxidação de C_2 - C_4 são diferentes espécies de *Pseudomonas* e *Nocardioides*.

Os motores de veículos emitem traços de etano e antes da implantação de conversores catalíticos, emitiam traços de propano. Isômeros de butano e pentano têm fontes mais dissipadas, mas aumentam consideravelmente em processos de extração e distribuição de combustíveis fósseis (Yates E. *et al.*, 2010).

Variações em temperatura e umidade podem influenciar as emissões de metano de origem natural (incêndios florestais e pântanos). Se altas temperaturas coincidem com condições secas, as emissões pirogênicas podem aumentar enquanto as emissões biogênicas diminuem. Assim, já que padrões de temperatura e umidade variam regionalmente, as emissões de hidrocarbonetos também variam regional e sazonalmente (Clarkson *et al.*, 1997; Ferretti *et al.*, 2005). Qin *et al.* (2007), reportaram variações sazonais e diurnas dos C₂-C₅ atmosféricos em Dallas, determinando as concentrações mais altas em inverno e horários de maior tráfego veicular.

Milkov *et al.* (2004), estudaram a distribuição do hidrato de carbono (*gas hydrate*) em sedimentos marinhos no sul de Oregon (EUA), detectando variabilidade nas concentrações de C_2 e C_3 por possível fracionamento molecular, resultado da cristalização de gás hidrato contendo C_2 . O hidrato de carbono é um mineral composto de água e gás natural (principalmente metano) que ocorre nas regiões polares e em sedimentos marinhos e lacustres em profundidades de água superiores a 200 - 600 m, dependendo da temperatura da água, da composição do gás, da porosidade do meio e da salinidade. A reserva global submarina de hidrato de carbono tem sido estimada na faixa de 500-2500 Gt de metano, tornando-se uma fonte energética de bastante interesse (Milkov *et al.*,2004). Embora o componente principal do hidrato de carbono seja

25

metano e água, a composição variável dos C_{2+} tem sido empregada para estimar padrões de cristalização e indicar possíveis zonas de ocorrência. Enriquecimento em algum C_{2+} pode indicar prévia cristalização de gases mais leves.

2.3. Análise dos n-alcanos C₁-C₅ por CG-EMRI

Metano, etano, propano, isobutano e n-butano (componentes do gás natural) podem ser caracterizados mediante sua razão isotópica de carbono (¹³C/¹²C) e hidrogênio (²H/¹H). Os isótopos pesados ¹³C e ²H (ou deutério, D) são espécies de menor abundância (1% do carbono total, 150ppm do hidrogênio total), assim pequenas variações nas razões ¹³C/¹²C e H/D são medidas com alta precisão e exatidão mediante espectrômetros de massas modernos (Schoell, 1993).

A análise isotópica de carbono em gás natural envolve, inicialmente, a separação dos componentes individuais do gás usando um cromatógrafo de gases, combustão em linha para transformação dos componentes em CO₂, purificação do CO₂ produzido, e por último, introdução deste gás no sistema de EMRI. O espectrômetro de massas separa e detecta analitos de acordo com a movimentação dos íons em um campo eletromagnético.

2.3.1. Espectrometria de Massas de Isótopos Estáveis

A espectrometria de massas de isótopos estáveis é uma técnica espectrométrica que permite a medição de abundâncias relativas de isótopos estáveis em uma amostra. Em contraste com os espectrômetros de massas convencionais que fornecem informações estruturais pela varredura de uma ampla faixa de massas (verificando a presença de vários íons fragmentados característicos), os equipamentos de EMRI medem abundâncias isotópicas com alta precisão e menor flexibilidade na discriminação de massas. (Meier, 1999). Em medidas de razão isotópica, os analitos devem ser convertidos em gases simples antes de entrar na fonte de íons do equipamento. Medidas isotópicas de ²H/¹H, ¹⁵N/¹⁴N, ¹³C/¹²C, ¹⁸O/¹⁶O e ³⁴S/³²S são feitas a partir dos gases H₂, N₂, CO₂, SO₂ ou SF₆, respectivamente (Brenna *et al.*, 1997). A Figura 4 demonstra o esquema de um equipamento de EMRI genérico incluindo a fonte de íons, o analisador magnético, e o sistema de detecção. Na fonte iônica ocorrem a ionização eletrônica, a formação do feixe de íons e a aceleração dos íons. A

deflexão magnética dá-se no analisador e a detecção ocorre no coletor múltiplo. Um equipamento de EMRI precisa de um sistema de vácuo capaz de manter a pressão menor que 10⁻⁵ mm Hg.



Figura 4 Sistema convencional de EMRI (Brenna et al., 1997) Modificado.

Na fonte de íons, elétrons são liberados de um filamento incandescente de tungstênio ou rênio e são acelerados por um potencial eletrostático de energia de 50 a 150 eV. Estes elétrons colidem com as moléculas e geram espécies iônicas que são aceleradas, extraídas e focalizadas por lentes eletrostáticas. Para incrementar a probabilidade de ionização, é usado um campo magnético fraco que mantém o caminho dos elétrons em forma espiral. No final da câmara de ionização os elétrons são coletados por uma armadilha carregada positivamente, onde a corrente eletrônica é medida e mantida constante (Hoefs, 2004). As moléculas ionizadas são atraídas para fora do feixe de elétrons por ação de um campo elétrico, posteriormente são aceleradas por vários kV e passam através de uma fenda de saída dentro do analisador. No analisador, o feixe de íons passa através de um ímã e é direcionado por um campo eletromagnético constante, até um sistema detector (Brand, 1995). Quando o feixe de íons atravessa o campo magnético, os íons são desviados em trajetórias circulares, os raios destas trajetórias são proporcionais à raiz quadrada da razão massa/carga. Assim, os íons são separados em feixes, cada um caracterizado por um determinado valor de m/z (Hoefs, 2004). Os sistemas de introdução de amostra de maior uso são o analisador elementar (AE) e o cromatógrafo de gases (CG). Nestes dispositivos a amostra é separada e os componentes individuais são transformados em gases simples após a eluição da coluna, e injetados no sistema de EMRI.

Na análise isotópica do CO₂, devem ser monitoradas três massas 44, 45 e $^{12}C^{18}O^{16}O$, $^{12}C^{16}O_{2}$ $^{13}C^{16}O_2$, 46 correspondentes aos isotopómeros respectivamente. Cada massa (feixe iônico) é registrada simultaneamente por um coletor múltiplo tipo Faraday. Os coletores são alinhados em posições fixas ao longo do plano da imagem do setor magnético do espectrômetro. A corrente iônica resultante é continuamente monitorada, subseqüentemente digitalizada e transferida até um ordenador (Meier, 1999). As correntes iônicas são amplificadas e processadas mediante um conversor de alta freqüência. No ordenador as áreas de cada isotopómero são integradas quantitativamente e a razão isotópica é calculada.

É preciso ter em mente que em EMRI é determinada a diferença na proporção de isótopos com maior precisão e exatidão do que a razão isotópica absoluta. As medidas em EMRI fornecem informação sobre a abundância isotópica do gás analito em relação à medida de razão isotópica de um gás padrão ou referência (Meier, 1999). Por conveniência, as razões são normalmente expressadas em notação delta em parte por mil (‰) relativas ao padrão PDB (*Pee Dee Belemite*) para o carbono e ao padrão SMOW (*Standard Mean Ocean Water*) para o hidrogênio (Schoell, 1993).

$$\delta^{13}C(\%) = \left[\frac{\left(\frac{1^{3}C}{^{12}C}\right)_{amostra}}{\left(\frac{1^{3}C}{^{12}C}\right)_{PDB}} - 1\right]X1000$$
$$\delta D(\%) = \left[\frac{\left(\frac{D}{H}\right)_{amostra}}{\left(\frac{D}{H}\right)_{smow}} - 1\right]X1000$$

Assim, os valores δ correspondem à razão entre isótopos pesados e leves na amostra comparados a um padrão internacionalmente reconhecido. Um valor positivo de δ indica que a amostra tem razão isotópica maior que o padrão e possui mais espécies isotópicas pesadas. Por outro lado, os valores negativos indicam que a amostra tem uma razão isotópica menor que aquela do padrão (Pereira *et al.*, 2007).

2.3.1.1. Injeção Dupla

Nesta técnica de análise, as medidas da abundância isotópica são feitas usando um sistema de injeção duplo (*dual inlet*) com dois reservatórios de gás (gás de referência e gás amostra), cada um ligado à fonte iônica mediante um sistema de capilares. Para evitar o fracionamento isotópico causado pela efusão de gases no vácuo do espectrômetro de massas, o sistema de capilares garante um fluxo viscoso (pressão igual ou superior a 20mbar) e acopla a entrada de gases. Durante um fluxo viscoso de gás, as moléculas colidem freqüentemente (alta mistura do gás), evitando a discriminação de massas (Hoefs, 2004). Entre os capilares e o espectrômetro de massas, uma válvula é usada para alternar a entrada de gases na fonte iônica mantendo um fluxo constante. As correntes iônicas dos isotopómeros de interesse são amostradas simultaneamente mediante um arranjo de coletores múltiplos tipo *Faraday* (Brand, 1995).

Para analisar amostras usando esta técnica é necessário realizar a extração e combustão em um sistema *off-line*. Tipicamente, a preparação *off-line* das amostras envolve múltiplos passos em linhas de vácuo customizadas com agentes secantes, armadilhas criogênicas, reatores com catalisadores e micro-destiladores. Durante estas etapas pode ocorrer fracionamento isotópico e contaminação das amostras, e em geral, os métodos de extração manual são demorados e tediosos, além de requerer maior volume de amostra e maior habilidade por parte do operador. A combustão da amostra purificada pode ser feita estaticamente em um tubo evacuado (contendo CuO a >700°C), ou dinamicamente em uma linha de vácuo com excesso de O₂ (Brenna *et al.*, 1997). Na figura 5 encontra-se representado um esquema simplificado comparativo dos sistemas de introdução de amostra.

2.3.1.2. Fluxo Contínuo

Analisadores elementares e cromatógrafos de gases acoplados a sistemas de EMRI funcionam mediante um fluxo contínuo. Nestes equipamentos, um fluxo contínuo de He ultra puro carrega os gases simples, produtos da combustão até o espectrômetro de massas (o fluxo somente é interrompido para a injeção de pulsos de gás de referência). Assim, a preparação da amostra ocorre em linha.



Figura 5 Sistemas de introdução de amostra em EMRI: Fluxo contínuo e Dupla injeção (Brenna *et al.*, 1997) Modificado.

No analisador elementar, as amostras são pesadas em uma cápsula de estanho e são introduzidas no equipamento através de um carrossel automático. A amostra é direcionada até um reator de combustão aquecido (1000-1100°C) em uma atmosfera enriquecida em oxigênio. Os produtos de combustão passam pelo catalisador trióxido de cromo (CrO_3) usando um fluxo de He constante. Os produtos de oxidação passam pelo tubo de redução mantido a 650°C, contendo cobre, onde os NO_x são reduzidos a N₂ e o excesso de oxigênio é removido. A água de combustão é removida mediante um agente secante (perclorato de magnésio) e os produtos gasosos, CO₂ e N₂, são separados por uma coluna cromatográfica e detectados no sistema de EMRI. A coluna de separação pode ser trocada por uma armadilha criogênica (Brenna et al., 1997). O analisador elementar também pode ser usado na configuração de pirólises, usando um reator de cerâmica recheado com fragmentos de carbono vítreo. A pirólise ocorre em ausência de oxigênio a altas temperaturas (1250-1400°C) e permite medir as razões isotópicas ²H/¹H e ¹⁸O/¹⁶O. Os produtos formados durante a pirólises dependem da composição elementar da matriz e a amostra é pesada em cápsulas de prata (Amaral, 2008).

2.3.2. Cromatografía Gasosa Acoplada à EMRI

O acoplamento de cromatógrafos de fase gasosa com espectrômetros de massa de razão isotópica constitui uma das mais versáteis técnicas isotópicas, pois combina o poder de separação das técnicas cromatográficas com a elevada precisão e exatidão da determinação de isótopos estáveis. Na técnica de CG-EMRI, um cromatógrafo com um sistema de injeção convencional (Split/splitless ou on-column) é acoplado a um sistema de EMRI mediante um reator de combustão que age como interface. Esta técnica foi introduzida por Matthews e Hayes em 1978 (Brenna et al., 1997). O reator consiste em um tubo de cerâmica ou quartzo com fios de CuO/Pt ou CuO/NiO/Pt mantido a uma temperatura aproximada de 900°C. Os óxidos do reator fornecem o oxigênio necessário para a combustão quantitativa de compostos orgânicos até CO₂ e H₂O. A conversão quantitativa dos compostos nitrogenados a N2 é feita em um reator de redução contendo Cu a 600°C. Uma válvula de escape facilita a re-oxidação do reator de combustão (com um fluxo de O2) e a inversão de fluxo (backflush) do sistema (Brand, 1996). Para remover o vapor de água gerado durante a combustão, é usada uma armadilha de um polímero de tetrafluoretileno sulfonado (Nafion) que age como uma membrana semipermeável retendo os produtos de combustão e expulsando água (Meier, 1999). Esta remoção é necessária já que traços de água na fonte iônica causam a protonação do CO₂, cujo produto HCO₂⁺ interfere na análise do ¹³CO₂. Assim, a amostra de interesse é introduzida no GC e separada em seus constituintes mediante uma coluna, os efluentes do GC entram no reator (onde são convertidos quantitativamente em gases simples), o vapor de água gerado na combustão é removido e finalmente, os picos de CO2 resultantes da oxidação de cada analito são introduzidos sequencialmente na fonte de íons. O acoplamento ao espectrômetro de massa é feito através de uma fenda aberta (open split), a fim de lidar com as flutuações de pressão inerentes ao processo de combustão. A figura 6 demonstra um esquema simplificado do sistema CG-EMRI.

Neste sistema de fluxo contínuo, os processos de purificação e o comprimento da interface produzem sinais analíticos com formas Gaussianas. A medição de sinais transientes com alta precisão precisa de um alto grau de linearidade no espectrômetro de massas, em especial na fonte iônica. A ionização por impacto eletrônico é ideal pela alta estabilidade e pelo rendimento no processo de ionização (Brand, 1996).

Devido ao efeito isotópico cromatográfico o sinal da m/z 45 (¹³CO₂) antecede o sinal da m/z 44 (¹²CO₂) por alguns milissegundos, este deslocamento depende da natureza do composto e das condições cromatográficas. Este efeito é causado pelas diferentes interações entre o soluto e a fase estacionária (forças de Van der Waals) que geram a eluição adiantada do isotopómero mais pesado (Meier, (1999)).



Figura 6 Esquema simplificado de um sistema CG-EMRI (Brand, 1996)Modificado.

2.4. Análise de gases traço

Procedimentos longos associados com a amostragem, preparação de amostras em linhas de vácuo e análise isotópica por injeção dupla, limitavam o uso da composição isotópica de gases na determinação de fontes e processos de fracionamento. A técnica CG-EMRI com fluxo contínuo requer menos volume de ar, a preparação de amostra é feita em linha e o tempo de preparação de amostra é significativamente menor do que a análise por EMRI convencional (Rice *et al.*, 2003).

Medidas de composição isotópica nos gases traço atmosféricos mais abundantes, são feitas por EMRI no modo de dupla injeção (*dual inlet*), nesta técnica são necessários grandes volumes de amostras, por exemplo, a análise isotópica de metano atmosférico geralmente precisa de até 50L de amostra e na análise de δ^{13} C em CO são necessários entre 400 e 800L de amostra de ar (Rudolph, 1995). Um maior tamanho de amostra requerida por análise impede uma determinação destes gases de forma rotineira.

Assim, os desafios mais importantes na análise de gases traço são a baixa concentração de analito, os volumes elevados de amostras necessários para produzir informação isotópica com alta exatidão e precisão e o acesso a

metodologias de extração livres de fracionamento e contaminação. Igualmente, em análise de traços as duplicatas resultam comprometidas quando a quantidade de amostra é insuficiente e os pontos de amostragem são remotos.

A concentração criogênica e crio-focalização de gases têm-sido vislumbradas como ferramentas poderosas na análise isotópica *on-line* de amostras com baixa concentração de analitos. Os gases mais pesquisados têm sido aqueles com potencial de efeito estufa, e os gases importantes em exploração de hidrocarbonetos e em elucidação de ciclos biogeoquímicos.

2.4.1. Concentração de Gases para análise por CG-EMRI

Na área de estudo de águas naturais, especialmente em sistemas aquáticos anaeróbicos, Poop e Sansone (1995), analisaram a composição isotópica do metano dissolvido em água de mar e sedimentos mediante duas técnicas de introdução de amostra, pré-concentração em fluxo alto de He e análise de *headspace*. Em ambas as técnicas a pré-concentração do CH₄ foi feita mediante secagem da amostra, tratamento criogênico (coleta em nitrogênio líquido, sobre adsorvente Porapak-Q), dessorção de gases (200°C), separação a baixa temperatura (-25°C, coluna PoraPLOT-Q) no CG, combustão (1000°C), remoção de água e análise da composição isotópica no espectrômetro de massas. A razão isotópica do metano foi empregada no monitoramento de diagêneses anaeróbica de sedimentos correspondentes a sistemas com baixas introduções de matéria orgânica.

A Figura 7 demonstra o sistema usado no caso da técnica de análise do *headspace* de sedimentos. O sistema de injeção foi composto por uma agulha calibre 22 ligada a uma válvula de duas posições. O gás *headspace* injetado passou através de um tubo de Nafion de 20 cm para remoção do vapor de água mediante um fluxo de 10 mL/min de He. O gás seco foi crio-focalizado através de uma coluna capilar de 0.53mm (diâmetro) e foi adsorvido em um segmento de 2cm (comprimento) de Porapak-Q submerso em nitrogênio líquido (Figura 8a). O gás foi dessorvido usando um mini forno de quartzo contendo um fio de Ni-Cr mantido a 200°C. O metano foi separado do N₂ e CO₂ usando uma coluna capilar Poraplot-Q, um fluxo de 2mL/min de He e uma temperatura de -25°C. Após a amostra ser oxidada mediante um forno de Cu/Pt (1150°C), a água de combustão foi removida e a composição isotópica foi determinada usando um sistema de EMRI.



Figura 7 Diagrama esquemático do sistema usado para amostragem de metano na técnica *headspace* (Poop *et al.*, 1995).

Na técnica de pré-concentração com fluxo alto de He (Figura 8b), os gases da amostra líquida, carreados por um fluxo de 20 mL/min de He, passaram através de uma coluna capilar com uma armadilha de água (bulbo 10 mL) até um tubo de Nafion (separador de água). O CO₂ foi removido usando uma coluna de 5cm preenchida com Ascarite II. Os gases remanescentes foram focalizados, mediante uma válvula Valco, até a unidade criogênica onde o metano foi coletado em nitrogênio líquido sobre uma coluna de aço inoxidável preenchida com o polímero Porapak-Q. A separação e análise do metano, incluindo criofocalização e cromatografia foram idênticas ao procedimento descrito para os gases *headspace*.

Posteriormente, Poop e Sansone sugeriram a troca do banho de nitrogênio líquido por um banho de etanol/nitrogênio líquido (-118°C) para diminuir a quantidade de nitrogênio e oxigênio coletados, que podem interferir na análise de metano. Nesta temperatura o nitrogênio e oxigênio são expulsos do sistema através do respiradouro.



Figura 8 Diagrama esquemático do sistema usado na análise isotópica de CH₄ a partir de água de mar (Poop *et al.*, 1995).

Pioneiros na análise isotópica de metano atmosférico, Merritt *et al.*, 1995, descreveram o desenho, construção e operação de um sistema em linha para análise isotópica mediante a técnica de CG-EMRI. A Figura 9 demonstra o dispositivo usado. Neste sistema as amostras foram injetadas sobre uma coluna preparativa e após a eluição do N₂, O₂ e Ar, o CH₄ e o CO₂ foram transferidos até uma coluna tipo PLOT. Os efluentes desta coluna foram oxidados, a água foi removida e o gás resultante foi introduzido na fonte de íons do sistema de EMRI. Duas válvulas Valco controlavam os fluxos de He do sistema (injeção e transferência). Uma válvula de 4-vias permitiu a purga do gás de arraste mediante um *bypass*, enquanto a válvula de 8-vias permitiu a concentração e transferência dos gases coletados na coluna preparativa (20 cm de tubo de aço

inoxidável preenchido com Hayesep D, 80-100 de poro). Esta coluna preparativa foi mantida a -118°C (etanol/N₂(I)) com o objetivo de reter CH₄ e CO₂ e evitar a coleta de interferentes como N₂ e O₂. Estes gases podem co-eluir junto com o metano e comprometer as medidas do *background*. A resina Hayesep D foi selecionada como adsorvente da coluna preparativa pela adsorção seletiva de CH₄ (deixando passar o N₂, O₂ e argônio) e pela rápida liberação do metano a temperatura ambiente sem fracionamento isotópico. Esta resina também se mostrou tolerante à acumulação gradual de água e às abruptas mudanças de temperatura. Para transferir a amostra de gás até a coluna analítica (Poraplot-Q, 25m de comprimento X 0.32mm de diâmetro X 10µm de poro) a coluna preparativa foi aquecida (22-24°C) e um fluxo de 1 mL/min de He levou o analito até o sistema CG-EMRI. Neste sistema ocorreram a separação cromatográfica e a oxidação em um forno de combustão de NiO (1150°C). Após a remoção da água de combustão, uma porção do gás foi inserida na fonte de íons para a determinação da composição isotópica.



Figura 9 Esquema do dispositivo pré-concentrador usado por Merrit et al., 2005.

Rice *et al.*, 2001, desenvolveram um sistema de pré-concentração de CH₄ usando as técnicas CG/C/EMRI (Cromatografia de Gases com interface de Combustão acoplada a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica) e CG/P/EMRI (Cromatografia de Gases com interface de Pirólises acoplada à Espectrometria de Massas de Razão Isotópica), para analisar δD e $\delta^{13}C$ em amostras de ar coletadas na zona equatorial do oceano Pacífico. No sistema empregado (Figura 10), uma mostra de 60 mL de ar foi carreada por um fluxo de He de 55 mL/min através de duas armadilhas. A primeira armadilha era um tubo de aço inoxidável de 1.59mm de diâmetro submerso em N₂(I) (remoção parcial de CO₂ e remoção total de água). A segunda armadilha, também chamada de pré-coluna, consistiu em um tubo de aço inoxidável (20cm de comprimento X 3.18cm de diâmetro) preenchido com resina polimérica Hayesep-D submerso em um banho de N₂(I)/n-pentano (-130°C). A resina Hayesep-D absorveu CH_4 quantitativa e preferencialmente. Durante 900 segundos, um fluxo de He removeu o N2 e o O2 da amostra enquanto o CH4 foi adsorvido na segunda armadilha. Posteriormente, para crio-focalizar, a segunda armadilha foi aquecida e o CH₄ foi transferido até uma alça de 70 cm de coluna PoraPLOT-Q através de um fluxo de He de 2.6 mL/min. Esta coluna foi inserida em um tubo de aço inoxidável de 1.59 mm de diâmetro, o qual também estava submerso num banho de $N_2(I)/n$ -pentano. Finalmente, o CH₄ foi liberado e transferido para o CG, quando a última armadilha foi retirada do banho. A coluna PoraPLOT-Q (25m X 0.32m), instalada no CG, permitiu a separação de CH₄ dos outros gases traço residuais (N₂, O₂, Ar, CO₂, CO, outros hidrocarbonetos, etc.) que não foram completamente removidos no dispositivo pré-concentrador. O efluente da coluna passou através de um forno de combustão de alumina contendo CuO, NiO e fios de Pt (960°C) que oxidou todo o CH₄ à CO₂. O dispositivo usado por Rice et al., 2001, também funcionava com um forno de pirólise (1450°C) para produzir H₂ e realizar a análise de δD. Após a remoção da água (resultante da oxidação) por uma membrana de Nafion, a amostra foi introduzida no sistema EMRI através de uma fenda aberta (open split). Os níveis de precisão analítica atingida foram de 0.05% para o δ^{13} C e 1.5‰ para o δ D.



Figura 10 Vista esquemática do sistema para determinação de δ^{13} C e δ D em metano atmosférico (Rice *et al.*, 2001).

Rice *et al.*, 2003, aplicaram este sistema (Figura 10) no estudo da composição isotópica de metano estratosférico e troposférico para modelar o fracionamento isotópico do metano em processos de oxidação pela reação com OH, CI e O(¹D). A aplicação do modelo de Rayleigh permitiu a estimativa de uma série de fatores de fracionamento na estratosfera.

Miller *et al.*, 2002, introduziram uma armadilha de pré-concentração com resfriamento automático. O desenho da armadilha é demonstrado na Figura 11. Novamente, a etapa de pré-concentração consistiu em isolar o metano sobre um substrato enquanto o N₂, O₂ e Ar foram expulsos pelo respiradouro. O dispositivo pré-concentrador consistiu em uma coluna de aço inoxidável de 20 cm de comprimento e 1/8"de diâmetro preenchida com 4cm de Hayesep D seguido de 5cm de pérolas de vidro e 1cm de fibra de vidro em cada lado. A coluna foi mantida a -120°C por um condutor solenóide que controlava a temperatura do N₂ líquido que rodeava a coluna de pré-concentração. A temperatura foi monitorada usando um termopar.



Figura 11 Armadilha de pré-concentração automática (Miller et al., 2002).

O metano eluído do sistema de pré-concentração foi crio-focalizado a uma de temperatura de -150°C através de um capilar de sílica fundida de 0.32mm de diâmetro e em seguida foi introduzido em uma coluna analítica de peneira molecular de 5A (Molecular Sieve 5Å, 25m X 0.32mm). Os autores comprovaram que esta coluna separava com maior eficiência o ar do CH₄ e que permitia crio-focalizar com um menor comprimento de coluna (pela forte retenção do metano). Os compostos separados pela coluna entravam em um reator de combustão (1150°C) no qual seis fios de NiO foram usados como substrato de oxigênio e dois fios de Pt cumpriam a função catalisadora. O CO₂ produzido no reator foi transferido até o espectrômetro de massas onde foi ionizado e os sinais para m/z= 44, 45 e 46 foram simultaneamente monitorados.

38

Seguindo os princípios desenvolvidos por Merritt *et al.*, 1995, e sistemas similares descritos por Behrens *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2002, e Rice *et al.*, 2001, Brass e Röckmann, 2010, introduziram um sistema *online* para análise de metano em pequenas amostras de ar.

O metano da amostra foi armazenado em uma alça e foi isolado de outros componentes mediante um processo de pré-concentração, focalização criogênica e separação cromatográfica. O metano obtido foi oxidado até CO₂ ou pirolisado até H₂ e foi injetado no sistema EMRI para determinar sua composição isotópica. Três fluxos de He purgavam continuamente o sistema, além da injeção de O₂ e CH₄ através das válvulas SGE para condicionar os fornos. Foram usadas três válvulas Valco que direcionavam os fluxos através do sistema, a válvula 1 foi usada para formar a alça (loop) da amostra gasosa (no modo load) e para injetar a amostra na unidade de pré-concentração (no modo inject), a válvula 2 permanecia no modo load durante a pré-concentração até a liberação do CH₄ concentrado e a válvula 3 foi usada para transferir seletivamente o CH₄ (que foi separado na coluna do GC) até o sistema de combustão ou pirólises. Neste sistema, ilustrado na Figura 12, novamente, a unidade pré-concentradora foi formada por tubo de aço inoxidável preenchido no centro com resina HayeSep D fixada por fibra de vidro em ambos lados. Esta armadilha, quando submetida a temperaturas próximas a -130°C, captura o metano da amostra deixando passar componentes como O2 e N2. Quando estes gases foram retirados, o metano foi liberado da armadilha a uma temperatura próxima de -85°C. Esta temperatura permite que o CH₄ seja liberado enquanto o CO₂, a água e outros condensáveis continuam sendo retidos. Este sistema evitou o uso de armadilhas químicas na fase de pré-concentracão. Quando o metano foi transferido completamente para ser crio-focalizado (-150°C), a válvula 2 retornou à posição *load* e um fluxo de He de 20 mL/min retirou do sistema o CO₂, a água e outros condensáveis retidos. Enquanto este fluxo de He limpava o sistema, a armadilha de Hayesep foi aquecida até 70°C e ocasionalmente precisava um aquecimento por várias horas a 150°C. Este aquecimento controlado da unidade de pré-concentração foi atingido mediante um desenho especial da armadilha e é demonstrado na Figura 13. As duas unidades demonstradas usam nitrogênio líquido e os aumentos de temperatura são atingidos através de resistências elétricas.

A separação foi feita mediante uma coluna PoraPLOT Q (25m X 0.32mm) e na combustão foi usado um forno de alumina contendo fios de Ni (1130°C). Com este sistema foram atingidas reprodutibilidades de ±0.07‰ para δ^{13} C e ±2.3‰ para δ D em análise de metano atmosférico.



Figura 12 Sistema *online* para análise isotópica de C₁ desenvolvido por Brass et al., 2010.





Nos estudos sobre emissões históricas de metano, Sowers *et al.*, 2005, apresentaram registros de δ^{13} C de metano em ar preso em núcleos de gelo,

empregando dois tipos de dispositivos de pré-concentração baseados nos princípios já vistos. Isto é, a amostra de gás é introduzida em três armadilhas desenhadas para pré-concentrar CH₄ e remover gases interferentes, uma coluna PoraPLOT-Q faz a separação dos gases crio-focalizados, o metano eluído é oxidado em um forno de combustão e o CO₂ previamente seco é direcionado até o equipamento de EMRI.

No primeiro sistema, a amostra de ar foi expandida em uma alça préevacuada de 150 mL e, carreada por He (70 mL/min), passou através de uma coluna de HaySep D (20 cm de comprimento, 0.32cm de diâmetro, 80/100 de poro) submersa num banho a -130°C. Esta coluna capturou CH₄ e CO₂ enquanto os outros gases foram liberados. A válvula Valco foi ativada antes que a coluna HayeSep D fora aquecida a 50°C para liberar o CH₄ e outros gases condensáveis. O metano e CO₂ foram crio-focalizados em uma coluna capilar PoraPLOT-Q (3m X 0.32mm) a -130°C e finalmente, foram liberados (por aquecimento a 50°C) e direcionados até uma coluna PoraPLOT-Q de 30 m onde o CH₄ foi separado do CO₂ e do N₂O. O CH₄ separado na coluna entrou no forno de combustão (Ni, Pt e Cu a 980°C), onde foi oxidado até CO₂. O fluxo de amostra, em seguida, passou por um forno de redução para remover N₂O e O₂. O CO₂ produzido foi direcionado até o sistema EMRI após a secagem através de uma membrana de Nafion.

O segundo dispositivo consistiu em um equipamento tipo PreCon modificado. Inicialmente a amostra de ar foi inserida no sistema de injeção do equipamento e as conexões foram varridas com um fluxo de He (15 mL/min) por 3 min antes que as válvulas do sistema foram abertas. Um fluxo de He de 30 mL/min arrastou a amostra através de uma armadilha de água e de CO₂ $(Ascarite e Mg(ClO_4)_2)$ e através de uma armadilha (T1) submersa em nitrogênio liquido (para capturar N₂O). O ar e o metano passaram pela armadilha (T2) a uma temperatura de -130°C (submersa em banho de n-pentano/N₂ líquido), onde o metano foi capturado sobre uma coluna (10cm X 0.32cm) preenchida com a resina HaySep D. O sistema de injeção e frasco da amostra foram varridos durante 1400s para garantir a captura quantitativa do CH₄ na armadilha T2. As válvulas Valco 1 e 2 foram acionadas para que o metano fosse transferido da armadilha T2 à armadilha T3 que continha 1 m de coluna PoraPlot (0.32mm de diâmetro) submersa em um banho de n-pentano/N₂ líquido (-130°C). Após 500s, a armadilha T3 foi removida do banho mobilizando o CH₄ que seria separado dos outros gases (ou impurezas) na coluna PoraPlot-Q restante, antes de entrar no forno de oxidação (fios de Ni, 1050°C) para conversão quantitativa em CO₂. Para remover a água produzida no forno, o efluente passou através de uma membrana de Nafion submersa em um banho a -60°C, antes de entrar no sistema de EMRI. A figura 14 demonstra este sistema PreCon modificado.



Figura 14 Esquema do dispositivo PreCon modificado usado por Sowers *et al.*, 2005.

Ferretti *et al.*, 2005, reportaram a introdução atmosférica de metano (com sua composição isotópica) dos últimos 2000 anos mediante a análise do metano coletado em amostras de gelo da Antártica. Outra reconstrução sobre a composição histórica de metano na atmosfera, também analisando gases presos em núcleos de gelo, foi feita por Behrens *et al.*, 2008. O equipamento usado consistiu em um dispositivo PreCon modificado com uma interface de combustão acoplada a um sistema de EMRI, a figura 15 demonstra o sistema de extração e pré-concentração de CH₄ usado.

Inicialmente o fluxo de He passou através de um purificador de gás que removeu H_2O , O_2 , CO_2 e CO. Posteriormente, o gás carreador passou através de uma armadilha de aço inoxidável (preenchida com HayeSep D), submersa em $N_2(I)$, que removeu traços de CH₄ e outros hidrocarbonetos. Uma amostra de

200g de gelo foi inserida em um frasco, após, o ar do ambiente foi evacuado mediante uma bomba de alto vácuo (1 h, -10°C). As conexões e válvulas manuais do frasco foram purgadas com um fluxo de He de 10 mL/min por 30 min enquanto a amostra foi fundida num banho de água (20-40°C). Após a fusão, o banho de água foi trocado por um banho frio para manter a temperatura a 0°C. Para igualar a pressão do frasco com a pressão do sistema de préconcentração, a válvula 2 e a válvula de injeção foram acionadas para que o fluxo de He entrasse no frasco. A seguir, a válvula de injeção do frasco foi fechada e a válvula 2 foi alternada para esfriar a armadilha de CO_2 e CH_4 . Com as válvulas manuais do frasco abertas, um capilar de aco inoxidável borbulhou He através da amostra fundida. O vapor de água do fluxo de He (que vinha do frasco) foi removido por uma membrana de Nafion resfriada a -25°C. O CO₂, N₂O e resíduos de água foram capturados em uma armadilha de 1/8"de aço inoxidável (com fios de Ni para aumentar a área superficial e melhorar a adsorção), submersa em N₂(I). O CH₄ foi retido na seguinte armadilha de aço inoxidável preenchida com HayeSep D, mantida a -140°C (a temperatura é verificada mediante um termopar). A válvula 3 ligou a armadilha de HayeSep com o CG, enquanto a maioria de hidrocarbonetos não metano foram liberados pelo respiradouro desta válvula.

A armadilha de Hayesep foi retirada do banho frio, enquanto a armadilha de crio-focalização permaneceu a temperatura ambiente permitindo que o N_2 e O_2 fossem expulsos da armadilha de HayeSep antes da crio-focalização do metano. O metano foi crio-focalizado sobre 1 m de coluna CP-Porabond-Q submersa em $N_2(I)$ por 10 minutos, passada esta etapa, a última armadilha foi aquecida para liberar o CH₄ e introduzir os gases no CG onde foram separados por uma coluna CarbonPLOT (30m X 0.32mm).

Após a separação no CG a 30°C, o metano e gases residuais foram oxidados a 940°C em um tubo de micro-oxidação de AI_2O_3 que continha fios de CuO, NiO e Pt. A água resultante da oxidação foi removida por uma segunda membrana de Nafion, e o CO₂ produzido a partir de CH₄ foi transferido até o espectrômetro de massas convencionalmente (*open split*). O forno foi reoxidado semanalmente mediante o fluxo de 0.5mL/min de O₂ por 2h a 940°C.



Figura 15 Esquema do sistema PreCon-CG-EMRI usado por Behrens *et al.*, 2008 na análise de δ^{13} CH₄ em gás preso em núcleos de gelo.

Fisher *et al.*, 2006, descreveram um sistema em linha (Figura 16) para análise da razão δ^{13} C de CH₄ ou das razões δ^{13} C e δ^{18} O de CO₂. Durante a análise de metano, 20 mL/min de He transportaram a amostra gasosa através de armadilhas de perclorato de magnésio e de Carbosorb para remover água e CO₂. Armadilhas adicionais de Carbosorb garantiram que o fluxo de He fosse livre de CO₂. A amostra passou através de um catalisador (Sofnocat) para oxidar o CO presente e o CO₂ produzido foi coletado em uma armadilha de níquel submersa em N₂(I). A oxidação, crio-focalização e determinação isotópica ocorreram convencionalmente. Neste estudo foram testados diferentes reatores (Pt/NiCr/Cu, Pt, Pd) e diferentes temperaturas de combustão (960°C, 800°C, 790°C).



Figura 16 Esquema do pré-concentrador de CH₄ usado por Fisher et al., 2006

Melton *et al.*, 2011, incluíram algumas modificações interessantes no sistema convencional de análise de δ^{13} CH₄ em gás trapeado em gelo. Mediante uma armadilha pós-combustão a amplitude do sinal do metano aumentou, a razão sinal/ruído diminuiu e a precisão analítica atingida foi de ±0.3‰. Igualmente foram empregadas duas armadilhas para a remoção de CO e o fluxo de He da linha foi purificado através de uma coluna de Hayesep-D (em N₂(I)). Na figura 17 é demonstrado o sistema usado.



Figura 17 Sistema analítico usado por Melton et al., 2011.

O gás extraído do núcleo de gelo passou através de uma armadilha de água (tubo de aço inoxidável oco mantido a -70°C) e após a secagem passou por duas armadilhas de CO (catalizador de Pd, Pt, Sn SofnocatTM 514 e I₂O₅ suportado sobre sílica gel conhecido como reagente Schütze). O gás foi direcionado por uma válvula Valco de 6-vias até uma armadilha de préconcentração de CO₂ e CH₄ (tubo de aço de 10cm de comprimento e 3 mm de diâmetro preenchido com Hayesep-D mantido a -125°C). O CO₂ que também é retido pela resina Hayesep-D pode interferir na análise posterior do metano, devido a isto, foi removido pela passagem através de um capilar submerso em N₂(I). Após a passagem pela armadilha de CO₂, o metano foi direcionado por uma segunda válvula de 6-vias até um sistema de crio-focalização (coluna GSQ®PLOT, 10cm X 0.32mm submersa em N₂(I)). Para separar o metano coletado dos outros gases traço (CO, CO₂, N₂, O₂, SO₂, N₂O, etc.) foram usadas duas colunas cromatográficas com um sistema de combustão entre elas. A primeira coluna (GSQ®PLOT, 30m X 0.53mm) foi mantida em isoterma à temperatura ambiente para separar o CH₄ do CO, e CO₂. Após a primeira coluna, a amostra gasosa passou através de um forno de micro-combustão com fios de Ni e Pt (1080°C) e a água produzida durante a combustão foi removida por uma membrana de 15 cm de Nafion®. Os gases pós-combustão foram criofocalizados em uma armadilha submersa em N₂(I) para aumentar o sinal do metano, obter picos bem definidos e diminuir a razão sinal ruído. Para separar o CO₂ derivado do metano do N₂O o gás crio-focalizado passou através de uma segunda coluna (GSQ Poraplot®, 30m X 0,53mm) mantida a temperatura ambiente. Posterior à separação cromatográfica o CO₂ foi introduzido na fonte do sistema de EMRI.

Pré-concentração criogênica, separação cromatográfica e combustão em linha acoplada ao sistema de EMRI, tem sido técnicas empregadas na análise isotópica de outros hidrocarbonetos diferentes do metano. Baylis *et al.*, 1994, estudaram diferentes colunas cromatográficas tipo PLOT para analisar os componentes C_1 - C_5 de amostras de gás natural. Foram testadas as colunas Alumina-KCI, Carbowax GC2 e a PoraplotQ sendo esta última a mais apropriada, com uma precisão analítica <0.2‰ e um comportamento linear para metano, etano e CO_2 .

Rudolph *et al.*, 1997, desenvolveram um método para determinação de δ^{13} C de compostos orgânicos voláteis (VOC) em ar em níveis ppb. A composição isotópica dos VOC depende da composição das fontes e do fracionamento isotópico devido à reação de remoção do radical hidroxila (OH·). Drierita e Carbosorb foram usados como armadilhas químicas para remover água e CO₂. Os VOC foram separados por uma coluna PoraPLOT a 35°C por 10 min e uma rampa de 2°C/min até 200°C. O efluente da coluna foi oxidado por um reator de cerâmica contendo um fio de Ni-Cu-Pt a uma temperatura de 960°C. O CO₂ produzido foi introduzido na fonte de ionização do sistema de EMRI onde foi analisado.

A composição isotópica de CH₃Cl, CH₃Br e hidrocarbonetos saturados (C₂-C₅) em amostras de gás de exaustor (produto da queima de biomassa), foi determinada mediante uma técnica de subtração seletiva com o reagente Schütze (I₂O₅), que remove os hidrocarbonetos insaturados presentes. A Figura 18 demonstra este sistema analítico usado por Komatsu *et al.*, 2005. A amostra gasosa foi introduzida na linha de vácuo e os componentes entraram em uma armadilha preenchida com lã de quartzo e submersa em N₂(I). A armadilha de pré-concentração foi aquecida até 80°C enquanto foi varrida com um fluxo de He (previamente purificado mediante a passagem através de uma coluna Molecular Sieve 5Å submersa em N₂(I)). Os hidrocarbonetos mais o CH₃CI e o CH₃Br, liberados da primeira armadilha, passaram por uma segunda armadilha que consistiu em um tubo de aço inoxidável (15cm X 1mm) submerso igualmente em N₂(I). A maioria do CO₂ e da umidade foram removidas através de uma coluna (20cm X 4mm) preenchida com Mg(CIO₄)₂ e Ascarite II localizada entre as duas armadilhas. Os hidrocarbonetos insaturados foram retirados, antes da segunda armadilha, passando através de uma coluna (20cm X 4mm) preenchida com I₂O₅ acidificado com H₂SO₄ e suportado sobre sílica gel. O efeito do reagente de Schütze foi avaliado mediante a sua remoção facilitada pela presença de uma válvula de 6-vias.

O gás coletado na segunda armadilha foi liberado retirando a armadilha do banho e aquecendo até 80°C sob um fluxo de He de 1.5 mL/min. Os gases analitos foram injetados em uma coluna capilar CP-PoraBOND-Q (50m X 0.32mm) e foram separados mediante uma programação de temperatura (25°C por 14 min, 0.5-4°C/min até 250°C). Os efluentes foram quantitativamente oxidados em um forno de combustão (CuO/Pt, 960°C) e introduzidos no equipamento de EMRI.



Figura 18 Esquema do sistema analítico usado por Komatsu et al., 2005.

Pesquisas sobre a variabilidade isotópica de gases hidrocarbonetos (C_1 - C_5) em lama vulcânica, foram feitas por Stadnitskaia *et al.*, 2006, usando um sistema de pré-concentração. Este estudo facilitou a caracterização geoquímica dos gases em relação as suas fontes e permitiu determinar os efeitos devidos a

migração, mistura e alteração microbiana. O metano foi separado mediante uma coluna preenchida com a resina Molecular Sieve 5Å, os alcanos C_2 - C_5 foram crio-gênicamente enriquecidos (coletados em $N_2(I)$) e separados em uma coluna Poraplot-Q. Após a separação cromatográfica os gases foram analisados em um sistema de EMRI.

Huiban et al., 2009, desenvolveram uma técnica analítica para analisar a composição isotópica de hidrocarbonetos C1-C5 em baixa concentração. A pré-concentração técnica de consistiu em uma coleta seletiva de hidrocarbonetos sobre uma fase adsorvente, enquanto foram removidos outros gases (N₂, O₂, Ar, etc.). Em uma segunda etapa, os alcanos coletados foram dessorvidos, liberados e focalizados até o sistema CG-EMRI onde ocorreu a separação cromatográfica e a determinação da razão isotópica. O sistema usado aparece demonstrado na Figura 19 e consiste em uma linha de vácuo em aco inoxidável equipada com válvulas de múltiplas vias, armadilhas, medidores de pressão e fluxômetros.



Figura 19 Esquema detalhado do sistema de pré-concentração usado por Huiban et al., 2009

Na primeira etapa o sistema foi evacuado (10⁻⁴ mbar) mediante um arranjo de bombas, na segunda etapa a amostra ou gás de referência foram injetados

controlando a pressão, na terceira a amostra foi carregada sobre uma alça de aço inoxidável de 25 mL com um fluxo de He de 50 mL/min. Na quarta etapa, através de uma válvula de 6-vias, o fluxo de He carregou o gás até um tubo de aço inoxidável de 20 cm em forma de U, preenchido com resina Hayesep Q, submerso em um banho de n-pentano / N₂(I) a -115°C. Nesta temperatura os hidrocarbonetos e o CO₂ foram coletados por dez minutos enquanto outros gases (Ar, He, N₂, O₂) foram liberados. Na quinta etapa, a armadilha de Hayesep foi aquecida (75°C) em um banho de água para liberar o gás trapeado e um fluxo de He (2 mL/min) carregou os analitos até uma alça de coluna capilar GSQ[™] submersa em N₂(I). Na última etapa, a coluna GSQ foi aquecida em um banho de água (75°C) e o gás amostra foi crio-focalizado e direcionado até o sistema CG-EMRI. A separação dos gases foi feita com auxilio de uma coluna capilar GSQ[™] (30m X 0.32mm) e a temperatura de combustão usada foi 950°C. Neste estudo foi atingida uma precisão analítica de ±0.2‰ até 1.5‰ para concentrações de hidrocarbonetos menores que 1ppm.

O interesse no ciclo atmosférico do carbono tem sido intensificado como resposta aos estudos recentes sobre mudanças climáticas. As pesquisas têm sido orientadas no estudo de fontes e sumidouros de CO2 em diferentes ecossistemas. O uso potencial das razões isotópicas do CO₂ (¹³C/¹²C, ¹⁸O/¹⁶O), em estudos sobre os processos atmosfera-biosfera de diferentes ecossistemas, tem sido vislumbrado como uma ferramenta poderosa para pesquisas sobre o ciclo do carbono, particularmente para distinguir os diferentes fluxos dentro dos ecossistemas, para quantificar a contribuição das fontes com diferente composição isotópica, e para compreender melhor fenômenos de fracionamento em processos de respiração e fotossínteses. Assim, a concentração e razão isotópica do CO₂ fornecem um dos sinais mais importantes para quantificar as interações ecossistema-atmosfera. Seguindo esta linha de pesquisa, Ehleringerger e Cook (1998), iniciaram estudos sobre o processo de respiração de coníferas, empregando um dispositivo PreCon para analisar as razões ¹³C/¹²C e ¹⁸O/¹⁶O em amostras de ar de pequeno tamanho (50-300µL). Neste estudo foram comparadas as técnicas de fluxo contínuo e injeção dupla (com extração externa), onde a análise de CO₂ foi feita mediante pré-concentração criogênica e o CO₂ coletado foi separado do N₂O por uma coluna Poraplot (25m, 25°C).

Na linha de estudos atmosféricos, muitos pesquisadores tem se dedicado a analisar o gás trapeado nos núcleos de gelo procedentes dos pólos. O objetivo destas pesquisas tem sido descrever a composição atmosférica de épocas préindustrializadas para avaliar o efeito das descargas antropogênicas posteriores e atuais. Levenberger *et al.*, 2003, analisaram o δ^{13} CO₂ em amostras pequenas de gelo (10 cm³) através de uma técnica especial de extração em linha, o sistema usado é ilustrado na Figura 20. Nesta técnica, uma amostra de gelo foi inserida em uma câmara que possui uma lâmina com agulhas de aço inoxidável que trituram o gelo a uma pressão de 10⁻⁵ mbar. O ar extraído na câmara passou através de uma armadilha de água (-70°C) e foi expandido a um volume maior (700 mL). Posteriormente, a amostra foi carreada por um fluxo alto de He através de uma segunda armadilha (-115°C) e de um capilar de 12 m até o dispositivo de pré-concentração. No PreCon utilizado nesta aplicação somente foram usadas duas armadilhas criogênicas, uma para coletar o CO₂ da amostra e outra para crio-focalizar o CO₂. O CO₂ separado foi liberado em um fluxo baixo de He e foi direcionado até o sistema de EMRI.



Figura 20 Esquema do sistema analítico usado por Levenberger *et al.*, 2003, a) extração em linha, b) pré-concentrador acoplado ao EMRI.

Theis *et al.*, 2004, desenvolveram um amostrador de ar (ASA) automático e portátil capaz de coletar 33 amostras para análise isotópica de gases traço (CO, CO₂ e CH₄). O amostrador ligado ao dispositivo PreCon está composto de 3 válvulas de múltiplas vias, cada uma com 11 amostras. No sistema (Figura 21), a amostra de gás foi carreada por um fluxo de 50 mL/min de He por 380 segundos e foi crio-focalizada em nitrogênio líquido através de uma válvula Valvo de 6-vias. A separação cromatográfica e a análise isotópica no sistema de EMRI levaram mais 640s, no entanto, uma segunda amostra foi injetada 380 segundos antes de concluir a primeira análise. Na análise de monóxido de carbono, o CO foi separado dos outros gases usando Carbosorb e uma armadilha submersa em N₂(I). A oxidação foi feita com o reagente Schütze e o CO_2 produto foi analisado no dispositivo de EMRI correspondente. Neste sistema o metano foi analisado convencionalmente com oxidação em reator de combustão (1050°C). Posteriormente, Zeeman *et al.*, 2008, refinaram a unidade ASA, re-configuraram a programação analítica, automatizaram o refil de nitrogênio líquido no sistema, e introduziram o uso do dispositivo Gasbench para omitir o emprego do PreCon na análise de δ^{13} C de CO₂ em ar atmosférico. Estas modificações aumentaram a precisão da metodologia (<0.1‰) e diminuíram os tempos de análise (~600s).



Figura 21 a) PreCon modificado por Theis et al., 2004. b) Amostrador de ar ASA.

O CO é importante na química atmosférica por ser considerado o principal sumidouro de radicais hidroxila (OH•), e por afetar a capacidade oxidante da atmosfera. As razões isotópicas (δ^{13} C e δ^{18} O) do CO atmosférico fornecem informações valiosas sobre a contribuição de diferentes fontes e permitem estimar os efeitos de fontes e sumidouros. Um sistema de coleta criogênica de alta eficiência *off-line* para análise de CO atmosférico foi introduzido por Huff *et al.*, 1997. Cilindros preenchidos com pérolas de vidro, submersos em N₂(I), serviram como armadilhas do CO₂ (produto da oxidação do CO com o reagente I₂O₅). Mak e Yang, 1998, empregaram um dispositivo pré-concentrador para analisar δ^{13} C e δ^{18} O em CO atmosférico (EMRI com fluxo contínuo) e compararam seus resultados com a técnica convencional (dupla injeção). A

amostra de ar (5 mL/min) foi carreada por um fluxo de He (10 mL/min) através de uma armadilha, submersa N₂(I), que capturou CO₂, H₂O, N₂O e outras espécies condensáveis. O CO purificado foi oxidado quantitativamente mediante o reagente Schütze instalado em um tubo entre a armadilha T1 e a válvula Valco de 6-vias (para proteger o reagente durante a purga do sistema foi instalado um *bypass*). O CO₂ derivado do CO foi coletado criogenicamente na armadilha T2 por 1200s e posteriormente a válvula de 6-vias foi acionada para purgar o sistema por 400s. O CO₂ concentrado foi crio-focalizado na armadilha T3 por 340s e foi dirigido até a coluna do CG (Poraplot Q, 25m X 0.25mm) por um fluxo de 1.3 mL/min. A coluna separou o CO₂ de outras espécies interferentes e aumentou o percurso para que o tempo do pulso de CO₂ não fosse muito pequeno. A Figura 22 demonstra este sistema.



Figura 22 Sistema analítico para determinação isotópica de CO em linha (Mak *et al.*, 1998).

Wang e Mak, 2010, analisaram núcleos de gelo da Antarctica usando um sistema de extração criogênica em vácuo, para estimar fontes de CO anteriores aos períodos industrializados. O novo sistema é um refinamento da montagem do Mak e Yang, 1998, acoplando um sistema de extração úmida (para amostras de gelo) com um sistema de pré-concentração criogênica em vácuo. A extração de CO envolve os processos já descritos, a) limpeza em duas armadilhas, b) oxidação química, c) coleta e crio-focalização do CO₂ formado, d) purificação no

CG e e) injeção no sistema de EMRI. A figura 23 demonstra este sistema analítico correspondente a um dispositivo PreCon modificado.



Figura 23 Sistema usado na análise isotópica de CO trapeado em gelo por Wang et al., 2010.

O N₂O é um gás traço importante na atmosfera devido a seu potencial como gás de efeito estufa (com um tempo de residência alto) e por controlar a concentração de ozônio na estratosfera através da produção de óxido nítrico. E sabido que a maior fonte de N2O é a produção microbiológica em solos naturais e fertilizados, no entanto, contribuições relativas ao processo de nitrificação e desnitrificação são ainda pouco conhecidas. A medição da abundância isotópica das espécies estáveis ¹⁵N e ¹⁸O é uma ferramenta útil para estimar a origem e os mecanismos de consumo e produção de gás, além de facilitar o esclarecimento do ciclo geoquímico do N₂O e do nitrogênio. Cliff e Thiemens, 1994, e Huff et al., 1997, desenvolveram sistemas de coleta criogênica de alta eficiência off-line para análise de N₂O atmosférico. Lauf e Gebauer, 1998, testaram diferentes fornos de oxidação e redução na análise isotópica on-line de NH₃, NO e NO₂. Yoshida e Toyoda, 2000, reportaram as primeiras pesquisas sobre a distribuição intra-molecular do isótopo 15 N na molécula N $_2$ O e sua variação através da atmosfera. O conhecimento desta distribuição permitiu prever possíveis fontes de emissão, avaliar fenômenos de fracionamento por efeito fotoquímico e quantificar a descarga e os sumidouros de N2O. A figura 24a demonstra o sistema PreCon usado na análise de N2O (sem usar o forno de combustão do dispositivo). O N₂O foi pré-concentrado e purificado através da unidade de préconcentração e do CG, entrou na câmara de ionização do espectrômetro de massas com um fluxo contínuo de He e os íons fragmentados foram monitorados por um sistema multicoletor.



Figura 24 Sistemas de pré-concentração de N₂O. a) Sistema usado por Yoshida *et al.*, 2000. b) Sistema usado por Toyoda *et al.*, 2005.

Toyoda *et al.*, 2005, reportaram as primeiras medidas precisas da preferência pelo isótopo ¹⁵N (diferença na razão isotópica entre N^{α} e N^{β}) em N₂O produzido por duas espécies de bactérias denitrificadoras, *Pseudomonas fluorescens* e *Paracoccus denitrificans*. A concentração e razão de isotopómeros de N₂O foram medidas em um sistema analítico em linha composto de uma linha de injeção, um CG com detector de captura eletrônica (DCE), uma unidade de

pré-concentração modificada (PreCon), e um CG acoplado a um espectrômetro de massas (Figura 24b). Os frascos de incubação foram ligados a uma linha de vácuo de aco inoxidável, a fase líquida foi congelada (em N₂(I)) e uma alíquota de fase gasosa foi introduzida no sistema. Para realizar a quantificação foram injetados de 0.1 a 7 mL de amostra (dependendo da concentração esperada) na pré-coluna (1 m de tubo de aço inoxidável preenchido com Porapak Q) mantida a 70°C por um fluxo de 40 mL/min de N₂. Após a separação da água e outros componentes menos voláteis, o N₂O foi purificado na coluna principal (2 m de tubo preenchido com sílica Unibeads C) a 70°C enquanto a pré-coluna foi purgada com N₂. Para analisar a composição isotópica, foram medidos 0.2-100 mL de amostra na linha de vácuo e foram evacuados na armadilha de préconcentração (40 cm de tubo de aço inoxidável preenchido com Flusin GH de 60/80 de poro) submersa em N₂(I). Os gases coletados foram transferidos até a pré-coluna (1.5 m de tubo de aço inoxidável preenchido com sílica gel) por um fluxo de He de 20 mL/min. Os analitos eluidos foram processados em uma unidade PreCon modificada, onde a água e o CO₂ foram removidos por uma armadilha química (30 cm de tubo de vidro de 10 mm de diâmetro, preenchido com Mg(ClO₄)₂ suportado em NaOH e Ascarite) e o N₂O foi crio-focalizado em uma alça submersa em N₂ líquido. Finalmente, o N₂O foi separado e purificado em uma coluna capilar (PoraPLOT Q, 30m) a 27°C e foi introduzido no sistema de EMRI.

O Nitrato (NO₃⁻) é a forma predominante de nitrogênio bio-disponível nos oceanos, assim o conhecimento sobre suas variações isotópicas é uma ferramenta importante nos estudos sobre o ciclo do nitrogênio. Dependendo do ambiente, a razão ¹⁵N/¹⁴N de nitrato em água do mar fornece informação sobre a maioria das transformações que sofre o nitrogênio no oceano, incluindo fixação de N₂, absorção do nitrogênio fixado pelo fito-plâncton, nitrificação e desnitrificação. Sigman *et al.*, 2001, descreveram um método para medir a composição isotópica de nitrato em água do mar, baseado na análise do N₂O produzido por uma bactéria denitrificante (*Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aureofaciens*). Este método aproveita a ocorrência natural de bactérias desnitrificantes que carecem da N₂O-reductase, que é a enzima que reduz o N₂O até N₂. Foram usadas duas técnicas de análise, na primeira foi usado um dispositivo completamente automático para extração, purificação e análise isotópica do N₂O (GasBench modificado). O sistema de extração manual

de N₂O (Figura 25) foi purgado com He a 80 mL/min por 5 min antes de cada extração, através de uma válvula manual que permitiu a purga de agulhas, armadilha de água e armadilha de N₂O. Durante a extração de uma amostra, a armadilha em forma de U (preenchida de pérolas de vidro) foi submersa em N₂(I), o fluxo foi reduzido até 20 mL/min e a agulha foi inserida no frasco da amostra e submersa na solução. Com este fluxo de He a extração levou 15 minutos e o gás extraído da amostra passou por uma armadilha de água submersa em um banho a -70°C. A válvula manual foi fechada e o He borbulhou no frasco extraindo e transportando o N₂O até o tubo em forma de U. O tubo em forma de U foi removido do banho e foi acoplado em linha ao dispositivo PreCon onde o N₂O foi concentrado, crio-focalizado, e purificado. O sistema de extração foi purgado mediante um fluxo de 80 mL/min de He usando outro tubo em "U".



Figura 25 Sistema de Extração manual usado por Sigman *et al.*, 2001. a) em modo de purga, b) em modo extração.

No estudo feito por Casciotti *et al.*, 2002 foi descrito o funcionamento do dispositivo modificado GasBench II usado para a análise isotópica de ¹⁸O/¹⁶O de nitrato em água do mar.

O método analítico para análise de ¹⁵N/¹⁴N do nitrato em água do mar, descrito por Sigman *et al.*, 2001, baseado na conversão bacteriana (redução) do nitrato a N₂O pode oferecer informação isotópica sobre o oxigênio. Podem ser estimados processos de fracionamento isotópicos devido à perda de oxigênio no nitrato, e também processos de intercâmbio de átomos com a água do mar. Neste sistema, novamente, uma amostra líquida foi submetida a um fluxo de 25 mL/min de He e o gás extraído passou através de uma membrana de Nafion e por uma armadilha química (Ascarite e Mg(ClO₄)₂). Após coletar o N₂O em uma armadilha submersa em N₂(I), um fluxo de 3 mL/min de He crio-focalizou o N₂O mediante uma segunda armadilha submersa em N₂(I). Este fluxo baixo de He transportou o analito até o CG onde ocorreu a separação (mediante uma coluna Poraplot-Q) e o acoplamento com o sistema de EMRI.

As emissões de NO e sua contribuição no ciclo do nitrogênio, foram objeto de estudo dos pesquisadores Lauf e Gebauer, 2001, usando um dispositivo préconcentrador (PreCon modificado) que funciona como sistema de introdução de amostra e como unidade de crio-focalização. O método de determinação de ¹⁵N/¹⁴N para NO em amostras gasosas consistiu em acumular o NO sobre um adsorvente Molecular Sieve de 5Å, realizar dessorção por aquecimento a 350°C, pré-concentrar e crio-focalizar sobre uma matriz de PoraPLOT Q a -196°C, liberar o NO capturado, separar no CG, e reduzir até N₂ para posterior análise isotópica. Neste sistema o gás de arraste foi purificado antes de entrar no dispositivo de pré-concentração mediante uma armadilha de PoraPack S submersa em N₂(I) (remoção de N₂ e O₂).

2.5. Aplicações da análise isotópica de C1-C5

Os isótopos estáveis são traçadores naturais que revelam a origem de gases e são fracionados por processos químicos e físicos, seguindo o principio geral de que isótopos leves apresentam uma maior reatividade química, e são mais móveis do que os isótopos pesados. As composições isotópicas e químicas de um composto podem ser alteradas por múltiplos processos, este fato dificulta a sua interpretação. Neste contexto, vários modelos têm sido desenvolvidos usando correlações empíricas que explicam quantitativamente algumas mudanças isotópicas observadas. Assim, a composição química e isotópica dos C_1 - C_5 permitiu o desenvolvimento de novos conceitos sobre gênese e evolução de hidrocarbonetos. Esses modelos levam em conta a composição isotópica da

2. Revisão Bibliográfica

fonte, a maturidade térmica, o craqueamento primário e secundário, os fenômenos de migração desde as rochas geradoras até as acumulações petrolíferas (Prinzhofer *et al.*, 2000).

Alguns desafios na área de produção de hidrocarbonetos correspondem à estimativa de continuidade do reservatório, caracterização de fenômenos de migração de hidrocarbonetos, determinação de tempos de residência e predição de produção de gases não hidrocarbonetos como CO₂ e N₂. Estes fenômenos têm sido abordados e contornados associando diferentes técnicas, entre elas, a geoquímica orgânica e a modelagem de bacias sedimentares (Rangel e Hernández, 2007). Igualmente, muitas companhias petroleiras tem-se interessado na informação geoquímica que pode ser resgatada durante operações de exploração e perfuração, com o objetivo de entender melhor a gêneses e história de acumulação de hidrocarbonetos (Huiban *et al.*, 2009).

Na área de estudos ambientais, a análise de hidrocarbonetos em solos, águas profundas e superficiais fornece informação sobre atividades com potencial contaminante (indústrias abandonadas, postos de gasolina, áreas próximas a estradas, derrames de petróleo, etc.). A caracterização de hidrocarbonetos desgaseificados, a partir da água intersticial de rochas sedimentares, fornece informação sobre o grau de confinamento em locais de sequestro de gases (Huiban *et al.*, 2009).

2.5.1. Diagnóstigo de Biodegradação

A biodegradação do petróleo e outros hidrocarbonetos no meio ambiente é um processo complexo, cujos aspectos quantitativos e qualitativos dependem do tipo, natureza, e quantidade de óleo ou hidrocarboneto presente, das condições ambientais (como temperatura, oxigênio, nutrientes, salinidade e pH), e da composição da comunidade microbiana autóctone. Os hidrocarbonetos diferem na sua suscetibilidade ao ataque microbiano. Em geral, a degradação de hidrocarbonetos segue a seguinte ordem de suscetibilidade: n-alcanos > alcanos ramificados (isoprenóides) > aromáticos de baixo peso molecular > aromáticos de alto peso molecular e cicloalcanos (Wang e Fingas, 2003, Jones *et al.*, 2008). Já que as bactérias atacam diferentes hidrocarbonetos com base em uma ordem de preferência, o estágio de biodegradação pode ser determinado com base na alteração das diferentes estruturas e classes específicas de compostos (Wenger *et al.*, 2002).

O incremento nos níveis de biodegradação geralmente causa um declínio na qualidade dos óleos, diminuindo a produtividade e seu valor, já que o grau API e o rendimento de destilados diminuem, enquanto a viscosidade, acidez e conteúdo de metais, enxofre e asfaltenos aumentam. Um óleo biodegradado é um óleo pesado que requer tratamento e infraestrutura mais custosos nas etapas de perfuração, extração e produção (Wenger *et al.*, 2002).

O gás natural é suscetível à alteração microbiana (biodegradação), onde a temperatura do subsolo é inferior a 80°C. Em superfícies mais profundas da biosfera, estão envolvidos microrganismos anaeróbicos. Atualmente, as bactérias sulfato redutoras, bicarbonato redutoras e ferro oxi-redutoras têm sido reconhecidas como causadoras de biodegradação de óleos (em ausência de oxigênio). A biodegradação progressiva converte o gás úmido em gás seco mediante a remoção dos C₂₊ (Jones et al., 2008). O mecanismo principal de biodegração anaeróbica de gases úmidos comumente envolve a ativação de carbonos subterminais. Hidrocarbonetos gasosos com carbonos secundários em posições subterminais serão preferencialmente biodegradados comparados com carbonos subterminais terciários ou quaternários. Isto explica a os biodegradação preferencial onde propano > n-butano > n-pentano > iso-pentano > iso-butano >> neo-pentano. O etano, com dois carbonos terminais, demonstra uma forte resistência à biodegradação semelhante à resistência do iso-butano (Boreham et al., 2008).

A biodegradação de gás natural diminui a razão gás:óleo (GOR) e o conteúdo de componentes úmidos, enquanto aumentam a proporção relativa de metano e o conteúdo de CO₂ (como subproduto da oxidação bacteriana). Isto resulta na produção de uma capa de gás (acumulada na parte superior do reservatório) enriquecida em metano (Hosgörmez *et al.*, 2002; Head *et al.*, 2003). Conteúdos elevados de CO₂ podem impactar negativamente o desenvolvimento de poços devido à necessidade de materiais especiais resistentes à corrosão (Wenger *et al.*, 2002). Embora o aumento do CO₂ seja uma consequência da biodegradação, não é uma medida confiável do nível de degradação, já que a concentração é altamente dependente de numerosos processos inorgânicos. No entanto, a composição isotópica do carbono é diagnóstica.

Adicionalmente às mudanças na composição, a degradação bacteriana causa mudanças na razão isotópica δ^{13} C dos componentes individuais do gás. Hidrocarbonetos gasosos exibem um importante fracionamento isotópico durante fenômenos de biodegradação, assim, um incremento na degradação aumenta o enriquecimento em ¹³C. O propano é preferencialmente atacado nas etapas

59

2. Revisão Bibliográfica

iniciais de biodegradação, assim, a diminuição na concentração absoluta é acompanhada pelo fracionamento da composição isotópica. Durante a biodegradação, o propano residual torna-se enriquecido no isótopo pesado ¹³C, enquanto o CO₂ (subproduto) é isotopicamente enriquecido no isótopo leve ¹²C. Estas mudanças isotópicas e de composição são controladas por processos bacterianos e enzimáticos e dependem das energias da ligação C-C. A energia requerida para quebrar a ligação ¹²C-¹²C é menor que aquela necessária para a quebra da ligação ¹³C-¹³C. A intensidade relativa da biodegradação se torna evidente quando a diferença isotópica entre o propano e o n-butano é plotada contra a composição isotópica do propano. Esta tendência resulta do fato do propano ser preferencialmente degradado em relação ao n-butano (Wenger *et al.*, 2002). Outro gráfico útil na estimativa de biodegradação é a razão C₂/C₃ vs. C₂/i-C₄ (Magnier *et al.*, 2004; Rangel e Hernández, 2007).

Mudanças isotópicas na razão do propano, relativa a outros hidrocarbonetos gasosos mais resistentes, ocorrem em reservatórios correspondentes a óleos ligeiramente biodegradados. A diferença nos valores de δ^{13} C entre gases alterados e não alterados está diretamente relacionada com o grau ou extensão da biodegradação (Peters *et al.*, 2005).

As composições isotópicas δ^{13} C e δ D de hidrocarbonetos gasosos são alteradas por processos biológicos favorecendo os isótopos mais leves. Assim, a decomposição de gases úmidos deixa os componentes do gás residual enriquecidos em ¹³C e D. Adicionalmente, introduções de metano biogênico, em gases biodegradados, podem deixar o metano isotopicamente mais leve. No entanto, a introdução de metano biogênico não necessariamente altera a razão δ D. Neste contexto, devido a alta resistência à biodegradação apresentada pelo neo-pentano, Boreham *et al.*, 2008, usaram a concentração e composição isotópica do neo-pentano (neo-C₅) num estudo de gases altamente biodegradados.

2.5.2.

Determinação de maturidade e gênesis de gases: craqueamento primário ou secundário.

No processo de formação de gás e óleo a partir do querogênio são quebradas ligações C-X. Durante a gênese, ligações ¹²C-¹²C são preferencialmente quebradas gerando um enriquecimento no isótopo leve na fase gasosa e um enriquecimento no isótopo pesado no resíduo. Este fenômeno é conhecido como efeito isotópico cinético. A combinação deste efeito com o

modelo de fracionamento de *Rayleigh* tem permitido estimar fontes e maturidade de gases. As equações de *Rayleigh* são usadas na geoquímica para descrever as mudanças da razão isotópica de reagentes e produtos em reações com cinética de primeira ordem. Estas equações são frequentemente usadas em geoquímica para modelar processos de evaporação - condensação e para estimar as mudanças em δ^{13} C durante a fotossíntese (Rooney *et al.*, 1995). Galimov, 2006, descreveu um modelo para geração de metano usando a distribuição de energias de ativação de precurssores de querogênio. Rooney *et al.*, 1995, testaram um modelo para estimar os valores de δ^{13} C para os C₁-C₃, em função da conversão fracionada do querogênio em gás e óleo, correlacionando a conversão fracionada com a temperatura de geração de gás.

A maturidade é um parâmetro de controle em gases hidrocarbonetos que caracteriza o processo de gênesis. Isto é, permite estabelecer se o gás analito é biogênico ou produto de craqueamento primário ou secundário, igualmente associa o gás analito aos diferentes estágios de transformação (diagênese, catagênese, metagênese, metamorfismo). Como a composição isotópica dos gases hidrocarbonetos, gerados termicamente, muda continuamente durante a maturação da respectiva rocha fonte, a razão isotópica dos C₁-C₄ pode ser usada para identificar o grau de maturidade do gás produzido.

Vários diagramas têm sido propostos para distinguir a geração bacteriana da termogênica. O diagrama de *Bernard* (C_1/C_2+C_3 vs. $\delta^{13}C_1$ da Figura 26 a) permite a classificação dos gases segundo sua gênese (Hosgörmez *et al.*, 2002; Prinzhofer e Battani, 2003; Gürgey *et al.*, 2005). Uma composição intermédia é interpretada como um fenômeno de mistura de gases. Prinzhofer e Pernaton, 1997; Hogörmez *et al.*, 2002, usaram o gráfico δD_1 vs. $\delta^{13}C_1$ para distinguir e classificar gases submetidos a processos de migração. Nestes estudos foi possível obter assinaturas ambíguas e gases termogênicos foram vislumbrados como biogênicos ou produtos de mistura. Portanto, processos pós-genéticos (migração) podem alterar uma assinatura termogênica e sugerir erroneamente a origem bacteriana. Uma estimativa mais conclusiva sobre fenômenos secundários pode ser determinada usando o gráfico de mistura C_2/C_1 vs. $\delta^{13}C_1$, demonstrado na Figura 26 b) e c), onde uma linha reta indica mistura com metano bacteriano e fenômenos de difusão apresentam um perfil curvo (Zhang e Krooss, 2001; Prinzhofer e Battani, 2003; Magnier *et al.*, 2004).

61

2. Revisão Bibliográfica



Figura 26 Diagramas para identificar a gêneses de gases e processos de mistura (Prinzhofer *et al.*, 2003)

Rangel e Hernández, 2007, estudaram a maturidade e gêneses de gases mediante a sua composição química e isotópica. A classificação dos gases como úmidos ou secos foi determinada pela concentração dos C_{2+} e pela razão C_1/C_2+C_3 . Usando o diagrama de *Shoell* ($\delta^{13}C_1$ vs. $%C_1$) os gases foram classificados como termogênicos ou biogênicos. O gráfico C_2/C_1 vs. $\delta^{13}C_1$ demonstrou-se útil na interpretação do metano isotopicamente leve (distinção entre mistura com gás biogênico e fracionamento por migração), já que a história geológica dos gases era bem conhecida e pouco complexa (Prinzhofer e Pernaton, 1997; Prinzhofer *et al.*, 2000; Zhang e Krooss, 2001). A maturidade foi avaliada usando o modelo de Whiticar (Whiticar e Shaefer, 2007) que descreve a assinatura isotópica do metano, etano e propano gerados desde querogênio tipo II como uma função da maturidade ($\delta^{13}C_1$ vs. $\delta^{13}C_2$ e $\delta^{13}C_3$ vs. $\delta^{13}C_2$). Para aplicar este modelo é necessário conhecer a composição isotópica do querogênio precursor (Gürgey *et al.*, 2005).

Em sistemas geológicos mais complexos nos quais as fontes de metano são de difícil determinação, a estimativa de maturidade tem sido feita através das composições dos C₂-C₅. Dois gráficos têm sido amplamente utilizados, o primeiro C₂/C₃ vs. C₂/iC₄ (Figura 27a) permite distinguir entre um fenômeno de biodegradação e uma tendência à maturidade, já que em gases com alta maturidade as proporções de i-C₄ diminuem mais rapidamente que as proporções de C₃. Durante processos de biodegradação C₃ e n-C₄ sofrem maior alteração do que o i-C₄ (Prinzhofer *et al.*, 2000; Magnier *et al.*, 2004). O segundo gráfico corresponde ao sistema C₂-C₃ (δ^{13} C₂- δ^{13} C₃ vs. C₂/C₃) que permite estimar a maturidade de gases e suas fontes em termos do craqueamento primário e secundário (Figura 27b) (Prinzhofer *et al.*, 2000; Magnier *et al.*, 2004; Gürgey *et al.*, 2005). Prinzhofer e Hue, 1995, usaram o diagrama δ^{13} C₁- δ^{13} C₃ vs. In (C₁/C₁) para distinguir gases hidrocarbonetos gerados por craqueamento primário dos

gases gerados por craqueamento secundário (mediante o sistema etanopropano).



Figura 27 Diagramas úteis na estimativa de maturidade usando a composição isotópica dos C_{2+} (Prinzhofer *et al.*, 1995)

O diagnóstico do nível de maturidade deve estar igualmente suportado pela geoquímica de biomarcadores e pela reflectância da vitrinita (Ro). (Boreham *et al.*, 2000; Magnier *et al.*, 2004).

2.5.3. Geoquímica de Reservatórios

A continuidade do reservatório pode ser avaliada com informação geológica e geofísica. A perfilagem de poços, os gradientes de pressão, os dados sísmicos, o histórico de produção, etc. fornecem informação útil na estimativa da continuidade. Porém, a geoquímica do reservatório é uma das poucas técnicas que fornece uma direta análise de continuidade. Esta técnica

2.Revisão Bibliográfica

determina a origem de variações na composição dos fluídos contidos nos reservatórios para melhorar as estratégias de exploração, produção e desenvolvimento de campos (Pimentel *et al.*, 2008).

A caracterização de gases traço, a partir de amostras superficiais e de perfuração, fornece dados úteis para desvendar a história geológica de eventos sucessivos em uma bacia com acumulação de hidrocarbonetos (Huiban et al., 2009). O registro isotópico de gases em operações de perfuração é uma técnica que usa a composição isotópica dos gases expelidos durante esta etapa para avaliar o conteúdo de hidrocarbonetos no reservatório. O uso da composição isotópica é justificado já que a concentração de hidrocarbonetos no reservatório pode ser modificada pelo processo de perfuração, enquanto a razão isotópica permanece inalterada. O propósito principal dos registros isotópicos é modelar vertical e horizontalmente o reservatório identificando as possíveis vias de comunicação entre as diferentes formações. Geralmente, a composição isotópica de zonas interligadas é similar, enquanto zonas separadas por barreiras de fluxo diferem nas suas razões isotópicas (Schoell, 1993). As heterogeneidades composicionais na coluna de fluídos em escala lateral sugerem a direção de preenchimento, ou a direção do fluxo de água em campos com óleo biodegradado, ou ainda a presença de grandes barreiras à migração de fluídos no reservatório. Por outro lado, as heterogeneidades verticais sugerem que os reservatórios podem estar verticalmente compartimentados (Pimentel et al., 2008; Schoell, 1993).

Devido a sua natureza conservativa, a composição isotópica de hidrocarbonetos leves pode ser útil na identificação da origem de filtrações de gás na superfície e permite estudar a mistura de gases ocasionada pelo processo de injeção de gás em campos empobrecidos ou abandonados (Schoell, 1993). Gases com um valor de δ^{13} CH₄ muito negativo têm origem bacteriana, enquanto gases com valores menos negativos são gerados a partir de rochas fonte cada vez mais maturas. Um gás biogênico é composto majoritariamente por metano, enquanto gases gerados pela degradação térmica da matéria orgânica possuem maior concentração dos C₂₊. Assim, semelhanças na composição isotópica podem sugerir comunicação entre diferentes poços ou formações além de distinguir poços isolados ou com quantidade significativa de gás biogênico.