



**Flávia Galvão Wandekoken**

**Desenvolvimento de método para a  
quantificação de porfirinas de vanadila em  
frações de petróleo por Cromatografia Líquida  
de Alta Eficiência com Injeção em Fluxo e  
Espectrometria de Massas com Plasma  
Indutivamente Acoplado**

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Tatiana Dillenbourg Saint'Pierre

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Christiane Béatrice Duyck

Rio de Janeiro  
Setembro de 2016



**Flávia Galvão Wandekoken**

**Desenvolvimento de método para a  
quantificação de porfirinas de vanadila em  
frações de petróleo por Cromatografia Líquida  
de Alta Eficiência com Injeção em Fluxo e  
Espectrometria de Massas com Plasma  
Indutivamente Acoplado**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de  
Pós-Graduação em Química da PUC-Rio.  
Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo  
assinada.

**Prof<sup>a</sup>. Tatiana Dillenburg Saint'Pierre**

Orientadora

Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof<sup>a</sup>. Christiane B. Duyck**

Co-orientadora

UFF

**Prof<sup>a</sup> Ângela Wagner**

Departamento de Química - PUC-Rio

**Dr. Flávio Cortiñas Albuquerque**

CENPES

**Prof. José Marcus Godoy**

Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof<sup>a</sup> Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro**

Departamento de Química - UFES

**Prof. José Eugenio Leal**

Coordenador Setorial do Centro

Técnico-Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2016

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

### **Flávia Galvão Wandekoken**

Mestre em Química, com área de atuação em Química Analítica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro em 2011. Graduou-se em Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) em 2008.

#### Ficha Catalográfica

Wandekoken, Flávia Galvão

Desenvolvimento de método para a quantificação de porfirinas de vanadila em frações de petróleo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Injeção em Fluxo e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado / Flávia Galvão Wandekoken; orientadora: Tatiana D. Saint'Pierre; co-orientadora: Christiane B. Duyck – 2016.

186 f.: il. (color.) ; 30 cm

1. Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Química – Teses. 2. Vanádio. 3. Porfirina. 4. Óleo cru. 5. HPLC-FI-ICP-MS. I. Saint'Pierre, Tatiana Dillenburg. II. Duyck, Christiane Béatrice. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. IV. Título.

CDD: 540

Dedico este trabalho aos meus amados pais e em especial à minha filha Maria Clara, que já é muito amada mesmo ainda em meu ventre.

## Agradecimentos

A Deus por minha existência e por permitir que tudo isso acontecesse em minha vida.

Às professoras Tatiana D. Saint’Pierre e Christiane Duyck, pela contribuição em minha formação, orientação, apoio e, principalmente, pelo incentivo, inestimáveis na execução deste trabalho, sem os quais o mesmo não teria sido concluído.

Aos professores que participaram da Comissão Examinadora, por gentilmente aceitarem o convite e prestarem suas contribuições para este trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da PUC-Rio, pela contribuição na minha formação acadêmica;

Ao meu amigo “Jeff”, pela amizade e pela contribuição na execução deste trabalho.

Aos amigos do LABSPECTRO, em especial aos técnicos Izabel, Rafael e Álvaro, por me ajudarem nas análises e no treinamento, muitas vezes sem hora para terminar e, e aos companheiros de sala Beatriz, Vinícius, e Wendy pela amizade e auxílio em partes deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química da PUC-Rio, em especial à Fátima.

Ao meu esposo Antonio, que na maioria das vezes entendeu a minha ausência, e por me amparar nos momentos mais difíceis durante esse período.

À minha família, que sempre me apoiou e torceu por mim, principalmente aos meus pais e irmã, e minha avó falecida durante esse período.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, pela bolsa de isenção e por todo o suporte estrutural fornecido.

Ao CNPq e PETROBRAS, pelo auxílio financeiro concedido.

## Resumo

Wandekoken, Flávia Galvão; Saint'Pierre, Tatiana D. **Desenvolvimento de método para a quantificação de porfirinas de vanadila em frações de petróleo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Injeção em Fluxo e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado** Rio de Janeiro, 2016. 186p. Tese de Doutorado - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A cromatografia líquida de alta eficiência hifenada por injeção em fluxo com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-FI-ICP-MS) foi utilizada para investigar vanádio ligado a porfirinas presente em frações de óleo cru. Em primeiro lugar, a amostra de óleo cru foi submetida a um fracionamento por meio de cromatografia líquida preparativa com detecção em UV-Vis, no comprimento de onda da banda Soret da porfirina (400 nm). As frações de porfirina obtidas foram então separadas numa coluna única de 250 mm, no HPLC e eluídas com fases móveis diferentes, metanol ou metanol:tolueno (80:20; v:v). A quantificação de V-porfirinas nas frações eluídas do HPLC foi feita pela medida do isótopo  $^{51}\text{V}$  no ICP-MS, usando-se soluções-padrão de octaetil-porfirina de vanádio (VO-OEP), preparados no mesmo solvente usado na fase móvel, e injetados pós-coluna diretamente no plasma. Um padrão de Ge em metanol ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi utilizado como padrão interno para minimizar interferências não-espectrais, tais como oscilações devido à injeção. O tratamento matemático do sinal com base no algoritmo de suavização do tipo Transformada Rápida de Fourier (FFT) foi utilizado para melhorar a precisão. As concentrações de V como V-porfirinas foram entre 2,7 e 11  $\text{mg kg}^{-1}$  nas frações, valores próximos à concentração total de V nas frações de óleo cru estudadas.

## Palavras-chave

Vanádio; porfirina; óleo cru; HPLC-FI-ICP-MS.

## Abstract

Wandekoken, Flávia Galvão; Saint'Pierre, Tatiana D. (Advisor)  
**Development of method for the quantification of vanadyl porphyrins in crude oil fractions by High Performance Liquid Chromatography with Flow Injection and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.**  
Rio de Janeiro, 2016. 186p. Doctoral Thesis - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

High performance liquid chromatography hyphenated by flow injection to inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC–FI–ICP–MS) was used to investigate vanadium linked to porphyrins present in fractions of crude oil. First, the crude oil sample was submitted to fractionation by preparative liquid chromatography with UV-Vis detection, at the porphyrin Soret band wavelength (400 nm). The obtained porphyrin fractions were then separated in a 250 mm single column, in the HPLC, and eluted with different mobile phases, methanol or methanol:toluene (80:20; v:v). The quantification of V-porphyrins in the fractions eluted from HPLC was carried out by online measuring the  $^{51}\text{V}$  isotope in the ICP-MS, against vanadyl octaethylporphine standard solutions (VO-OEP), prepared in the same solvent as the mobile phase, and injected post-column directly into the plasma. A  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  Ge in methanol was used as internal standard for minimizing non-spectral interference, such as short-term variations due to injection. The mathematical treatment of the signal based on Fast Fourier Transform (FFT) smoothing algorithm was employed to improve the precision. The concentrations of V as V-porphyrins were between 2.7 and 11  $\text{mg kg}^{-1}$  in the fractions, which were close to the total concentration of V in the fractions of the studied crude oil.

## Keywords

Vanadium; porphyrin; crude oil; HPLC-FI-ICP-MS

## Sumário

1. Contextualização e justificativas do trabalho	21
2. Revisão Bibliográfica	23
2.1. Petróleo	23
2.1.1. Classificação quanto à composição do petróleo	24
2.1.2. Classificação quanto à solubilidade em solventes orgânicos	26
2.2. Metais em petróleo	26
2.3. Metaloporfirinas no petróleo	28
2.4. Determinação elementar em petróleo	33
2.4.1. Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado	33
2.4.2. Problemáticas inerentes à introdução de solventes orgânicos no ICP-MS	38
2.4.3. Determinação de metais em óleo cru por introdução direta em ICP-MS com diluição da amostra em solventes orgânicos	40
2.5. Determinação de metaloporfirinas de V em petróleo	43
2.5.1. Fracionamento do petróleo: preparação da amostra para especiação dos metais	44
2.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	47
2.5.3. Identificação e quantificação de metaloporfirinas do petróleo por espectroscopia do UV-Visível, HPLC e espectrometria de massa (MS)	50
2.5.4. Caracterização de porfirinas presentes no petróleo usando técnicas de alta resolução	55
2.6. Aquisição por sinal transiente	58
3. Objetivos	61
3.1. Objetivo geral	61
3.2. Objetivos específicos	61
4. Materiais e Métodos	63

4.1. Preparo das amostras e das soluções de calibração	63
4.1.1. Descrição das amostras, reagentes e padrões	63
4.1.2. Fracionamento das amostras de óleo	65
4.2. Instrumentação	68
4.2.1. Descrição e otimização dos sistemas HPLC-FI-ICP-MS e análise direta por ICP-MS	68
4.2.2. Parâmetros de separação	74
4.3. Parâmetros de mérito	76
4.3.1. Linearidade	76
4.3.2. Precisão	81
4.3.3. Limite de detecção (LOD)	82
4.3.4. Exatidão	83
4.4. Quantificação por HPLC-FI-ICP-MS	85
4.5. Balanço de massa	86
5. Resultados e discussão	87
5.1. Testes preliminares: avaliação das separações para as Frações 1 e 2	87
5.2. Picos por medida ( <i>Peaks for reading</i> )	94
5.3. Padronização interna e processamento de sinal transiente	95
5.4. Otimizações das condições usadas na separação e recuperação das V-porfirinas por HPLC-FI-ICP-MS	99
5.4.1. Escolha da vazão da fase móvel	99
5.4.2. Comprimento da Coluna	100
5.4.3. Composição da fase móvel	103
5.4.4. Estudo de interferências	114
5.4.5. Efeito da massa injetada na separação e retenção dos compostos de V-porfirinas	116
5.5. Análise do óleo certificado NIST 8505	118
5.6. Otimização das condições do plasma (ICP-MS)	122
5.7. Avaliação da injeção em fluxo para a calibração	131
5.8. Avaliação do método quantitativo desenvolvido (HPLC-FI-ICP-MS): Parâmetros de mérito	133
5.8.1. Linearidade	133

5.8.2. Precisão	139
5.8.3. Limite de detecção (LOD)	141
5.9. Quantificação de V na amostra	142
5.10. Balanço de massas (BM)	144
6. Resultados preliminares para o Ni	145
7. Conclusões	151
8. Referências bibliográficas	153
9. Anexos	164
10. Artigo publicado	178

## Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação do óleo bruto em relação à sua: a) composição; b) solubilidade em solventes orgânicos apolares.	25
Figura 2 - Estrutura do núcleo de uma porfirina.	29
Figura 3 - Estruturas tetrapirrólicas: a) clorofila a; b) metaloporfirinas encontradas no petróleo.	31
Figura 4 - Principais componentes encontrados em um ICP-MS.	34
Figura 5 - Fluxograma da extração sequencial pelo método SARA.	46
Figura 6 - Esquema gráfico de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.	48
Figura 7 - Esquema global do fracionamento usado nas amostras usadas neste trabalho, por Gradiente Reverso (GR) de solventes.	67
Figura 8 - Esquema do 2º fracionamento - sistema de detecção em 400 nm.	68
Figura 9 - Esquema da hifenação do HPLC com o ICP-MS, usando a injeção em fluxo (FI) para a quantificação on line.	71
Figura 10 - Foto dos instrumentos usados no sistema HPLC-FI-ICP-MS: a) Espectrômetro de ICP-MS Nexlon 300X (PerkinElmer) hifenado ao cromatógrafo de HPLC LC-20 (Shimadzu); b) Sistema de introdução de amostra. (LABSPECTRO/PUC-Rio)	72
Figura 11 - Esquema da válvula de injeção: Posição 1, carregando a solução de calibração ou fração da amostra no <i>loop</i> de amostragem; e Posição 2: injeção. (Adaptada de Duyck (2011))	73
Figura 12 - Perfil cromatográfico da adição de um <i>spike</i> de VO-OEP na detecção de V-porfirinas por ICP-MS durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (3,9 mg injetada), sem <i>spike</i> (—) e com <i>spike</i> de aproximadamente 100 µg L <sup>-1</sup> (—).	88
Figura 13 - Perfil cromatográfico das V-porfirinas por ICP-MS (— <sup>51</sup> V) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição de frações do óleo cru O1 usando duas colunas em série e metanol como fase móvel e: a) fração 1 (4,7 mg injetados); b) fração 2 (3,1 mg injetados).	90

Figura 14 - Perfil cromatográfico das V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição de frações do óleo cru O2 usando duas colunas em série e metanol como fase móvel: a) fração 1 (5,5 mg injetados); b) fração 2 (3,4 mg injetados). 92

Figura 15 - Perfil cromatográfico das V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição de frações do óleo certificado NIST 8505 usando as duas colunas em série e metanol como fase móvel e: a) fração 1 (3,5 mg injetados); b) fração 2 (3,7 mg injetados). 93

Figura 16 - Testes de estabilidade da linha de base de possíveis padrões internos na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  por HPLC-FI-ICP-MS, inseridos *on line* pós coluna. 96

Figura 17 - Aproximação da linha de base de 2 picos obtidos em 5 injeções de uma solução padrão VO-OEP (aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em metanol por HCPL-FI-ICP-MS, com  $^{74}\text{Ge}$  como padrão interno ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ): a) sem suavização FFT; b) com suavização FFT. 98

Figura 18 - Perfil cromatográfico do efeito da variação da dimensão da coluna na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (4,1 mg injetados) com metanol como fase móvel, usando: a) uma única coluna (250 mm); b) duas colunas em série (150 mm e 125 mm). 102

Figura 19 - Perfil cromatográfico da detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 com metanol como fase móvel (DUYCK et al., 2011). 104

Figura 20 - Perfil cromatográfico do efeito da fase móvel metanol na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 2 do óleo cru O1 (4,1 mg injetados) com metanol como fase móvel. 106

Figura 21 - Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tampão acetato na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (3,7 mg injetados), usando: a) metanol:tampão acetato (99:1, v:v); b) metanol:tampão acetato (90:10, v:v). 108

Figura 22 - Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V-porfirinas

por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 2 do óleo cru O1 (4,0 mg injetados). 110

Figura 23 - Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (3,8 mg injetados). 111

Figura 24 - Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição do óleo cru O1: a) fração 3 (0,2 mg injetados); b) fração 4 (0,1 mg injetados); c) fração 5 (0,1 mg injetados). 113

Figura 25 - Espectros de massa gerados na análise dos brancos: a) metanol; b) metanol:tolueno (80:20; v:v). 114

Figura 26 - Espectros de massa gerados na análise de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de: a) VO-OEP em metanol; b) VO-OEP em metanol:tolueno (80:20; v:v). 115

Figura 27 - Perfil cromatográfico do efeito das massas, na detecção de V-porfirinas por ICP-MS durante a eluição da fração 1 óleo cru O1 nas injeções de: (— 4,1 mg); (— 2,7 mg); (— 1,0 mg). 117

Figura 28 - Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol, na detecção de V por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo certificado 8505 (0,07 mg injetada). 119

Figura 30 - Otimização do Ar de nebulização ( $\text{L min}^{-1}$ ) em metanol: a) Resposta em função da intensidade (—  $^{115}\text{In}$ ); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxidos (—  $\text{LaO}^+$ ) ou íons bivalentes (—  $\text{Ba}^{2+}$ ) formados no plasma. 124

Figura 31 - Otimização do Ar auxiliar ( $\text{L min}^{-1}$ ) em metanol: a) Resposta em função da intensidade (—  $^{115}\text{In}$ ); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxido (—  $\text{LaO}^+$ ) ou bivalente (—  $\text{Ba}^{2+}$ ) formados no plasma. 127

Figura 32 - Otimização univariada do Ar de nebulização ( $\text{L min}^{-1}$ ) em metanol:tolueno (80:20;v:v): a) Resposta em função da intensidade (—  $^{115}\text{In}$ ); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxido (—  $\text{LaO}^+$ ) ou bivalente (—  $\text{Ba}^{2+}$ ) formados no plasma. 12

Figura 33 - Medidas resultantes de 3 injeções do padrão VO-OEP

de concentração  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  preparado em metanol, na coluna, usando o mesmo solvente como fase móvel. 132

Figura 34 - Curvas analíticas construídas com o padrão VO-OEP diluídos na mesma fase móvel usada nas análises das frações, empregado na determinação de V-porfirinas por HPLC-FI-ICP-MS: a) metanol; b) metanol:tolueno (80:20; v:v). 137

Figura 35 - Perfil cromatográfico das Ni-porfirinas (—  $^{60}\text{Ni}$ ), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 nas seguintes fases móveis: a) metanol (2,7 mg injetados); b) metanol:tolueno (80:20; v:v) (2,0 mg injetados), por HPLC-ICP-MS. 147

Figura 36 - Perfil cromatográfico do efeito da fase móvel na detecção de Ni-porfirinas por ICP-MS (—  $^{60}\text{Ni}$ ), durante a eluição da fração 2 do óleo cru O1 em metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel (2,0 mg injetados) por HPLC-ICP-MS. 148

Figura 37 - Perfil cromatográfico de Ni-porfirinas (—  $^{60}\text{Ni}$ ), durante a eluição do óleo cru O1: a) fração 3 (0,2 mg injetados); b) fração 4 (0,1 mg injetados); c) fração 5 (0,1 mg injetados), por HPLC-ICP-MS. 149

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros operacionais do plasma para as duas metodologias usadas. 69

Tabela 2 - Análise da variância para o ajuste de um modelo linear com dois parâmetros. 81

Tabela 4 - Resultados obtidos para o teste de Grubbs feito para os valores mínimos e máximos dos níveis de concentração em um nível de confiança de 0,05 e $n=5$ , tendo o $G_{\text{tabelado}}= 1,715$ .	134
Tabela 5 - Resultados obtidos para o teste de homocedasticidade das variâncias, tendo o $C_{\text{tabelado}} = 0,6287$ , para $k = 4$ níveis de concentração e $n = 5$ replicatas.	135
Tabela 6 - Resultados obtidos para os parâmetros das curvas analíticas.	133
Tabela 7 - Resultados obtidos com a análise da variância para o ajuste de um modelo linear construído para a curva analítica preparada em metanol.	138
Tabela 8 - Resultados obtidos com a análise da variância para o ajuste de um modelo linear construído para a curva analítica preparada na mistura metanol:tolueno (80:20; v:v).	139
Tabela 9 - Avaliação da precisão em função da repetitividade.	140
Tabela 10 - Concentração de V total no óleo cru O1 e em suas frações, por ICP-MS e V ligado às porfirinas em frações do óleo cru de referência interno O1, por HPLC-FI-ICP-MS. A porcentagem de V ligado às porfirinas (%) nas frações em relação à concentração de V total medida nas respectivas frações.	142
Tabela 11 - Parâmetros calculados para o teste $t$ pareado para comparação dos resultados obtidos por HPLC-FI-ICP-MS e ICP-MS, tendo o $t_{\text{tabelado}} = 4,303$ , para 2 graus de liberdade e 95 % de confiança.	143

## Lista de Abreviaturas

**AAS** - Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês *Atomic Absorption Spectroscopy*

**AFS** - Espectrometria de Fluorescência Atômica, do inglês *Atomic Fluorescence Spectrometry*

**APPI** - Fotoionização por Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric*

*Pressure Photoionization*

**APPI-FT-ICR MS** - Espectrometria de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier com Fotoionização por Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*

**BM** – Balanço de Massa

**CI** - Ionização Química, do inglês *Chemical Ionization*

**CMD** - Concentração Mínima Detectável

**cps** - Contagens por segundo, do inglês *counts per second*

**ddp** - Diferença de potencial

**DIHEN** – Nebulizador de Injeção Direta de Alta Eficiência, do inglês *Direct Injection High Efficiency Nebulizer*

**DIN** - Nebulizador de Injeção Direta, do inglês *Direct Injection Nebulizer*

**EI MS** - Espectrometria de Massa com Ionização por Impacto de Elétrons, do inglês, *Electron Ionisation Mass Spectrometry*

**ESI** - Ionização por Electrospray, do inglês *Electrospray Ionisation*

**ESI MS** - Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray, do inglês *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*

**ESI-FT-ICR MS** - Espectrometria de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier com Ionização por Electrospray, do inglês *Electrospray Ionisation Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*

**ET AAS** - Absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*

**FFT** - Transformada Rápida de Fourier, do inglês *Fast Fourier Transform*

**FI** – Injeção em Fluxo, do inglês *Flow Injection*

**FIA** – Análise por Injeção em Fluxo, do inglês *Flow Injection Analysis*

**FT-ICR MS** - Espectrometria de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*

**g.l.** - Graus de liberdade

**GC** - Cromatografia Gasosa, do inglês *gas chromatography*

**GR** - Gradiente Reverso

**HETP** - Altura Equivalente a um Prato Teórico, do inglês *Height Equivalent to a Theoretical Plate*

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

**HPLC-FI-ICP-MS** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Injeção em Fluxo hifenada ao Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Injeção em Fluxo, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with flow injection hyphenated Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**HPLC-ICP-MS** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada ao Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *High Performance Liquid Chromatography hyphenated to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**ICP** - Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma*

**ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**ICP OES** - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente

Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

**INMETRO** - Instituto Nacional de Metrologia

**LC** - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

**LOD** - Limite de Detecção

**MS** - Espectrometria de Massa, do inglês *mass spectrometry*

**NIST** – *National Institute of Standards and Technology*

**PAP** - Parafinas, Aromáticos e compostos Polares

**PDA** - Detector de Arranjo de Diodos, do inglês, *Photo Diode Array*

**Q<sub>spI</sub>** - Quantidade de solvente que efetivamente atinge o plasma, do inglês *Quantity of solvente plasma load*

**Rec** - Recuperação

**RF** – Radiofrequência

**RSD** – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

**SARA** - Saturados, Aromáticos, Resina e Asfaltenos

**SD** – Desvio Padrão, do inglês *Standard Deviation*

**SEC** - Cromatografia por Exclusão de Tamanho, do inglês *Size Exclusion Chromatography*

**SEC-HPLC-ICP-MS** - Cromatografia por Exclusão de Tamanho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenadas ao Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Size Exclusion Chromatography Hyphenated to High Performance Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**THF** – Tetrahidrofurano

**TOF** - Tempo-de-voo, do inglês *Time-of-flight*

**USN** - Nebulização Ultrassônica, do inglês *Ultrasonic Nebulization*

**USN-ICP-MS** - Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Nebulização Ultrassônica, do inglês *Ultrasonic Nebulization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

**UV** - Ultravioleta

**UV-Vis** – Ultravioleta-visível

# 1

## Contextualização e justificativas do trabalho

Pesquisas direcionadas à análise de petróleo são exaustivamente realizadas com o interesse das indústrias do petróleo, que buscam soluções para problemas científicos, ambientais, econômicos e melhorias nos processos de refino e exploração (YEN, 1975). As técnicas analíticas empregadas nestes estudos sofreram avanços tecnológicos nos últimos tempos, o que propiciou determinar elementos e compostos em concentrações cada vez mais baixas, além de possibilitar análises mais confiáveis, com alta precisão e exatidão. Tais avanços permitiram aprimorar as técnicas analíticas, melhorando os limites de detecção, a possibilidade de se quantificar quase todos os elementos da tabela periódica, além da redução do tempo de análise, graças às análises multielementares.

Biomarcadores em petróleo são empregados em pesquisas relacionadas a processos geoquímicos de origem, maturidade térmica e biodegradação do petróleo. Neste âmbito, dentre os biomarcadores de extrema relevância estão as petroporfirinas, que são compostos de coordenação, formados por núcleos tetrapirrólicos, com os quais os metais Ni ou V estão complexados (CAUMETTE et al., 2009). A identificação destes compostos, bem como a quantificação dos metais associados, revela informações sobre os efeitos apontados anteriormente.

O desenvolvimento de técnicas para determinação de metais traço, ultra traço e organometálicos em óleo bruto e frações é objeto de pesquisa durante as duas últimas décadas pelo grupo LABSPECTRO da PUC-Rio, o qual obteve a aprovação de alguns projetos financiados pela Petrobras desde 2006, sendo renovados desde então.

Fonseca (2000) pesquisou a ocorrência de metais em óleos brutos de quase todas as bacias brasileiras, em particular na Bacia de Potiguar.

O fracionamento de mais de dez petróleos foi estudado por Duyck (2001), cujos resultados revelaram que parte dos elementos metálicos se distribuía entre as frações polar, resinosa e asfáltica. Outro trabalho com óleos de diferentes bacias mostrou que havia elementos associados à fase aquosa emulsionada (TEIXEIRA, 2007).

Com o objetivo de investigar a distribuição de V e Ni foi realizado um fracionamento do óleo bruto (método SARA) usando a cromatografia líquida com gradiente de solvente e a espectrofotometria no visível para identificar, separar e pré-concentrar as subfrações de interesse. A quantificação foi realizada por ICP-MS após dissolução em tolueno (CARDOSO FILHO, 2009).

Souza (2011) desenvolveu um método para análise elementar de óleo lubrificante, óleo combustível e biodiesel por ICP OES e ICP-MS, com introdução direta das amostras diluídas em xileno.

O presente estudo é parte de uma pesquisa de um dos projetos que foi financiado pela Petrobras, com a cooperação de pesquisadores, técnicos e alunos de iniciação científica. Neste sentido, este trabalho vem propor uma investigação das porfirinas de Ni e V presentes em amostras de óleo bruto. A metodologia desenvolvida emprega fracionamentos por cromatografia líquida preparativa, usando heptano, tolueno, diclorometano e metanol para separar as frações de porfirinas. Uma metodologia para quantificação de porfirinas de V é apresentada, a partir da hifenação entre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). As frações obtidas a partir de um óleo bruto de referência interna ou de um óleo NIST certificado em V, foram injetadas no HPLC, os compostos porfirínicos foram separados na coluna cromatográfica analítica e V e Ni foram determinados por sinal transiente no ICP-MS. A concentração de V ligado às porfirinas é estabelecida por uma técnica de calibração em linha empregando a injeção em fluxo (FI) entre o HPLC e o ICP-MS.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1. Petróleo

Nos dias atuais o petróleo vem desenvolvendo um grande papel na economia mundial, tornando-se um bem largamente utilizado na vida moderna. O seu principal emprego está relacionado à fonte energética. Além disso, seus derivados são matérias-primas para a manufatura de diversos bens de consumo, como plásticos, tecidos sintéticos, cosméticos, tintas, etc (FARAH, 2012). Segundo a Agência Internacional de Energia (Key Words Energy Statistics, 2013), em 2013 o petróleo representou cerca de 31,5 % do consumo mundial de energia primária.

O petróleo é uma matriz complexa e sua composição química varia dependendo da sua origem e de processos geoquímicos, tais como a maturidade térmica e a migração (SELLEY, 1998). Basicamente, o petróleo é constituído por uma mistura de compostos orgânicos, dos quais predominam os hidrocarbonetos saturados e aromáticos, contendo também compostos heteronucleares, alguns metais em nível traço, sendo o vanádio, o níquel e o ferro, os mais abundantes e alguns não metais, como enxofre, oxigênio e nitrogênio (SELLEY, 1998; DUYCK et al., 2007). Sais e minerais podem ser observados, devido a presença de água emulsionada (FARAH, 2012).

O petróleo pode ser dividido em classes, dependendo da sua composição ou de sua solubilidade em solventes apolares.

### 2.1.1. Classificação quanto à composição do petróleo

Como já mencionado, o petróleo é principalmente formado por hidrocarbonetos, representando mais de 90 % de toda sua composição. Sendo assim, a composição do petróleo pode ser dividida em duas grandes classes: os hidrocarbonetos e os não hidrocarbonetos, formados por compostos orgânicos que apresentem heteroátomos (FARAH, 2012). Na Figura 1a está presente um fluxograma com as divisões e subdivisões da composição do óleo bruto.

Os hidrocarbonetos são subdivididos em parafinas, naftênicos e aromáticos. As parafinas (ou alcanos) são constituídas por compostos alifáticos lineares ou ramificados. Os naftênicos (ou cicloalcanos) apresentam compostos policíclicos saturados podendo apresentar cadeias laterais de parafinas, ocorrendo usualmente em frações leves e médias. Os aromáticos são constituídos por um ou mais anéis aromáticos e também podem conter cadeias parafínicas e até mesmo naftênicas ligadas a sua estrutura, ocorrendo em maior quantidade nas frações mais pesadas do petróleo (FARAH, 2012).

Os não hidrocarbonetos são compostos que contém outros elementos, além do carbono e hidrogênio, denominados de heteroátomos. Neste grupo estão inseridos os compostos heterocíclicos, como os compostos policíclicos aromáticos contendo átomos de S, N e O (como tióis, sulfóxidos, tiofenos, porfirinas, pirróis, carbazóis, ácidos carboxílicos, fenóis, etc.), e metais (especialmente níquel e vanádio) associados à matéria orgânica em compostos denominados de organometálicos. E alguns compostos não heterocíclicos na forma de sulfetos, mercaptanos, etc. Neste grupo podem compreender os asfaltenos e a resina, que são compostos de alto peso molecular. A diferença entre os compostos pertencentes aos asfaltenos e as resinas está na quantidade de unidades básicas de agregados moleculares. Desta forma, os que possuem menores números de unidades básicas são conhecidos por resinas, e os de maiores níveis de agregação são os asfaltenos. Cerca de 50 % do S, 80 % do N e mais de 80 % do Ni e do V presentes no petróleo se

concentram nessas frações. Devido à natureza química dessas estruturas, estes compostos são relativamente polares (FARAH, 2012).

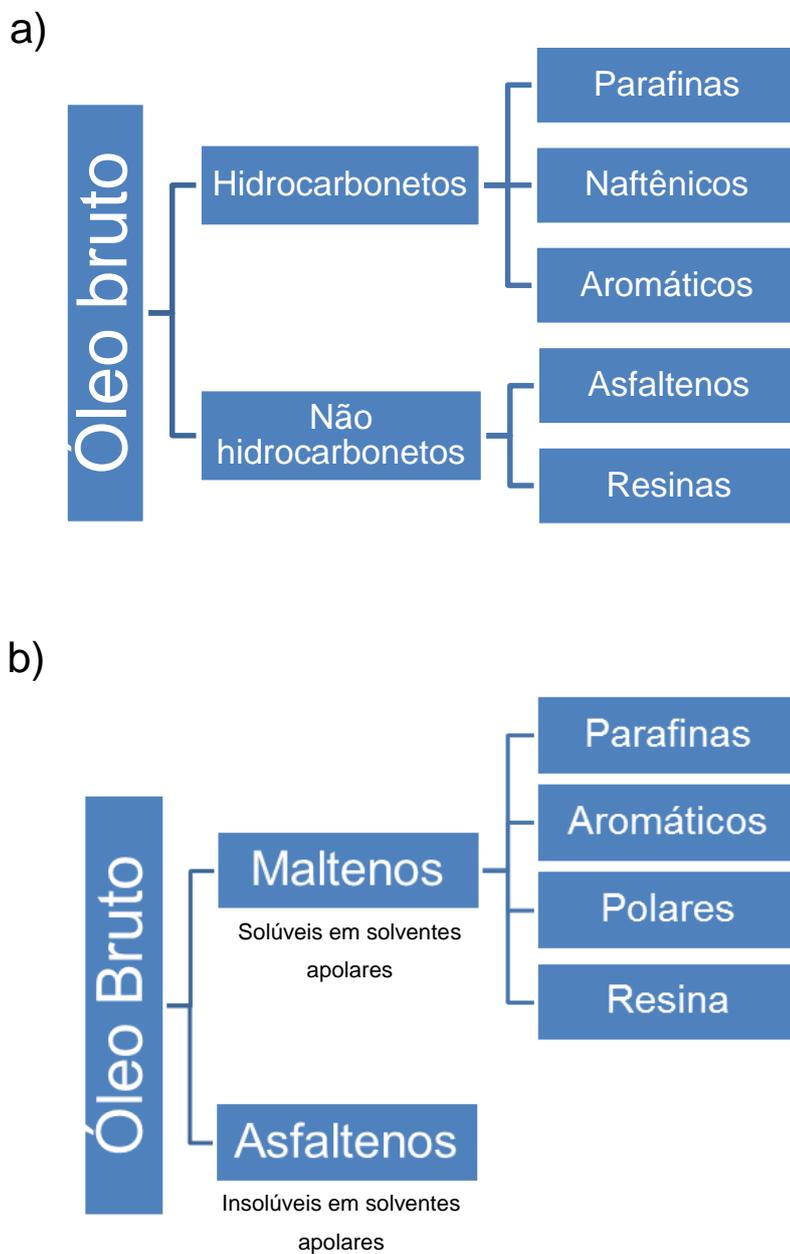


Figura 1: Classificação do óleo bruto em relação à sua: a) composição; b) solubilidade em solventes orgânicos apolares.

### 2.1.2.

#### **Classificação quanto à solubilidade em solventes orgânicos**

Em se tratando da polaridade, o petróleo por ser dividido em duas frações: os maltenos, que constitui a fração solúvel em solventes orgânicos apolares, e os asfaltenos, cuja fração é insolúvel em parafinas leves (como pentano e heptano). Na Figura 1b é apresentado um fluxograma com as classificações do óleo bruto em se tratando de sua solubilidade em solventes orgânicos apolares.

Os maltenos contêm três classes de compostos, os hidrocarbonetos saturados ou parafinas, os hidrocarbonetos aromáticos, os compostos heteronucleares de N, S e O, chamados polares, neste último está inserida a resina. Os maltenos podem ser separados da resina através de um procedimento conhecido como SARA (Saturados, Aromáticos, Resina e Asfaltenos), por cromatografia líquida de adsorção (CAUMETTE et al., 2009).

### 2.2.

#### **Metais em petróleo**

Metais são naturalmente encontrados em petróleo como compostos organometálicos de Cu, Fe, Zn, V e Ni, principalmente, concentrados nas frações de aromáticos, polares, resina e asfaltenos, presentes em maiores quantidades nas duas últimas (DUYCK et al., 2007; CAUMETTE et al., 2009). Entretanto, os metais podem ser inseridos durante os processos de extração, transporte e/ou estocagem, normalmente suspensos ou dissolvidos na fase aquosa emulsionada no óleo (SPEIGHT, 2001).

Os metais estão presentes em concentrações que variam de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , em frações leves, a  $\text{mg kg}^{-1}$ , em frações pesadas (DUYCK et al., 2007; CAUMETTE et al., 2009). Os mais abundantes no petróleo são Ni e V, com concentrações entre 10 e 1000  $\text{mg kg}^{-1}$ , seguidos por Fe (SPEIGHT, 2001; CAUMETTE et al., 2009). Outros metais, como Pb, Ba, Sn, Ag, Co, Cu, Mo, Ti, Zn e até Hg, também podem estar presentes, em

concentrações menores, entre 1 e 50 mg kg<sup>-1</sup> (WILHELM; BLOOM, 2000; HARDAWAY; SNEDDON; BECK, 2004; DUYCK et al., 2007; CAUMETTE et al., 2009).

Segundo Caumette e colaboradores (2009), as espécies metálicas presentes no petróleo podem ser classificadas em três principais classes:

- I. **Metaloporfirinas**, esse termo refere-se a complexos de metal com as porfirinas, que são moléculas macrocíclicas derivadas a partir de quatro subunidades de pirróis interligados através dos seus átomos de carbono via pontes metino (CH-). Os metais presentes neste tipo de estrutura são principalmente Ni, V, Fe ou Cu;
- II. **Espécies supostamente não porfirínicas**, são espécies metálicas que não estão ligadas às porfirinas. São menos polares que as metaloporfirinas e supostamente mais abundantes.
- III. **Sais de ácidos naftênicos**, tratam-se de uma mistura não especificada de vários ácidos carboxílicos ciclopentil e ciclohexil, com um número de átomos de carbono variando de 9 a 20. Formam sais com Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Ti<sup>2+</sup>, mas também provavelmente a outros elementos.

A presença de metais pode gerar efeitos nocivos em processos do refino do petróleo, especialmente nos que utilizam catalisadores (envenenados por metais) (SPEIGHT, 2001; CAUMETTE et al., 2009), além de ocasionar corrosão de equipamentos (CAUMETTE et al., 2009) (SPEIGHT, 2001; PESSOA et al., 2012) incrustações em tubulações (WILHELM; BLOOM, 2000; CAUMETTE et al., 2009; PESSOA et al., 2012), afetar a qualidade dos produtos derivados do petróleo (através de reações paralelas indesejáveis e contaminação do produto final)

(SPEIGHT, 2001; HARDAWAY et al., 2004; CAUMETTE et al., 2009), e aumentar a emissão de compostos tóxicos ao meio ambiente (HARDAWAY et al., 2004; CAUMETTE et al., 2009).

Por outro lado, alguns metais como V e Ni, são usados como traçadores geoquímicos, estes metais podem ser encontrados complexados em diferentes estruturas, dentre as quais estão as porfirinas. Suas concentrações e/ou razões isotópicas são usadas para correlação óleo-óleo ou óleo-rocha geradora ou para a identificação do ambiente de origem do óleo e na determinação da maturidade térmica e de níveis de biodegradação do óleo (AMORIM et al., 2007; CAUMETTE et al., 2009). Assim, a determinação de elementos em petróleo e seus produtos derivados é um assunto de grande interesse, pois pode gerar soluções para problemas encontrados pelas indústrias de petróleo. Nesse contexto, a análise de especiação, que pode ser definida como sendo a identificação e/ou quantificação de espécies químicas presentes em uma amostra (TEMPLETON et al., 2000; CORNELIS et al., 2003), também é relevante quando o assunto é propor ações corretivas durante o refino do petróleo, uma vez que processos envolvidos no refino são afetados por diferentes espécies químicas. Assim, o conhecimento das espécies elementares presentes pode proporcionar uma melhor compreensão de mecanismos, como o envenenamento de catalisadores, por exemplo, como também para datar ou identificar a origem de um petróleo de forma mais eficaz (CAUMETTE et al., 2009).

### **2.3. Metaloporfirinas no petróleo**

Metaloporfirinas são compostos de coordenação formados por tetrapirróis ligados por pontes de metino (-CH) que apresentam em seu centro um metal complexado, na Figura 2 encontra-se o núcleo de uma porfirina. Este centro porfirínico pode ser encontrado em vários sistemas vivos, participando de processos respiratórios, na forma de hemoglobina e

clorofila (ACKLEY et al., 2000). As porfirinas que são oriundas do petróleo são chamadas de geoporfirinas ou petroporfirinas, e Ni e V formam complexos de alta estabilidade com estas estruturas.

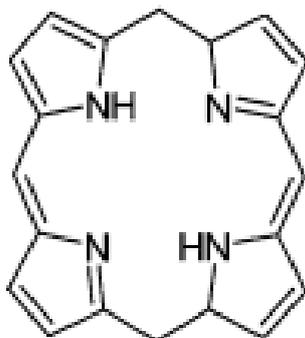


Figura 2: Estrutura do núcleo de uma porfirina (Adaptada de Caumette e colaboradores (2009)).

As porfirinas têm sido extensivamente estudadas desde a sua descoberta em óleo cru e xisto como "fósseis moleculares" por Treibs (1936). Existem evidências de que as porfirinas presentes no petróleo sejam derivadas da clorofila e, no caso de algumas das petroporfirinas de Ni e V, de serem oriundas da clorofila-a (TISSOT, 1984; HUSEBY; OCAMPO, 1997). Em geral, estas petroporfirinas complexadas aos metais estão distribuídas em frações mais pesadas do petróleo, como as frações polares, resinas e asfaltenos (DUYCK et al., 2011).

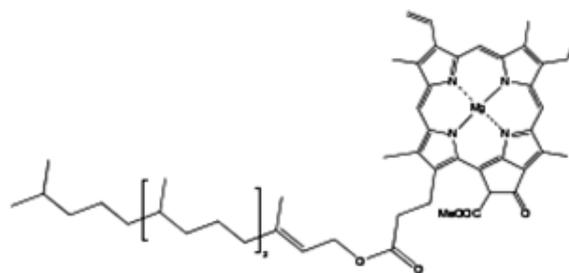
O processo de formação das petroporfirinas envolve uma série de processos de transformações das porfirinas provenientes da clorofila-a, passando por uma série de desidrogenações e descarboxilações. Nestes processos, que ocorrem durante a sedimentação, organismos mortos são soterrados e moléculas, como a clorofila, podem ser preservadas (Figura 3).

Durante a diagênese dos sedimentos, a ação bacteriana gera produtos de degradação que são usados como biomarcadores de ambientes deposicionais (marinho, lacustre, terrestre). Evidências indicam

que tais moléculas são precursores das porfirinas de V e Ni encontradas nos petróleos (OCAMPO, 1999; OCAMPO; REPETA, 2002, 2004).

Dentre as metaloporfirinas de V e Ni até então identificadas no petróleo, destacam-se famílias compostas por uma estrutura de base, a qual sofre ramificações e adição de grupos, em geral alquila ou carboxílicos. Dois principais tipos de petroporfirinas são encontrados, as etioporfirinas (ETIO) e as deoxoetioeritroporfirina (DPEP) (TREIBS, 1936). A partir dessas duas estruturas, distingue-se famílias representadas pelos principais grupos: tetrahydrobenzo-, tetrahydrobenzo-DPEP, benzo(rhodo) e benzo(rhodo)-DPEP. A partir destas, já foram identificados mais quatro séries homólogas variando em  $-(CH_2)_n$ . (ALI et al., 1993) Um recente estudo identificou três novas séries de porfirinas de vanádio, as quais correspondem:  $C_nH_mN_4VO_2$ ,  $C_nH_mN_4VO_3$  e  $C_nH_mN_4VO_4$ .(ZHAO et al., 2013) Nas séries homólogas estabelecidas a partir do núcleo principal de cada uma, as metaloporfirinas com  $C_{27}$  a  $C_{32}$  são mais abundantes e variam com a origem e com a evolução térmica do óleo (OCAMPO; ALBRECHTT, 1993; SUNDARARAMAN et al., 1993).

a)



b)

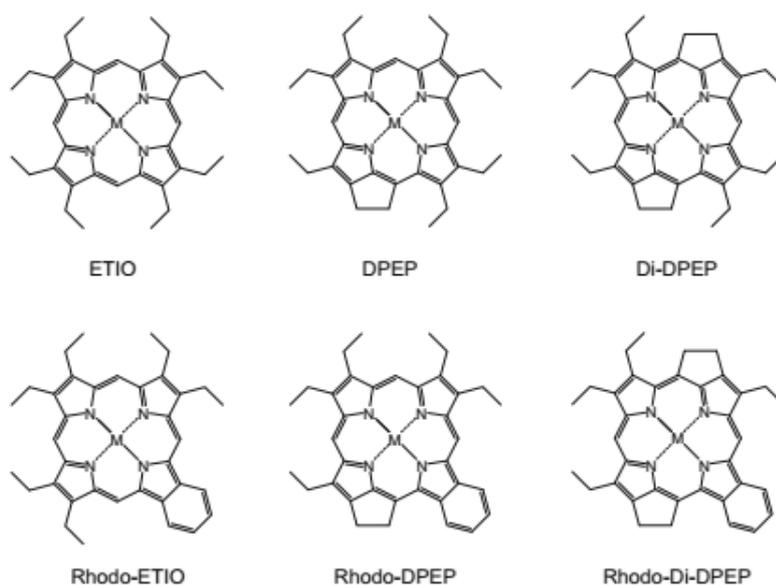


Figura 3: Estruturas tetrapirrólicas: a) clorofila a; b) metaloporfirinas encontradas no petróleo (Adaptadas de Sundararaman e Boreham (1991) e Zhao e colaboradores (2016)).

As petroporfirinas de Ni e V se diferenciam através da geometria espacial formada pelos devidos complexos, o que proporciona diferentes polaridades. No caso do V(IV), este se liga ao centro porfirínico através da vanadila ( $VO^{2+}$ ), formando uma estrutura de geometria piramidal quadrática, a qual confere polaridade ao composto formado. Já o Ni(II), forma complexos planares, o que resulta em um composto de menor polaridade (KVENVOLDEN, 2006).

Os grupos de substituição do núcleo das porfirinas, bem como a concentração e distribuição de suas séries estão relacionadas com fenômenos geoquímicos. Devido à alta estabilidade do núcleo porfirínico, tornam-se potenciais biomarcadores em campos biodegradados onde derivados de isopreno e terpenos dão informações limitadas (DUYCK et al., 2008; FERNÁNDEZ-VARELA et al., 2010; ESCOBAR et al., 2012; AKINLUA et al., 2015). A razão Ni/V tem sido empregada como indicadora de origem e pode conceder informações sobre a rocha geradora assim como os efeitos da maturação térmica e da biodegradação no petróleo durante seu processo de formação e acumulação. Esta razão, avaliada nas frações de Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos (SARA), também vem sendo empregada como parâmetro geoquímico, associada a efeitos de biodegradação (LÓPEZ; LO MÓNACO, 2004). Autores observaram que, quanto maior a razão Ni/V em frações de aromáticos e polares, menos biodegradado é o petróleo (GALLEGOS; SUNDARARAMAN, 1985; DUYCK et al., 2008). Além disso, para óleos de uma mesma origem, os que apresentam maiores quantidades de porfirinas de Ni e V são menos biodegradados, em comparação aos que exibem menores quantidades (SPEIGHT, 2001). A relação da concentração das duas séries de petroporfirinas de Ni e V mais abundantes (DPEP e Etio) também são indicadores de maturidade (GALLEGOS; SUNDARARAMAN, 1985; CHOSEN, 1990).

Além disso, o conhecimento da concentração de vanadil-porfirinas em óleos crus é importante para a indústria do petróleo, já que estes compostos são prejudiciais para a maioria das operações de refinaria, causando envenenamento catalítico e corrosão, rachaduras em unidades e fornos (LIU et al., 2015).

## **2.4. Determinação elementar em petróleo**

A determinação elementar do petróleo pode ser feita após a decomposição ácida das amostras em sistemas fechados ou ser realizada diretamente por diluição da amostra em solvente orgânico. Como já mencionado, a quantificação dos metais Ni e V é importante porque além de serem os mais abundantes no petróleo, também fornecem informações relevantes sobre o petróleo analisado. A determinação destes elementos pode ser feita por técnicas monoelementares, como a absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS, do inglês *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*) ou multielementares, como ICP-MS.

Como neste trabalho foi empregada a técnica ICP-MS, esta será descrita resumidamente abaixo.

### **2.4.1. Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado**

A espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês "*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*") é uma técnica analítica largamente usada na determinação e quantificação de elementos traços, a qual se baseia na seleção de íons positivos produzidos em um plasma. Os íons selecionados são acelerados para dentro de um analisador de massa, onde são submetidos a um campo eletrostático com radiofrequência variável, que permite a separação dos íons de interesse em função da razão massa/carga, para finalmente serem detectados através do sinal elétrico gerado no detector. A Figura 4 mostra os principais componentes de um ICP-MS.

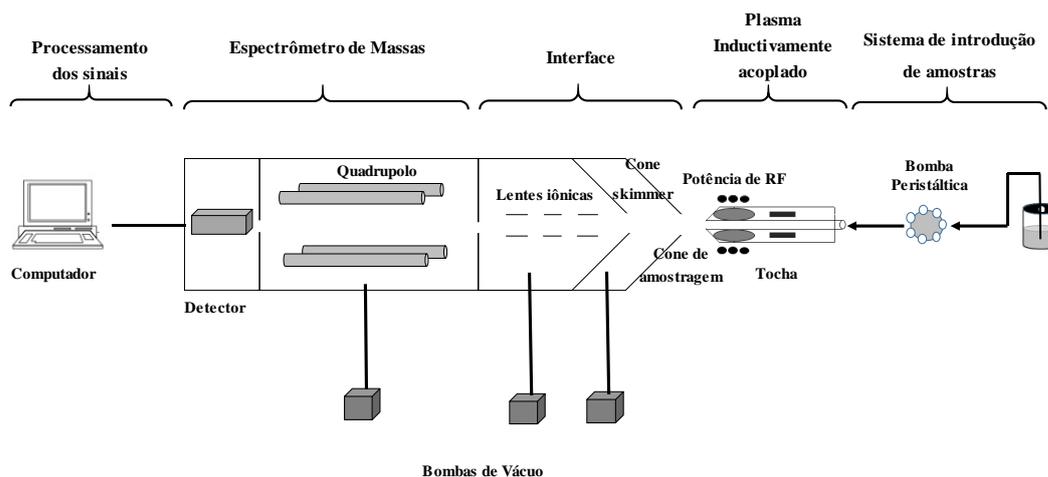


Figura 4: Principais componentes encontrados em um ICP-MS.

Esta técnica tornou-se uma das mais importantes para análise multielementar de elementos traços, o que se deve aos baixos limites de detecção, alta sensibilidade, possibilidade de baixo consumo de amostra (quando por exemplo micronebulizadores são empregados), ampla faixa linear, boa precisão e exatidão, além de ser capaz de gerar íons monovalentes com eficiência e espectros de massa simples (HILL, 1999; THOMAS, 2008).

Para a produção do plasma usa-se um gás pouco reativo, normalmente argônio. Ele é gerado em uma tocha de quartzo que possui três tubos concêntricos (GINÉ, 1999; HILL, 1999), localizada dentro de uma bobina de indução a qual é ligada a um gerador de radiofrequência (RF) (BOSS; FREDEEN, 1997; GINÉ, 1999). Uma descarga elétrica do tipo Tesla produz elétrons livres no argônio, provocando as primeiras ionizações do argônio. Estes elétrons são acelerados pelo campo magnético e acabam colidindo com outros átomos de argônio, propagando sua ionização. Essa ionização colisional continua em uma reação em cadeia, quebrando o gás em um plasma (gás parcialmente ionizado) (GINÉ, 1999; HILL, 1999).

Após formado o plasma, sucede-se a introdução da amostra. No caso de amostras líquidas, normalmente é usado um sistema de nebulização pneumática que consiste em um nebulizador, o qual produz

um aerossol através de um fluxo de argônio de nebulização, e uma câmara de nebulização, responsável pela separação das gotículas.

A amostra quando chega ao plasma passa por processos de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização. A ionização será possível quando os potenciais de ionização dos elementos no interior do plasma forem menores do que o do argônio (16 eV). Os íons produzidos no plasma, são transportados para o espectrômetro pelo efeito da diferença de pressão, pois o plasma se encontra à pressão atmosférica e o quadrupolo em uma região de alto vácuo ( $10^{-6}$  atm). O feixe iônico primeiramente passa pelo cone amostrador, estando em uma região de vácuo intermediário ( $10^{-3}$  atm). Em seguida, os íons direcionados para o segundo cone (*skimmer*), onde são colimados por uma lente iônica e por fim direcionados ao analisador. Existem vários tipos de analisadores de massa, entretanto mais empregado nos espectrômetros de massa é o quadrupolo (GINÉ, 1999). No quadrupolo ocorre a separação dos íons pelas suas razões  $m/z$  e os demais íons são desviados e extraídos através de uma bomba de vácuo. Por fim, os íons selecionados são detectados pelo detector, o qual medirá a magnitude da corrente produzida pelos íons. Normalmente se empregam detectores do tipo multiplicador de elétrons, que é formado por uma placa que ejeta elétrons secundários quando atingido pelos íons e uma série de dinodos são usados para multiplicá-los.

#### **2.4.1.1. Interferências**

A técnica ICP-MS, ao mesmo tempo que é extremamente eficiente devido a sua alta sensibilidade e capacidade multielementar, é uma técnica bastante suscetível a interferências (EVANS; GIGLIO, 1993). Qualquer alteração no sinal analítico, causando erro sistemático, é chamada de interferente.

As interferências em ICP-MS podem ser classificadas em espectrais e não-espectrais, as quais serão explanadas com mais detalhes a seguir.

As interferências espectrais ocorrem quando a resolução do espectrômetro não é capaz de distinguir íons atômicos e/ou moleculares com razão massa/carga próxima a do analito de interesse, causando um aumento errôneo no sinal do mesmo (GINÉ, 1999). Neste tipo de interferência ocorre uma sobreposição espectral e trata-se das interferências mais abrangentes e difíceis de serem solucionadas em ICP-MS (THOMAS, 2008). As interferências espectrais podem ser divididas em (EVANS; EBDON, 1990; MONTASER; GOLIGGHTLY, 1992; HILL, 1999; THOMAS, 2008):

- I. **Isobárica**, ocorre quando há sobreposição de sinais de um isótopo de um determinado elemento com a mesma massa nominal do analito de interesse.
- I. **Íons poliatômicos ( $MX^+$ )**, são formados pela recombinação de íons gerados no plasma, oriundos da própria matriz da amostra, dos solventes usados na diluição (como  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $HF$ ), dos gases presentes na atmosfera (como  $O_2$ ,  $N_2$ ), ou do próprio gás que constitui o plasma (geralmente  $Ar$ ).
- II. **Íons de óxidos refratários ( $MO^+$ )**, são espécies que podem ser oriundas da dissociação incompleta dos componentes constituintes da matriz da amostra ou da recombinação de íons no plasma com o oxigênio do solvente, da atmosfera ou da própria amostra.
- III. **Íons de dupla carga ( $M^{+2}$ )**, esse tipo de íon se forma no plasma devido a baixos valores do segundo potencial de ionização de alguns elementos.

A interferência não espectral, ocorre quando as substâncias presentes na matriz da amostra interferem aumentando ou suprimindo o sinal do analito.

Esse tipo de interferência pode ser ocasionado por várias razões. Uma delas é quando há diferença entre as soluções de calibração e as soluções da amostra, no caso de matrizes orgânicas, geralmente é causado por variações na taxa de bombeamento de solventes com diferentes viscosidades, o que é conhecido como efeito de transporte.

Uma outra possibilidade é o efeito causado quando a matriz da amostra possui sais dissolvidos, causando alterações na taxa de introdução e no transporte das soluções. Além disso, elevados teores de sais, quando a nebulização pneumática é empregada, pode provocar depósitos salinos que se acumulam no cone de amostragem, obstruindo seu orifício. O que interfere na amostragem dos íons, gerando uma contagem que não remete à realidade da amostra analisada (GINÉ, 1999).

Também pode ocorrer na interface perdas durante o transporte de íons leves quando há elevadas concentrações de íons pesados. Isso ocorre devido ao efeito da distribuição da carga na região localizada entre o cone de amostragem e as lentes iônicas (efeito espaço-carga). Nessa região, a presença de íons com massas altas alteram a trajetória dos íons de massas baixas devido ao efeito *Coulombiano* e à ddp aplicada na lente de extração. Quando altos potenciais são aplicados nas lentes iônicas, esse efeito é mais acentuado.

Quando a solução da amostra possui elementos facilmente ionizáveis, em altas concentrações, podem promover uma supressão do sinal do analito, pois diminuem a ionização do analito, reduzindo-a.

Para solucionar este tipo de interferência, normalmente se aplicam técnicas de calibração específicas ou medidas de contorno, tais como: diluição da amostra, uso de um padrão interno, simulação da matriz (*matrix matching*), separação do analito da matriz e emprego de acessórios de introdução de amostra.

#### 2.4.2.

#### **Problemáticas inerentes à introdução de solventes orgânicos no ICP-MS**

Primeiramente, a presença de solventes orgânicos pode desestabilizar o plasma. Isto ocorre porque há um alto consumo da energia usada na dissociação das moléculas, e em casos mais extremos pode até mesmo extinguir o plasma. Além disso, há a possibilidade de depósitos de carbono gerado pela combustão incompleta sobre componentes do aparelho, principalmente nos cones de amostragem (*skimmer* e lentes iônicas), o que diminui a eficiência de propagação dos íons de interesse, acarretando uma depreciação da sensibilidade e conseqüentemente dos limites de detecção. Além disso, estes impactos sofridos nos cones e também na tocha geram um desgaste prematuro nestas peças.

Existem alguns artifícios que podem contornar estes problemas, como a introdução de um gás auxiliar, como o O<sub>2</sub>, o qual promove a oxidação do carbono a CO e CO<sub>2</sub>, evitando o depósito de carbono citado, o que preserva o equipamento (BOTTO, 1993; DUYCK et al., 2007). O uso deste gás deve ser de forma cautelosa, pois o excesso pode causar deterioração dos cones por oxidação e até mesmo o derretimento da tocha.

Uma outra possibilidade é o uso de uma câmara de nebulização resfriada, a qual promove a condensação de solventes orgânicos e compostos voláteis da matriz antes da sua introdução no plasma. Existem também algumas alternativas relacionadas a acessórios de introdução da amostra, que podem ser usados em alternância à nebulização pneumática, como o nebulizador ultrassônico equipado com sistema dessolvador, a redução na quantidade de amostra introduzida através de sistemas para análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês, *flow injection analysis*), por nebulizadores de injeção direta ou micronebulizadores.

Estes sistemas de introdução de amostra específicos foram desenvolvidos a fim de reduzir a carga de solvente no plasma (refrigeração) ou melhorar o fator de resposta do instrumento de elementos em diferentes produtos petrolíferos (aquecimento) (SÁNCHEZ et al., 2012, 2014). O princípio destes sistemas consiste em reduzir o  $Q_{spl}$  (do inglês, *Quantity of solvent plasma loaded*) que é a quantidade de solvente que efetivamente atinge o plasma, através da diminuição da temperatura.

Quando se opta por usar a diluição em solvente orgânico, a seleção do solvente é uma das etapas mais críticas, pois este deve satisfazer a algumas condições, tais como: ser capaz de dissolver a amostra de forma satisfatória; não apresentar alta volatilidade e causar o mínimo de interferências possíveis (DUYCK et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 2013). Os solventes normalmente utilizados, quando técnicas de ICP são empregadas nas determinações são tolueno, clorofórmio, querosene e xileno (SÁNCHEZ et al., 2013).

Algumas configurações do plasma, que podem ser obtidas através de uma otimização, podem cooperar para uma diminuição de tais impactos citados acima. Como relatado, o aumento da potência do plasma, altos valores de RF, diminuem a vida útil do instrumento (DUYCK et al., 2007).

Mesmo com uma configuração operacional adequada do espectrômetro, para a introdução de compostos orgânicos, a determinação de elementos em solventes é propensa a interferências devidos principalmente a formação de espécies poliatômicas de Ar com O, C e H: em particular,  $^{51}\text{V}^+$  sofre interferência do  $^{38}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ . Sempre que possível deve-se escolher isótopos livres de interferências e/ou aplicar métodos matemáticos baseados nas abundâncias naturais de isótopos alternativos.

### 2.4.3.

#### **Determinação de metais em óleo cru por introdução direta em ICP-MS com diluição da amostra em solventes orgânicos**

Mesmo com todas as adversidades inerentes à introdução de solventes orgânicos no ICP-MS, as análises que utilizam introdução direta têm como vantagem eliminar etapas no preparo da amostra, pois muitas vezes são empregadas com a finalidade de simplificar amostras complexas, como é o caso do óleo bruto.

Em estudos iniciais, o nebulizador Meinhard foi usado em combinação com uma câmara de nebulização tipo Scott para introduzir solventes orgânicos em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*). A quantidade de solvente que efetivamente atinge o plasma foi identificada como um problema crítico, o que provocou a instabilidade e, por vezes, a extinção do plasma e o aumento do sinal de fundo (*signal-to-background*) devido às fortes emissões verdes de C<sub>2</sub> e de outros como, por exemplo, CN e OH (MAESSEN et al., 1984; BOORN; BROWNER, 1992). A dessolvatação do aerossol foi conseguida através de uma câmara refrigeração (-10 °C), reduzindo o nível de fundo. (BOORN; BROWNER, 1992) Quando a técnica foi aplicada ao ICP-MS, um outro efeito observado foi a deposição de carbono nos cones amostrador e *skimmer* e um maior nível de interferências de carbono (HUTTON, 1986). O problema foi resolvido pela adição de fluxo de O<sub>2</sub> ao argônio (MAGYAR et al., 1986), mas novas interferências apareceram devido à presença de oxigênio, como por exemplo, <sup>40</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup> na m/z 56 (Fe), <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> na m/z 48 (Ti).

O advento de dispositivos de nebulização ultrassônica (USN, do inglês *ultrasonic nebulization*), que combinado com controle de temperatura e uma membrana de dessolvatação, finalmente aposentaram o uso do nebulizador Meinhard para esta finalidade (BOTTO, 1993; BOTTO; ZHU, 1994). Neste mesmo contexto, Duyck e colaboradores (2002) desenvolveram um método para a determinação de elementos traços no petróleo bruto por ICP-MS após a dissolução da amostra em

tolueno e subsequente nebulização ultrassônica. A técnica de adição de analito, combinada com a padronização interna ( $^{115}\text{In}$ ), foi o procedimento de calibração capaz de corrigir adequadamente a supressão de sinal observada, especialmente em soluções com concentrações mais elevadas de asfaltenos. Foram obtidos bons limites de detecção, menores que  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  para V, Ni, Co, Y, Mo, Cd, Ba e La, e na faixa de  $0,1$  a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  para Al, Ti, Fe, Zn, Sr e Ag. A validação foi realizada através da análise de dois materiais certificados: NIST 1634c (V, Ni, Co) e NIST 1084a (para os outros 12 elementos), com precisão cerca de 10 % para ambos materiais. As amostras de óleo analisadas, oriundas da Bacia Potiguar (Brasil), tiveram inicialmente os asfaltenos separados por precipitação em heptano. A fração solúvel (maltenos) foi separada por cromatografia com eluição em três sub-frações: (1) saturadas, com baixa massa molecular (MM) de aromáticos, (2) aromáticos e compostos polares de baixa MM, e (3) compostos polares de alta MM (resinas). Os elementos traços foram determinados nestas frações após a dissolução em tolueno por USN-ICP-MS. Os cálculos para o balanço de massa mostraram um aumento significativo da maioria dos elementos (10-30 vezes) na fração asfáltica, e em menores proporções na fração 3, em comparação com as amostras de óleo bruto. A comparação com decomposição ácida assistida por micro-ondas apresentou boa concordância, validando a metodologia proposta e enfatizando sua aplicabilidade para análise de rotina de petróleo bruto e outros produtos petrolíferos solúveis em tolueno.

Com a criação dos micronebulizadores, surgiram novas aplicações e melhorias nas análises envolvendo a introdução de solventes orgânicos no plasma. Isto porque implica em menores taxas de aspiração da amostra, o que diminui a quantidade de solvente que efetivamente atinge o plasma, minimizando todas as implicações geradas quando estes tipos de solventes são introduzidos no equipamento. Os nebulizadores de injeção direta (DIN, do inglês, *direct injection nebulizer*) (BOTTO, 2002) e injeção direta de alta eficiência (DIHEN, do inglês, *direct injection high efficiency nebulizer*) (KAHEN et al., 2003) foram usados para se analisar

nafta, utilizando um fluxo de oxigênio no gás nebulizador, com taxas de aspiração da solução muito baixas (60 e 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ ), o que reduziu consideravelmente os níveis de carbono no plasma. A metodologia DIN permitiu a determinação de elementos voláteis como As, fornecendo limites de detecção inferiores a 0,1  $\text{ng g}^{-1}$  (BOTTO, 2002). O DIHEN foi utilizado para a determinação de Hg e suas espécies orgânicas em hexano, com limites de detecção semelhantes e sem efeitos de memória significativa (BJÖRN; FRECH, 2003).

Com efeito semelhante, foram usados micro nebulizadores de Teflon, mostrando-se promissores em ferramentas para a introdução de solventes no ICP-MS (MAESTRE et al., 2004; DREYFUS et al., 2005).

Seguindo esse conceito, Dreyfus e colaboradores (2005) empregaram um micronebulizador em teflon com taxa de aspiração de 100  $\mu\text{L min}^{-1}$  (PFA-100) e uma câmara de refrigeração em seu sistema para determinar metais traço e ultra-traço em petróleo bruto e suas frações (ou seja, maltenos-asfaltenos) por ICP-MS após a diluição com xileno. Neste sistema, foi introduzido  $\text{O}_2$  no sistema para a combustão completa da amostra e a técnica de adição de analito foi empregada para a calibração, de modo a controlar os efeitos de matriz. A validação do método foi realizada através da análise de três materiais de referência certificados (NIST 1085b, 1084a e 1634c) obtendo-se precisões próximas de 10 %. Os limites de detecção obtidos foram da ordem de  $\text{pg g}^{-1}$ . Foi feito um balanço de massa chegando à recuperação próxima de 100 % para Ni, V, Cu, Mo, Ag, Sn, Ba, e Pb. Os resultados apresentados mostraram que os elementos determinados estavam muito mais concentrados na fração asfáltica.

Souza e colaboradores (2012) também propuseram um método usando o micronebulizador PFA-100, acoplado a uma câmara de dessolvatação criogênica (5  $^{\circ}\text{C}$ , Isomist<sup>TM</sup>) para a determinação direta multielementar em amostras de óleo após simples diluição em xileno por ICP-MS com célula de reação dinâmica. As condições do plasma foram otimizadas por planejamento experimental  $2^3$  e resultaram nos valores ótimos de potência de RF de 1300 W e fluxo de gás de nebulização 0,42

L min<sup>-1</sup>, 1,1 L min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (Ar), e 0,1 L min<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> utilizado como um gás adicional. Para os elementos Ca, Cr, Fe e Mg, foi usado o metano como gás de reação na célula de reação dinâmica, a fim de minimizar as interferências espectrais sofridas por eles. Dois materiais de referência certificados, NIST 1634c (óleo combustível) e NIST 1085b (óleo lubrificante), foram analisados e as recuperações foram entre 90 e 110 % para a maioria dos elementos (obtendo-se 96 e 97 % para V e Ni, respectivamente) sendo os limites de detecção da amostra entre 0,2 µg kg<sup>-1</sup> e 40 µg kg<sup>-1</sup> (alcançando-se 0,6 e 0,1 µg kg<sup>-1</sup> para V e Ni, respectivamente). A confiabilidade dos resultados também foi testada, comparando os resultados para um conjunto de amostras de biodiesel analisadas por ICP OES, obtendo-se boa concordância para a maioria dos elementos.

Poirier e colaboradores (2016) também empregaram um micronebulizador (do tipo Micromist, que consiste em um nebulizador concêntrico fabricado com quartzo) para melhorar a eficiência da análise de amostras de petróleo diluídas em xileno por injeção direta em ICP OES/MS. Para avaliar a precisão dos dados, um padrão multielementar Conostan, bem como o material de referência certificado NIST 1634c, foram analisados. Em geral, os resultados obtidos para as técnicas usadas se mostraram compatíveis em relação à precisão, obtendo-se boa concordância entre as duas técnicas. Os limites de detecção obtidos foram entre 0,70 e 6,87 µg kg<sup>-1</sup>.

## 2.5.

### **Determinação de metaloporfirinas de V em petróleo**

### 2.5.1.

#### **Fracionamento do petróleo: preparação da amostra para especificação dos metais**

Devido à complexidade das amostras de petróleo, faz-se necessário um preparo da amostra mais elaborado antes da análise para especificação, pois desta forma simplifica-se a matriz para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os métodos para o preparo de amostra têm sido geralmente baseados em destilação à vácuo e sublimação, precipitação de asfaltenos, ou extração sequencial.

#### 2.5.1.1.

##### **Destilação e sublimação a vácuo**

A destilação é um método capaz de separar o óleo bruto através do ponto de ebulição de cada fração. Os compostos metálicos concentram-se no resíduo gerado chegando a 98 % dos metais presentes no óleo fracionado. A destilação pode ser feita à pressão atmosférica ou sob vácuo. A destilação à pressão atmosférica gera as seguintes frações, de acordo com a temperatura: gás (ponto de ebulição (P.E.) < 0 °C), gasolina (0 °C < P.E. < 185 °C), querosene (185 °C < P.E. < 240 °C), gasóleo (240 °C < P.E. < 360 °C) e resíduos (> 360 °C). Sob vácuo, a destilação gera destilados e resíduo de vácuo. Para se obter as porfirinas, pode se sublimar à vácuo o resíduo obtido (CAUMETTE et al., 2009).

A sublimação é realizada à pressão de  $10^{-2}$  mmHg, em um intervalo de temperatura entre 80 °C e 240 °C, gerando as seguintes frações: duas frações de asfaltenos (amarelo claro, 90-120 °C e laranja, 130-160 °C), duas frações de semi-sólido (uma fração grudenta vermelho escura, 170-200 °C e outra quebradiça vermelha, 210-240 °C) e um resíduo sólido preto (CAUMETTE et al., 2009). Marquéz e colaboradores (1999) isolou metaloporfirinas de um petróleo através da sublimação e metade de todo V e Ni originalmente presente no óleo foi encontrada nas 4 frações sublimadas (provavelmente por serem moléculas pequenas), enquanto a outra metade ficou retida no resíduo.

### **2.5.1.2. Precipitação de asfaltenos**

Como já mencionado, o óleo bruto é composto de asfaltenos (fração do petróleo insolúvel em parafinas) e maltenos. A precipitação dos asfaltenos é a maneira de separá-los dos maltenos, usando n-pentano ou n-heptano. Os asfaltenos compõem a parte mais polar e pesada do óleo e por isso não se solubilizam nesses solventes apolares, logo precipitam. Os maltenos se solubilizam e são recuperados por filtração (CAUMETTE et al., 2009).

Esse processo de precipitação dos asfaltenos permite o enriquecimento de metais nessa fração. Em se tratando dos metais, 80 % de Ni e V são precipitados com os asfaltenos, mesmo esta fração constituindo apenas 4 a 20 % do óleo cru (CAUMETTE et al., 2009).

A especiação da fração dos asfaltenos é particularmente complexa, pois nesta estão contidos os compostos aromáticos de alto peso molecular e heteroátomos presentes no petróleo. (CAUMETTE et al., 2009)

### **2.5.1.3. Extração sequencial**

A extração sequencial baseia-se na lixiviação do petróleo bruto com diferentes solventes orgânicos e suas misturas. Para isso usa-se uma coluna preenchida com alumina ou sílica. (MÁRQUEZ; YSAMBERTT; LA CRUZ, DE, 1999)

O método de separação mais popular para a separação prévia de porfirinas presentes em petróleo é o método SARA, que já foi pontualmente comentado. O princípio consiste em uma sequência de eluições em que se aumenta gradativamente a força dos solventes

usados e está esquematicamente apresentado na Figura 5. Essa extração sequencial de um óleo bruto permite a separação de quatro frações de hidrocarbonetos: (MÁRQUEZ et al., 1999)

- I. **hidrocarbonetos saturados**, é extraída com uma mistura 1:1 (v/v) de mistura de hexano/ciclo-hexano;
- II. **aromáticos**, é extraída com uma mistura 7:3 (v/v) de hexano/tolueno;
- III. **resina**, é extraída com uma mistura 7:3 (v/v) de tetracloreto de carbono/cloro metano;
- IV. **asfaltenos**, é extraída com uma mistura 1:1 (v/v) de acetonitrila/metanol.

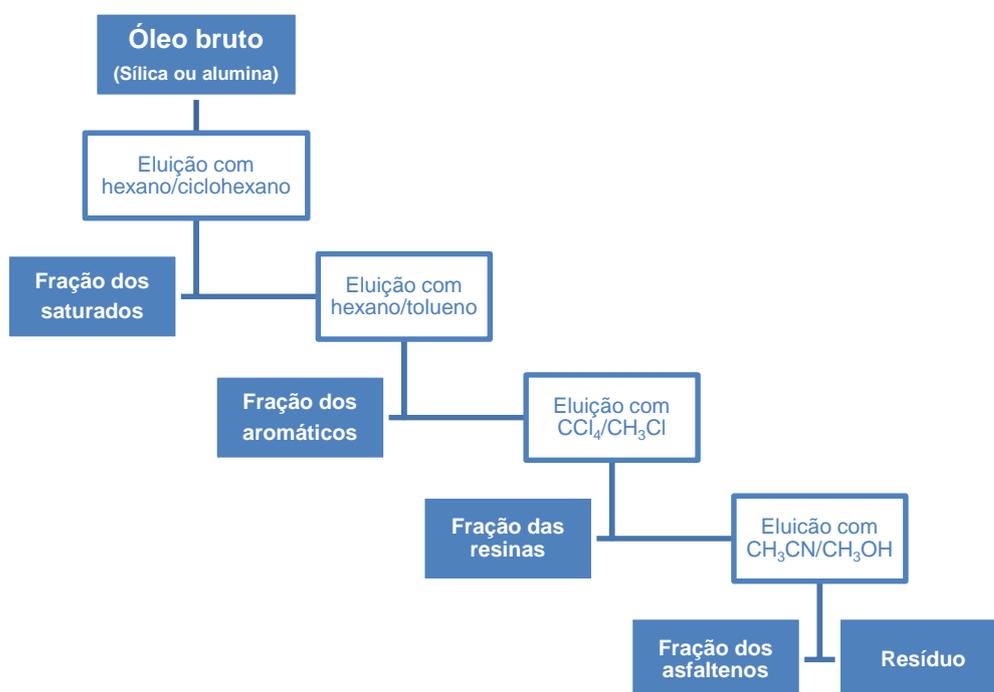


Figura 5: Fluxograma da extração sequencial pelo método SARA. Adaptado de Márquez e colaboradores (1999)

Uma alternativa para o método SARA é o método Soxhlet, no qual é feita uma extração sequencial com acetonitrila, metanol, n-heptano e benzeno, em alguns casos com prévia precipitação dos asfaltenos. Os metais Ni e V ficam concentrados nas frações de n-heptano e benzeno. Nas frações de acetonitrila e metanol foram encontrados entre 5 e 10 % de todo Ni e V associados às porfirinas. Em se tratando da fração de n-heptano, foi encontrado aproximadamente 10 vezes mais Ni e V do que nas frações solúveis em metanol ou acetonitrila, entretanto a absorção UV foi mais fraca e a identidade das formas destes metais permaneceu desconhecida. Já na fração extraída com benzeno, foi obtido cerca de 50 % dos metais. Mas como esta fração não absorve no UV, supõe-se que os metais devam estar presente sob a forma de espécies não porfirínicas. A recuperação de todo o processo foi relatada ultrapassando valores de 96 %. (MÁRQUEZ et al., 1999; CAUMETTE et al., 2009)

### **2.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”) é uma técnica largamente utilizada em química analítica tanto para análises qualitativas quanto análises quantitativas, para análises de rotina e de pesquisa. A grande utilização desta técnica se dá pela sua adaptabilidade para promover separações e determinações de uma grande gama de substâncias em variadas amostras, sendo capaz de ser realizada em poucos minutos (dependendo da amostra), com alta sensibilidade e resolução.

Um sistema HPLC é basicamente composto por um reservatório de solvente, uma bomba, um injetor (manual ou automático), uma coluna, um detector e um computador para aquisição e processamento de dados. Na Figura 6 está representado um esquema genérico de um sistema de HPLC e os seus principais componentes.

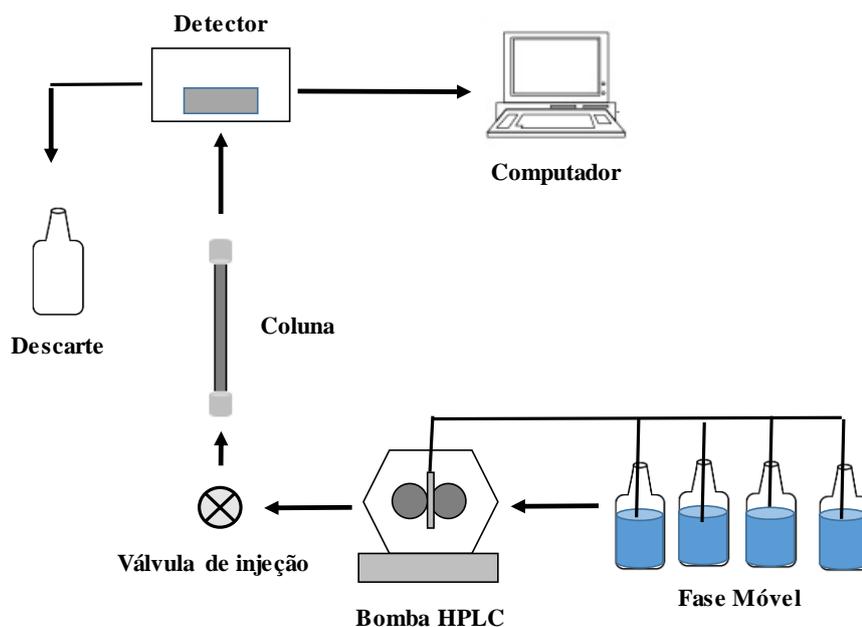


Figura 6: Esquema gráfico de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

O sistema HPLC funciona inicialmente com o bombeamento da fase móvel através de bombas, que tem como função enviar um fluxo constante, selecionado previamente, e reprodutível da fase móvel para o sistema cromatográfico. Este sistema de bombeamento permite variar a proporção dos componentes da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica, o que possibilita a eluição por dois métodos: isocrático e gradiente. No método isocrático, a composição da fase móvel permanece constante ao longo da análise. Já no gradiente, a composição da fase móvel varia durante a análise, o que permite variar a polaridade da fase móvel durante a corrida cromatográfica, possibilitando melhores separações quando amostras complexas são analisadas.

O injetor atua na transferência das amostras líquidas para a fase móvel que as transporta até a coluna. As injeções das amostras podem ser realizadas automaticamente ou manualmente.

A coluna é uma das partes mais importantes do sistema, pois é nela que acontece a separação dos compostos. Nela se encontra a fase estacionária que, em conjunto com a fase móvel, atuam na separação

almejada. As colunas usadas na cromatografia líquida de alta eficiência são constituídas por material inerte, na maioria das vezes aço inoxidável, com diâmetro interno uniforme e resistente às altas pressões em que serão utilizadas. Em seu interior encontra-se a fase estacionária, em que grupamentos são ligados a um suporte de sílica e dependendo do tipo de material usado em seu preenchimento pode ser de fase normal ou reversa. Na cromatografia em fase reversa são introduzidos na coluna grupos apolares, como os grupos C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> e C<sub>30</sub>, logo a fase móvel deve possuir certa polaridade. Na fase normal, os grupamentos presentes na coluna são polares e a fase móvel pode ser um solvente ou uma mistura de solventes orgânicos com baixa polaridade. A separação dos compostos presentes na amostra ocorrida na coluna se dá por diferentes mecanismos de interação (partição, adsorção ou troca iônica) entre o composto, a fase estacionária e a fase móvel. A escolha da coluna é crucial para o desenvolvimento de um método analítico. O tamanho da coluna, o tamanho da partícula e a fase estacionária afetam diretamente os resultados das análises, bem como a seletividade do método, eficiência de separação dos compostos e, conseqüentemente, a resolução dos picos obtidos nos cromatogramas (NEUE, 1997; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; LANÇAS, 2009).

Ao passo que os compostos vão sendo eluídos juntamente com a fase móvel, estes vão sendo encaminhados a um detector, que deverá responder a mudanças de concentração de todos os analitos presentes. Os detectores mais empregados em HPLC são os detectores de absorvância de radiação ultravioleta. Este tipo de detector possui uma célula que é colocada no caminho de um feixe de radiação UV-visível. A radiação não absorvida é então registrada e medida em um dispositivo denominado fotodiodo.

O sinal de resposta emitido pelo detector é enviado para um computador, que coleta os dados e reprocessa-os através de um *software* específico, gerando um cromatograma. Neste cromatograma são apresentados os picos obtidos com diferentes tempos de retenção, sendo possível, em alguns casos, identificar os compostos eluídos através do

tempo de retenção. Por intermédio das áreas dos picos gerados pode ser feita a quantificação dos analitos, comparativas às respostas de padrões.

Após passar pelo detector, a fase móvel, juntamente com os compostos presentes na amostra é direcionada a um reservatório para que possa ser feito o descarte. No caso de se empregar técnicas hifenadas, esse fluxo é direcionado ao segundo equipamento usado na hifenação

### 2.5.3.

#### **Identificação e quantificação de metaloporfirinas do petróleo por espectroscopia do UV-Visível, HPLC e espectrometria de massa (MS)**

Uma das técnicas mais usadas na análise de metaloporfirinas presentes no petróleo é a espectroscopia do UV-Vis, devido à sua alta sensibilidade e intensidade para as metaloporfirinas e porfirinas livres do metal. Muitas das V e Ni-porfirinas possuem forte coeficiente de absorção na banda de Soret em 400 nm. Elas também possuem duas bandas características na região do visível entre 500 e 600 nm, referentes às bandas  $\alpha$  e  $\beta$  (ZHAO et al., 2015). No entanto, quando amostras complexas são analisadas, como as oriundas do petróleo, e estes compostos se encontram em baixas concentrações, a identificação destes compostos é difícil (ZHAO et al., 2015).

Os primeiros estudos sobre estes compostos em óleo e xistos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a sua separação empregaram a espectrometria de massa para a sua identificação (GALLEGOS; SUNDARARAMAN, 1985; OCAMPO et al., 1985; SUNDARARAMAN, 1985). Apesar das porfirinas serem pouco voláteis, alguns trabalhos também foram feitos usando a técnica de cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*) (BARWISE; WHITEHEAD, 1980; ECKARDT et al., 1988). Estas metodologias empregavam extensas separações cromatográficas para purificação que requeriam grandes quantidades de amostra (10 g de óleo e até 10 kg de

xisto). A utilização de detecção UV-Vis durante a análise de HPLC dá uma estimativa quantitativa do DPEP e ETIO conteúdo global de um petróleo e verificou-se que a série DPEP é mais abundante do que a série -ETIO, sendo este último formado durante o processo de maturação (Sundararaman 1993, Doukkali, 2002).

A hifenação das técnicas HPLC e GC com detectores elementares, tais como ICP-MS, ICP OES, AAS e AFS (Espectrometria de Fluorescência Atômica, do inglês, *Atomic Fluorescence Spectrometry*), permite a determinação de elementos em sua forma organometálica. De uma maneira bem simplificada, as técnicas cromatográficas são utilizadas para separar e garantir a existência de porfirinas, enquanto que os detectores da espectrometria atômica são usados para a quantificação, utilizando padrões adequados (DUYCK et al., 2007).

Alguns trabalhos empregaram a hifenação da cromatografia gasosa (GC) a espectrometria de massas com plasma (ICP-MS) (EBDON et al., 1994; CAUMETTE et al., 2010; ELLIS et al., 2011). No entanto, devido aos pontos de ebulição elevados e as massas pesadas dos compostos investigados, essas técnicas hifenadas nem sempre são confiáveis.

Por outro lado, a hifenação da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ao ICP-MS surgiu como uma alternativa para a quantificação de espécies não voláteis, contendo metais em níveis de ultra-traços. Essa hifenação é bastante simples e as taxas de fluxo provenientes do HPLC (na faixa de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ) são compatíveis com o ICP-MS. Além disso, a especiação por HPLC fornece um nível de informação muito maior quando hifenada a um ICP-MS, uma vez que não requer uma interface aquecida, mantendo a amostra em seu estado líquido (DUYCK et al., 2007).

Em contrapartida, vale destacar todas as preocupações e procedimentos preventivos que normalmente são adotados quando solventes são usados em ICP (ver item 2.4.2).

O primeiro estudo utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenada ao espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado

(HPLC-ICP-MS) foi relatado por Ebdon e colaboradores (1994). Eles utilizaram uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> como fase estacionária, o que resultou na separação de níquel e vanádio, porfirinas em extratos de xisto de duas amostras de óleo de origem australiana e suíça. A hifenação foi realizada de modo bem simples, no qual um capilar de aço inoxidável diretamente aquecido foi usado para introduzir o eluente provido do HPLC para a tocha no ICP. Foi utilizado metanol, um solvente oxigenado, como fase móvel e uma vazão de 3,5 % de oxigênio no argônio nebulizador. A detecção no UV foi realizada em 400 nm. As concentrações de porfirinas Ni foram relatadas, na qual se obteve 14,9 e 119,8 µg g<sup>-1</sup>, para os dois óleos analisados. No entanto, não há dados relatados nos resultados reportados sobre a precisão, exatidão e limites de detecção da metodologia HPLC-ICP-MS desenvolvida e a quantificação dos compostos de vanádio não foi avaliada.

Caumette e colaboradores (CAUMETTE et al., 2010), realizaram o acoplamento da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, do inglês, *size exclusion chromatography*) e HPLC com fase normal, utilizando fases móveis orgânicas em modo isocrático e gradiente de eluição (THF), com ICP-MS. Neste estudo foram desenvolvidos e investigados a distribuição molecular de níquel e vanádio em amostras de óleo de origem francesa, as quais foram tratadas com n-heptano obtendo-se os asfaltenos por precipitação. Neste acoplamento foi usado um *Split*, o que permitiu a divisão de fluxo da fase móvel antes de sua introdução no ICP-MS, para o uso de solventes com pressão de vapor elevada, tal como tetrahidrofurano (THF), que resultou numa porcentagem de oxigênio mais baixa do que normalmente é empregada (cerca de 5,6 %), misturada com o fluxo do argônio nebulizador, através de uma conexão em T, antes da nebulização. A utilização deste solvente foi necessária para a eluição completa dos compostos V e Ni que se concentram nas frações de elevado peso molecular dos óleos brutos (asfaltenos). Os resultados quantitativos foram relatados como porcentagem do metal total coletado. As técnicas HPLC de fase normal e SEC foram utilizadas para separações bi-dimensionais e os compostos de vanádio detectados foram

sugeridos como não-porfirínicos, porém nenhuma informação adicional sobre UV-Vis ou espectrometria de massa, apoiando esta sugestão, foi apresentada. Os limites de detecção ( $0,8$  e  $2 \text{ ng g}^{-1}$  para V e Ni, respectivamente) e exatidão do método ( $99 \pm 0,3 \%$  de recuperação para um padrão de vanádio) foram apenas relatados para as análises por SEC-HPLC-ICP-MS.

Duyck e colaboradores (2011), também propuseram um método para quantificar porfirinas de vanádio em óleos brutos usando o HPLC com fase reversa hifenado ao ICP-MS. O preparo das amostras de óleo cru foi realizado em duas etapas: primeiramente houve a precipitação dos asfaltenos usando heptano e para o fracionamento dos maltenos foi utilizado o método SARA para a pré-concentração de porfirinas. Duas frações (fração 1 e fração 2) foram obtidas e separadas de acordo com a sua absorbância a  $400 \text{ nm}$ , que é o comprimento de onda característico da banda Soret de tetrapirroles usando tolueno e diclorometano. A resina foi eluída com uma mistura polar ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ ;  $65:25:4$ , v:v:v). As frações polares e as resinas estudadas foram obtidas de uma amostra de óleo brasileiro. Para a separação por HPLC foi usada uma coluna  $\text{C}_{18}$ , com detecção a  $400 \text{ nm}$ , e como fase móvel o solvente metanol, para a eluição das V porfirinas e uma mistura de clorofórmio-metanol, para as Ni porfirinas, o qual não pode ser usado para vanádio, devido à interferência causada pelo íon  $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$  em  $^{51}\text{V}^+$ . Um sistema de injeção em fluxo foi usado entre o HPLC e o ICP-MS para a introdução de um padrão inorgânico usado na calibração para a quantificação por HPLC-FI-ICP-MS com uma precisão de  $6,5 \%$  na calibração. O oxigênio foi adicionado na entrada do injetor com uma taxa de aspiração de  $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ . Os limites de detecção para V durante a eluição em metanol e para Ni durante a eluição em gradiente de clorofórmio foram  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $8 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Foi relatado apenas a quantificação da fração 1 por HPLC-ICP-MS, na qual foi encontrada  $7,39 \text{ mg kg}^{-1}$  de V. Como a análise de V total desta mesma fração por ICP-MS, realizada por diluição direta em xileno, apresentou resultado muito próximo ( $7,34 \pm 0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ), foi sugerido pelos autores que todo V desta fração está sob a forma

porfirínica, o que é coerente com a sua polaridade. Já em relação aos compostos de Ni, estes não foram detectados sob a forma de porfirinas. A recuperação foi avaliada por uma fração de porfirina injetada, entretanto, o balanço de massa elementar entre o óleo e a fração não foi investigado.

Os métodos de espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) para a caracterização de porfirinas vem sendo desenvolvidos desde da década de 60 (MEAD; WILDE, 1961), fornecendo pesos moleculares e fórmulas empíricas para as porfirinas (GALLEGOS; SUNDARARAMAN, 1985). A espectrometria de massa com ionização por impacto de elétrons (EI MS, do inglês, *electron ionization mass spectrometry*) foi a técnica mais utilizada neste campo. No entanto, a maior parte do trabalho inicial foi realizada em frações desmetalizadas.

Neste âmbito, várias técnicas foram associadas a espectrometria de massas com a finalidade de caracterizar as porfirinas, a nível molecular: ionização química (CI, do inglês, *chemical ionization*) (GJ; QUIRKE JME, 1978), de alta resolução e baixa energia de ionização por impacto de elétrons (GRIGSBY; GREEN, 1997), setor magnético (PREMOVIĆ et al., 2002), tempo-de-voos (TOF, do inglês, *time-of-flight*) (XU et al., 2005), bem como em modo *tandem* (MS/MS) (JOHNSON et al., 1986; CONCHA et al., 1991).

O emprego da técnica EI MS para caracterizar porfirinas livres de metal provou a existência de grupos ETIO e DPEP, além de encontrar rhodo-ETIO, rhodo-DPEP, Di-DPEP e rhodo-Di-DPEP de porfirinas (ZHAO et al., 2015). Os pesos moleculares de porfirinas isentas de metal foram relacionados com suas séries homólogas. ETIO, por exemplo, tem pesos moleculares de  $310 + 14n$ , (proveniente de  $-(CH_2)_n$ ) onde  $n$  é um número inteiro, já a série DPEP têm pesos moleculares de  $308 + 14n$ . Tais resultados permitem a determinação da série homóloga de porfirina, a razão principal da série ( $\Sigma DPEP / \Sigma ETIO$ ), o intervalo de números de carbono e o pico máximo para cada série (BAKER, 1966; BAKER et al., 1967).

O uso da espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI MS, do inglês, *electrospray ionization*) para detectar porfirina foi

primeiramente empregada por Van Berkel e colaboradores (VAN BERKEL et al., 1993). Esta técnica fornece uma ionização mais suave, a fragmentação é reduzida, desta forma, pode-se observar o pico molecular. Entretanto, a ionização direta de compostos de hidrocarbonetos em petróleos não é possível, o que pode ser feito é ionização de compostos polares presentes na amostra, tais como as porfirinas (SAKAIRI et al., 1991; FENN et al., 1997; CECH; ENKE, 2002).

#### **2.5.4.**

#### **Caracterização de porfirinas presentes no petróleo usando técnicas de alta resolução**

Recentemente, a espectrometria de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR MS) vem sendo empregada para a análise de porfirinas em petróleo. Uma de suas grandes vantagens é a ultra-alta resolução, que soluciona os problemas de resolução nas massas encontrados anteriormente.

O FT-ICR MS geralmente utiliza a ionização por electrospray (ESI), que ioniza com facilidade moléculas de alto peso molecular, alta polaridade e complexidade estrutural. No caso das análises de porfirinas, esta técnica é limitante, justamente por esses compostos não se ionizarem facilmente, o que requer alta voltagem para a ionização ou o emprego de ácidos para facilitarem a formação de íons. Ainda mais complexo é o caso das porfirinas de Ni, pois até recentemente não haviam sido analisadas diretamente por técnicas de alta resolução. Uma possível causa para este obstáculo é justamente à ineficiência na ionização deste tipo de composto.

O primeiro estudo utilizando FT-ICR MS para caracterizar porfirinas de níquel e vanádio em petróleo foi publicado por Rodgers e colaboradores (2013). Utilizando padrões de vanádio octaetil ( $V=O(II)OEP$ ) e níquel octaetil ( $Ni(II)OEP$ ) foi avaliada a possibilidade de se analisar estes tipos de compostos através da ionização por

*electrospray*, o que mostrou resultados satisfatórios. As amostras de óleo foram fracionadas por cromatografia líquida, obtendo duas frações que absorveram em 408 nm, indicando a presença de porfirinas nestas frações. Estas frações foram posteriormente submetidas a processos de purificação. Eles mostraram que é possível analisar porfirinas de V por ESI-FT-ICR MS e identificaram duas séries de porfirinas de V: etio e DPEP.

Qian e colaboradores (2008), identificaram algumas porfirinas de vanádio (VO) e vanádio contendo enxofre (VOS) em asfaltenos por fotonização por pressão atmosférica (APPI) e espectrometria de massas de ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR MS). A fórmula molecular e razões isotópicas foram encontradas a partir de modelos teóricos. Eles determinaram VO porfirinas com números de carbonos variando de C26 a C65. O inédito deste trabalho foi a identificação de porfirinas de vanádio contendo enxofre (VOS) usando a capacidade de ultra-alta resolução.

McKenna e colaboradores (2009), pela primeira vez identificaram VO porfirinas em óleo cru sul-americano e em asfaltenos sem fracionamento prévio ou tratamento da amostra por APPI-FT-ICR MS. As amostras de óleo da América do Sul foram somente diluídas com tolueno para posterior análise. Já as amostras de betume da Athabasca foram fracionadas de acordo com o método SARA. Nas amostras de óleo, identificaram as porfirinas DPEP e -etio, as quais foram as mais abundantes e apresentaram similares proporções, como também as porfirinas Di-DPEP, rhodo-etio, e rhodo-DPEP em menores quantidades.

Com o intuito de evitar tais processos de desmetalização e mostrar a possibilidade de se ionizar compostos de porfirinas de Ni, Qian e colaboradores (2010) mostraram pela primeira vez a identificação de porfirinas de Ni em amostras de asfaltenos por APPI-FT-ICR MS. A grande contribuição deste trabalho se deve à análise das porfirinas de Ni por ionização utilizando a técnica APPI em amostras de asfaltenos sem prévias desmetalizações. Os autores demonstraram que as porfirinas de Ni são menos sensíveis do que as de VO (cerca de três vezes menos), pois

o Ni possui dois isótopos abundantes  $^{58}\text{Ni}$  e  $^{60}\text{Ni}$ , este último tem uma abundância relativa de 35 % do  $^{58}\text{Ni}$ . As porfirinas de Ni também se encontram em menores quantidades quando comparadas às porfirinas de V, o que também contribui, juntamente com a ineficiência da ionização, para justificar o porquê destes compostos não terem sido identificados anteriormente. Os autores também relataram que alguns compostos contendo enxofre podem causar interferências espectrais nas massas de algumas porfirinas de Ni, sendo necessária resolução de no mínimo 1,2 milhão para os casos citados. Como as técnicas de ultra-alta resolução de massa ainda não chegaram a grandezas tão elevadas, a única solução apresentada foi analisar amostras de petróleo com baixos teores de enxofre. Houve a tentativa de analisar diretamente as amostras, em que facilmente foi detectada a presença de porfirinas de V, entretanto, para os compostos de Ni, os sinais obtidos foram baixos e ambíguos. Desta forma, as amostras de asfaltenos foram fracionadas, gerando três frações, as quais foram analisadas por ICP-MS. Foi observado que a primeira fração era a que retinha praticamente todo o Ni, então esta foi submetida à análise por APPI-FT-ICR MS. Os resultados mostraram que as porfirinas DPEP constituíram a mais abundante série determinada, seguida pela etio e di-DPEP. Os autores compararam os resultados obtidos com o Ni e V, concluindo que em ambos os casos as estruturas DPEP foram as mais abundantes e as razões etio/DPEP e Rhodo etio/Rhodo DPEP foram maiores para o Ni. Como a vaporização da amostra por APPI é um processo térmico, é possível que nem todas as moléculas de alto peso molecular da amostra de asfalto sejam vaporizadas e ionizadas por APPI. Portanto, outros trabalhos precisam ser desenvolvidos para verificar a possibilidade de existência de outros compostos de Ni presentes em amostras do petróleo.

Zhao e colaboradores (2013), analisaram porfirinas de vanádio em petróleo da Venezuela. As amostras de óleo foram fracionadas, a quantificação de vanádio foi feita utilizando um espectrômetro de absorção atômica (AAS) e a caracterização das porfirinas de vanádio por espectroscopia UV-Vis e por ESI-FT-ICR MS. Eles encontraram seis

classes de porfirinas de vanádio que já tinham sido previamente identificadas e três novas classes de porfirinas de vanádio, correspondendo às séries  $C_nH_mN_4VO_2$ ,  $C_nH_mN_4VO_3$  e  $C_nH_mN_4VO_4$ , suas possíveis estruturas foram sugeridas pelos autores.

Apesar dos estudos realizados com o uso da técnica FT-ICR MS na identificação de porfirinas presentes no petróleo fornecerem dados sobre a estrutura destes compostos, ainda não é uma técnica quantitativa. Desta forma, resultados de recuperações e balanço de massa, que são informações importantes na análise destes compostos necessitam ser investigadas com o emprego de outra técnica que possa fornecer dados quantitativos.

## **2.6. Aquisição por sinal transiente**

Quando se usa a aquisição de sinais transientes mesmo com duração de segundos ou de milissegundos, a fonte de íons do ICP passa a não ser mais constante. Isto porque uma vazão constante da amostra será introduzida e adquirida durante um intervalo de tempo superior ao método tradicional de aquisição de sinal (sinal contínuo). Sendo assim, nenhum estado constante ou estável de temperatura e densidade de elétrons podem ser assumidos (TANNER; GÜNTHER, 2009).

Em relação à precisão obtida nas análises por introdução contínua da amostra, pode-se classificar em precisão "interna" e "externa". A precisão "interna" está relacionada com a reprodutibilidade dos dados de razão isotópica obtidos durante várias medições individuais em uma corrida, ou seja, a reprodutibilidade será medida entre os valores obtidos em relação a razão isotópica para cada ponto durante a eluição de um pico em uma única injeção. Enquanto a precisão "externa" é a reprodutibilidade entre execuções repetidas, isto é, entre as injeções repetidas de uma mesma amostra. A precisão interna de um sinal transiente é muito mais difícil de ser determinada quando se tem sinais

contínuos, porque as intensidades de sinal mudam durante a eluição de um pico. De acordo com as estatísticas de contagem, as razões isotópicas obtidas no início de um pico e em seu final deve ser menos precisa do que no centro do pico, onde os sinais são mais elevados. Isso significa que, a precisão "interna" em um sinal transiente sofre mudanças ao longo da eluição de um pico (KRUPP; DONARD, 2005; GOURGIOTIS et al., 2014).

Para obter melhores sinais transientes utilizando ICP-MS, são necessários três requisitos: (a) condições de plasma robustas e estáveis em escalas de tempo de curta duração, (b) detecção simultânea de diferentes massas (c) aquisição de dados, leitura e armazenamento rápidos. O primeiro requisito é difícil de ser atingido, mas pode ser minimizado ou corrigido obtendo-se uma melhor compreensão da fonte de instabilidades do plasma. Os requisitos b e c são puramente instrumentais e estão sendo resolvidos no desenvolvimento de novos conceitos de ferramentas para melhorar a densidade de informação (aquisição de dados) para as análises (TANNER; GÜNTHER, 2009).

Quando as técnicas de HPLC e ICP-MS são hifenadas, o sinal transiente obtido para a determinação de um elemento por cromatografia é sujeito a vários problemas. Por exemplo, um desvio sistemático do sinal é observado, principalmente devido ao tempo de resposta do amplificador do detector, sendo este mais lento comparado com as alterações dos sinais ocorridas com a entrada dos íons (GOURGIOTIS et al., 2014). Adicionalmente, a co-eluição da matriz pode causar uma diferença no fator de resposta do instrumento, no caso de análises com amostras de petróleo, a presença de hidrocarbonetos pode causar supressão no sinal do analito (ANTLER et al., 2007).

Quando se trabalha com sinais transientes nem sempre as amplitudes do sinal são verdadeiras, podem haver muitos tipos de ruídos que são vistos como mudanças rápidas ou aleatórias na amplitude do ponto de um sinal. Pode acontecer pontos individuais que são mais elevados do que os pontos imediatamente adjacentes ou os pontos que são mais baixos do que os pontos adjacentes. Desta forma, existe um

algoritmo matemático com o objetivo de suavizar os sinais, conhecido por *smoothing*. Ele faz com que os sinais mais elevados, descritos acima, sejam reduzidos, bem como os mais baixos sejam aumentados. Este artifício não distorce o valor verdadeiro, mas reduz o ruído (<https://terpconnect.umd.edu/~toh/spectrum/TOC.html>, 2016). Um desses artifícios é o um algoritmo de suavização do tipo Transformada Rápida de Fourier (FFT, do inglês, *Fast Fourier Transform*), em que o modelo considera a periodicidade dos ruídos em diferentes frequências e calcula seus componentes harmônicos. O FFT vem proporcionando bons resultados ao ser usado no tratamento dos sinais obtidos por HPLC.

## **3** **Objetivos**

### **3.1.** **Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método capaz de separar e quantificar compostos porfirínicos de vanádio em frações de petróleo por HPLC-FI-ICP-MS.

### **3.2.** **Objetivos específicos**

1. Hifenar as técnicas de HPLC, FI e ICP-MS de modo a permitir a introdução do padrão interno em linha, juntamente com a amostra, buscando a máxima eficiência do sistema HPLC-FI-ICP-MS.
2. Otimizar os parâmetros operacionais do ICP-MS: potência, vazão de Ar de nebulização e vazão de Ar auxiliar, para máxima eficiência do sistema HPLC-FI-ICP-MS.
3. Adaptar as etapas de fracionamento das amostras de óleo cru, em vista de separar frações concentradoras de porfirinas de V e Ni.
4. Avaliar o comprimento da coluna HPLC, a polaridade da fase móvel e a massa de fração porfirínica injetada, visando otimizar as separações e recuperações para V porfirinas presentes nas frações de um óleo teste, por HPLC-FI-ICP-MS.
5. Investigar o emprego de padrão interno e da transformada de Fourier no processamento do sinal transiente produzido pelo sistema HPLC-FI-ICP-MS, a fim de obter o melhor sinal/ruído.

6. Desenvolver uma técnica de calibração adequada para a quantificação de V-porfirinas por HPLC-FI-ICP-MS e avaliar a precisão e exatidão da metodologia, empregando uma referência interna (óleo teste) e uma amostra certificada de óleo (NIST 8505).

## **4**

### **Materiais e Métodos**

#### **4.1.**

#### **Preparo das amostras e das soluções de calibração**

##### **4.1.1.**

##### **Descrição das amostras, reagentes e padrões**

Neste trabalho foram usados 3 óleos: um óleo brasileiro de referência interna (O1), um óleo angolano (O2) e um óleo cru venezuelano certificado, NIST 8505 (USA). Estes óleos foram submetidos a processos de fracionamentos, que serão mencionados no item 4.1.2. As frações finais obtidas (fração 1 a 5) eram solúveis em tolueno e com baixíssima solubilidade ou insolúveis em metanol ou água.

Os solventes metanol, tolueno, clorofórmio, n-heptano e diclorometano foram de grau HPLC (JT Baker, USA) e o solvente xileno (Vetec, Brasil) foi de grau PA. A solução tampão (pH = 4,1), empregada na fase móvel para os testes de separações de V-porfirinas, foi preparada com ácido acético (1,0 mol L<sup>-1</sup>) e acetato de sódio (1,0 mol L<sup>-1</sup>) em água. Água deionizada foi usada para o preparo do tampão.

Soluções de 20 µg kg<sup>-1</sup> dos padrões organometálicos monoelementares de Ba, La e In (Conostan, Conoco, Ponca City, OK, USA), diluídas em xileno, metanol ou na mistura metanol:tolueno (80:20; v:v), foram usadas na otimização das condições operacionais do equipamento ICP-MS. O tipo de solvente usado nas diluições dos padrões foi escolhido dependendo do tipo de otimização realizada: xileno nas

análises de V total nas frações, metanol e a mistura metanol:tolueno (80:20; v:v) nas análises por HPLC-FI-ICP-MS.

Para a curva analítica usada na determinação de V total nas amostras de óleo cru e suas frações, pelo método de introdução direta em ICP-MS, desenvolvido por Souza e colaboradores (2012), foi usado um padrão orgânico multielementar (SPC 21, Conostan, Canada), contendo V, diluído em xileno de 5 a 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

O padrão de V-porfirina, *vanadyl octaethyl porphine* (VO-OEP) (Sigma Aldrich, MI, USA), foi usado nas soluções de calibração para determinação de V sob forma porfirínica nas frações de óleo cru, por HPLC-FI-ICP-MS. Esse padrão também foi usado para avaliar a conformidade da coluna cromatográfica (HPLC), bem como determinar alguns parâmetros de mérito para o método quantitativo proposto (HPLC-FI-ICP-MS). Para a maioria destes testes foi usada a concentração de aproximadamente 20,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com exceção do teste de seletividade, em parâmetros de mérito, em que foi adicionado um *spike* de aproximadamente 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Cerca de 1 mg deste padrão foi diluído em 100,0 mL de metanol e uma diluição foi feita a partir desta solução, obtendo-se concentrações teóricas de V de aproximadamente 100,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A exata concentração do V como VO-OEP nesta solução foi determinada por ICP-MS através de uma calibração externa preparada com soluções de um padrão inorgânico multielementar (PerkinElmer, 29 elementos em 5 %  $\text{HNO}_3$ ).

Padrões inorgânicos monoelementares de Ge, Sc, Y, Nb, Rh and Ta, com 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  preparados em metanol (PerkinElmer) ou na mistura metanol:tolueno (80:20; v:v), foram testados como padrões internos.

Argônio 99,996 % de pureza (Linde Gás, Brasil) foi usado no ICP-MS. Oxigênio 99,5 % de pureza (White Martins, Brasil) foi usado para evitar depósitos de carbono e a formação de interferentes na introdução de solventes orgânicos no plasma.

#### 4.1.2. Fracionamento das amostras de óleo

Como um dos objetivos deste trabalho foi estudar a presença de V na forma de porfirinas em amostras de petróleo, foi necessário recorrer ao fracionamento dessas amostras a fim de pré-concentrar estes compostos porfirínicos devido às baixas concentrações encontradas no petróleo. O processo de fracionamento foi realizado em duas etapas. A primeira etapa foi realizada com uma coluna gravimétrica (50 cm x 2,5 cm) preenchida com Silicagel® (63–200 mm, Merck, Alemanha), previamente ativada a 150 °C para se obter a fração PAP (Parafinas, Aromáticos e compostos Polares) e a resina (Figura 7), como descrito por Duyck e colaboradores (2002, 2011). Cerca de 0,6 g de óleo cru foi diluído em 1,0 mL de heptano e depositado no topo da coluna. O sistema montado consiste em separar os compostos pela interação com a fase estacionária, a partir da percolação da fase móvel, usando 200 mL de heptano, 200 mL da mistura heptano:tolueno (1:1, v:v), 200 mL da mistura tolueno:diclorometano (1:1, v:v) e 400 mL de diclorometano. A fração recolhida é chamada de PAP e contém parafinas, aromáticos e polares. Os compostos de maior peso molecular, mais retidos na coluna, foram eluídos com 376 mL de uma mistura polar de clorofórmio:metanol:água (65:25:4, v:v:v), obtendo-se a resina. As duas frações foram submetidas aos processos de evaporação dos solventes através de um evaporador rotativo mantido a, no máximo, 60 °C, visto que os compostos porfirínicos são sensíveis à temperatura. Após a redução do solvente, as frações foram transferidas para frascos âmbar de 7 mL, os quais foram previamente descontaminados e pesados, e seguindo para a evaporação do solvente residual sob fluxo de argônio. As massas foram determinadas e as frações correspondentes armazenadas em geladeira a 2 °C.

Na segunda etapa, um sistema de cromatografia líquida de média pressão foi usado. O sistema é composto por uma bomba peristáltica, que pressiona a fase móvel dentro de uma coluna (250 mm x 25 mm, Omnifit Supelco, Cambridge, USA), a qual foi empacotada com sílica-gel (previamente ativada a 150 °C). O sistema foi montado com um detector

UV na saída dos eluentes, no qual se observava o comprimento de 400 nm, que é o comprimento de onda da banda Soret de tetrapirróis. O esquema usado para essa etapa do fracionamento das frações encontra-se na Figura 8. As frações PAP e resina foram diluídas em 1 mL de tolueno e posteriormente foram manualmente injetadas. Uma sequência decrescente de polaridade (Gradiente Reverso) de solventes foi usada: metanol, metanol:tolueno (50:50; v:v) e tolueno. Quando o eluente, ao sair da coluna, absorvia em 400 nm, este era coletado separadamente. Duas frações de porfirinas concentradas foram obtidas da PAP (Frações 1 e 2) e três da resina (Frações 3 a 5), como pode ser observado na Figura 7, que representa um esquema global do fracionamento usado. As frações 1 a 5 foram filtradas (0,45  $\mu$ m, Teflon, Millipore, USA), evaporadas e estocadas em um refrigerador a 2 °C até o momento das análises por HPLC-FI-ICP-MS ou por introdução direta no ICP-MS.

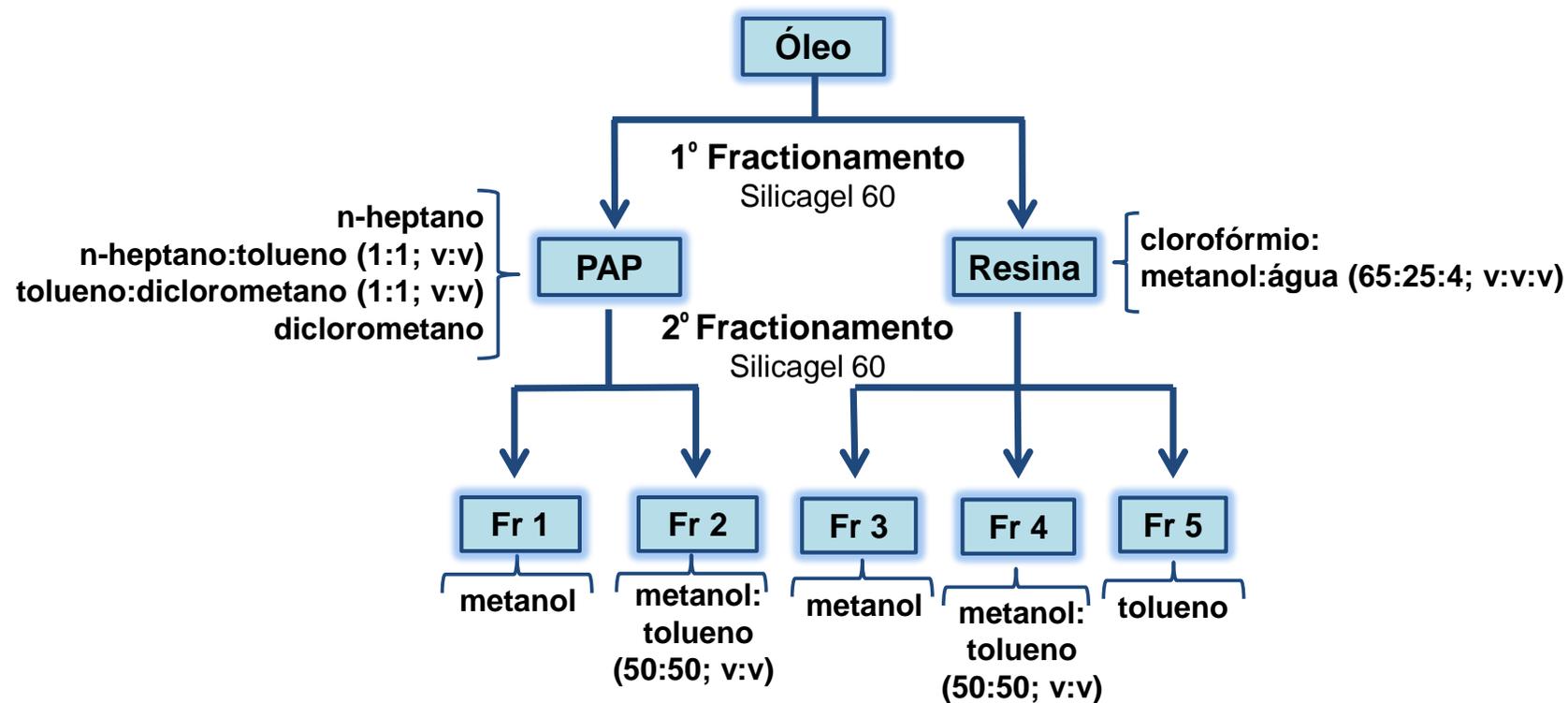


Figura 7: Esquema global do fracionamento usado nas amostras usadas neste trabalho, por Gradiente Reverso (GR) de solventes.

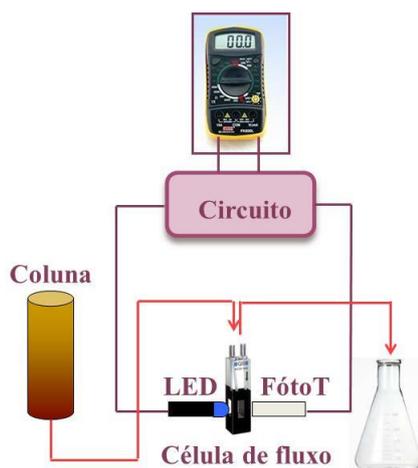


Figura 8: Esquema do 2º fracionamento - sistema de detecção em 400 nm.

## 4.2. Instrumentação

### 4.2.1. Descrição e otimização dos sistemas HPLC-FI-ICP-MS e análise direta por ICP-MS

Em todas as análises (HPLC-FI-ICP-MS e análise direta por ICP-MS) as concentrações de V foram determinadas usando um espectrômetro de ICP-MS modelo Nexlon 300X equipado com célula de colisão/reação (PerkinElmer, Canadá). O dispositivo para introdução de amostras usado foi composto por um nebulizador (escolhido de acordo com o tipo de análise, como será descrito abaixo) e uma câmara ciclônica de nebulização acoplada a um sistema de controle de temperatura, Isomist™ (Glass Expansion, USA), usado para fixar a temperatura de acordo com o solvente introduzido. Foi utilizado um injetor de quartzo com 0,8 mm de diâmetro interno (Glass Expansion, USA) e um fluxo de oxigênio introduzido após o nebulizador e antes do injetor, a fim de diminuir a formação de carbono nos cones de amostragem. Esta vazão de oxigênio foi controlada por fluxo de massa (MKS Instruments Inc., EUA).

Para a análise direta de soluções em xileno por ICP-MS, o nebulizador utilizado foi um micro-concêntrico PFA-100 (Elemental Scientific, USA) adequado para solventes orgânicos. Este nebulizador foi escolhido por permitir menor carga de solvente no plasma, e a temperatura da câmara de nebulização Isomist™ foi fixada em 5 °C. Esta análise foi realizada para se determinar o balanço de massa do V. O espectrômetro de massas foi otimizado com uma solução de aproximadamente 20 µg kg<sup>-1</sup> de Ba, La e In diluídos em xileno. Fixado o valor da vazão de oxigênio em 0,1 L min<sup>-1</sup>, foi avaliada a contribuição da potência da RF e as vazões de Ar de nebulização e Ar auxiliar sobre o máximo obtido na sensibilidade (intensidade do In > 5x10<sup>4</sup> cps), limitando a formação de óxidos (LaO<sup>+</sup>) e bivalentes (Ba<sup>2+</sup>) em ≤ 3 % (DUYCK et al., 2011).

Os parâmetros instrumentais selecionados como mais adequados, usados nas quantificações com introdução direta por ICP-MS estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros operacionais do plasma para as duas metodologias usadas.

	ICP-MS	HPLC-FI-ICP-MS
Potência do gerador RF (W)	1350	1150
Ar do plasma (L min <sup>-1</sup> )	17	17
Ar auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,2	1,2
Ar de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,4	0,6
Vazão de oxigênio (L min <sup>-1</sup> )	0,1	0,1
Dwell time (ms)	50	120
Internal Standard	-	<sup>74</sup> Ge

Um nebulizador Conikal (Glass Expansion, USA) foi empregado para a introdução das soluções de metanol e da mistura metanol:tolueno

(80:20; v:v) no ICP-MS e para as análises por HPLC-FI-ICP-MS. Este nebulizador foi escolhido porque suas vazões de operação são compatíveis com as vazões de saída do HPLC. A temperatura da câmara ciclônica de nebulização Isomist™ foi fixada em -5 °C. O padrão interno foi introduzido em linha, empregando uma junção em T (Figura 9). A otimização foi feita da mesma maneira, com os padrões Ba, La e In diluídos em metanol ou metanol:tolueno (80:20; v:v). Todas as áreas obtidas foram processadas pelo Origin®.

O instrumento usado nas separações por HPLC foi um modelo LC-20 (Shimadzu, Japão) equipado com um detector *Photo Diode Array* (PDA), que permite a aquisição simultânea de todos os comprimentos de onda até 900 nm. A hifenação realizada encontra-se no esquema apresentado na Figura 9 e na foto dos equipamentos usados mostrados na Figura 10a. A válvula de injeção foi de 20 µL e a vazão da fase móvel foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Os estudos de otimização foram realizados com duas colunas Lichrospher (150 x 4,6 mm, Supelco, e 125 x 4 mm, Merck) e com uma coluna Hypersil Gold (250 x 4,6 mm, Termo Scientific, USA), todas preenchidas com C<sub>18</sub> como fase estacionária (fase reversa), com 5 µm de diâmetro de partícula. V-porfirinas foram detectadas na região do UV-Vis, observando a banda de Soret (400 nm) e os picos β (550 nm) e α (570 nm) (XU et al., 2005).

O tubo de saída do HPLC foi conectado a uma válvula de injeção de seis saídas (7125 N, Rheodyne, EUA), equipada com um *loop* de amostragem de 20 µL, que foi usado como um dispositivo *flow injection* (FI) para a introdução no ICP-MS de soluções de calibração de VO-OEP durante a quantificação de V-porfirinas nas frações ou para a introdução das frações nos testes de recuperação (Figura 11), como descrito em estudos anteriores (DUYCK et al., 2011).

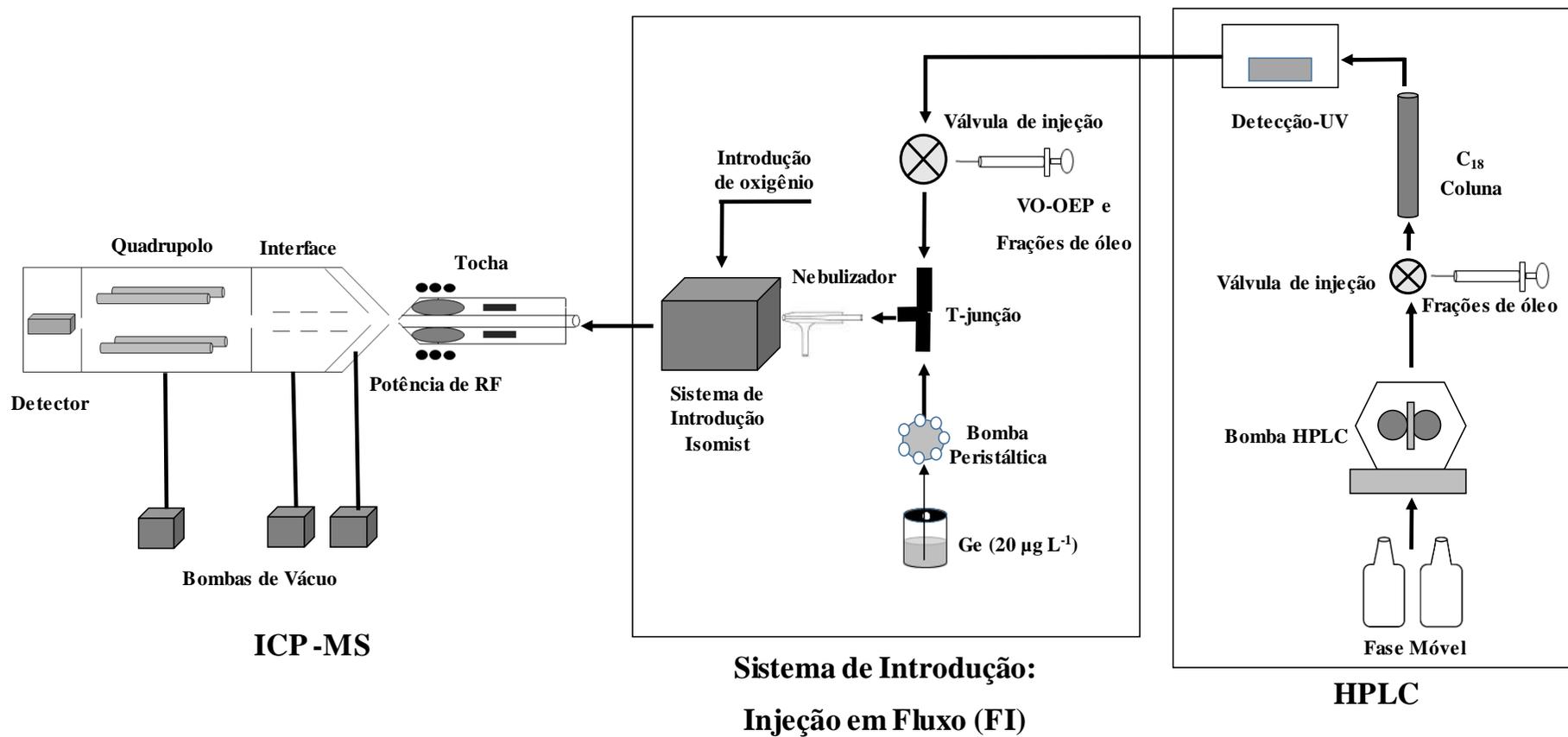


Figura 9: Esquema da hifenação do HPLC com o ICP-MS, usando a injeção em fluxo (FI) para a quantificação on line.

a)



b)



Figura 10: Foto dos instrumentos usados no sistema HPLC-FI-ICP-MS: a) Espectrômetro de ICP-MS Nexlon 300X (PerkinElmer) hifenado ao cromatógrafo de HPLC LC-20 (Shimadzu); b) Sistema de introdução de amostra. (LABSPECTRO / PUC-Rio)

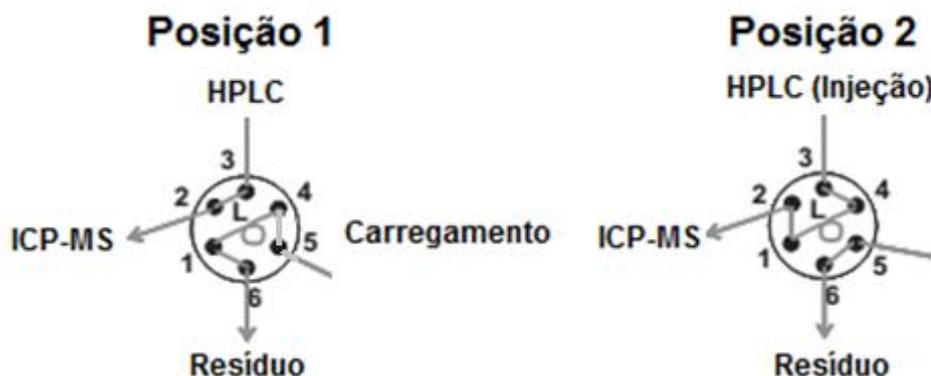


Figura 11: Esquema da válvula de injeção: Posição 1, carregando a solução de calibração ou fração da amostra no *loop* de amostragem; e Posição 2: injeção. (Adaptada de Duyck (2011))

Nas otimizações das condições usadas na separação por HPLC foram avaliadas as separações dos compostos de V-porfirinas presentes nas frações dos óleos analisadas e as recuperações obtidas quando alguns parâmetros pertinentes à técnica HPLC foram testados, como: comprimento da coluna, composição da fase móvel e massa injetada.

Para todo o trabalho optou-se por colunas de fase reversa ( $C_{18}$ ) devido a sua eficiência na separação, estabilidade, por permitir boa repetitividade e processamento de amostras complexas (SNYDER et al., 1997), além de já ser usada em trabalhos anteriores com o objetivo de fracionar amostras de petróleo (SUNDARARAMAN; RAEDEKE, 1993; EBDON et al., 1994).

Nos testes desenvolvidos para verificar o melhor comprimento de coluna a ser usado nas separações e quantificações dos compostos de V-porfirinas, foi analisada a fração 1 do óleo O1, usando metanol como fase móvel. Este solvente foi usado como fase móvel neste estudo porque a primeira fração é mais polar do que as demais, o que lhe confere maior solubilidade nesta fase móvel. Foi avaliada a separação e a recuperação em dois comprimentos de coluna: uma coluna com 250 mm e duas colunas em série com 150 e 125 mm cada. A recuperação foi calculada com a comparação das áreas obtidas nas injeções na coluna

cromatográfica e com as áreas obtidas ao injetar diretamente na válvula pós coluna. Essa recuperação (Rec) foi calculada usando a Equação 1:

$$Rec = \frac{100 \times A_1}{A_0} \quad \text{Equação 1}$$

em que:

$A_1$  → área total dos picos obtidos pelo sistema HPLC – FI – ICP – MS

$A_0$  → área total dos picos obtidos pela injeção em fluxo (FI)

Nestes testes foram observadas as bandas a 400, 550 e 570 nm para o espectro do UV-Vis, as quais são pertinentes às porfirinas.

A vazão da solução foi escolhida em 0,8 mL min<sup>-1</sup>, que é o máximo fisicamente permitido na hifenação das duas técnicas (HPLC-ICP-MS) e foi adotada em todos os testes de otimização.

Todas as frações (Fr1 até Fr5) do óleo de referência interno O1 foram analisadas frente a diferentes fases móveis, para se obter a melhor composição da fase móvel para cada fração. Para estes testes foi usada a coluna de 250 mm e avaliadas as fases móveis com o emprego de metanol, metanol:tampão acetato (99:1; v:v e 90:10; v:v ), e metanol:tolueno (80:20; v:v), todos através de métodos isocráticos.

#### **4.2.2. Parâmetros de separação**

A eficiência de separação de uma coluna cromatográfica é usualmente medida pelo número de pratos teóricos (N), o qual é calculado a partir de informações obtidas do cromatograma por meio da relação entre o tempo de retenção de um composto e a largura de sua base, como mostra a Equação 2 (NEUE, 1997; SNYDER et al., 1997; LANÇAS, 2009). Em geral, recomendam-se valores acima de 2000 para o número

de pratos teóricos, em prol de uma boa eficiência de separação de uma coluna (BOTTOLI et al., 2004).

$$N = \left( \frac{t_r}{w_b} \right)^2 \times 16 \quad \text{Equação 2}$$

em que:

$t_r$  → *tempo de retenção do analito*

$w_b$  → *largura da base do pico do analito*

Outra maneira de avaliar a eficiência de separação de uma coluna é por intermédio da altura equivalente a um prato teórico (HETP do inglês, *Height Equivalent to a Theoretical Plate*). A Equação 3 mostra como calculá-la. Neste caso, quanto menor a altura equivalente a um prato, mais eficiente será a coluna. Estima-se que para uma excelente eficiência de separação deva-se obter valores menores que 0,06 para HEPT.

$$HETP = \frac{L}{N} \quad \text{Equação 3}$$

em que:

$L$  → *comprimento da coluna (cm)*

$N$  → *número de pratos teóricos*

Sendo assim, a avaliação da eficiência de separação das colunas usadas se deu através da injeção de um padrão porfirínico (VO-OEP), com concentração de aproximadamente 20 µg L<sup>-1</sup>, preparado em metanol. Este padrão foi injetado nas duas conformações de colunas estudadas: uma coluna com 250 mm e duas colunas em série (150 e 125 mm). Este mesmo solvente foi usado como fase móvel, adotando-se uma vazão de

1,0 mL min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas usados para determinar as informações necessárias para se calcular o número de pratos teóricos ( $n_{TR}$  e  $w_b$ ) foram os obtidos em 400 nm.

### **4.3. Parâmetros de mérito**

Os parâmetros de mérito são empregados para avaliar se um método analítico produz resultados confiáveis, e é adequado ao uso pretendido. Para tal verificação, pode-se empregar alguns parâmetros, como: linearidade, limite de detecção (LOD), precisão e exatidão.

#### **4.3.1. Linearidade**

A curva analítica usada nas quantificações por HPLC-ICP-MS foi obtida a partir de diluições do padrão VO-OEP em metanol ou metanol:tolueno (80:20; v:v), dependendo da fase móvel utilizada. Este padrão foi previamente quantificado usando uma curva analítica obtida por diluições do padrão inorgânico de V (PE-29) em metanol, por introdução direta via ICP-MS.

Após determinar a concentração correta do padrão VO-OEP, foram feitas diluições, obtendo-se as concentrações cujos valores foram próximos à 50-100-200-400 µg L<sup>-1</sup>. Cada nível de concentração foi injetado cinco vezes na válvula de injeção em fluxo localizada pós coluna, gerando sinais que foram previamente tratados por FFT, assim como os sinais obtidos para o padrão interno (<sup>74</sup>Ge). Em seguida, a razão <sup>51</sup>V/<sup>74</sup>Ge foi calculada e usada para a construção dos picos, obtendo-se as médias das áreas de cada nível de concentração, juntamente com seus respectivos desvios padrão.

Antes de se aplicar essa equação matemática, é necessário verificar se os valores obtidos são estatisticamente significativos. Isso pode ser feito avaliando-se a ausência de valores discrepantes para todos os níveis de concentração, podendo ser usado o teste de Grubbs, como mostra a Equação 4 (NETO et al., 2001; OLIVEIRA, 2008; INMETRO, 2010).

$$G_{calc} = \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \quad \text{Equação 4}$$

em que:

$x_i$  → *valor suspeito*

$\bar{x}$  → *média dos valores*

$s$  → *desvio padrão*

Uma vez calculado o valor de G, compara-se com o valor crítico tabelado ( $G_{tab}$ ), para n valores avaliados em um nível de significância escolhido. Caso o  $G_{calc} > G_{tab}$ , o valor avaliado é discrepante e deve ser descartado (NETO et al., 2001; OLIVEIRA, 2008).

Sendo assim, para avaliar a ausência de valores discrepantes obtidos para a construção da curva analítica, foi aplicado o teste de Grubbs para os valores mínimos e máximos encontrados em cada nível de concentração.

Após a verificação da ausência de valores discrepantes, deve-se avaliar alguns fatores para que juntos possam confirmar a linearidade da curva analítica. Os fatores avaliados neste trabalho para averiguar a linearidade das curvas de calibração usadas no método quantitativo desenvolvido (HPLC-FI-ICP-MS) foram: homocedasticidade, coeficientes de regressão (linear, angular e determinação) e análise de variância.

A variância constante em uma sequência de variáveis aleatórias é chamada de homocedasticidade. O teste de Cochran pode ser usado para avaliar a homocedasticidade de um conjunto de experimentos (INMETRO, 2010). Este compara a maior variância com as demais obtidas, como mostra a Equação 5 (BAHIA FILHO et al., 2011):

$$C_{calc} = \frac{S_{máx}^2}{\sum S^2} \quad \text{Equação 5}$$

em que:

$S_{máx}^2$  → *quadrado da maior variância encontrada*

$S^2$  → *quadrado das variâncias*

Após calcular o valor de C, compara-se com o valor crítico tabelado, levando em consideração a quantidade de níveis de concentração usados na curva analítica (k) e o número de replicatas para cada um desses níveis (n). Se  $C_{calc} < C_{tab}$ , o sistema é homocedástico e os dados podem ser usados sem nenhum tipo de transformação.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear por mínimos quadrados (BOTTOLI et al., 2004). Para se obter uma melhor reta deve-se minimizar a distância dos pontos em relação à reta. Um meio de obter esse resultado é determinar a reta de tal maneira que a soma dos quadrados dos resíduos seja mínima. A equação matemática que relaciona a concentração e a resposta do equipamento é a equação da reta (Equação 6) (INMETRO, 2010):

$$y = ax + b \quad \text{Equação 6}$$

em que:

$y$  → *variável dependente (sinal ou massa obtido)*

$x$  → *variável independente (concentração do analito)*

$a$  → *coeficiente angular*

$b$  → *coeficiente linear*

Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, através da regressão dos mínimos quadrados também é possível calcular o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que dá um indicativo que o modelo matemático proposto se aplica à realidade do sistema. Quanto mais próximo de 1,0 forem esses valores, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Foi feita a regressão linear para as médias das áreas obtidas (para cada nível de concentração) x concentração, utilizando o desvio padrão obtido em cada nível de concentração. Estabeleceu-se dessa forma, uma curva analítica. Foram determinados os coeficientes da reta (**a** e **b**) e avaliado os valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ), como indicativos de que o modelo matemático proposto é linear.

#### 4.3.1.1. Análise de variância

O modelo matemático construído para a curva analítica é feito de forma que haja o melhor ajuste possível entre os resultados experimentais e a equação produzida com o modelo. A reta construída deve passar mais próximo possível dos dados experimentais, ou seja, os resíduos devem ser os menores possíveis. Por isso, examinar os resíduos é fundamental, para avaliar a qualidade do ajuste do modelo proposto (NETO et al., 2001).

A Análise da Variância é o método mais empregado para fazer essa avaliação. Para fazê-la, inicia-se com uma decomposição algébrica das respostas observadas experimentalmente em relação à resposta média global, como mostra a Equação 7 (NETO et al., 2001):

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i) \quad \text{Equação 7}$$

em que:

$y_i \rightarrow$  valor obtido experimentalmente

$\bar{y}$  → *média global*

$\hat{y}_i$  → *valor previsto pelo modelo*

A primeira e segunda parcelas representam, respectivamente, o desvio do valor obtido experimentalmente em relação ao valor ajustado pela regressão e o desvio da observação em relação ao valor ajustado pelo modelo. Um modelo bem ajustado terá um valor pequeno para a segunda parcela. Logo pode-se dizer que o desvio  $(y_i - \bar{y})$  deve ser o mais próximo possível do desvio  $(y_i - \hat{y}_i)$ .

Pode-se então obter as somas quadráticas para cada componente (Equação 8):

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Equação 8}$$

em que:

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = SQT \text{ (é a Soma dos Quadrados Totais)}$$

$$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 = SQR \text{ (é a soma dos Quadrados da Regressão)}$$

$$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2 = SQE \text{ (é a soma dos Quadrados dos resíduos)}$$

Desta forma, podemos escrever a Equação 9:

$$SQT = SQR + SQE \quad \text{Equação 9}$$

Essas somas quadráticas estão associadas a certos números de graus de liberdade (g.l.). Fazendo a divisão das somas quadráticas pelos seus respectivos números de graus de liberdade, obtém-se as médias quadráticas (MQ), como pode ser observado na Tabela 2, que resume a análise de variância para o ajuste de um modelo linear com dois parâmetros (NETO et al., 2001).

Tabela 2: Análise da variância para o ajuste de um modelo linear com dois parâmetros (NETO et al., 2001).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	$\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$MQR = SQR$
Resíduos	$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	n - 2	$MQE = \frac{SQE}{n - 2}$
Total	$\sum (y_i - \bar{y})^2$	n - 1	

Determinando-se as médias quadráticas, faz-se um teste para averiguar se a equação é estatisticamente significativa, como mostra a Equação 10:

$$\frac{MQR}{MQE} \approx F_{1,n-2} \quad \text{Equação 10}$$

onde 1 e n - 2 são os números de graus de liberdade da média quadrática da regressão e residual, respectivamente, sendo n o número de níveis de concentração usado na curva analítica.

Calcula-se então a razão entre as médias quadráticas (Equação 10) e compara-se o valor encontrado com o valor tabelado, para os mesmos números de grau de liberdade e no nível de confiança desejado. Se o valor encontrado para a razão  $\frac{MQR}{MQE}$  for maior que o valor  $F_{\text{tab}(1,n-2)}$  pode-se atestar a significância estatística da regressão.

#### 4.3.2. Precisão

A precisão de um método representa a dispersão entre os resultados obtidos sucessivamente através da análise de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões.

Para se determinar a precisão do método desenvolvido neste trabalho (HPLC-FI-ICP-MS) um padrão VO-OEP (~ 100 µg L<sup>-1</sup>) foi injetado

na coluna cromatográfica de 250 mm, usando metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v) como fases móveis. Para este fim, foram avaliados a dispersão entre os resultados obtidos em um mesmo dia de análise, a partir de injeções sucessivas usando as mesmas condições operacionais obtidas, e em um intervalo de 5 semanas, analisando em dias não consecutivos.

A avaliação da precisão em um mesmo dia de análise foi realizada a partir de 8 injeções consecutivas do padrão VO-OEP. Os resultados obtidos pelo ICP-MS, para a razão  $^{51}\text{V}/^{74}\text{Ge}$ , foram usados na construção do cromatograma. Com o auxílio do Origin<sup>®</sup>, obtiveram-se as áreas e tempos de retenção ( $t_R$ ) para cada pico adquirido, sendo então feita a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) destas medidas.

Em se tratando dos dias alternados, foram analisadas 15 injeções do mesmo padrão, em um intervalo de 5 semanas, analisando em dias não consecutivos. Para este, somente foi avaliado os desvios produzidos pelos tempos de retenção ( $t_R$ ).

#### **4.3.3. Limite de detecção (LOD)**

O limite de detecção (LOD) é o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado por um determinado método, capaz de diferenciar do ruído do equipamento.

Existem algumas formas de expressar o LOD, uma delas é considera-lo como sendo a concentração mínima detectável (CMD). O que representa a concentração ou massa do analito que gera um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema, como mostra a Equação 11 (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2011):

$$LOD = 3N$$

Equação 11

em que:

$N \rightarrow$  ruído do sistema

Para o método desenvolvido neste trabalho foi adotado o cálculo do LOD instrumental através da Equação 11. Em seguida, foi feita uma verificação do valor encontrado injetando um padrão de VO-OEP com a correspondente concentração determinada, comparando a altura dos picos obtidos com a altura do ruído.

#### **4.3.4. Exatidão**

A exatidão de um método retrata o grau de concordância entre os resultados obtidos e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os parâmetros usados na determinação da exatidão de um método são: análise de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação ou participação em comparações interlaboratoriais.

Para avaliar a exatidão do método desenvolvido neste trabalho foi usada a comparação de método, que consiste em comparar os resultados obtidos com o método desenvolvido com os resultados obtidos através de um método de referência, avaliando o grau de exatidão alcançado com o método proposto em relação ao de referência. O método usado como referência neste trabalho foi o desenvolvido por Souza e colaboradores (2012).

Para verificar se as duas técnicas descritas fornecem os mesmos resultados, foi feito um teste t pareado. Primeiramente, foram enunciadas as hipóteses nula ( $H^0$ ) e alternativa ( $H^1$ ). Para a hipótese  $H^0$  as duas técnicas fornecem os mesmos resultados, ou seja, as médias geradas nas duas análises distintas são iguais, a diferença entre elas deve ser igual a

zero e na hipótese  $H^1$  as duas técnicas fornecem resultados distintos, temos então:

$$H^0 = \mu_d = 0$$

$$H^1 = \mu_d \neq 0 \quad \mu_d = \mu_{\text{HPLC-ICP-MS}} - \mu_{\text{ICP-MS}}$$

O teste t pareado é realizado através da Equação 12:

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d/\sqrt{N}} \quad \text{Equação 12}$$

em que:

$\bar{d}$  → média das diferenças entre todas as médias avaliadas

$s_d$  → desvio padrão da diferença

$N$  → número de médias avaliadas

O desvio padrão da diferença pode ser calculado como mostra a Equação 13:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d_i^2 - [(\sum d_i)^2/N]}{N-1}} \quad \text{Equação 13}$$

em que:

$d_i$  → diferença para cada par de médias

Para que a hipótese nula faça-se cumprir, ou seja, para que os resultados fornecidos pelas duas técnicas sejam considerados estatisticamente iguais,  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ , para o nível de significância escolhido.

Caso contrário, os resultados fornecidos pelas duas técnicas são considerados diferentes.

#### **4.4. Quantificação por HPLC-FI-ICP-MS**

Otimizado o método para a quantificação de V-porfirinas em frações de óleo cru, usou-se uma única coluna (250 mm), as fases móveis metanol para a fração 1 e metanol:tolueno (80:20; v:v) para todas as frações, bem como as condições do plasma expressas no item anterior (ver Tabela 1).

Antes das injeções no HPLC, as frações foram retiradas da geladeira e diluídas em solventes e/ou misturas apropriadas. O ideal é, sempre que possível, diluir as frações no mesmo solvente empregado na fase móvel do HPLC, entretanto, isto não foi possível devido à diferença de polaridade entre as frações e os solventes. Por isso, na medida do possível, as frações foram diluídas utilizando proporções de solventes em que a fase móvel estivesse presente em alguma proporção. As diluições foram feitas de modo que a massa injetada fosse próxima ao valor otimizado (~1,6 mg). As duas primeiras frações provenientes da PAP (Frações 1 e 2) apresentaram cerca de 0,1 g. Como a fração 1 do óleo corresponde a fração mais polar, por ser eluída em metanol no 2º fracionamento (ver Figura 7), estas frações do óleo de referência interna O1 foram diluídas com 0,3 mL de metanol e 0,9 mL de tolueno. Entretanto, na fração 2 não foi possível adicionar metanol, pois esta fração tem polaridade média, com isso essa foi diluída somente com 1,2 mL de tolueno. A fração 3 apresentou massas próximas a 0,06 g e foram feitas duas diluições somente em tolueno. Na primeira diluição foi adicionado 1 mL de tolueno e em 0,1 mL desta mistura foi adicionado 0,6 mL de tolueno.

#### 4.5. Balanço de massa

O balanço de massa (BM) é usado como um teste de validação adicional quando frações de uma amostra são analisadas. A Equação 14 mostra o cálculo usado para de determinar o BM.

$$BM (\%) = \left[ \frac{m_{Fr1}C_{Fr1} + m_{Fr2}C_{Fr2} + m_{Fr3}C_{Fr3} + m_{Fr4}C_{Fr4} + m_{Fr5}C_{Fr5}}{m_O C_O} \right] \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

14

em que:

$m \rightarrow$  massa (g)

$C \rightarrow$  concentrações ( $mg\ kg^{-1}$ ) em um óleo (O) e em suas frações (Fr1 a Fr5)

## 5 Resultados e discussão

### 5.1. Testes preliminares: avaliação das separações para as Frações 1 e 2

Inicialmente as frações 1 e 2 separadas a partir do óleo de referência interna O1, do óleo O2 e do óleo de referência NIST 8505 foram injetadas no sistema HPLC-FI-ICP-MS. Foram usadas as duas colunas C<sub>18</sub> conectadas em série, totalizando 275 mm de comprimento, com a vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e metanol como fase móvel. A finalidade desses testes iniciais foi avaliar a solubilidade dessas frações nos solventes usados na diluição (metanol e tolueno) e averiguar o comportamento dessas frações frente ao sistema montado. Além disso, nesta etapa do trabalho, objetivou-se assegurar que os resultados obtidos referem-se às porfirinas de V. Para este fim foi avaliada a detecção de V-porfirinas por ICP-MS (na massa <sup>51</sup>V) e por UV-Vis. Além disso, a análise e possível detecção de um *spike* de um padrão porfirínico de V na mesma faixa de retenção corroboram a detecção destes compostos.

Os testes se iniciaram com a análise da adição de um *spike* do padrão porfirínico VO-OEP (~100 µg L<sup>-1</sup>) na fração 1 do óleo O1. A Figura 12 mostra o cromatograma obtido com a análise desta fração.

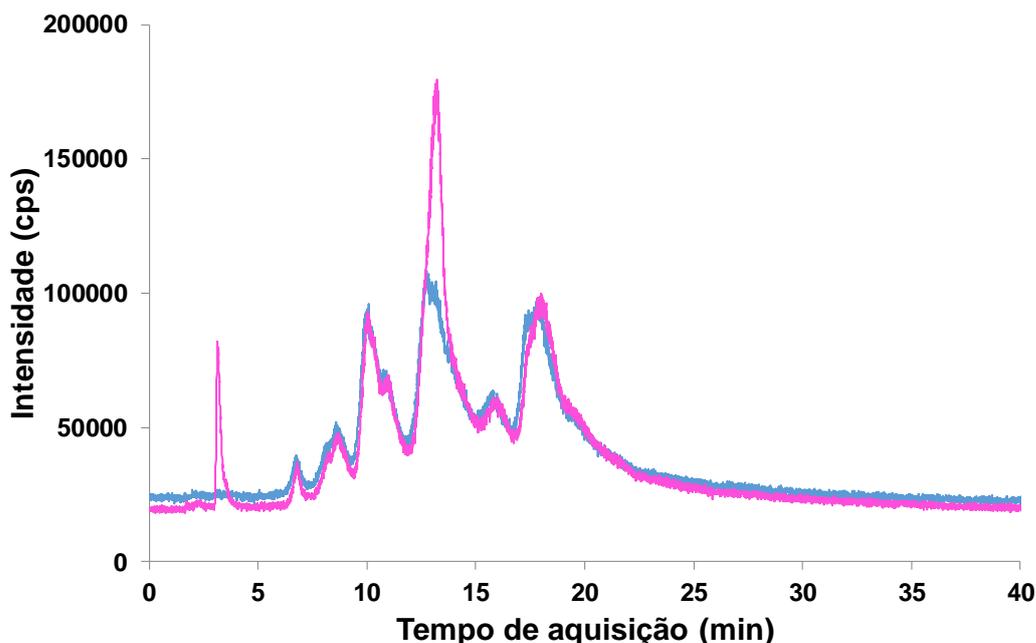


Figura 122: Perfil cromatográfico da adição de um *spike* de VO-OEP na detecção de V-porfirinas por ICP-MS durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (3,9 mg injetada), sem *spike* (—) e com *spike* de aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (—).

Como pode ser observado na Figura 12, o pico referente à adição da VO-OEP, em aproximadamente 13 min, foi bem pronunciado e co-eluiu com outro pico presente nesta fração. A partir destes resultados, pode-se afirmar que há indícios da identificação de porfirinas de V nesta fração.

Também foi observado um pico eluindo no tempo morto (em aproximadamente 4 min), quando a fração com *spike* foi analisada. Isto evidenciou que alguns compostos que ficaram retidos na coluna a partir de alguma análise das frações anteriormente injetadas, eluíram com o solvente usado na injeção desta fração com *spike*. Por esse motivo, foi adotada uma limpeza na coluna, usando metanol:tolueno (50:50; v:v) como fase móvel após as injeções das frações. Esse procedimento se mostrou eficiente na eluição de compostos que ficaram retidos durante as injeções das frações.

Com base nos resultados satisfatórios para a detecção de V-porfirias, acima apontados, foram analisados todos os óleos, com suas respectivas frações 1 e 2.

Os resultados obtidos com a análise das frações 1 e 2 do óleo O1 (Figura 13), mostraram que a hifenação HPLC-ICP-MS pode gerar resultados promissores no que diz respeito à separação e detecção das porfirinas de V. A possível detecção em 570 nm (DECHAINE; GRAY, 2010), que refere-se ao pico  $\alpha$ , o que se mostrou mais compatível com os espectros de V obtidos pelo ICP-MS, sustentou a natureza porfirínica desses compostos, visto que os espectros obtidos pelo ICP-MS e UV são semelhantes. Além disso, também foi possível a detecção na banda de Soret (400 nm) que é o comprimento de onda característico de tetrapirróis, e nos picos  $\beta$  (550 nm) (Anexo 1) também legitimam o caráter porfirínico destes compostos.

Na análise da fração 2, também foi observado um pico eluindo no tempo morto (Figura 13b), reafirmando a ideia inicial de retenção de compostos na coluna e a necessidade de uma limpeza da coluna após as injeções das frações.

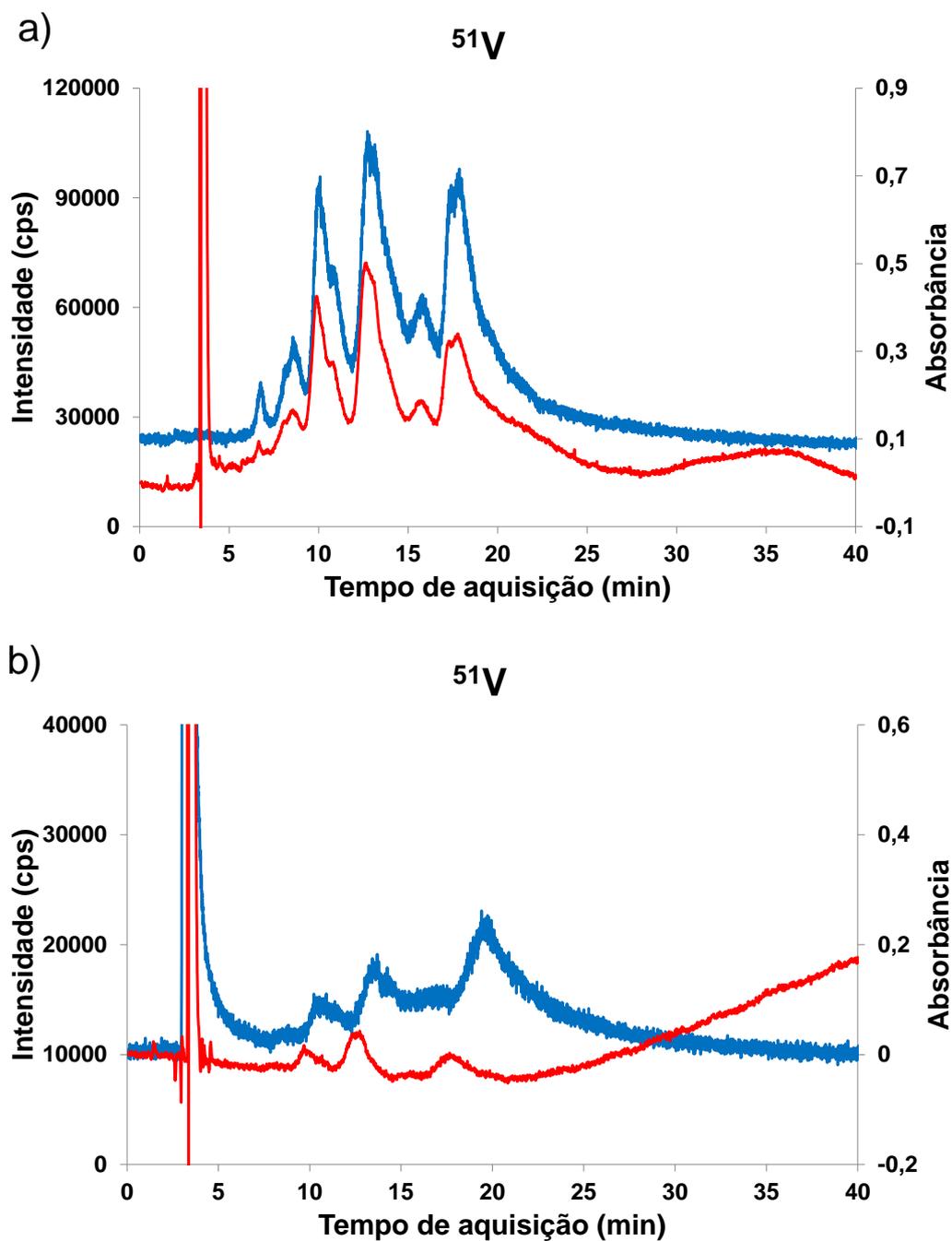


Figura 13: Perfil cromatográfico das V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição de frações do óleo cru O1 usando duas colunas em série e metanol como fase móvel e: a) fração 1 (4,7 mg injetados); b) fração 2 (3,1 mg injetados).

Os resultados obtidos com a separação dos compostos das frações 1 e 2 do óleo O2 encontram-se na Figura 14. Os picos saíram co-eluídos, evidenciando que metanol pode não ser a fase móvel mais adequada para separar estes compostos, podendo também ser efeito da quantidade de VO-porfirinas nas amostras. A presença de porfirinas de V também pode ser verificada na observação do pico em 570 nm (Figura 14), 400 nm e 550 nm (Anexo 2).

O óleo certificado NIST 8505 é proveniente da Venezuela e é visualmente mais viscoso que o óleo O1, contendo uma concentração maior de V. Como pode ser visualizado na Figura 15, os resultados também foram promissores para a análise das frações 1 e 2, pois houve a absorção de compostos em 570 nm, evidenciando a presença de porfirinas. As demais bandas de absorção (400 nm e 550 nm) estão mostradas no Anexo 3. Entretanto a separação das porfirinas de V não foi eficiente, o que pode ser justificado pela complexidade da amostra. Para uma avaliação qualitativa na qual se almeja identificar as porfirinas associadas a cada pico registrado, o metanol não poderá ser empregado, pois não houve resolução adequada entre os picos, ocorrendo co-eluição em todo o cromatograma.

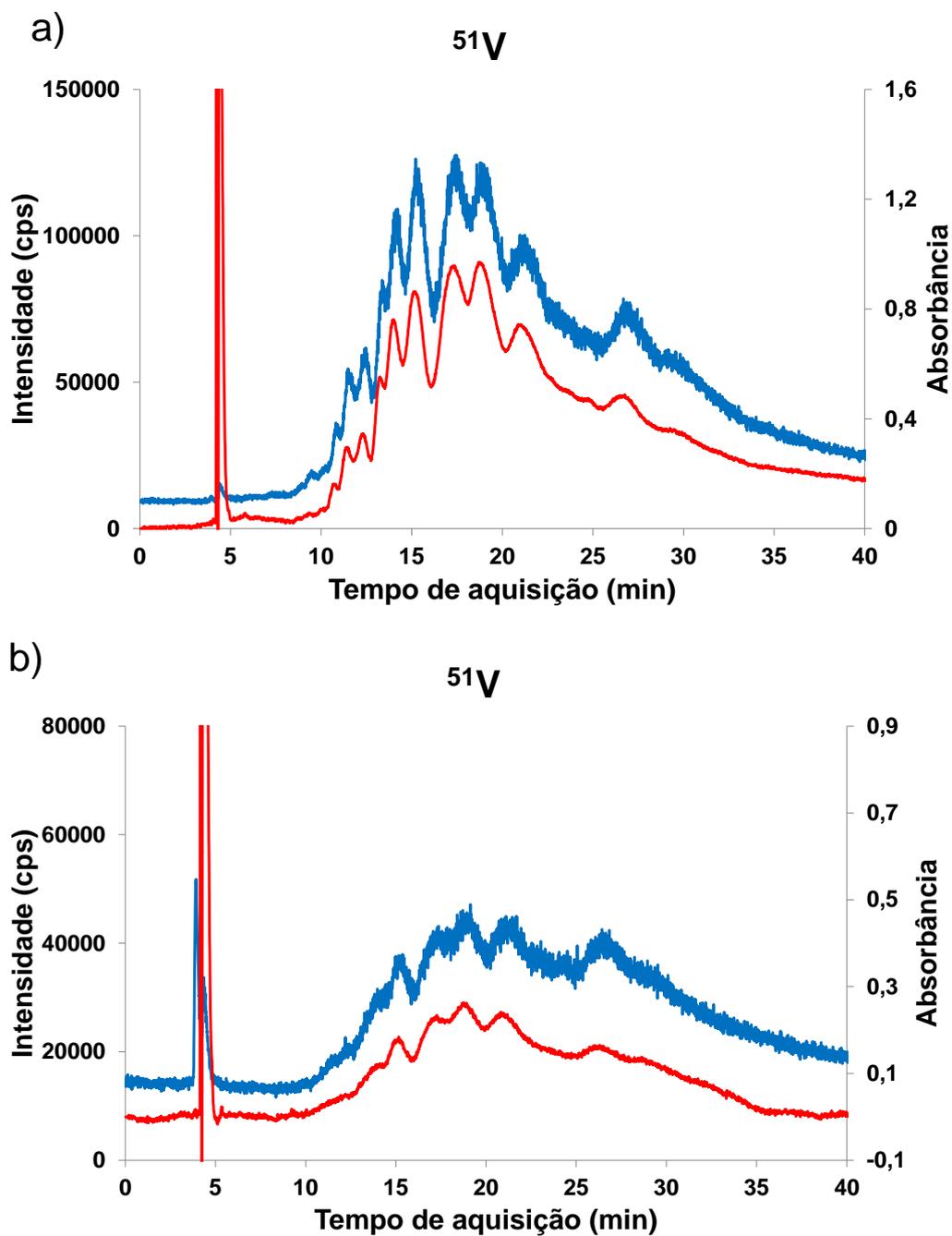


Figura 14: Perfil cromatográfico das V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição de frações do óleo cru O2 usando duas colunas em série e metanol como fase móvel: a) fração 1 (5,5 mg injetados); b) fração 2 (3,4 mg injetados).

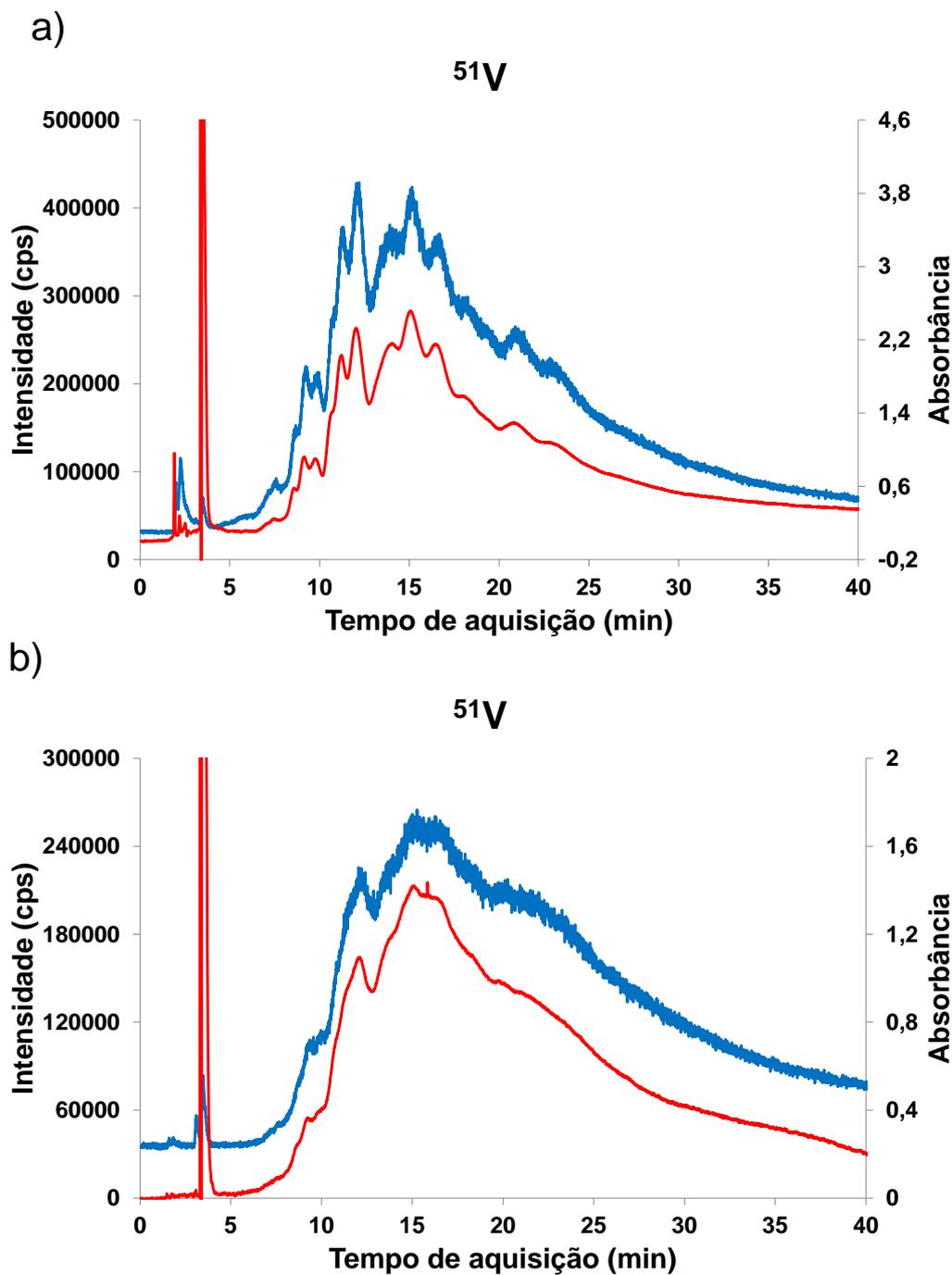


Figura 15: Perfil cromatográfico das V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição de frações do óleo certificado NIST 8505 usando as duas colunas em série e metanol como fase móvel e: a) fração 1 (3,5 mg injetados); b) fração 2 (3,7 mg injetados).

Em suma, esses resultados se mostraram promissores no que diz respeito à detecção de V sob a forma de porfirinas presentes em óleos cru, em que as semelhanças entre os cromatogramas (UV e ICP-MS) puderam confirmar este fato. Em seguida, foi adotada uma limpeza usando uma mistura metanol:tolueno (50:50; v:v) por 30 minutos, visto que em algumas injeções consecutivas destas frações geraram picos no tempo morto, acompanhando a eluição destes compostos da coluna, indicado pelo UV. Além disso, foi observado uma grande variação no ruído, com diferentes frequências e amplitudes elevadas na linha de base do sinal transiente de  $^{51}\text{V}$ . Isto já era esperado, pois o emprego de sinal transiente quando HPLC é hifenado ao ICP-MS produz um desvio sistemático do sinal (GOURGIOTIS et al., 2014).

A partir desses estudos preliminares, as seguintes metas foram estabelecidas para o desenvolvimento do método: melhorar a forma dos sinais transientes, otimizar as condições de separação e recuperação por HPLC, otimizar as condições do plasma e quantificar V-porfirinas nas frações dos óleos.

## 5.2. Picos por medida (*Peaks for reading*)

A eluição dos compostos em HPLC requer longos intervalos de tempo, podendo chegar a horas de análise, a fim de se obter uma série de medidas suficientes para uma distinção estatística do sinal (pico) em relação ao ruído (linha de base) (TANNER; GÜNTHER, 2009). Portanto, foi calculado o número de medidas realizados quando um padrão VO-OEP, com aproximadamente  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , era injetado em uma única coluna (250 mm), com metanol como fase móvel e  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  de vazão. Nesse estudo, o intervalo de tempo, calculado como a largura na base do pico foi aproximadamente de 20 s para a eluição padrão VO-OEP em metanol com a única coluna. O uso de 120 ms de *dwell time* (tempo gasto para a

aquisição de dados em cada um dos canais que formam um pico no espectro de massa) resultou em uma média de aproximadamente 170 leituras na  $m/z = 51$  para a obtenção do pico da solução padrão. Este valor é bastante satisfatório para a construção de um sinal transiente, pois normalmente adotam-se valores maiores que 70 para garantir uma boa aquisição do pico. Com isto, foi gerada uma linha de base com amplitudes menores, sem comprometer as estatísticas de aquisição de sinal.

### **5.3. Padronização interna e processamento de sinal transiente**

O sinal transiente obtido para a determinação de um elemento por HPLC-ICP-MS é sujeito a vários problemas, tais como desvio sistemático do sinal, causado principalmente devido ao tempo de resposta do amplificador do detector, e a co-eluição da matriz, podendo causar uma diferença no fator de resposta do instrumento (ANTLER et al., 2007). Sempre que possível, ações corretivas devem ser usadas para minimizar tais obstáculos.

Sendo assim, o uso de um padrão interno foi considerado a fim de minimizar os problemas observados com o emprego do sinal transiente. Foram testados os seguintes padrões internos, preparados em metanol ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ), com suas respectivas  $m/z$ :  $^{74}\text{Ge}$ ,  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{93}\text{Nb}$ ,  $^{103}\text{Rh}$ ,  $^{115}\text{In}$  e  $^{181}\text{Ta}$ . Como pode ser observado na Figura 16, todos os padrões internos geraram perfis semelhantes. Este teste mostrou que não ocorreram flutuações dos sinais durante as medidas, que pudessem ser corrigidas pelos padrões internos. Mesmo assim, optou-se por usar um padrão interno nas análises, a fim de corrigir quaisquer eventuais perturbações ocasionadas por possíveis flutuações, como as causadas por ruídos eletrônicos ou por problemas relacionados ao transporte e nebulização das soluções, por diferenças de viscosidade das soluções analíticas e solução da amostra. Uma boa opção para um padrão interno é um elemento que possua massa e potencial de ionização próximos ao analito.

Os potenciais de ionização dos elementos estudados neste teste variam entre 6 e 8 eV, valores próximos ao potencial de ionização do V (~7 eV). Como os resultados gerados (Figura 16) apresentaram o mesmo perfil e como todos os elementos avaliados apresentam potenciais de ionização próximos ao do V, a escolha do padrão interno foi definida de acordo com a massa. Desta forma, optou-se pelo uso do  $^{74}\text{Ge}$  por apresentar a massa mais próxima a do  $^{51}\text{V}$ . Além disso, este elemento encontra-se em baixa concentração nos óleos brutos de petróleo e suas respectivas frações.

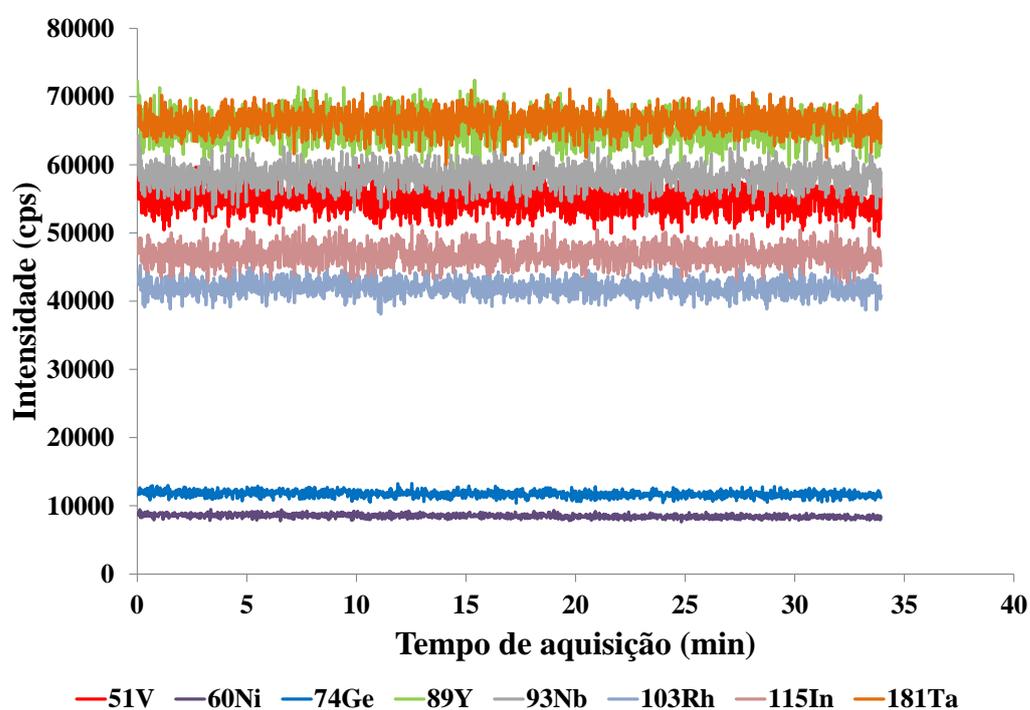


Figura 16: Testes de estabilidade da linha de base de possíveis padrões internos na concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  por HPLC-FI-ICP-MS, inseridos *on line* pós coluna.

Em seguida, uma solução do padrão VO-OEP, com aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  preparado em metanol, foi injetada cinco vezes no HCPL-FI-ICP-MS. Foi calculada a razão  $^{51}\text{V}/^{74}\text{Ge}$  e gerada a Figura 17a. Embora o padrão interno minimize as variações devido à injeção, observa-se que não foi suficiente para corrigir o ruído na variação

da linha de base, indicando que um tratamento adicional nos resultados obtidos deve ser necessário.

Quando se trabalha com sinal transiente, que é o caso de medidas por HPLC, uma distinção adequada entre a linha de base e do pico pode ser feito por um *software*. No entanto, neste estudo, dois sistemas de bombeamento (HPLC e FI) causaram ruídos com diferentes frequências e amplitudes elevadas na linha de base do sinal do  $^{51}\text{V}$ . Portanto, um algoritmo de suavização do tipo Transformada Rápida de Fourier (do inglês FFT) foi utilizado para o tratamento matemático dos sinais. O sinal transiente para cada isótopo ( $^{51}\text{V}$  e  $^{74}\text{Ge}$ ) foi a média de 5 injeções de uma solução-padrão de aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de VO-OEP em metanol nos HCPL-FI-ICP-MS. A área do pico ( $0,60 \pm 0,06$ ) foi calculada para o sinal relativo ( $^{51}\text{V} / ^{74}\text{Ge}$ ) após a aplicação da FFT para suavização do sinal transiente de cada isótopo e o resultado pode ser visualizado na Figura 17b. Assim, a suavização da FFT do sinal relativo foi aplicada para todas as otimizações e quantificações das V-porfirinas.

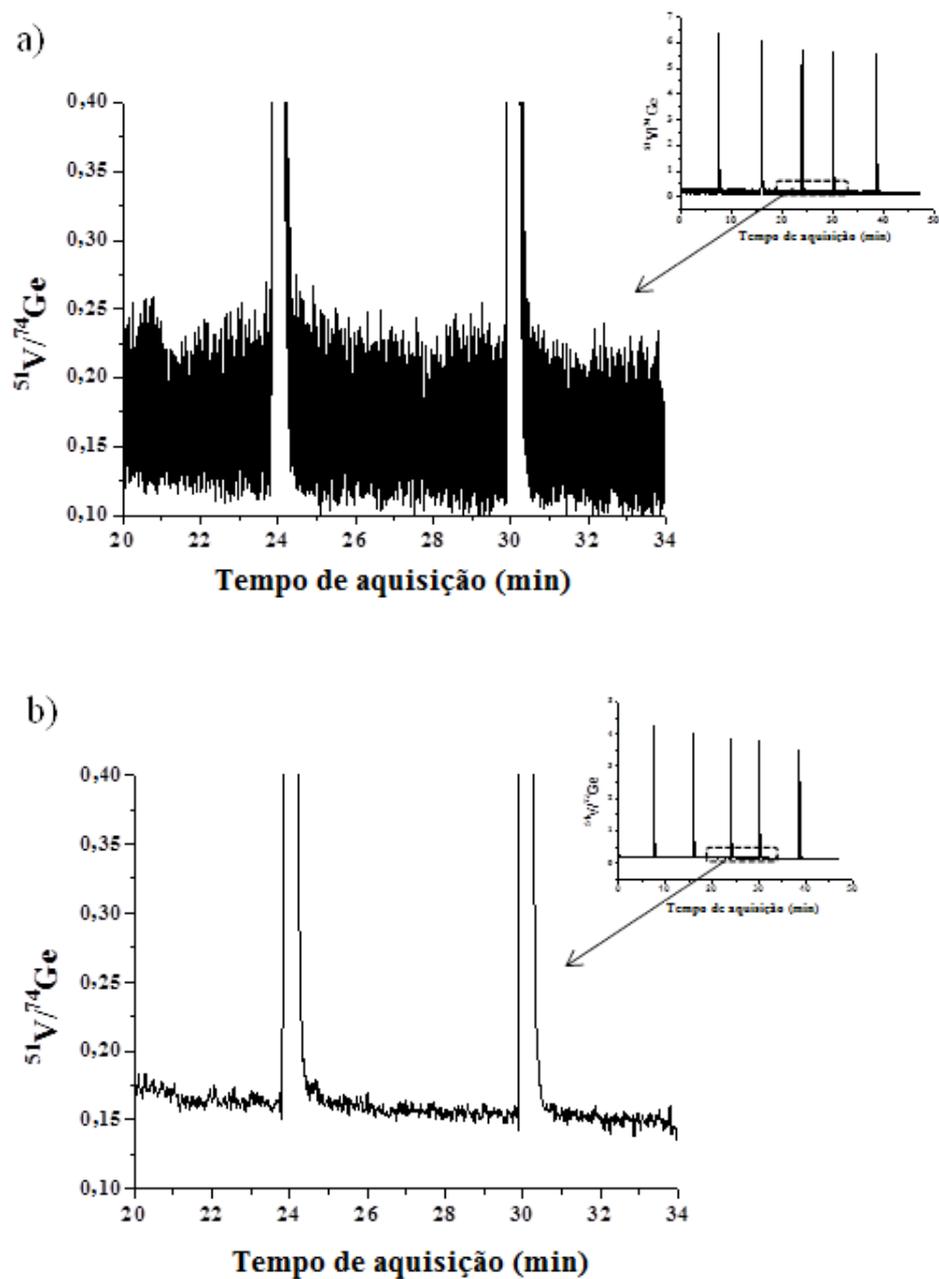


Figura 17: Aproximação da linha de base de 2 picos obtidos em 5 injeções de uma solução padrão VO-OEP (aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em metanol por HCPL-FI-ICP-MS, com  $^{74}\text{Ge}$  como padrão interno ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ): a) sem suavização FFT; b) com suavização FFT.

#### 5.4.

#### Otimizações das condições usadas na separação e recuperação das V-porfirinas por HPLC-FI-ICP-MS

Os testes de otimização das V-porfirinas por HPLC-FI-ICP-MS foram feitos através de comparações das áreas obtidas com a injeção da fração por HPLC-FI-ICP-MS e via injeção em fluxo (ver item 4.2.1), obtendo-se dessa forma a recuperação dos compostos de V que foram eluídos da coluna.

##### 5.4.1.

##### Escolha da vazão da fase móvel

A vazão da fase móvel está diretamente ligada ao número de pratos teóricos. Menores vazões proporcionam valores maiores de pratos teóricos (N), o que implica em melhores resoluções. Isto ocorre devido ao aumento do tempo de retenção ( $t_R$ ), gerando resultados maiores de N (ver Equação 2). Ela também altera a pressão (P) do sistema HPLC, já que maiores vazões geram pressões mais altas (SNYDER et al., 1997). Entretanto, pequenas mudanças na vazão da fase móvel pouco alteram a área de um pico.

Normalmente adota-se  $1 \text{ mL min}^{-1}$  para colunas com dimensões entre 4,0 e 5,0 mm de diâmetro interno (SNYDER et al., 1997). Entretanto, a escolha da vazão foi determinada respeitando-se o máximo fisicamente permitido na hifenação entre as duas técnicas (HPLC-ICP-MS). Valores maiores que  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  causaram vazamento na junção em T (ver item 4.2.1), o qual tem como função associar os fluxos oriundos do HPLC (solvente e analitos) e da bomba peristáltica (padrão interno:  $^{74}\text{Ge}$ ), e conduzi-los ao nebulizador, para que sejam misturados antes de serem encaminhados ao plasma.

Sendo assim, a vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  foi adotada para todos os testes de otimização e para as quantificações realizadas neste trabalho.

#### 5.4.2. Comprimento da Coluna

O comprimento da coluna é um fator de grande relevância na construção de um método para separar compostos por HPLC, pois este interfere na resolução dos picos, bem como no tempo de análise (NEUE, 1997). O aumento no comprimento da coluna propicia melhoras na resolução dos picos eluídos, pois aumenta o número de pratos teóricos. Entretanto, o tempo de aquisição da análise e pressão do sistema serão maiores (SNYDER et al., 1997; LANÇAS, 2009). Sendo assim, no desenvolvimento de um método quantitativo deve-se optar pelo menor comprimento da coluna que forneça relevantes separações, mas que principalmente gere melhores eluições dos analitos, conseqüentemente obtendo-se maiores recuperações.

Para determinar o comprimento de coluna mais adequado para o método quantitativo a ser desenvolvido, foram avaliados os desempenhos de duas colunas (150 mm e 125 mm) conectadas em série e de uma única coluna (250 mm), todas as três de fase reversa, por eluição com metanol. Inicialmente foram determinados alguns parâmetros que são usados para avaliar a eficiência de separação da coluna: número de pratos teóricos da coluna (N) e altura equivalente a um prato teórico. Os testes realizados neste estudo, monitorando-se a linha 400 nm, pois trata-se do comprimento de onda da banda Soret para tetrapirróis. O padrão empregado foi o VO-OEP ( $\sim 20 \mu\text{g L}^{-1}$ ), o qual foi injetado nas colunas, em uma vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Os Anexos 4 e 5 exibem os resultados obtidos para as duas situações descritas acima, mostrando que para ambas as situações testadas, as colunas mostraram-se eficientes, obtendo-se os valores de pratos teóricos acima de 2000, valor adotado para indicar uma boa eficiência de separação de colunas (BOTTOLI et al., 2004).

Após verificar uma boa eficiência de separação das conformações usadas nas colunas, a fração 1 do óleo de referência interno O1 foi analisada, e os resultados obtidos para as duas configurações de colunas

avaliadas se encontram na Figura 18. Os cromatogramas gerados para os comprimentos de 400 e 550 nm encontram-se no Anexo 6.

Como pode ser observado na Figura 18, a resolução entre os picos não foi adequada para ambos os comprimentos de coluna, observando-se a eluição conjunta dos compostos de V. Entretanto, a coluna com 250 mm apresentou a vantagem de diminuir o tempo de análise total em cerca de 20 min e a pressão do sistema em aproximadamente 600 psi. Além disso, resultou em menos compostos de V retidos na coluna com recuperação de 85 %, contra 61 % ao se empregar as duas colunas em série. Desta forma, optou-se pela coluna de 250 mm para toda a metodologia a ser desenvolvida para a quantificação de V-porfirinas neste trabalho.

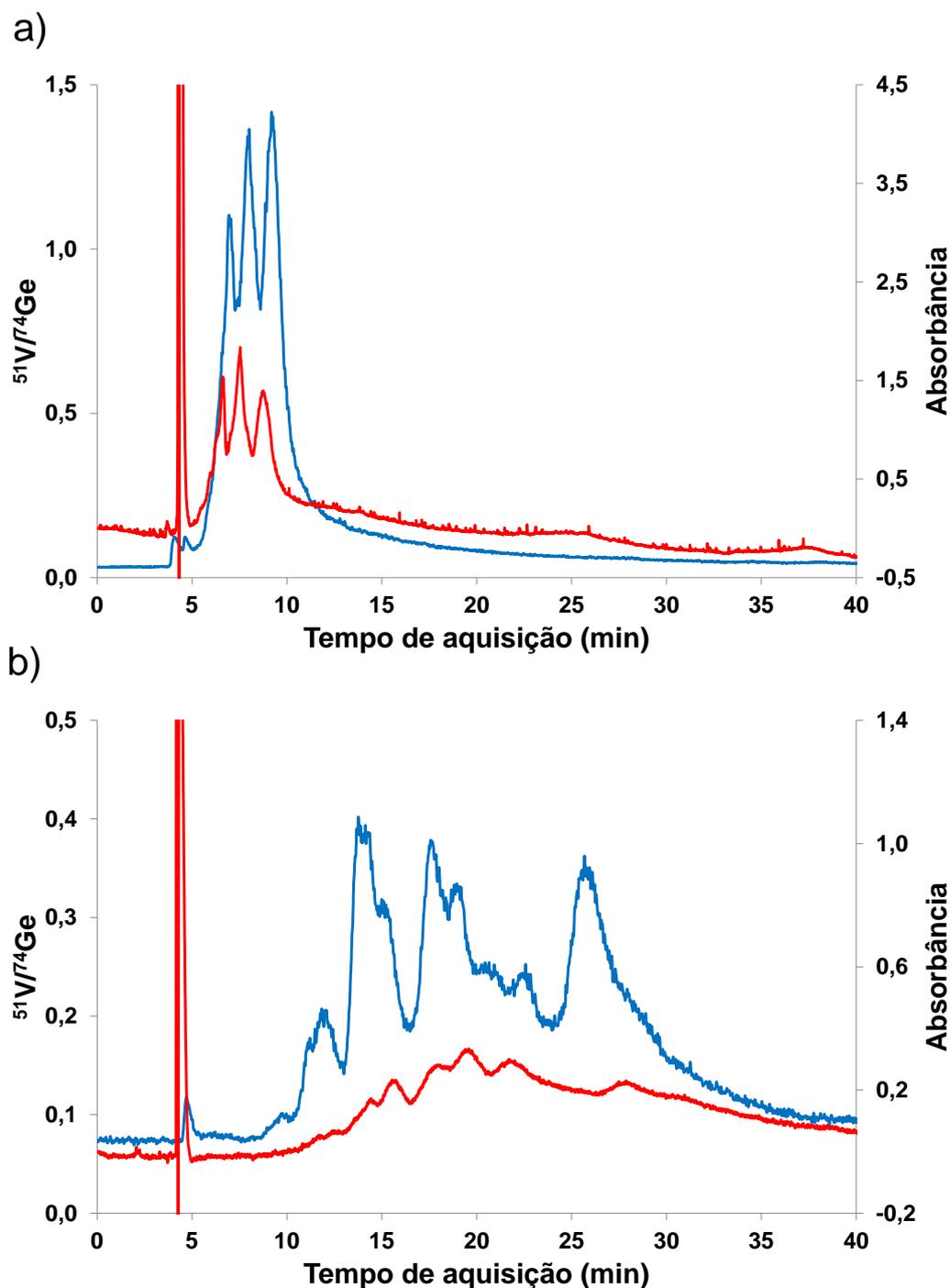


Figura 18: Perfil cromatográfico do efeito da variação da dimensão da coluna na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (4,1 mg injetados) com metanol como fase móvel, usando: a) uma única coluna (250 mm); b) duas colunas em série (150 mm e 125 mm).

### 5.4.3. Composição da fase móvel

Determinada a vazão da fase móvel ( $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ ) e o comprimento da coluna (250 mm) a serem utilizados nos demais estudos, a composição da fase móvel foi avaliada para garantir melhores resoluções dos picos, priorizando a recuperação destes compostos. A composição ou a polaridade (ou a força do solvente) da fase móvel é um parâmetro importante na separação dos compostos, principalmente no que se refere à resolução dos picos. Para sistemas de fase reversa, a fase estacionária é apolar (neste caso, um octadecilsilano –  $C_{18}$ ) e a fase móvel polar, geralmente constituída por água ou um solvente polar (acetonitrila ou metanol), por um modificador orgânico e, em algumas situações, por um aditivo como um sal ou tampão (SNYDER et al., 1997). Quando se aumenta a proporção do solvente orgânico, menor será a retenção dos compostos (menor  $k$ ), já quando se aumenta a quantidade de água, maior será a retenção (maior  $k$ ). Dependendo da complexidade e polaridade da fração analisada, a composição da fase móvel é crucial para minimizar as retenções de compostos na coluna.

Alguns requisitos devem ser considerados na determinação da melhor fase móvel a ser empregada em um método analítico: favorecer a solubilização dos componentes da amostra, apresentar baixa reatividade e viscosidade, baixa toxicidade, elevado grau de pureza e, quando possível, baixo custo (LANÇAS, 2009).

O efeito da composição da fase móvel sobre a separação do V na forma de porfirinas foi testado nas frações obtidas a partir do óleo bruto de referência interno (O1), sendo cada fração injetada diretamente no ICP-MS, utilizando o dispositivo de injeção em fluxo e no HPLC-FI-ICP-MS. As áreas obtidas, para cada situação descrita acima, foram comparadas, obtendo-se a recuperação. Essa recuperação foi calculada como descrito na Equação 1 (ver item 4.2.1).

Estudos anteriores do grupo de pesquisa a qual este trabalho está inserido, obtiveram resultados promissores, porém não satisfatórios no que diz respeito às separações obtidas para os compostos de V

presentes em porfirinas (DUYCK et al., 2011). A aplicação do método SARA no fracionamento da amostra do óleo de referência interno O1 com eluição isocrática utilizando metanol nas separações por HPLC e coluna C<sub>18</sub> de 125 mm gerou a separação apresentada na Figura 19 para a fração 1 do óleo teste O1.

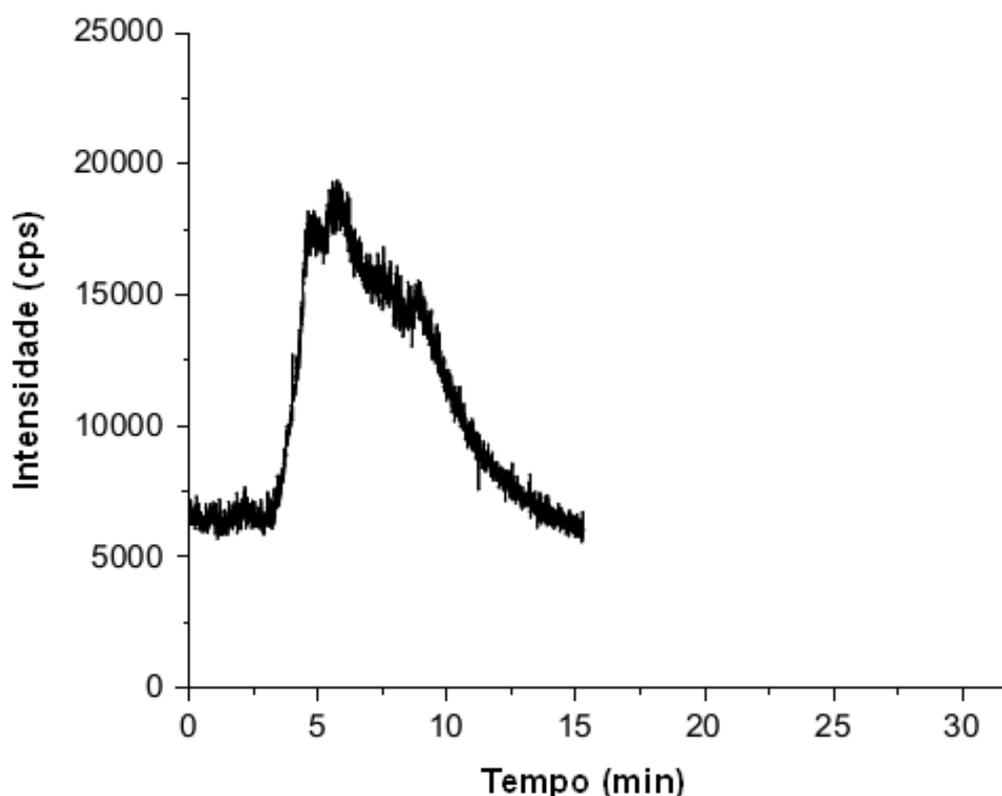


Figura 19: Perfil cromatográfico da detecção de V-porfirinas por ICP-MS (— <sup>51</sup>V) ou durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 com metanol como fase móvel (DUYCK et al., 2011).

Na tentativa de melhorar a separação dos compostos, foi avaliado um novo fracionamento (Gradiente Reverso) com diferentes fases móveis, levando-se sempre em consideração a resolução dos picos e a necessidade de quantificar essas frações, ou seja, a recuperação obtida para cada fração.

#### 5.4.3.1. Testes com metanol como fase móvel

Como de praxe para o desenvolvimento de método por HPLC em fase reversa é recomendado iniciar o estudo da composição da fase móvel pelo solvente mais polar, depois da água (SNYDER et al., 1997). Dentre os solventes mais polares disponíveis para este estudo, acetonitrila e metanol (com polaridades de 5,8 e 5,1, respectivamente) (SNYDER et al., 1997), optou-se por usar o metanol, por questões de segurança, pois a acetonitrila além de ser altamente inflamável, podendo causar o derretimento da tocha no ICP-MS, pode gerar cianeto de hidrogênio (ácido cianídrico) na sua decomposição (<http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Acetonitrila.pdf>). Além disso, o metanol é quimicamente estável (SADEK, 1996), apresenta pressões mais baixas e estáveis nas análises por HPLC, além de solubilizar VO-porfirinas de estruturas mais simples.

Ao analisar a fração 1 do óleo bruto de referência interno O1 usando metanol como fase móvel, a recuperação de V-porfirinas calculada foi de 85 %, resultado considerado satisfatório, devido à complexidade da amostra. No entanto, a separação de picos não foi tão eficiente (Figura 18a), como mencionado no item 5.4.2. Mesmo não apresentando os melhores resultados, houve avanço significativo nas separações anteriormente obtidas pelo mesmo grupo de pesquisa, através do método SARA (Figura 19) para este mesmo óleo analisado (O1). Como o objetivo norteador neste momento do trabalho é a quantificação, os resultados obtidos na recuperação do fracionamento da fração 1 com metanol como fase móvel são suficientes e aceitáveis. Entretanto, espera-se que alterando a polaridade da fase móvel possam ser obtidas melhor separação e melhor recuperação (LANÇAS, 2009).

A análise da fração 2 deste mesmo óleo O1, ao utilizar metanol como fase móvel por HPLC (Figura 20), resultou em apenas 66 % de V-porfirinas recuperadas. Estes resultados podem indicar a presença de compostos com polaridade média, que podem ficar retidos na coluna. Os

espectros de UV-Vis na banda de Soret (400 nm) e no pico  $\beta$  (550 nm) encontram-se no Anexo 7.

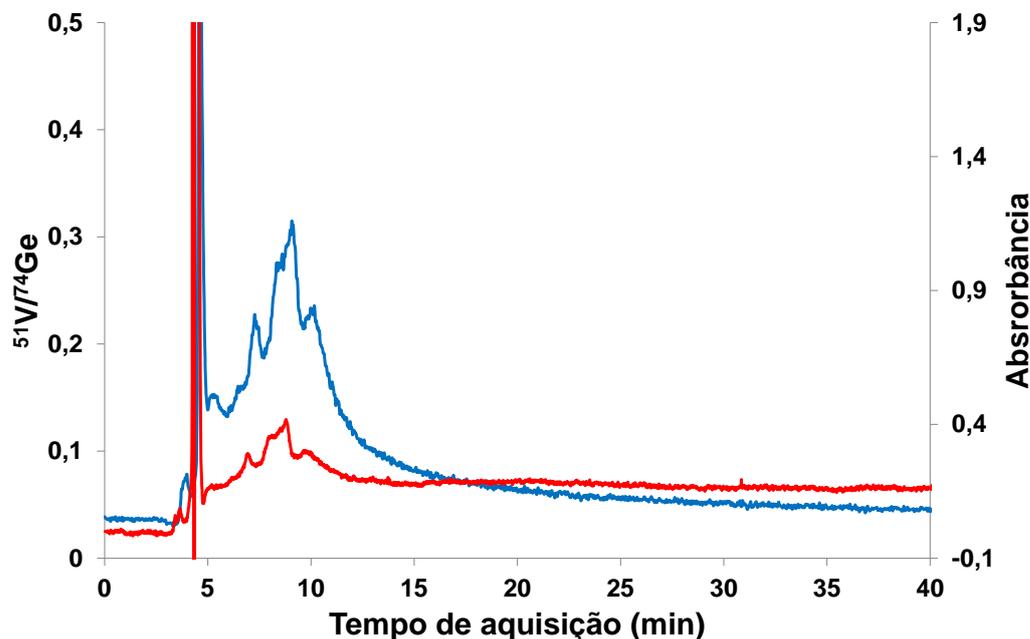


Figura 20: Perfil cromatográfico do efeito da fase móvel metanol na detecção de V-porfirinas por ICP-MS ( —  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis ( — 570 nm), durante a eluição da fração 2 do óleo cru O1 (4,1 mg injetados) com metanol como fase móvel.

Neste caso, para a quantificação da fração 2 do óleo de referência interno O1, necessita-se diminuir a polaridade da fase móvel, para favorecer a eluição destes compostos da coluna. Desta forma, promovendo maiores interações destes compostos com a fase móvel e consequentemente favorecendo a eluição destes compostos juntamente com o solvente.

As demais frações (3, 4 e 5) não foram testadas com a fase móvel metanol, pois são frações residuais. Com este solvente, espera-se que a retenção de compostos na coluna  $\text{C}_{18}$  sejam maiores, resultando em menores recuperações quando comparadas com as obtidas pela fração 2.

#### 5.4.3.2.

#### Testes com metanol:tampão acetato como fase móvel: Método isocrático

Na tentativa de melhorar as separações obtidas para a fração 1 em metanol como fase móvel, foi avaliado o aumento da polaridade desta com adição ao metanol de um tampão de acetato (pH = 4) preparado em água. No Anexo 6 encontram-se as propriedades, bem como a polaridade, de alguns solventes usados como fase móvel. A elevação da polaridade foi realizada no intuito de aumentar a retenção dos compostos na coluna e conseqüentemente melhorar a resolução dos picos (SNYDER et al., 1997).

Este efeito é apresentado na Figura 21, na qual os resultados obtidos referem-se às proporções 99:1 e 90:10 metanol:tampão acetato. Em se tratando das recuperações dos compostos de V, elas foram semelhantes, obtendo-se 85 e 81 %, para 99:1 e 90:10 metanol:tampão acetato, respectivamente. Os cromatogramas resultantes mostraram que a adição de 10 % do tampão em metanol melhorou a resolução dos picos (Figura 21b), no entanto, gerou tempo maior de análise.

Assim, comparando estes resultados com os obtidos com a fase móvel metanol, pode-se dizer que se obteve ganhos na separação dos compostos de V-porfirinas, entretanto, não houve melhorias na recuperação do V. Em se tratando de tempo de análise, as corridas em metanol foram mais eficientes, visto que os compostos eluem mais rápido devido à menor polaridade da fase móvel, comparada a com adição de proporções de tampão preparado em água. Além disso, devido à facilidade em se usar o metanol como fase móvel, pois não requer prévio preparo, e como o objetivo norteador do trabalho foi quantificar V como V-porfirinas, optou-se por empregar só metanol como fase móvel para as análises da fração 1. Vale ressaltar que o emprego do tampão poderá ser aplicado em futuros estudos qualitativos envolvendo a identificação de compostos.

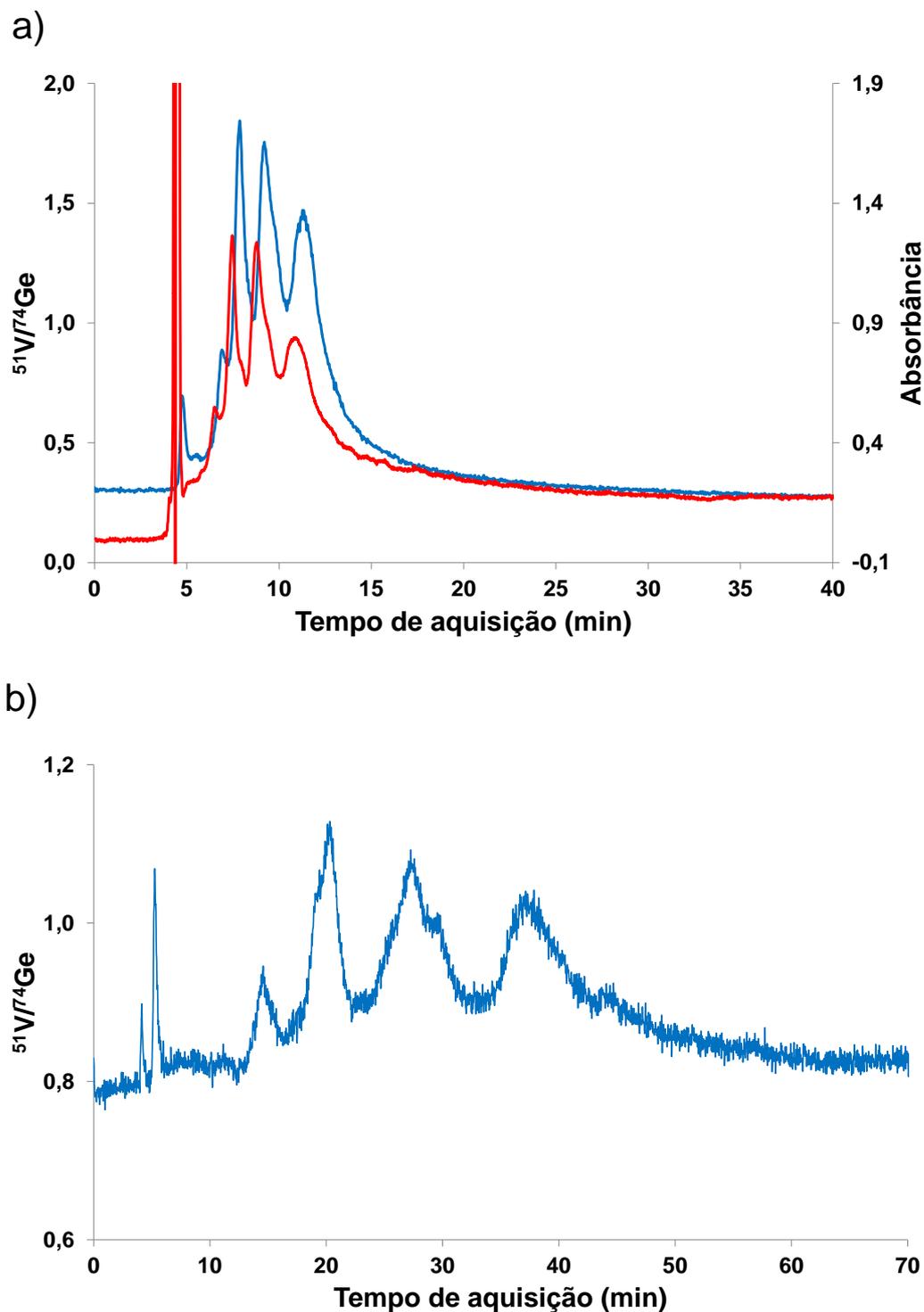


Figura 21: Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tampão acetato na detecção de V-porfirinas por ICP-MS ( —  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis ( — 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo

cru O1 (3,7 mg injetados), usando: a) metanol:tampão acetato (99:1, v:v);  
b) metanol:tampão acetato (90:10, v:v).

#### **5.4.3.3.**

#### **Testes com metanol:tolueno como fase móvel: Método isocrático**

A fim de avaliar a possibilidade de retenção de compostos na coluna quando a fração 2 foi eluída em metanol, foi feito um teste em que a polaridade da fase móvel foi diminuída, adicionando 20 % de tolueno ao metanol (Anexo 8). Esta é a porcentagem máxima de tolueno que pode ser empregada, uma vez que, com maiores quantidades, foi observada desestabilização do plasma, além de aumentar a possibilidade de formação de depósitos de carbono no interior do equipamento, que requer maiores vazões de O<sub>2</sub> introduzido no plasma para diminuir a formação de depósitos de C. Isto não é viável, pois já se trabalha próximo ao limite máximo de vazão desse gás. Vazões de O<sub>2</sub> maiores do que 0,1 L min<sup>-1</sup> podem ocasionar derretimento da tocha.

Com a fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v) obteve-se melhores recuperações dos compostos de V para a fração 2 do óleo de referência interno O1, encontrando-se o valor de 86 %. Entretanto os picos não foram bem separados e informações podem ser perdidas, no caso de uma possível identificação dos compostos presentes nesta fração (Figura 22). Uma vez que o objetivo é a obtenção de melhores recuperações, com a finalidade de quantificar V, a mistura metanol:tolueno (80:20; v:v) foi a mais apropriada para analisar a fração 2, visto que maiores porcentagens de tolueno não podem ser usadas.

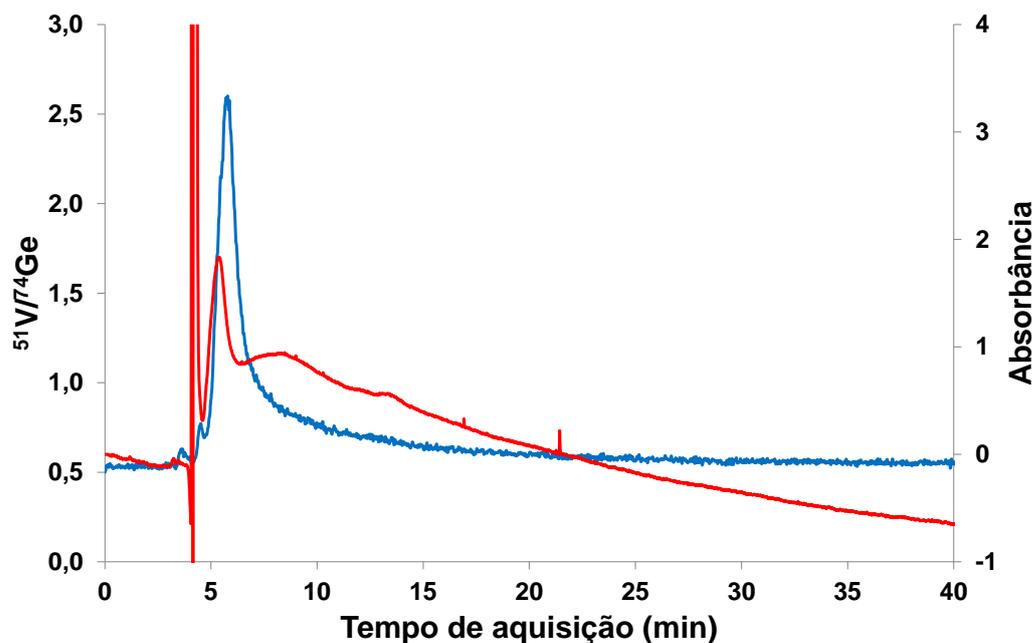


Figura 22: Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 2 do óleo cru O1 (4,0 mg injetados).

Como foram obtidos bons resultados para a fração 2 em metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel, em se tratando da recuperação dos compostos, as demais frações também foram testadas, inclusive a fração 1. Ainda que o metanol e sua mistura tamponada já haviam apresentados valores aceitáveis de recuperação para a fração 1, uma recuperação mais satisfatória melhoraria o balanço de massa desse óleo. Os cromatogramas obtidos encontram-se na Figura 23 e Anexo 9

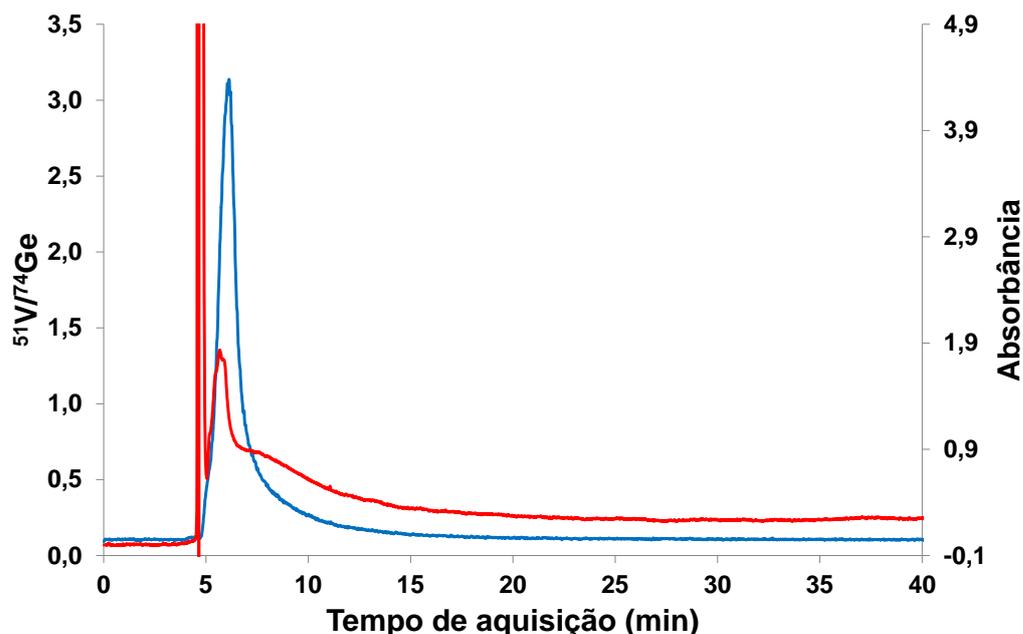


Figura 23: Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 (3,8 mg injetados).

Como já era esperado, houve ganhos na recuperação quando se usou a mistura metanol:tolueno (80:20, v:v) como fase móvel, obtendo 101 %. Entretanto, houve uma piora nas separações já obtidas com metanol, devido à diminuição da polaridade da fase móvel com o acréscimo de proporções de tolueno. Como os compostos de V-porfirina possuem mais afinidade com a fase móvel, a retenção destes compostos diminui e a pouca interação com a coluna faz com que praticamente todos os compostos eluam em um mesmo intervalo de tempo, observando desta forma, um grande pico no início da corrida. Da mesma forma, a melhor afinidade com a fase móvel e a baixa interação com a coluna, faz com que poucos compostos fiquem retidos, obtendo-se melhor recuperação. Como a quantificação vem sendo priorizada, a fase móvel metanol:tolueno (80:20, v:v) também mostrou-se eficiente, pois ela consegue extrair de forma mais significativa os compostos de V da coluna, o que melhoraria o balanço de massas do óleo testado. Entretanto, para fins qualitativos, em que se deseja identificar esses

compostos, essa fase móvel é inadequada, visto que houve co-eluição dos compostos contidos nesta fração em um único pico. Portanto, esta fase móvel, assim como o metanol, também foi empregada na quantificação da fração 1.

As frações obtidas a partir da resina (fração 3 à fração 5) também foram testadas com a fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v). As massas injetadas para essas frações foram menores do que as demais testadas (fração 1 e fração 2), pois são frações mais concentradas e as massas recuperadas durante o fracionamento da amostra por gradiente reverso de solventes são baixas.

Em se tratando das separações dos compostos de V-porfirinas, a metodologia empregando metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel, também não foi eficiente para as frações 3, 4 e 5, como pode ser observado na Figura 24. O percentual de recuperação foi aceitável apenas para a fração 3 (103 %). As baixas recuperações obtidas para a fração 4 (22 %) e a fração 5 (4 %) possivelmente foram devido à complexidade e às características mais residuais destas frações, uma vez que foram obtidas no final do fracionamento usado no preparo das amostras. Os demais cromatogramas obtidos para estas três frações encontram-se no Anexo 10.

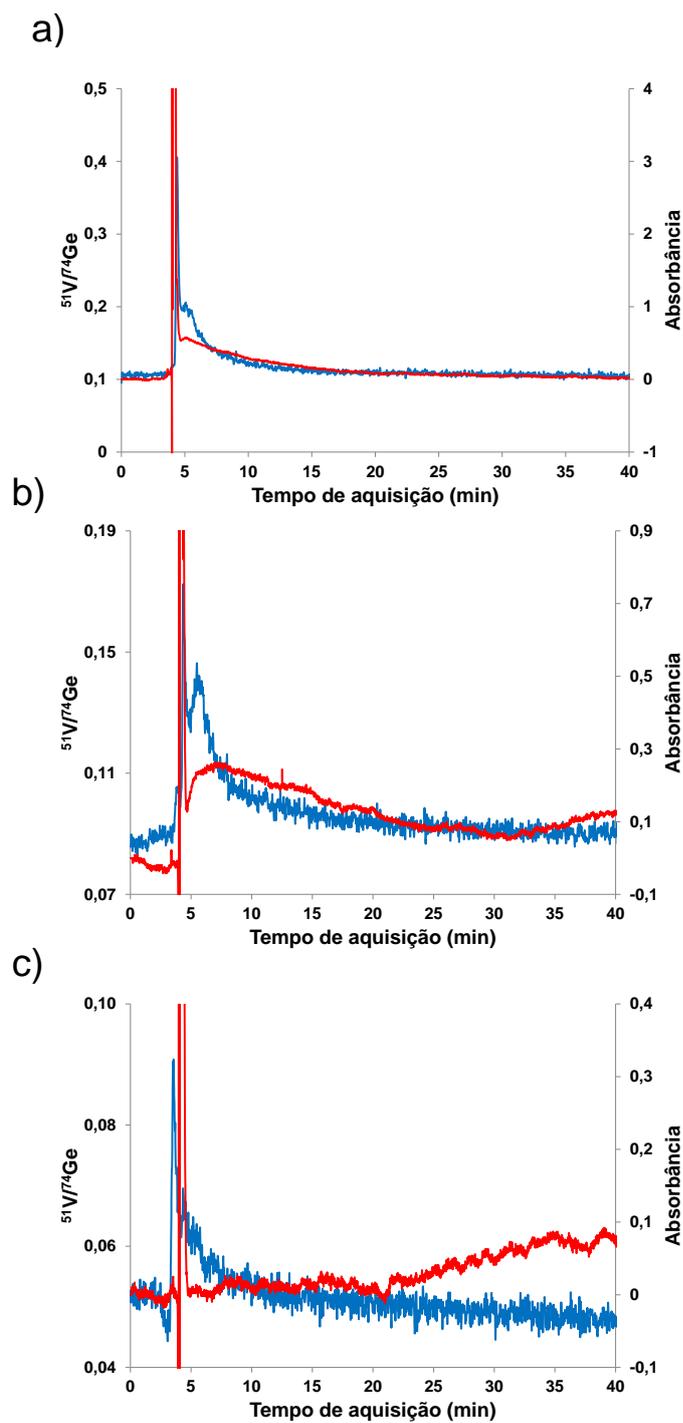


Figura 24: Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V-porfirinas por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição do óleo cru O1: a) fração 3 (0,2 mg injetados); b) fração 4 (0,1 mg injetados); c) fração 5 (0,1 mg injetados).

#### 5.4.4. Estudo de interferências

Como as fases móveis avaliadas neste trabalho são solventes orgânicos, foi feito um estudo para averiguar as interferências geradas quando estes solventes são introduzidos no plasma como fases móveis provenientes do HPLC. Realizou-se uma varredura entre as massas de 45 a 52, que compreende a faixa em que se encontra o isótopo  $^{51}\text{V}$ , elemento foco deste trabalho. Foi analisado o padrão VO-OEP ( $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) preparado em metanol e em uma mistura de metanol:tolueno (80:20; v:v), com seus respectivos brancos. Os espectros estão apresentados na Figuras 25 e 26.

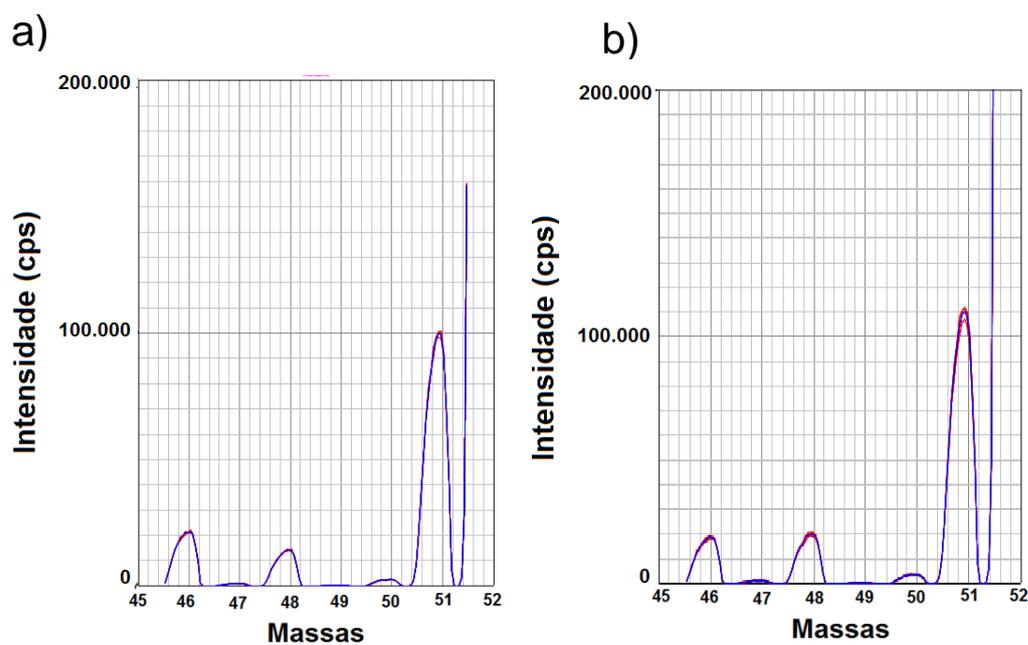


Figura 25: Espectros de massa gerados na análise dos brancos: a) metanol; b) metanol:tolueno (80:20; v:v).

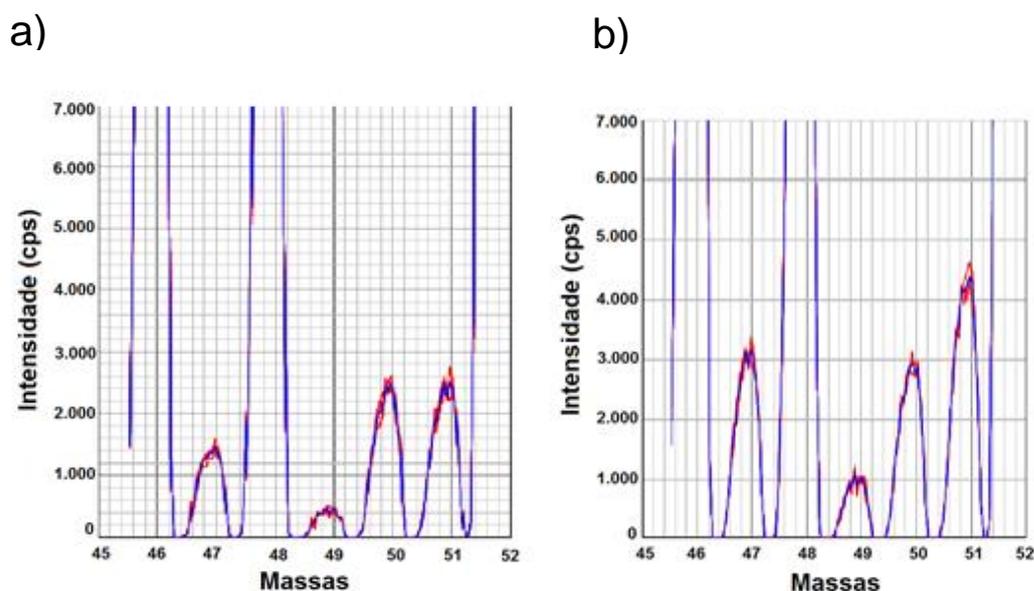


Figura 26: Espectros de massa gerados na análise de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  de: a) VO-OEP em metanol; b) VO-OEP em metanol:tolueno (80:20; v:v).

Como se pode observar, os resultados gerados nas análises dos brancos, preparados em metanol e tolueno:metanol (80:20; v:v) (Figura 25), foi possível a detecção da massa 51, a mesma utilizada na determinação do vanádio. Isto indica que a introdução dos solventes orgânicos ocorre a formação de espécies interferentes, possivelmente geradas na formação de espécie entre Ar e C (neste caso provavelmente proveniente do íon  $^{38}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ ). Ainda foi monitorada a massa 48, referente somente à espécie interferente  $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ , e verificou-se a presença desta espécie também nos brancos. Além disso, através das alturas dos picos foi possível verificar que a interferência causada pelo acréscimo de tolueno é relativamente maior que a gerada pelo metanol puro, o que é plausível visto que o tolueno possui quantidade maior de C. Os espectros gerados a partir da análise do padrão VO-OEP (Figura 26), confirmaram que a interferência é proveniente do solvente, uma vez que as magnitudes obtidas para a massa 51 foram próximas aos seus respectivos brancos, para ambas situações avaliadas (diluição em metanol e metanol:tolueno (80:20;v:v)).

Esse tipo de interferência é bastante comum quando solventes orgânicos são usados em quantificações via ICP-MS, mesmo quando alguns cuidados são tomados, como o uso de O<sub>2</sub> e câmara de refrigeração. Sendo assim, as curvas analíticas utilizadas para a quantificação de V por HPLC-FI-ICP-MS neste trabalho, foram preparadas em seus respectivos solventes (metanol ou mistura metanol:tolueno (80:20; v:v)), o que minimiza tais impactos abordados acima.

#### **5.4.5. Efeito da massa injetada na separação e retenção dos compostos de V-porfirinas**

Para maior eficiência de separação de uma coluna, ou seja, maior número de pratos teóricos (N), são requeridos menores volumes de amostra injetada ou menores massas. A separação de compostos por HPLC usando colunas de fase reversa por vezes requerem uma redução das massas injetadas a fim de evitar alargamento excessivo das bandas e a formação de caudas. Quando a massa da amostra é aumentada demasiadamente, eventualmente os picos se alargam. Isto faz com que o número de pratos teóricos (N) diminua, o tempo de retenção na coluna aumente, e conseqüentemente as resoluções piorem. Este efeito é conhecido como sobrecarga da coluna (SNYDER et al., 1997).

Então, foi feito um estudo para avaliar o efeito da massa na separação e retenção dos compostos de V-porfirinas, levando em consideração o tempo de análise, a recuperação e o alargamento das bandas e formação de caudas. Neste teste foi usada a fração 1 do óleo de referência interno O1 e metanol como fase móvel, em uma vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. As massas avaliadas neste teste foram: 4,0, 2,7 e 1,0 mg.

Como pode ser observado na Figura 27, menores massas proporcionam menores tempos de análise e minimizam o alargamento das bandas e formação das caudas. Entretanto, quando feita a recuperação, foi notado que, ao injetar a massa de 1,0 mg, apenas 74 % dos compostos de V foram recuperados, uma desvantagem frente aos 83

e 85 % de recuperação obtidos para as massas injetadas de 2,7 e 4,0 mg, respectivamente. Desta forma, foi adotada a massa de aproximadamente 2,7 mg como padrão a ser injetado nas devidas quantificações para as frações 1 e 2. Pois proporcionou uma das melhores recuperações, em tempo menor de análise e com menores formações de caudas. Além disso, essa massa intermediária (2,7 mg) proporcionará a construção da curva analítica com níveis de concentração menores do que a massa de 4,0 mg.

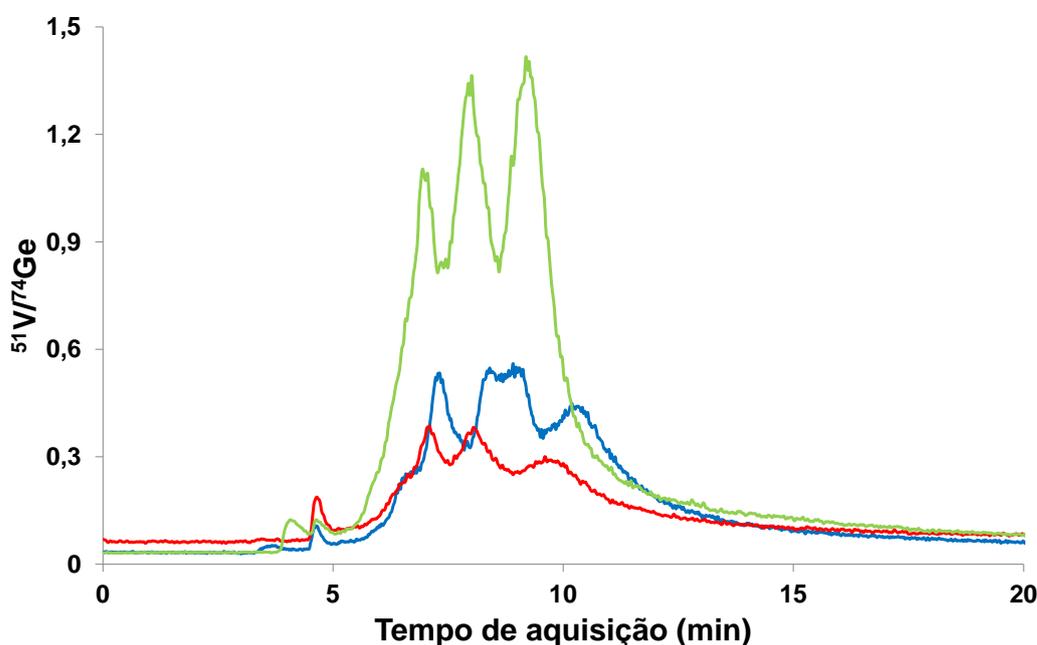


Figura 27: Perfil cromatográfico do efeito das massas, na detecção de V-porfirinas por ICP-MS durante a eluição da fração 1 óleo cru O1 nas injeções de: (— 4,1 mg); (— 2,7 mg); (— 1,0 mg).

Para as frações oriundas da resina (fração 3), a massa adotada em sua injeção foi menor, como já mencionado anteriormente, pois essa é uma fração concentrada, necessitando de maiores diluições. Neste sentido, manteve-se a massa de 0,2 mg usada nos testes de otimização, a qual é um valor baixo de massa, e que gerou resultados satisfatórios de recuperação e tempo de análise.

## 5.5. Análise do óleo certificado NIST 8505

A partir dos estudos de otimização feitos para as frações do óleo de referência interno O1, foram realizados testes para avaliar a recuperação das frações obtidas a partir do fracionamento do óleo certificado NIST 8505, o qual se trata de um óleo venezuelano. Este é um óleo com características bem diferentes do óleo brasileiro usado nos testes anteriores (óleo de referência interno O1). Suas características diferenciais vão desde a viscosidade, trata-se de um óleo mais viscoso, além de apresentar concentrações V bem superiores ao óleo O1. Por esse motivo, as massas usadas nas injeções para os testes realizados com óleo venezuelano foram menores do que as habitualmente usadas para os testes com óleo O1, mas procurou-se manter uma proporcionalidade na diluição, tomando-se como padrão a quantidade total de V nas duas amostras. O óleo NIST é aproximadamente 40 vezes mais concentrado que o óleo teste (O1).

Primeiramente a fração 1 do óleo certificado NIST 8505 foi analisada em metanol como fase móvel, os cromatogramas obtidos encontram-se na Figura 28, bem como os espectros UV-Vis (400 e 550 nm) obtidos para esta fração no Anexo 11. Como pode ser observado, as separações dos compostos de V-porfirinas não foram eficientes, além disso, apenas 46 % dos compostos foram recuperados na eluição através da coluna cromatográfica. Sendo assim, o metanol não se mostrou adequado para ser usado como fase móvel para a fração 1 do óleo certificado NIST 8505.

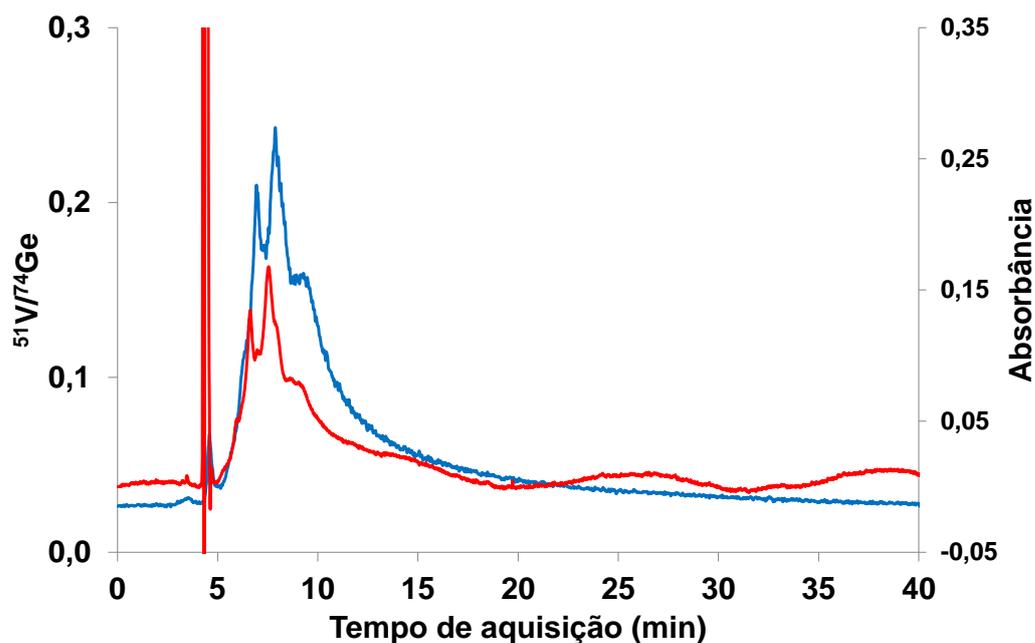


Figura 28: Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol, na detecção de V por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição da fração 1 do óleo certificado 8505 (0,07 mg injetada).

Como o metanol não se mostrou eficiente na recuperação dos compostos de V para a fração 1, foi testada a fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v) para esta mesma fração. Na Figura 29 podem ser observados os resultados obtidos na análise das Frações 1 e 2 do óleo certificado NIST 8505 em metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel. No Anexo 12 encontram-se os espectros UV-Vis obtidos nos comprimentos de onda 400 e 550 nm.

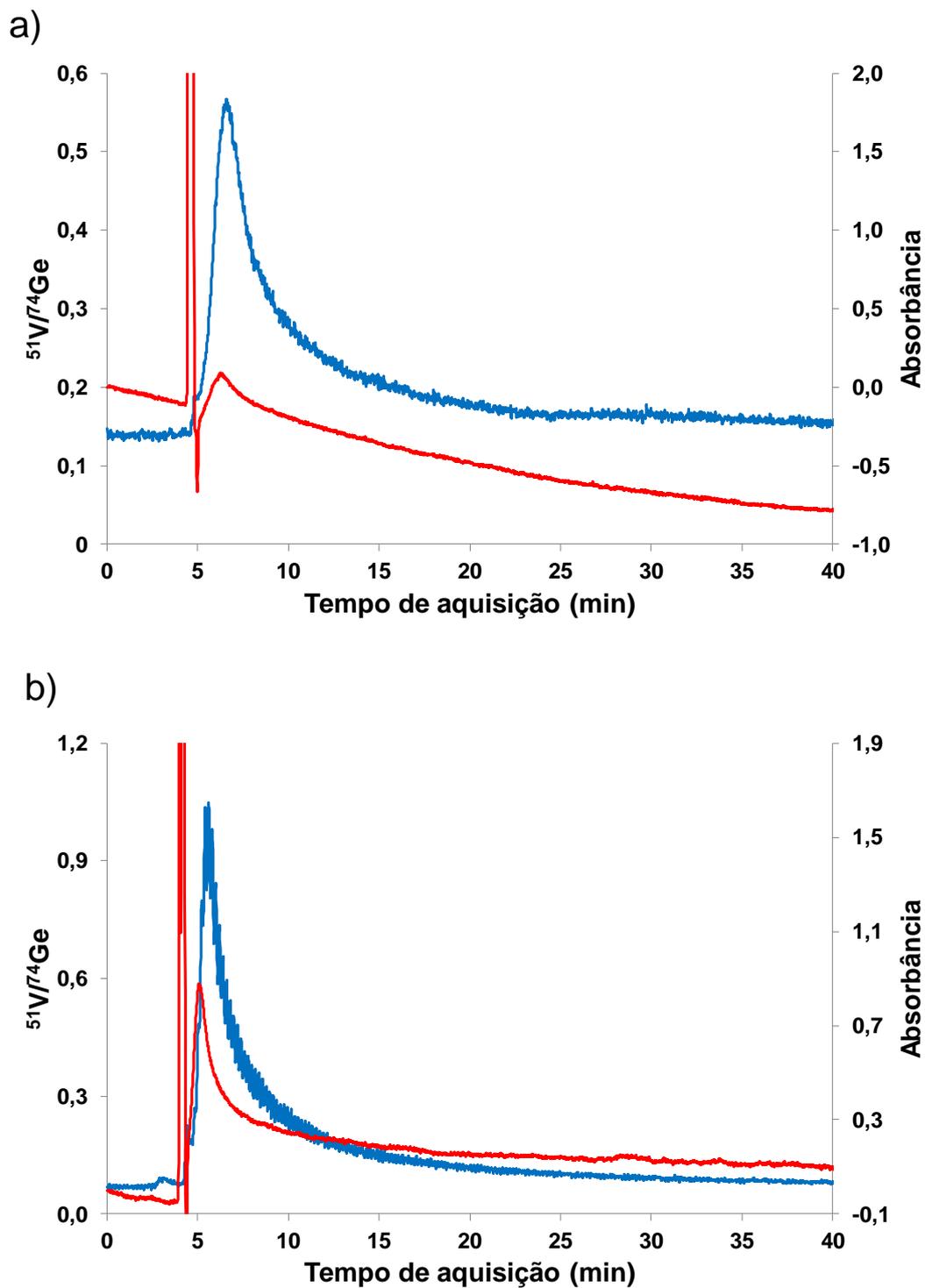


Figura 29: Perfil cromatográfico do efeito da polaridade da fase móvel metanol:tolueno (80:20; v:v), na detecção de V por ICP-MS (—  $^{51}\text{V}$ ) ou por UV-Vis (— 570 nm), durante a eluição do óleo certificado NIST 8505: a) fração 1 (0,08 mg injetada); b) fração 2 (0,07 mg injetada).

A recuperação obtida para a fração 1, ao se usar como fase móvel a mistura metanol:tolueno (80:20; v:v), mostrou melhoria em comparação ao uso somente do metanol como fase móvel. A recuperação foi de 75 %, entretanto, apesar desta progressão, não há como viabilizar a quantificação desta fração. A análise da fração 2 também não foi satisfatória, alcançando apenas 60 % de recuperação, quando esta mesma fase móvel foi utilizada. Estes baixos valores obtidos provavelmente remetem à alta complexidade da amostra certificada NIST 8505, a qual se difere muito do óleo então testado anteriormente (O1). Estes resultados mostram que alguns compostos de V ainda continuaram retidos na coluna, o que requer menores polaridades para a fase móvel. Contudo, como já foi exposto anteriormente, o acréscimo de 20 % de tolueno ao metanol já é o máximo permitido pela metodologia desenvolvida. Valores maiores acarretam desestabilização do plasma, o que dificulta as análises.

As demais frações residuais do óleo certificado NIST 8505, provenientes da resina (fração 3 a 5), não foram analisadas, em virtude de serem frações mais complexas do que as frações mais polares (fração 1 e 2), para as quais não foram obtidos bons resultados analíticos.

Como os resultados obtidos para as análises das Frações 1 e 2, provenientes do óleo certificado NIST 8505, mostraram baixas recuperações frente as fases móveis testadas, não foi possível quantificar V sob a forma de porfirinas para este óleo. Sendo assim, pode-se concluir que para avaliar a exatidão do método proposto neste trabalho deve-se empregar outra alternativa. Uma possibilidade é comparar os resultados obtidos através do método elaborado com aqueles gerados a partir de outro método já estabelecido. Este procedimento garantiria obter-se informações mais seguras sobre a exatidão do novo método.

## 5.6. Otimização das condições do plasma (ICP-MS)

Foi realizado um estudo para a otimização das condições operacionais do plasma, para o método quantitativo desenvolvido neste trabalho (HPLC-FI-ICP-MS). Para tal, foi avaliado a contribuição da potência da RF e as vazões de Ar de nebulização e Ar auxiliar sobre a sensibilidade e formação de óxidos/bivalentes na análise de uma solução preparada a partir dos padrões monoelementares de Ba, La e In ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Como as fases móveis escolhidas para analisar as frações dos óleos foram metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v), estes solventes, com suas devidas proporções, foram usados na diluição dos padrões.

Estes padrões foram selecionados por serem comumente empregados para análise de material orgânico por ICP-MS (TORMEN et al., 2008; DUYCK et al., 2011; SOUZA et al., 2012). O In é adotado para monitorar a sensibilidade da otimização, por apresentar baixo potencial de ionização ( $< 7 \text{ eV}$ ) e portanto ser facilmente ionizado (de 90 à 100 %), baseando-se na energia de ionização disponível no plasma referente ao potencial de ionização do Ar (15,7 eV) (GINÉ, 1999). As interferências causadas pela formação de óxidos foram monitoradas pelo La, que é um dos elementos que mais facilmente se liga ao oxigênio, e as interferências ocasionadas pela formação de bivalentes monitorou-se pelo Ba, que é um elemento muito suscetível a formar espécies com dupla carga, facilmente perde 2 elétrons, tendo segundo potencial de ionização igual a 10 eV, menor do que o potencial de ionização do Ar (15,8 eV). Desta forma, foram feitos testes a fim de alcançar o máximo de sensibilidade para o In (maiores intensidades), limitando a formação de óxidos ( $\text{LaO}^+$ ) e de íons bivalente ( $\text{Ba}^{+2}$ ) em  $\leq 3 \%$  (SOUZA et al., 2012).

Para a otimização da metodologia em que se emprega metanol como fase móvel, foi analisada uma solução multielementar preparada a partir dos padrões monoelementares de Ba, La e In diluídos em metanol.

Inicialmente, a vazão do Ar auxiliar e vazão de Ar de nebulização foram fixadas em 1,2 e  $0,46 \text{ L min}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores foram escolhidos por estarem próximos aos valores habitualmente usados em

análises de soluções orgânicas feitas no Labspectro, Laboratório de espectrometria atômica do Departamento de Química da PUC-Rio (onde o trabalho foi desenvolvido) (SOUZA et al., 2012). A potência foi variada de 1175 a 1350 W, com incrementos de 25 W, encontra-se no Anexo 13.

O aumento da potência levou a uma leve queda na sensibilidade, observada através da intensidade do In (Anexo 13a). O mesmo ocorreu na formação de bivalentes ( $\text{La}^{2+}$ ) e quase não houve alteração para a formação de óxidos ( $\text{BaO}^+$ ) (Anexo 13b). Geralmente a elevação da potência favorece a ionização dos átomos, fazendo com que a intensidade do íon em relação ao átomo aumente dentro no plasma. Entretanto, um efeito inverso pode ser observado na análise de metais com baixos potenciais de ionização e/ou em potências mais altas, devido à possibilidade da formação de espécies bivalentes, o que diminui a concentração dos íons de interesse. O que se observou foi que a formação de bivalentes se mostrou desfavorecida com o aumento da potência, havendo uma diminuição na porcentagem de  $\text{Ba}^{2+}$  formada.

Na escolha do valor da potência a ser fixada nos demais testes de otimização foi priorizado as maiores sensibilidades e levando também em consideração meios de minimizar o desgaste causado no equipamento quando se faz o uso de potências mais elevadas. Desta forma, optou-se por usar a menor potência de radiofrequência empregada nesta otimização (1150 W). Embora, neste ponto a porcentagem de  $\text{Ba}^{2+}$  formada seja a maior observada em todo o estudo. Adotou-se, mesmo assim, este menor valor de potência, pois espera-se que, ao variar a vazão de nebulização, esta porcentagem diminuísse alcançando valores inferiores ao máximo desejado (3 %).

Fixando a potência ótima em 1150 W e mantendo-se o Ar auxiliar em  $1,2 \text{ L min}^{-1}$ , foi avaliada a influência do Ar de nebulização, com incrementos de  $0,02 \text{ L min}^{-1}$ , e o efeito sobre a sensibilidade do In e a formação dos íons  $\text{LaO}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$ . Os resultados obtidos encontram-se na Figura 30.

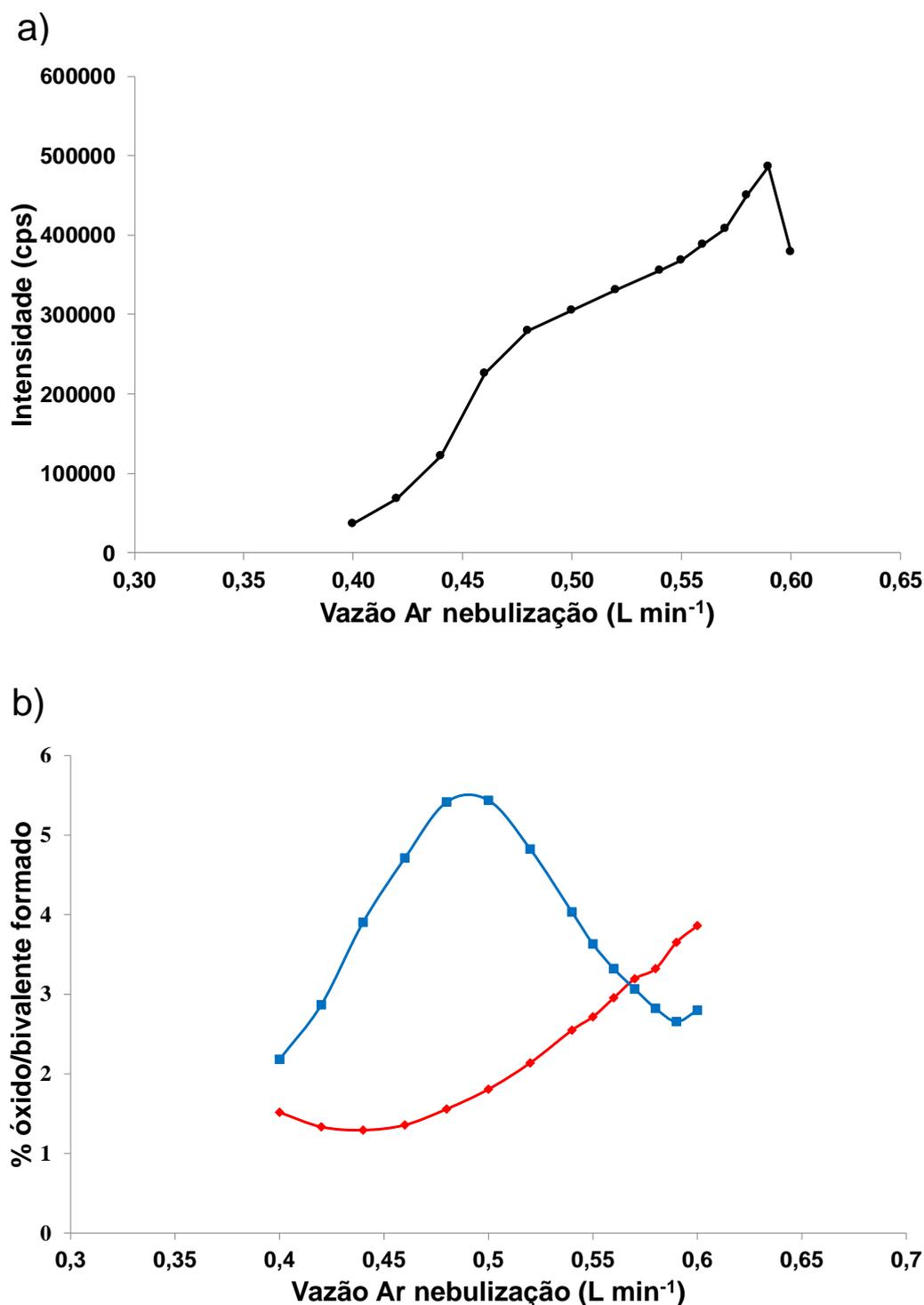


Figura 29: Otimização do Ar de nebulização (L min<sup>-1</sup>) em metanol: a) Resposta em função da intensidade (— <sup>115</sup>In); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxidos (— LaO<sup>+</sup>) ou íons bivalentes (— Ba<sup>2+</sup>) formados no plasma.

A mudança na vazão do Ar de nebulização pode deslocar o plasma, de forma que a extração dos íons possa ocorrer em uma região mais fria ou mais quente. Inicialmente, em baixas vazões, o plasma se encontrará em uma região mais fria, que favorece a recombinação com outros átomos, conseqüentemente a formação de óxidos nesta região é facilitada. Com o aumento da vazão, o plasma é empurrado para fora da tocha, em direção ao cone de amostragem, para uma região mais quente, o que propicia a ionização do analito, bem como a formação de íons bivalentes. O aumento da vazão do Ar de nebulização aumentou significativamente a sensibilidade do In, pois com o aumento da vazão de nebulização o plasma é deslocado para uma região mais quente que favorece a ionização do analito, além de aumentar a sua disponibilidade dentro do plasma até um certo limite. A formação de  $\text{LaO}^+$  foi favorecida com o acréscimo do Ar de nebulização. Já a formação do íon  $\text{Ba}^{2+}$  admitiu dois efeitos, primeiramente houve um aumento deste íon até aproximadamente  $0,5 \text{ L min}^{-1}$  de Ar de nebulização e uma queda após este valor. Nas baixas vazões usadas, a extração está ocorrendo em uma região mais fria, em que a formação de íons bivalentes não é tão pronunciada, devido à baixa temperatura do plasma. Com o aumento da vazão e o deslocamento do plasma para uma região mais quente, a dupla ionização prospera até que um máximo é atingido. Em seguida, mesmo com o contínuo aumento da vazão do Ar de nebulização, a formação dos íons bivalentes não é mais tão pronunciada como a formação de íons monovalente. Atinge-se então uma região ideal, na qualse tem o há máximo de íons monovalentes e o mínimo de íons bivalentes, e, ainda, não tão fria que favoreça a formação de óxidos em excesso.

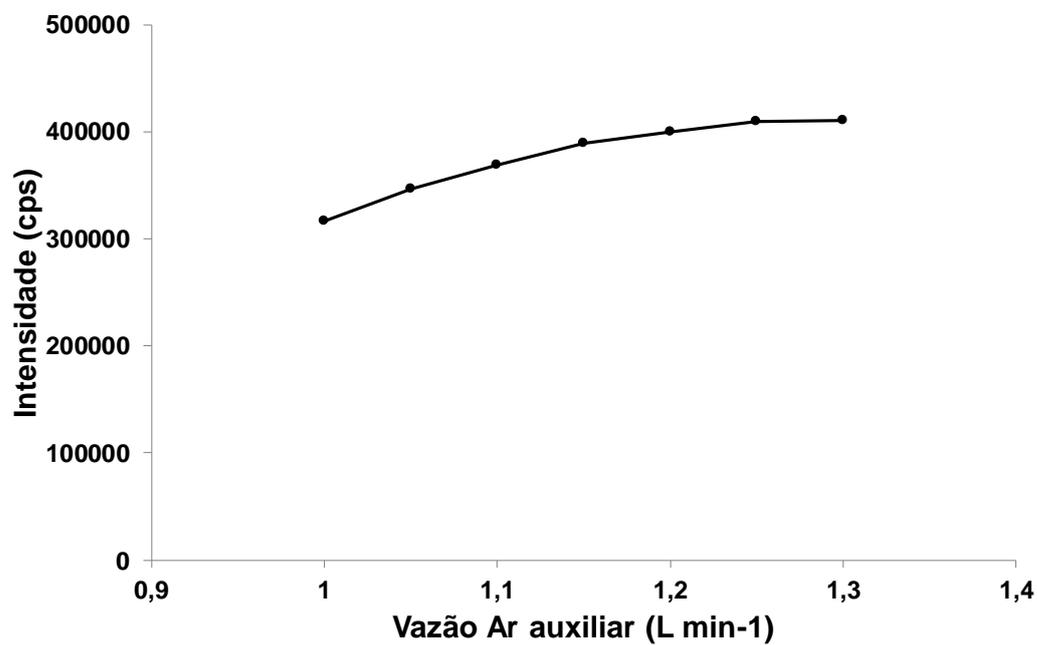
O valor ótimo para a vazão do Ar de nebulização foi de  $0,57 \text{ L min}^{-1}$ , pois é o ponto de vazão em que as duas curvas para a formação de óxidos ( $\text{LaO}^+$ ) e bivalentes ( $\text{Ba}^{2+}$ ) se cruzam, respeitando os valores máximos de 3 % e produzindo melhores sensibilidades para o In.

Por último, a vazão do Ar auxiliar foi variada de  $1,0$  a  $1,3 \text{ L min}^{-1}$ , com incrementos de  $0,05 \text{ L min}^{-1}$  e a vazão do Ar de nebulização e a

potência, já otimizados, foram fixadas em  $0,57 \text{ L min}^{-1}$  e  $1150 \text{ W}$ , respectivamente. A Figura 30 mostra a otimização da vazão do Ar auxiliar.

O argônio auxiliar possui a função de estabilizar o plasma durante a introdução da amostra. O aumento da vazão do argônio auxiliar melhorou a sensibilidade do equipamento, como podemos observar com o aumento da intensidade do In (Figura 31a), mostrando que os maiores valores testados foram os mais eficientes. Em se tratando dos resultados obtidos para a formação de óxidos e bivalentes, o valor escolhido como o ótimo foi o de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ , pois foi a vazão de Ar auxiliar em que as curvas obtidas para a formação do  $\text{LaO}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$  se cruzaram.

a)



b)

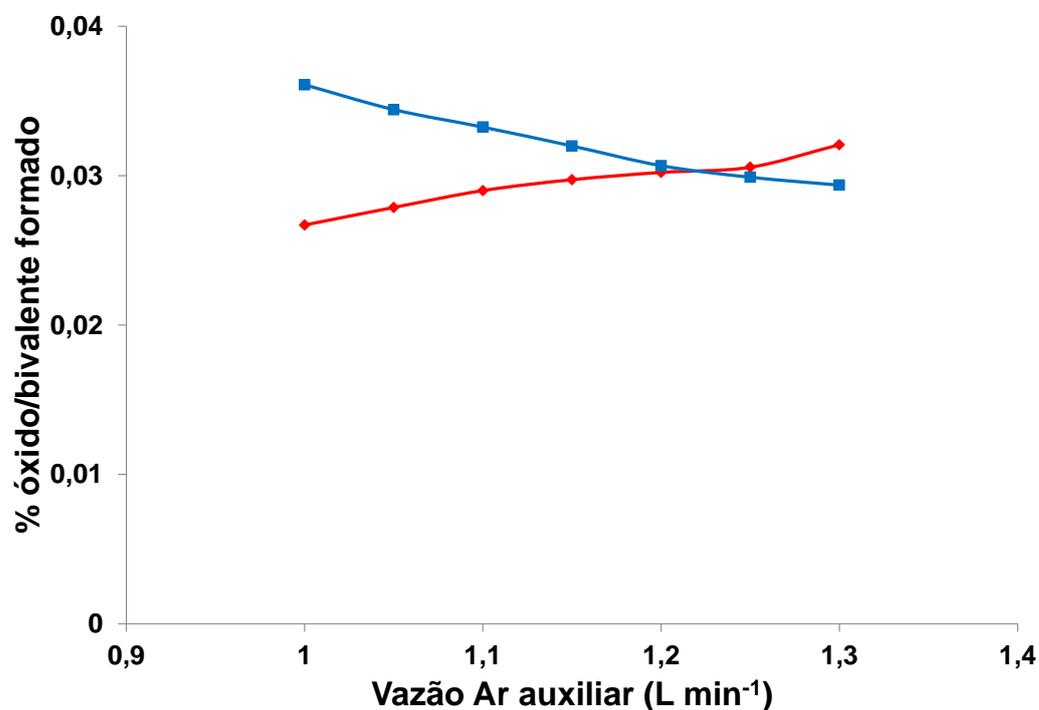


Figura 30: Otimização do Ar auxiliar (L min<sup>-1</sup>) em metanol: a) Resposta em função da intensidade (— <sup>115</sup>In); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxido (— LaO<sup>+</sup>) ou bivalente (— Ba<sup>2+</sup>) formados no plasma.

Assim como a otimização realizada a partir dos padrões monoelementares de Ba, La e In diluídos em metanol, foi feita uma otimização similar para a diluição destes padrões em metanol:tolueno (80:20; v:v), simulando uma das fases móveis que serão usadas na quantificação de V presentes nas frações dos óleos por HPLC-FI-ICP-MS.

Inicialmente, foi otimizado a potência, variando-a de 1175 a 1350 W, com incrementos de 25 W. As vazões do Ar auxiliar e do Ar de nebulização foram fixadas em 1,2 e 0,46 L min<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores foram os mesmos definidos na otimização em metanol, pelas mesmas razões. Os resultados obtidos na otimização da potência se encontram em Anexo 14.

A variação da potência mostrou mudanças mais significativas na intensidade do In, mas seguindo a mesma tendência obtida anteriormente, na otimização em metanol, em que menores potências geraram melhores sensibilidades para o In, houve pouca variação na formação de óxidos (BaO<sup>+</sup>) e uma queda na formação de bivalentes (Ba<sup>2+</sup>).

Da mesma forma que a otimização realizada em metanol, optou-se por usar a menor potência de radiofrequência empregada nesta otimização (1150 W), priorizando a sensibilidade do método e também contribuindo para amenizar o desgaste causado no equipamento.

Escolhido o valor da potência (1150 W), este foi mantido constante, juntamente com a vazão de 1,2 L min<sup>-1</sup> para o Ar auxiliar, para avaliar a influência do Ar de nebulização sobre a sensibilidade do In e a formação dos íons LaO<sup>+</sup> e Ba<sup>2+</sup>. A vazão de Ar nebulização foi variada de 0,40 a 0,63 L min<sup>-1</sup>, com incrementos de 0,02, nas situações em que não ocorreram variações significativas, e 0,01 nas situações mais críticas de variação. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 32.

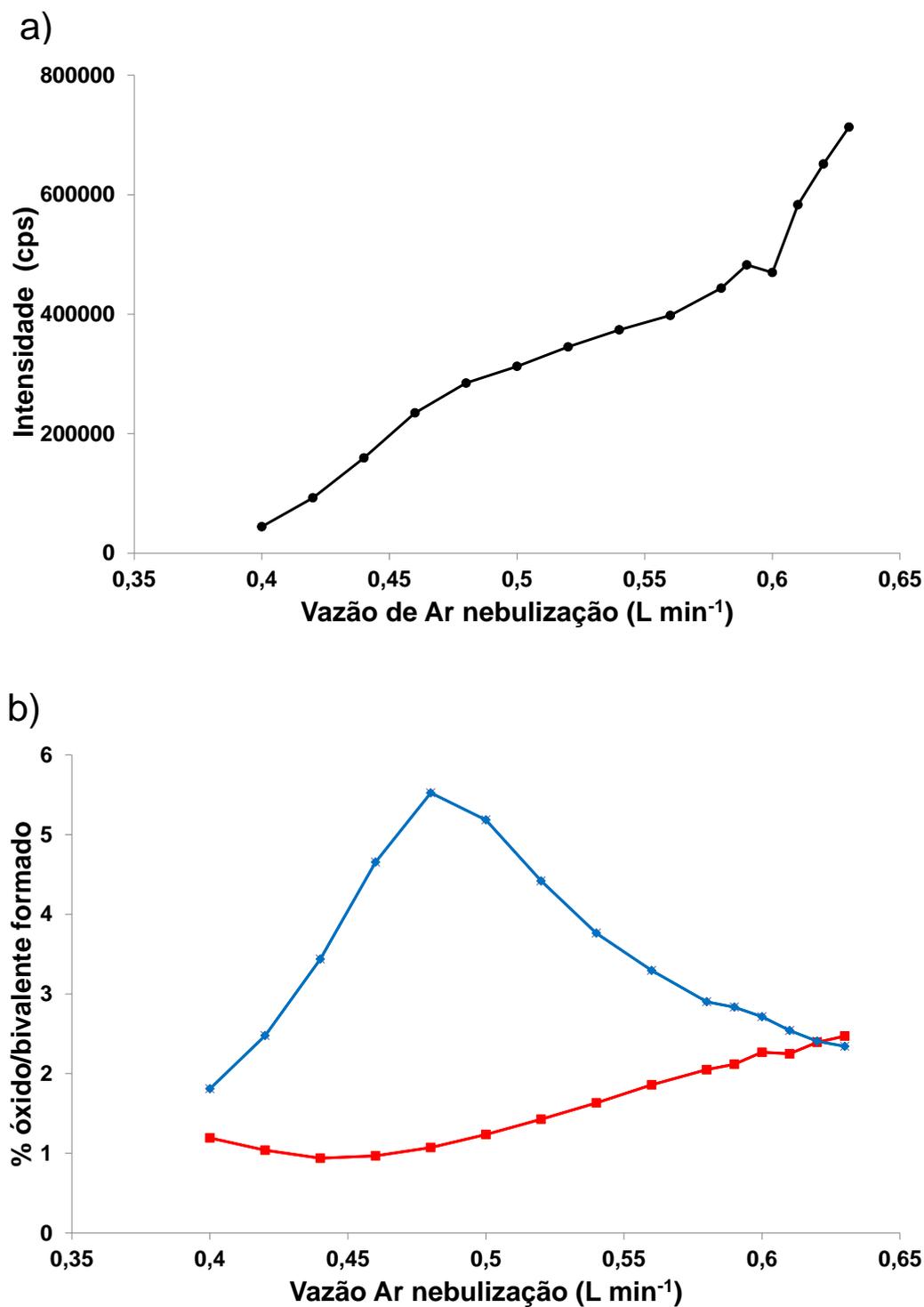


Figura 31: Otimização univariada do Ar de nebulização (L min<sup>-1</sup>) em metanol:tolueno (80:20;v:v): a) Resposta em função da intensidade

(—  $^{115}\text{In}$ ); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxido (—  $\text{LaO}^+$ ) ou bivalente (—  $\text{Ba}^{2+}$ ) formados no plasma.

Os resultados gerados na otimização da vazão do Ar nebulização em metanol:tolueno (80:20;v:v) foram semelhantes aos obtidos na otimização em metanol. Por isso, neste momento serão expostos os resultados obtidos em cada caso analisado, sendo plausíveis as mesmas explicações abordadas na otimização das condições para os analitos em metanol. O acréscimo da vazão do Ar de nebulização aumentou drasticamente a intensidade do In e, de uma forma significativa, a formação de óxidos ( $\text{BaO}^+$ ). A formação de bivalentes ( $\text{Ba}^{+2}$ ) sofreu o mesmo efeito observado na otimização em metanol: um acréscimo na formação deste íon até aproximadamente  $0,48 \text{ L min}^{-1}$  de Ar de nebulização e uma diminuição a partir deste valor.

Em se tratando do valor ótimo para a vazão do Ar de nebulização, foi escolhida  $0,62 \text{ mL min}^{-1}$ , pois é o ponto em que as duas curvas se cruzam, respeitando os valores máximos de 3 % para a formação de óxidos ( $\text{LaO}^+$ ) e bivalentes ( $\text{Ba}^{2+}$ ) e produzindo melhores sensibilidades para o In.

Neste caso, também foi avaliada a vazão do Ar de nebulização, fixadas a potência e a vazão do Ar 1150 W e  $0,62 \text{ mL min}^{-1}$ , respectivamente, e a vazão do Ar auxiliar foi variada de 1,0 a  $1,4 \text{ L min}^{-1}$ , com incrementos de  $0,05 \text{ L min}^{-1}$ . Foi observado que não houve mudanças em se tratando da otimização realizada em metanol para este mesmo parâmetro, optando-se por usar o mesmo valor ótimo encontrado ( $1,2 \text{ L min}^{-1}$ ).

Como os valores obtidos para a otimização em metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v) foram semelhantes, optou-se por usar as mesmas condições para ambos solventes ou mistura usados como fase móvel: 1150 W de potência,  $0,6 \text{ L min}^{-1}$  de vazão de nebulização e  $1,2 \text{ L min}^{-1}$  de Ar auxiliar. O valor estipulado para a vazão de nebulização foi

determinado como sendo uma condição de compromisso entre as duas situações estudadas.

## 5.7.

### **Avaliação da injeção em fluxo para a calibração**

Dois padrões foram avaliados para serem usados na construção das curvas analíticas: padrão porfirínico (VO-OEP) e um padrão inorgânico multielementar (PE 29). Em testes iniciais, foi observado que os dois padrões geravam resultados diferentes quando ambos eram solubilizados em metanol:tolueno (80:20; v:v). Esse fato sugeriu uma solubilidade parcial deste padrão inorgânico na mistura metanol:tolueno. Com isso, a calibração para o método quantitativo a ser desenvolvido foi realizada utilizando um padrão orgânico porfirínico (VO-OEP).

Após definido o emprego do padrão VO-OEP no preparo das curvas de calibração, foi testada a injeção das soluções para a construção da curva analítica na coluna pelo sistema HPLC. O que resultou em picos mais largos, o que dificulta a integração das áreas e exige tempos maiores de análise. A Figura 33 mostra essa problemática encontrada na análise de um ponto de aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  diluído em metanol e usando o metanol também como fase móvel.

Isso mostrou ocorrência de interação do composto VO-OEP com a coluna. O que não é ideal, pois os picos não possuem boa resolução para a integração de suas áreas. Além disso, foi observado que os picos consecutivos de um mesmo nível de concentração ficavam cada vez menores, gerando áreas distintas e conseqüentemente grandes desvios nas medidas.

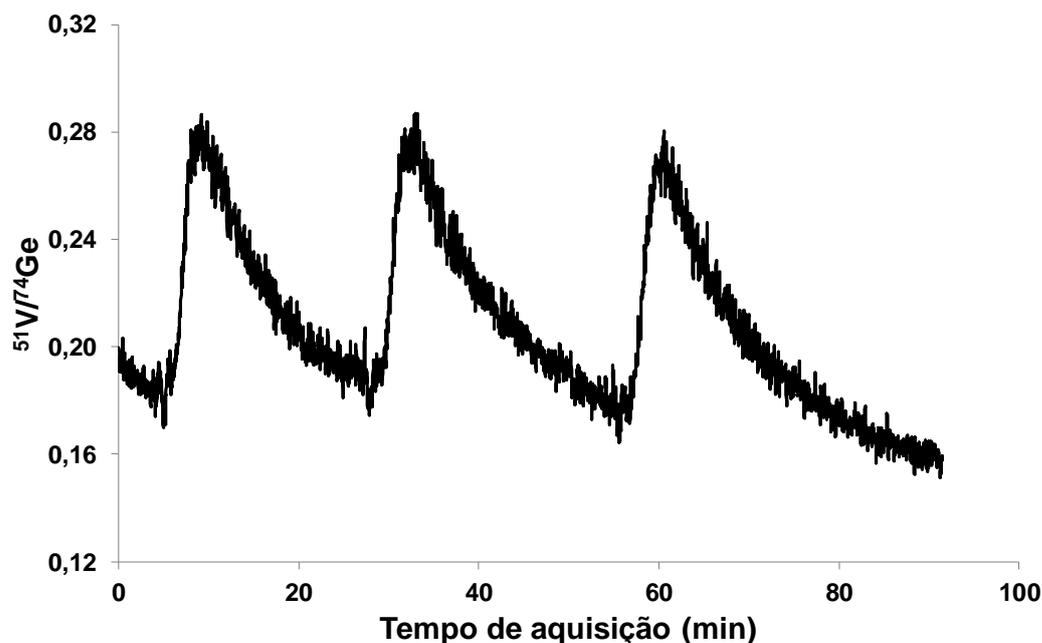


Figura 32: Medidas resultantes de 3 injeções do padrão VO-OEP de concentração  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  preparado em metanol, na coluna, usando o mesmo solvente como fase móvel.

Uma solução para este problema seria o emprego da injeção em fluxo dos padrões em modo *off line*, ou seja, após a coluna. O sistema montado foi o mesmo usado por Duyck e colaboradores (2011). Foi usada uma válvula de injeção, contendo um *looping* de aço inoxidável com  $20 \mu\text{L}$  de volume. Este foi disposto em um suporte e instalado em uma das saídas de uma junção em “T”, neste caso usada para misturar a solução padrão com o fluxo da fase móvel (ver Figura 9).

Sendo assim, foram repetidas as injeções da solução aproximadamente  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de V como VO-OEP diluído em metanol na válvula pós coluna, usando metanol também como fase móvel. Os resultados obtidos para este teste encontram-se na Figura 17b (ver item 5.3). Como pode ser observado, o uso da válvula de injeção melhorou a resolução dos picos, diminuindo o alargamento e melhorando a integração das áreas, com RSD em torno de 2,5 %. Além disso, o tempo de análise foi reduzido, possibilitando mais injeções de uma mesma

solução para que a média de cada ponto pudesse ser calculada, o que melhora estatisticamente a análise.

## **5.8.**

### **Avaliação do método quantitativo desenvolvido (HPLC-FI-ICP-MS): Parâmetros de mérito**

Definidas as condições de análise para as frações de óleos cru por HPLC-FI-ICP-MS, foram determinados alguns parâmetros de mérito, com o objetivo de avaliar a eficiência do método e garantir confiabilidade nos resultados analíticos obtidos neste trabalho. Os parâmetros de mérito avaliados foram: linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação, e exatidão.

#### **5.8.1.**

##### **Linearidade**

Foi verificada a linearidade de uma curva analítica construída a partir do método de calibração externa, usando soluções preparadas com o padrão porfirínico (VO-OEP), diluídas em metanol ou em metanol:tolueno (80:20; v:v).

Para avaliar a ausência de valores discrepantes, foi feito o teste de Grubbs para os valores mínimos e máximos de cada nível de concentração da curva analítica, em um nível de significância de 95 % (OLIVEIRA, 2008). A Tabela 4 mostra os resultados do teste realizado, o qual apontou ausência de valores discrepantes, para os valores testados.

Tabela 3: Resultados obtidos para o teste de Grubbs feito para os valores mínimos e máximos dos níveis de concentração, em um nível de confiança de 0,05 e  $n=5$ , tendo o  $G_{\text{tabelado}}= 1,715$  (OLIVEIRA, 2008).

	Nível de concentração	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor Médio	SD	$G_{\text{Calc-mín}}$	$G_{\text{Calc-máx}}$
<b>Metanol</b>	1	1,075	1,222	1,131	0,06	<b>-0,945</b>	<b>1,539</b>
	2	1,721	2,003	1,857	0,10	<b>-1,349</b>	<b>1,439</b>
	3	5,338	5,669	5,468	0,12	<b>-1,052</b>	<b>1,634</b>
	4	9,666	9,876	9,755	0,09	<b>-1,018</b>	<b>1,388</b>
<b>Metanol:tolueno (80:20; v:v)</b>	1	0,963	0,986	0,956	0,03	<b>-1,024</b>	<b>0,975</b>
	2	1,682	1,796	1,749	0,05	<b>-1,245</b>	<b>0,970</b>
	3	3,005	3,103	3,095	0,06	<b>-1,003</b>	<b>1,540</b>
	4	4,805	5,027	4,973	0,06	<b>-1,443</b>	<b>0,840</b>

Para avaliar a linearidade de uma curva analítica é necessário avaliar alguns parâmetros, tais como homocedasticidade, coeficientes da reta com intervalos de confiança, coeficiente de correlação e coeficientes de qualidade.

#### 5.8.1.1. Homocedasticidade

Para determinar a homocedasticidade usou-se o teste de Cochran. Para valores determinados para ( $C_{calc}$ ) menores que o C crítico ( $C_{tab}$ ) a condição de homocedasticidade é verdadeira. Na Tabela 5 encontram-se os resultados obtidos para esse teste, com um nível de significância de 95 %,

Tabela 4: Resultados obtidos para o teste de homocedasticidade das variâncias, tendo o  $C_{tabelado} = 0,6287$ , para  $k = 4$  níveis de concentração e  $n = 5$  replicatas.

	Nível de concentração	Valor Médio	SD	Variância	$C_{Calc}$
<b>Metanol</b>	1	1,131	0,06	0,003	<b>0,4162</b>
	2	1,857	0,10	0,010	
	3	5,468	0,12	0,015	
	4	9,755	0,09	0,008	
<b>Metanol:tolueno (80:20; v:v)</b>	1	0,956	0,03	0,001	<b>0,3759</b>
	2	1,749	0,05	0,002	
	3	3,095	0,06	0,004	
	4	4,973	0,06	0,004	

Com o teste de Cochran realizado com os valores obtidos para a construção da curva analítica, obteve-se condição satisfatória para homocedasticidade. Como o  $C_{calc}$  foi menor que o  $C_{tab}$  o sistema é considerado homocedástico, ou seja, não há diferenças de variância na faixa de concentração usada.

### 5.8.1.2.

#### Cálculo dos coeficientes da reta

A partir dos resultados obtidos para a construção da curva analítica foi feita a regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados, foram determinados os coeficientes angular (**a**), linear (**b**) e de determinação ( $R^2$ ), para cada curva, e seus respectivos desvios padrão. Os resultados obtidos para estes coeficientes estão apresentados na Tabela 6 e as curvas de calibração obtidas na Figura 34. As barras de erros nas curvas de calibração correspondem aos desvios padrão para cada nível de concentração da curva analítica.

Tabela 5: Resultados obtidos para os parâmetros das curvas analíticas.

Parâmetros	Curvas analíticas	
	Metanol	Metanol:Tolueno (80:20; v,v)
Coeficiente angular	0,0233	0,0123
Coeficiente Linear	0,0999	0,0735
$R^2$	0,9954	0,9953

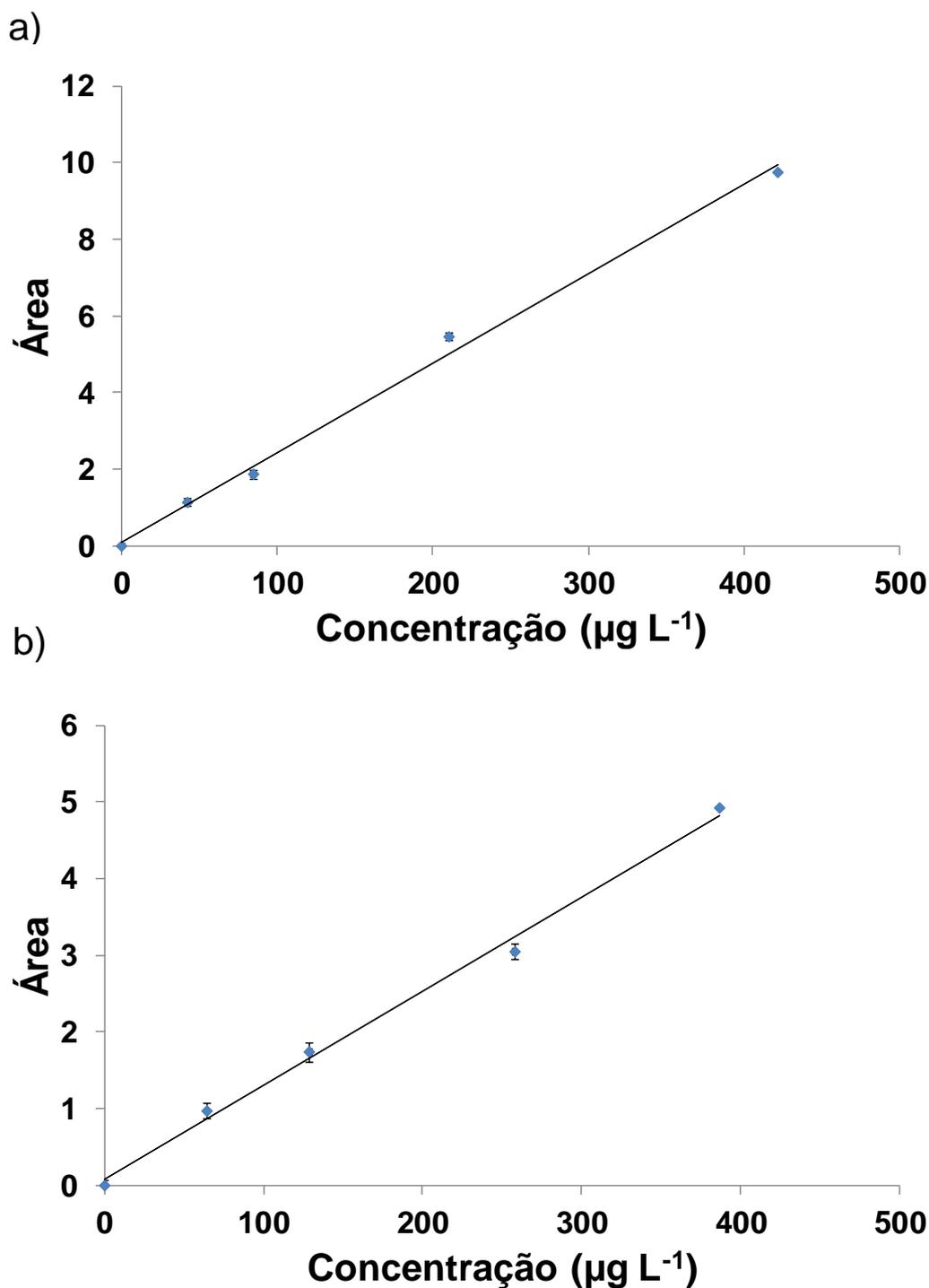


Figura 33: Curvas analíticas construídas com o padrão VO-OEP diluídos na mesma fase móvel usada nas análises das frações, empregado na determinação de V-porfirinas por HPLC-FI-ICP-MS: a) metanol; b) metanol:tolueno (80:20; v:v).

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) fornece indícios de que o modelo matemático desenvolvido representa a realidade, e quanto mais próximo de 1, mais o modelo matemático estimado se aproxima da situação real. No caso deste estudo, quanto mais próximo de 1, mais a curva analítica se aproxima da linearidade.

Para uma boa representação do modelo, o INMETRO (2010) recomenda um coeficiente de correlação com valor acima de 0,90. Diante deste fato, os valores obtidos para  $R^2$  se encontram dentro da faixa recomendada (0,9954 e 0,9953, para as curvas preparadas em metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v), respectivamente), o que possivelmente indica que o modelo linear matemático proposto representa a realidade.

### 5.8.1.3. Análise de variância

Para avaliar a qualidade do ajuste ao modelo linear proposto foi feita a análise de variância. Os resultados obtidos para cada curva analítica, preparada em metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v), encontram-se nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 6: Resultados obtidos com a análise da variância para o ajuste de um modelo linear construído para a curva analítica preparada em metanol.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	232,9891	1	232,9891
Resíduos	1,5216	18	0,0845
<b>F<sub>calc</sub></b>		<b>2757</b>	

Tabela 7: Resultados obtidos com a análise da variância para o ajuste de um modelo linear construído para a curva analítica preparada na mistura metanol:tolueno (80:20; v:v).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de g.l.	Média Quadrática
Regressão	44,4515	1	44,4515
Resíduos	0,3289	18	0,0183
<b>F<sub>calc</sub></b>		<b>2429</b>	

Os resultados obtidos para o  $F_{calc}$ , para as duas situações avaliadas foram comparados ao valor tabelado ( $F_{1,18} = 4,414$ ). Como os valores calculados foram superiores ao valor crítico, pode-se dizer que os modelos lineares propostos são estaticamente válidos.

De maneira geral, avaliando os parâmetros de linearidade aqui apresentados e levando em consideração toda a complexidade do sistema desenvolvido neste trabalho, pode-se dizer que foi obtida boa linearidade para as curvas analíticas preparadas em metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v) e que as mesmas podem ser usadas para quantificar as frações dos óleos.

### 5.8.2. Precisão

Para avaliar a precisão do método desenvolvido foi analisado o padrão VO-OEP ( $\sim 100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) diluído em metanol e na mistura metanol:tolueno (80:20; v:v). Foram feitos testes em um mesmo dia de análise e em um intervalo de 5 semanas.

Para a avaliação da precisão em um mesmo dia de análise foram feitas 8 medidas da mesma solução e calculados os desvios relacionados aos tempos de retenção ( $t_R$ ) e áreas obtidos para cada pico. Em se tratando da precisão quando dias alternados são avaliados, foram feitas 15 repetições e calculados os desvios obtidos apenas com o tempo de

retenção ( $t_R$ ), visto que os padrões são diluídos em solventes orgânicos e o armazenamento das soluções, mesmo em geladeira com temperatura controlada, não há como garantir a mesma concentração do padrão em dias diferentes, devido à evaporação do solvente. Logo, a área dos picos pode gerar resultados diferentes em dias distintos, que poderiam somar um desvio maior do que o esperado. Na Tabela 9 estão apresentados os valores dos desvios padrão (SD) e desvios padrão relativos (RSD) obtidos para cada tipo de precisão realizada.

Tabela 8: Avaliação da precisão em função da repetitividade.

			Metanol	Metanol:tolueno (80:20; v:v)
<b>Mesmo dia de análise</b>	$t_R$ (min)	Média	8,82	5,54
		SD	0,06	0,02
		RSD (%)	0,68	0,38
	Área	Média	0,205	1,17
		SD	0,002	0,02
		RSD (%)	1,1	1,9
<b>Dias alternados</b>	$t_R$ (min)	Média	8,82	5,56
		SD	0,06	0,03
		RSD (%)	0,68	0,51

Os resultados observados revelaram boa precisão do sistema HPLC-FI-ICP-MS usado nas quantificações de V-porfirinas presentes nas frações de óleo cru. Em razão dos RSD encontrados na faixa de 0,38 a

0,68 %, todos abaixo do valor máximo aceitável (1 %) (BOTTOLI et al., 2004; BAHIA FILHO et al., 2011).

### 5.8.3.

#### Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção (LOD) foi estimado pela concentração mínima detectável (CMD), a qual gera um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema (ver equação 11). Uma solução do padrão porfirínico (VO-OEP) com esta concentração foi injetada na coluna para que este valor pudesse ser verificado. Sendo assim, o valor obtido para o LOD do <sup>51</sup>V foi de 0,4 µg L<sup>-1</sup>.

Poucos trabalhos são relatados na literatura quantificando metaloporfirinas em amostras de petróleo utilizando HPLC-ICP-MS. Caumette e colaboradores (2010) usaram a hifenação das duas técnicas para separar as frações de porfirina, a fim de verificar a distribuição dos metais V e Ni em óleos brutos em termos de peso molecular e polaridade, entretanto não realizaram quantificações. Um dos estudos precursores deste trabalho foi o desenvolvido por Duyck e colaboradores (2011), autores que fazem parte do mesmo grupo de pesquisa do Labspectro (PUC-Rio). Nesse trabalho, foi quantificada a primeira fração do óleo de referência interna (O1), o mesmo usado nos testes de otimização desenvolvidos na pesquisa aqui relatada, e obtido um limite de detecção de 5 µg L<sup>-1</sup>.

Como pode ser observado, o LOD obtido neste desenvolvimento metodológico foi menor do que foi relatado em estudos preliminares, o que mostra uma vantagem deste trabalho em quantificar concentrações menores, o que neste caso é um ponto positivo, visto que as frações obtidas no tratamento das amostras de óleo possuem massas pequenas.

### 5.9. Quantificação de V na amostra

Como as frações obtidas da amostra certificada NIST 8505 se mostraram muito diferentes das frações geradas a partir da amostra de óleo de referência interna (O1) usada nos testes de otimização, optou-se por usar um método comparativo de análise direta (ICP-MS após diluição em xileno) para avaliar a exatidão do método desenvolvido. A exatidão da análise direta por ICP-MS após diluição em xileno foi confirmada pela determinação do V ( $380 \pm 20 \text{ mg g}^{-1}$ ) na amostra certificada NIST 8505 ( $V = 390 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}$ ).

Esta mesma metodologia foi utilizada para determinar as concentrações de V no óleo de referência interno O1 e em suas frações (Fr1 a Fr5), obtidas após a separação deste óleo por cromatografia preparativa (ver Figura 7) e os resultados estão listados na Tabela 10.

Tabela 9: Concentração de V total no óleo cru O1 e em suas frações, por ICP-MS e V ligado às porfirinas em frações do óleo cru de referência interno O1, por HPLC-FI-ICP-MS. A porcentagem de V ligado às porfirinas (%) nas frações em relação à concentração de V total medida nas respectivas frações.

<b>Amostras</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>ICP-MS V (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)*</b>	<b>HPLC-FI-ICP-MS V-porf. (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>	<b>V (%)</b>
Óleo Cru O1	0,50	$9,0 \pm 0,5$	-	-
Fr 1 (PAP)	0,17	$4,8 \pm 0,4$	4,0	83
Fr 2 (PAP)	0,08	$3,7 \pm 0,5$	3,4	92
Fr 3 (Resina)	0,06	$3,4 \pm 0,3$	3,7	109
Fr 4 (Resina)	0,03	$18 \pm 1$	11	61
Fr 5 (Resina)	0,03	$39 \pm 5$	n.d.	n.d.

n.d.: não determinado

\*Os resultados foram expressos como sendo o valor médio  $\pm$  o intervalo de confiança, para  $n = 3$  determinações.

Para avaliar se os resultados obtidos pelas duas técnicas quantitativas usadas podem ser considerados iguais, foi realizado o teste  $t$  pareado. Os resultados obtidos para este teste encontram-se na Tabela 11.

Tabela 10: Parâmetros calculados para o teste  $t$  pareado, para comparação dos resultados obtidos por HPLC-FI-ICP-MS e ICP-MS, tendo o  $t_{\text{tabelado}} = 4,303$ , para 2 graus de liberdade e 95 % de confiança.

Parâmetros	Fração 1	Fração 2	Fração 3
$d^*$	-0,8	-0,3	0,3
$S_d^{**}$		0,551	
$t_{\text{calc}}$		<b>-0,839</b>	

\* $d$  = diferença para cada par de médias

\* $s_d$  = desvio padrão da diferença

A comparação entre as médias obtidas com os métodos HPLC-FI-ICP-MS e ICP-MS, através do teste  $t$  pareado, mostrou que não existe diferença significativa para o nível de 95 % de confiança ( $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$ ) para os resultados obtidos nas diferentes frações (Fr 1 a 3) analisadas pelos dois métodos. Isto mostra que o método desenvolvido neste trabalho (HPLC-FI-ICP-MS), usado para quantificar V sob a forma de porfirinas é exato e pode ser empregado para este fim com boa confiança. A fração 4 não foi incluída neste teste, porque já apresentou perda de V-porfirinas retidas na coluna, durante o processo de otimização.

### **5.10. Balanço de massas (BM)**

A determinação dos elementos nas frações de óleo cru é um processo árduo, devido aos baixos valores de massas e complexidade da matriz. Neste aspecto, o balanço de massas (BM) pode ser usado como um teste de validação adicional (DUYCK et al., 2002) e foi calculado pela Equação 14 (ver item 4.5).

Obteve-se 70 % para o balanço de massa, o que é razoável, tendo em conta que os procedimentos de separação aplicados são propensos à perda de material nas colunas preparativas. Pode-se assumir que o V presente no óleo de referência interno O1 foi quantitativamente recuperado após o fracionamento de óleo.

## 6 Resultados preliminares para o Ni

Em alguns trabalhos sobre análise de porfirinas por HPLC-ICP-MS são relatadas determinações de V e Ni. Caumette e colaboradores (2010) apesar de usarem as técnicas hífenadas, não realizaram a quantificação destes compostos porfirínicos de V e Ni e fez o uso de uma coluna de fase normal. Duyck e colaboradores (2011) também determinaram V e Ni na forma de porfirinas por HPLC-ICP-MS, usando uma coluna de fase reversa e eluição em gradiente (usando clorofórmio e metanol). Entretanto, apenas o V pode ser quantificado na sua forma porfirínica.

Como a técnica de ICP-MS é multielementar e em alguns trabalhos anteriores foi possível quantificar Ni e V juntos, decidiu-se monitorar também o isótopo  $^{60}\text{Ni}$  nas análises subsequentes, para a otimização das condições de separação do sistema HPLC-ICP-MS, embora a otimização tenha sido focada nos resultados de V. Isto porque, como as colunas disponíveis  $\text{C}_{18}$  são mais eficientes na separação de compostos mais polares, espera-se que sejam mais eficientes para separar as porfirinas de V do que as de Ni, mais apolares. Isto deve dificultar o estabelecimento de condições de compromisso para a quantificação dos dois elementos simultaneamente.

Assim, neste item serão apresentados os resultados obtidos para as análises das porfirinas de Ni, monitoradas nas situações ótimas alcançadas para a separação das porfirinas de V, quais sejam, a coluna, as fases móveis e as massas injetadas.

Os cromatogramas obtidos na análise da fração 1 para o isótopo  $^{60}\text{Ni}$ , usando metanol e metanol:tolueno (80:20; v:v) como fases móveis, encontram-se na Figura 35. Os resultados obtidos nas duas situações mostraram que a sensibilidade para o  $^{60}\text{Ni}$  foi menor do que a encontrada para o  $^{51}\text{V}$ , nas mesmas condições: massa injetada e fases móveis (ver

Figuras 18a e 23) para metanol como fase móvel. Além disso, a integração das áreas gerou valores com grandes desvios. Entretanto, o acréscimo de tolueno possibilitou melhora na eluição dos compostos porfirínicos de Ni, quando comparada com metanol somente. O que já era esperado, pois as porfirinas de Ni apresentam baixa solubilidade em solventes polares, logo ficaram mais retidas na coluna quando o metanol foi usado como fase móvel.

Os resultados obtidos para as frações 2 à 5 em metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel encontram-se nas Figuras 36 e 37. Observando os cromatogramas, pode-se verificar que as frações 2 a 4 mostraram resultados semelhantes ao obtido na análise da fração 1, apresentando elevados desvios nas integrações das áreas. Além disso, a fração 5 revelou o pior desempenho dentre as demais analisadas, o que não permitiu a integração de área.

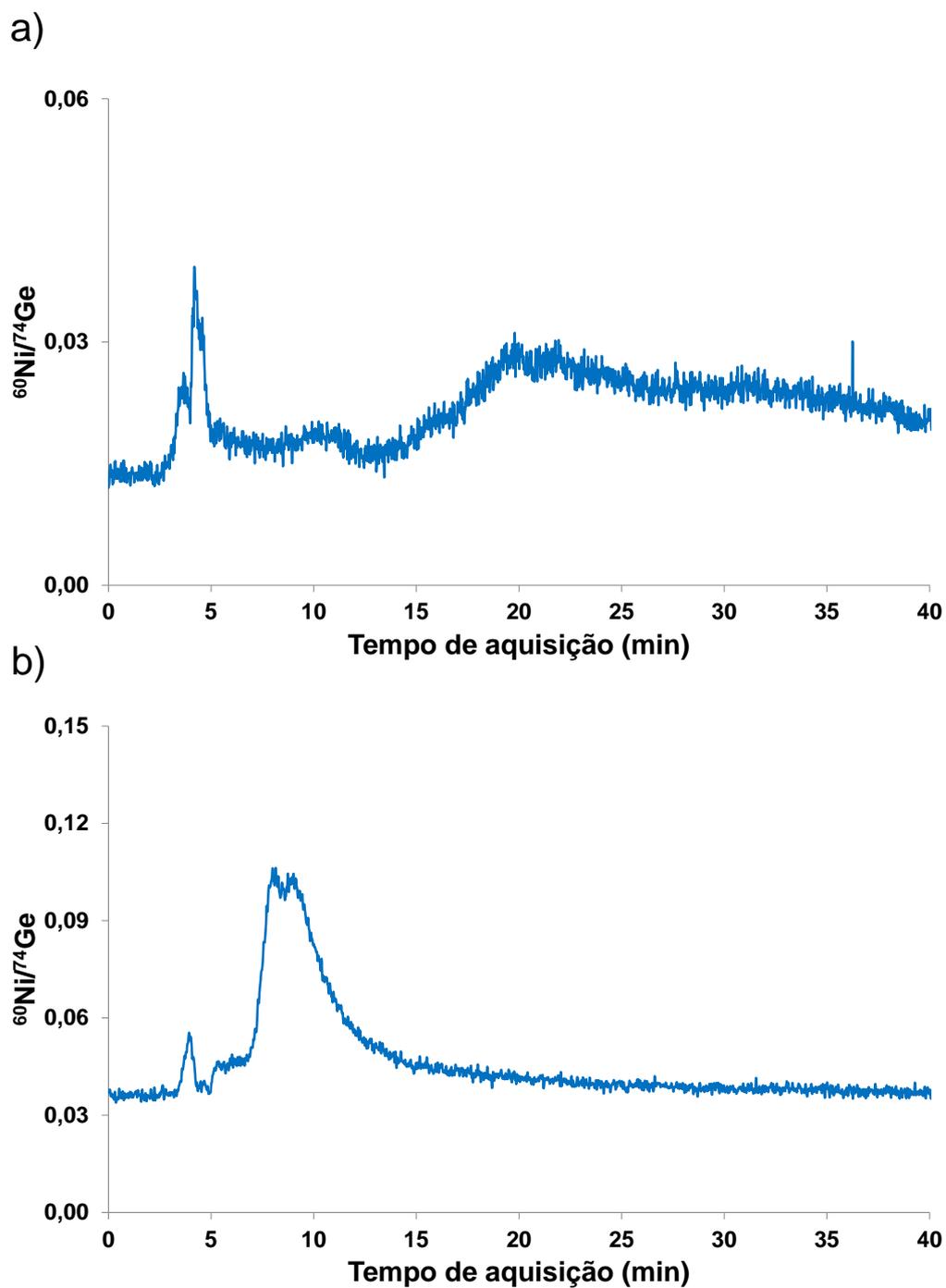


Figura 34: Perfil cromatográfico das Ni-porfirinas ( $^{60}\text{Ni}$ ), durante a eluição da fração 1 do óleo cru O1 nas seguintes fases móveis: a) metanol (2,7 mg injetados); b) metanol:tolueno (80:20; v:v) (2,0 mg injetados), por HPLC-ICP-MS.

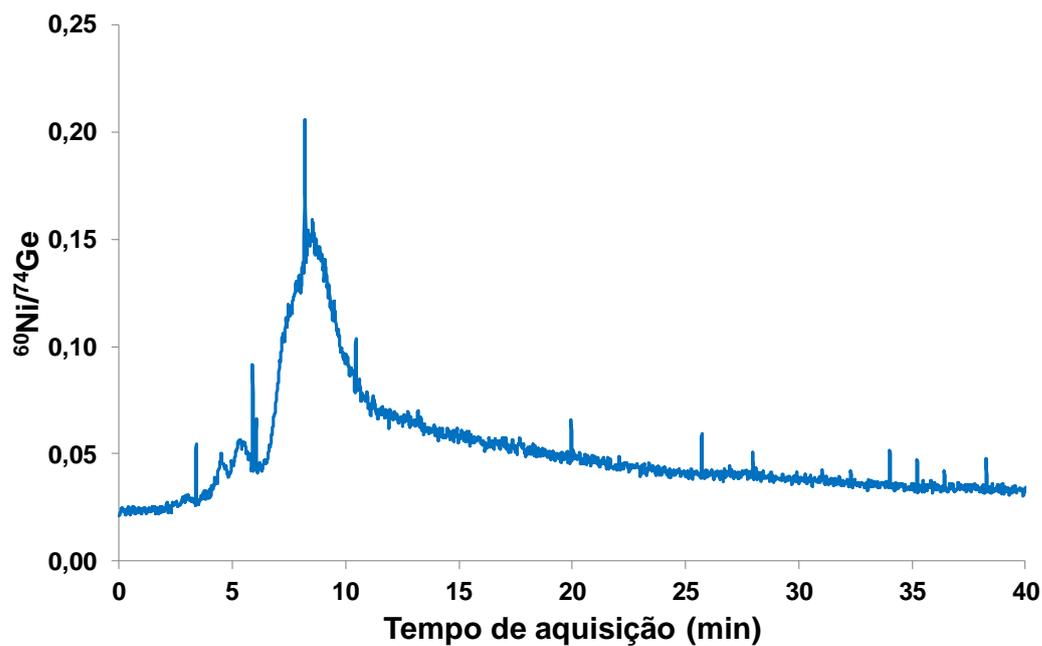


Figura 35: Perfil cromatográfico do efeito da fase móvel na detecção de Ni-porfirinas por ICP-MS (—  $^{60}\text{Ni}$ ), durante a eluição da fração 2 do óleo cru O1 em metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel (2,0 mg injetados) por HPLC-ICP-MS.

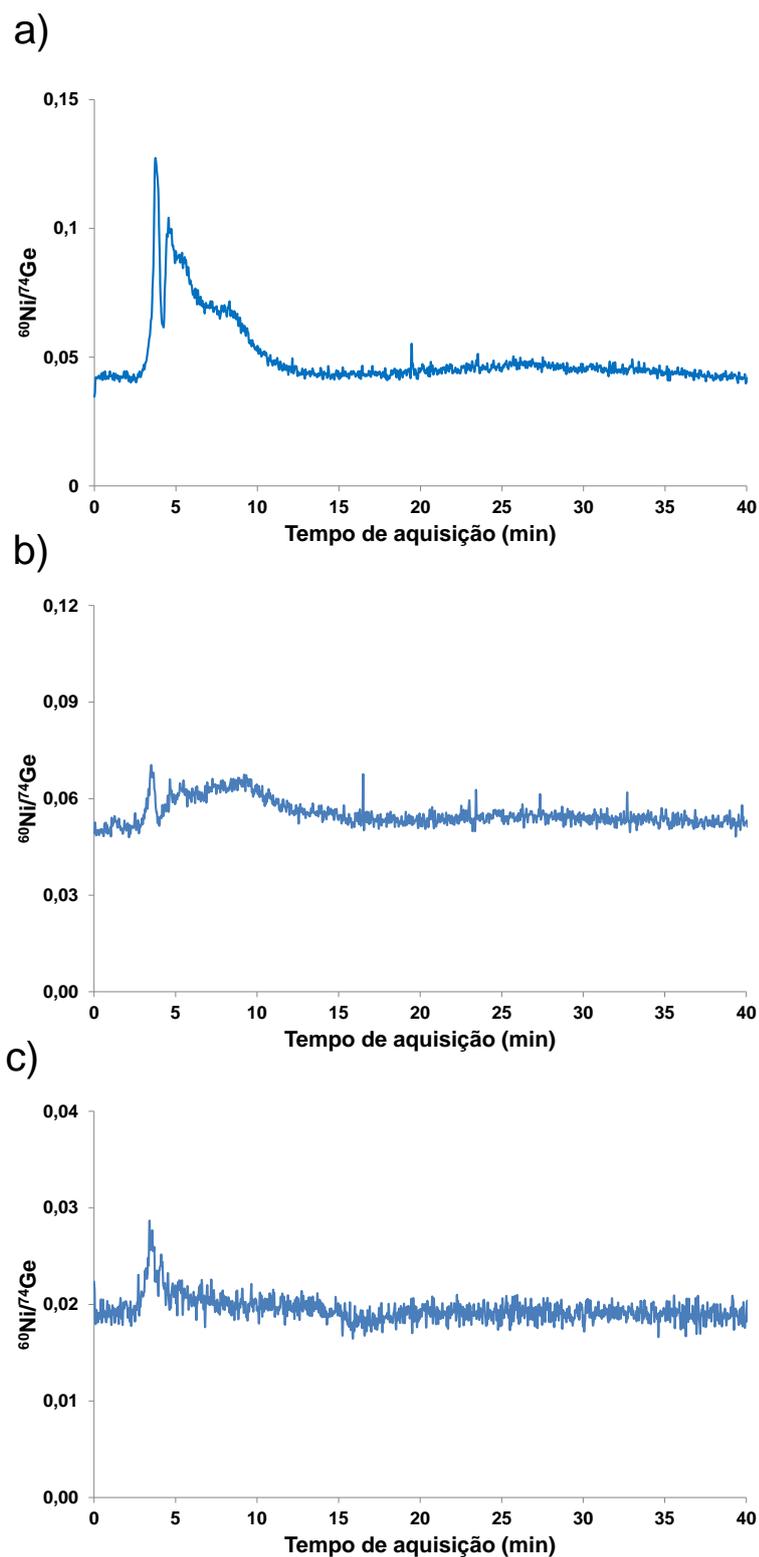


Figura 36: Perfil cromatográfico de Ni-porfirinas (—  $^{60}\text{Ni}$ ), durante a eluição do óleo cru O1: a) fração 3 (0,2 mg injetados); b) fração 4 (0,1 mg injetados); c) fração 5 (0,1 mg injetados), por HPLC-ICP-MS.

Devido aos grandes desvios obtidos nas integrações das áreas, não foi possível quantificar Ni nas frações de óleo cru estudadas. Entretanto, estes resultados confirmaram que um solvente apolar é o mais viável para analisar esse tipo de porfirina por HPLC, sendo mais viável uma outra fase estacionária, uma coluna de fase normal. Vale novamente apontar que maiores proporções de tolueno são inviáveis para uma quantificação via HPLC-FI-ICP-MS, usando o sistema de introdução de amostra apresentado neste trabalho. Isto porque uma grande carga deste solvente no plasma causa sua desestabilização, podendo extingui-lo, além de aumentar a possibilidade na formação de carbono no interior do ICP-MS, o que implica na deterioração prematura dos cones de amostragem e queda na sensibilidade. Desta forma, haveria a necessidade de dividir o fluxo proveniente do HPLC para que uma carga menor do solvente fosse introduzida no plasma, além do emprego de um micronebulizador compatível as taxas pós partição.

## 7 Conclusões

Neste estudo, a hifenação da cromatografia líquida de alta eficiência com injeção em fluxo e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-FI-ICP-MS) foi utilizada com sucesso para quantificar V ligado a porfirinas em frações de petróleo.

A detecção de bandas características de porfirinas (400, 550 e 570 nm) no espectro UV-Vis, coincidentes com os sinais de V obtidos por ICP-MS, e os resultados da análise de uma fração de petróleo enriquecida com um *spike* de VO-OEP, sustentam a natureza porfirínica dos compostos de V. Ou seja, o V quantificado pelo método desenvolvido (HPLC-FI-ICP-MS) está sob a forma de porfirinas.

O uso de uma solução de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Ge preparado em metanol como padrão interno, introduzido em linha, possibilitou minimizar as variações de sinal a curto prazo, devido a flutuações do sinal transiente. A garantia de picos bem resolvidos quando o sinal transiente é empregado, foi obtida a partir de um aumento no *dwell time* (120 ms), o pico gerado durante a aquisição das soluções padrão foi resultante de 170 medidas na  $m/z = 51$ , o que é estatisticamente suficiente para aquisição do sinal. O algoritmo de suavização do sinal por transformação rápida de Fourier (FFT) foi aplicado aos sinais transientes, em seguida, as intensidades relativas ( $^{51}\text{V}/^{74}\text{Ge}$ ) foram calculadas, a fim de diminuir o ruído de linha de base, resultando em menores desvio padrão para a área integrada.

A otimização das condições de separação das V-porfirinas resultou na escolha de uma coluna Hypersil C<sub>18</sub> de fase reversa de 250 mm x 4,6 mm, metanol como fase móvel para a fração mais polar (Fr1) e metanol:tolueno (80:20; v:v) para as outras frações.

O padrão VO-OEP provou ser representativo das amostras, sendo introduzido em fluxo para a calibração, pelo sistema FI acoplado. Sua

concentração exata foi determinada diretamente por ICP-MS contra um padrão inorgânico diluído em metanol.

O método desenvolvido revelou boa precisão, obtendo-se RSD abaixo de 1 %, e sensibilidade, com baixo limite de detecção (LOD) para o  $^{51}\text{V}$  ( $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), valor inferior ao referenciado na literatura. A exatidão foi avaliada através de um método comparativo de análise direta por ICP-MS, após diluição em xileno. A comparação dos resultados obtidos com os dois métodos (HPLC-FI-ICP-MS e ICP-MS), mostrou que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos, mostrando que o método desenvolvido é exato e pode ser usado na quantificação de V-porfirinas. Desta forma, as frações do óleo cru de referência interna foram analisadas por HPLC-FI-ICP-MS e as concentrações de V como V-porfirinas variaram entre 3,4 e  $11 \mu\text{g kg}^{-1}$ . O balanço de massa para V foi considerado adequado, tendo em conta a complexidade das amostras.

Em suma, o método desenvolvido por meio desse trabalho para a quantificação de V sob a forma de porfirinas em frações de amostras de óleo cru mostrou ser eficaz.

Assim, sugere-se como trabalhos futuros, estudos para a determinação de Ni-porfirinas, ajustando o método desenvolvido, como, por exemplo: o uso de coluna cromatográfica com fase normal, o emprego de um divisor de fluxo pós HPLC e o uso de micronebulizador.

ACKLEY, K. L.; DAY, J. A.; CARUSO, J. A. Separation of metalloporphyrins by capillary electrophoresis with UV detection and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. **Journal of chromatography. A**, v. 888, n. 1–2, p. 293–8, Aug. 2000.

AKINLUA, A.; SIGEDLE, A.; BUTHELEZI, T.; FADIPE, O. A. Trace element geochemistry of crude oils and condensates from South African Basins. **Marine and Petroleum Geology**, v. 59, p. 286–293, 2015.

ALI, M. F.; PERZANOWSKI, H.; BUKHARI, A.; AL-HAJI, A. A. Nickel and vanadyl porphyrins in Saudi Arabian crude oils. **Energy & Fuels**, v. 7, n. 2, p. 179–184, Mar. 1993.

AMORIM, F. A C.; WELZ, B.; COSTA, A. C. S.; LEPRI, F. G.; VALE, M. G. R.; FERREIRA, S. L. C. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 349–59, Apr. 2007.

ANTLER, M.; MAXWELL, E. J.; DUFORD, D. A.; SALIN, E. D. Online standard additions calibration of transient signals for inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 688–694, 2007.

BAHIA FILHO, O.; PRADA, P. R.; MENEGHESSO, C.; LANÇAS, F. M. Desvendando a medição nos ensaios químicos: 1. A curva analítica ou de calibração. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2011.

BAKER, E. W. Mass Spectrometric Characterization of Petroporphyrins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 10, p. 2311–2315, 1966.

BAKER, E. W.; YEN, T. F.; DICKIE, J. P.; RHODES, R. E.; CLARK, L. F. Mass Spectrometry of Porphyrins. II. Characterization of Petroporphyrins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 14, p. 3631–3639, 1967.

- BARWISE, A. J. . G.; WHITEHEAD, E. V. Separation and structure of petroporphyrins. **Phys Chem Earth**, v. 12, p. 181–192, 1980.
- BERKEL, G. J. VAN; QUINOÑES, M. A.; QUIRKE, J. M. E. Geoporphyrin analysis using electrospray ionization mass spectrometry. **Energy & Fuels**, v. 7, n. 19, p. 411–419, 1993.
- BJÖRN, E.; FRECH, W. Introduction of high carbon content solvents into inductively coupled plasma mass spectrometry by a direct injection high efficiency nebuliser. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 2, p. 274–278, 2003.
- BOORN, A. W.; BROWNER, R. F. Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Anal. Chem**, v. 54, p. 1402–1410, 1992.
- BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry**. Perkin-Elmer, 1997.
- BOTTO, R. I. Applications of Ultrasonic Nebulization in the Analysis of Petroleum and Petrochemicals By Inductively Coupled Plasma Atomic Emission-Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 8, n. 1, p. 51–57, 1993.
- BOTTO, R. I. Trace element analysis of petroleum naphthas and tars using direct injection ICP-MS. **J. Anal. Sci. Spectrosc**, v. 47, p. 1–13, 2002.
- BOTTO, R. I.; ZHU, J. J. Use of an Ultrasonic Nebulizer with Membrane Desolvation for Analysis of Volatile Solvents by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 9, n. 9, p. 905–912, 1994.
- BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em Métodos cromatográficos e eletroforéticos. , v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- CARDOSO FILHO, J. I. B. **Quantificação de Ni e V em frações polares de óleo bruto com o uso de cromatografia líquida e ICPMS**. 2009. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2009.
- CAUMETTE, G.; LIENEMANN, C.-P.; MERDRIGNAC, I.; BOUYSSIERE, B.; LOBINSKI, R. Element speciation analysis of petroleum and related materials. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 3, p. 263, 2009.

CAUMETTE, G.; LIENEMANN, C.-P.; MERDRIGNAC, I.; BOUYSSIERE, B.; LOBINSKI, R. Fractionation and speciation of nickel and vanadium in crude oils by size exclusion chromatography-ICP MS and normal phase HPLC-ICP MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 1123, 2010.

CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass spectrometry reviews**, v. 20, n. 6, p. 362–87, 2002.

CHOSEN, O. Role of Nickel and Vanadium in Petroleum Classification+. , n. 1, p. 647–652, 1990.

CONCHA, M. A.; QUIRKE, J. M. E.; BEATO, B. D.; YOST, R. A.; MERCER, G. E.; FILBY, R. H. The henryville bed of the New Albany Shale. IV. Tandem mass spectrometric analyses of geoporphyrins from the bitumen of the demineralised shale. **Chemical Geology**, v. 91, n. 2, p. 153–168, 1991.

CORNELIS, R.; CREWS, H.; CARUSO, J.; HEUMANN, K. **Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2003.

DECHAINED, G. P.; GRAY, M. R. Chemistry and Association of Vanadium Compounds in Heavy Oil and Bitumen, and Implications for Their Selective Removal †. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 2795–2808, May. 2010.

DREYFUS, S.; PÉCHEYRAN, C.; MAGNIER, C.; PRINZHOFER, A.; LIENEMANN, C.; DONARD, O. Direct Trace and Ultra-Trace Metals Determination in Crude Oil and Fractions by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Journal of ASTM International**, v. 2, n. 9, p. 12969, 2005.

DUYCK, C. B. **Determinação de elementos traço em petróleo bruto e suas frações por USN-ICPMS de soluções orgânicas visando aplicações geoquímicas**. 2001. Pontifícia Universidade Católica, 2001.

DUYCK, C. B.; SAINT'PIERRE, T. D.; MIEKELEY, N.; FONSECA, T. C. O. DA; SZATMARI, P. High performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry for V and Ni quantification as tetrapyrroles. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 66, n. 5, p. 362–367, May. 2011.

DUYCK, C.; MIEKELEY, N.; FONSECA, T. C. O.; SZATMARI, P.; NETO, E. V. D. S. Trace element distributions in biodegraded crude oils and fractions from the Potiguar Basin, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 5, p. 978–986, 2008.

DUYCK, C.; MIEKELEY, N.; PORTO, C. L.; SZATMARI, P. Trace element determination in crude oil and its fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry using ultrasonic nebulization of toluene solutions. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 1979–1990, 2002.

DUYCK, C.; MIEKELEY, N.; PORTO DA SILVEIRA, C. L.; AUCÉLIO, R. Q.; CAMPOS, R. C.; GRINBERG, P.; BRANDÃO, G. P. The determination of trace elements in crude oil and its heavy fractions by atomic spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 939–951, Sep. 2007.

EBDON, L.; EVANS, E. H.; PRETORIUST, W. G.; ROWLAND, S. J. Analysis of Geoporphyrins by High-temperature Gas Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and High-performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry \* Plenary Lecture. , v. 9, n. September, p. 939–943, 1994.

ECKARDT, C. B.; DYAS, L.; YENDLE, P. W.; EGLINTON, G. Multimolecular data processing and display in organic geochemistry: The evaluation of petroporphyrin GC-MS data. **Organic Geochemistry**, v. 13, n. 4–6, p. 573–582, 1988.

ELLIS, J.; RECHSTEINER, C.; MICHAEL, M.; WILBUR, S. Determination of volatile nickel and vanadium species in crude oil and crude oil fractions by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom**, v. 26, p. 1674–1678, 2011.

ESCOBAR, M.; MÁRQUEZ, G.; AZUAJE, V.; SILVA, A. DA; TOCCO, R. Use of biomarkers, porphyrins, and trace elements to assess the origin, maturity, biodegradation, and migration of Alturitas oils in Venezuela. **Fuel**, v. 97, p. 186–196, Jul. 2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. European Medicines Agency: An unacceptable choice. **Prescrire International**, v. 20, n. 121, p. 278, 2011.

EVANS, E. H.; EBDON, L. Effect of organic solvents and molecular on polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass

spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 5, p. 425–430, 1990.

EVANS, E. H.; GIGLIO, J. J. Interferences in Inductively Coupled plasma. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 8, p. 1–18, 1993.

FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados: definição, constituição, aplicação, especificações, características de qualidade**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

FENN, J. B.; ROSELL, J.; MENG, C. K. In Electrospray Ionization, How Much Pull Does an Ion Need to Escape Its Droplet Prison? **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 305, n. 97, 1997.

FERNÁNDEZ-VARELA, R.; ANDRADE, J. M.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Selecting a reduced suite of diagnostic ratios calculated between petroleum biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons to characterize a set of crude oils. **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 52, p. 8279–89, Dec. 2010.

FONSECA, T. C. O. DA. **Caracterização inorgânica de petróleos pela técnica de ICP-MS para fins de exploração geoquímica**. 2000. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2000.

GALLEGOS, E. J.; SUNDARARAMAN, P. Mass spectrometry of geoporphyrins. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 4, n. 1, p. 55–85, 1985.

GINÉ, M. F. **Espectrometria de massas com fonte de plasma**. Piracicaba: CENA, 1999.

GJ, S.; QUIRKE JME, E. G. Analysis of petroporphyrins by chemical ionisation mass spectrometry. **J Chem Soc Perkin Trans**, v. 1, n. 12, p. 1655–1659, 1978.

GOURGIOTIS, A.; BÉRAIL, S.; LOUVAT, P.; ISNARD, H.; MOUREAU, J.; NONELL, A.; MANHÈS, G.; BIRCK, J.-L.; GAILLARDET, J.; PÉCHEYRAN, C.; CHARTIER, F.; DONARD, O. F. X. Method for isotope ratio drift correction by internal amplifier signal synchronization in MC-ICPMS transient signals. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 9, p. 1607, 2014.

GRIGSBY, R. D.; GREEN, J. B. High-resolution mass spectrometric analysis of a vanadyl porphyrin fraction isolated from the greater-than-700 C resid of Cerro Negro heavy petroleum. **Energy Fuels**, v. 11, n. 3, p.

602–609, 1997.

HARDAWAY, C.; SNEDDON, J.; BECK, J. N. Determination of Metals in Crude Oil by Atomic Spectroscopy. **Analytical Letters**, v. 37, n. 14, p. 2881–2899, Dec. 2004.

HILL, S. J. (ED.). **Inductively coupled plasma spectrometry and its applications**. 1. ed. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999.

HUSEBY, B.; OCAMPO, R. I. Evidence for porphyrins bound , via ester bonds, to the Messel oil shale kerogen by selective chemical degradation experiments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 61, n. 18, p. 3951–3955, 1997.

HUTTON, R. C. Application of inductively coupled plasma source mass spectrometry (ICP-MS) to the determination of trace metals in organics. **J. Anal. At. Spectrom**, v. 1, p. 259–263, 1986.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. , 2010. Documento de caráter orientativo, .

JOHNSON, J. V; BRITTON, E. D.; YOST, R. A.; QUIRKE, J. M. E.; CUESTA, L. L. Tandem Mass Spectrometry for Characterization of High-Carbon-Number Geoporphyrins. **Anal. Chem.**, v. 58, p. 1325–1329, 1986.

KAHEN, K.; STRUBINGER, A.; CHIRINOS, J. R.; MONTASER, A. Direct injection high efficiency nebulizer-inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of petroleum samples. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 58, p. 397–413, 2003.

**Key Words Energy Statistics**. Paris: International Energy Agency, 2013.

KRUPP, E. M.; DONARD, O. F. X. Isotope ratios on transient signals with GC-MC-ICP-MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 242, n. 2–3, p. 233–242, 2005.

KVENVOLDEN, K. A. Organic geochemistry – A retrospective of its first 70 years. **Organic Geochemistry**, v. 37, n. 1, p. 1–11, Jan. 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

LIU, T.; LU, J.; ZHAO, X.; ZHOU, Y.; WEI, Q.; XU, C.; ZHANG, Y.; DING, S.; ZHANG, T.; TAO, X.; JU, L.; SHI, Q. Distribution of Vanadium Compounds in Petroleum Vacuum Residuum and Their Transformations in Hydrodemetallization. **Energy & Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2089–2096, Mar.

2015.

LÓPEZ, L.; MÓNACO, S. LO. Geochemical implications of trace elements and sulfur in the saturate, aromatic and resin fractions of crude oil from the Mara and Mara Oeste fields, Venezuela. **Fuel**, v. 83, n. 3, p. 365–374, 2004.

MAESSEN, F. J. M. J.; SEEVERENS, P. J. H.; KREUNING, G. Analytical aspects of organic solvent load reduction in normal-power ICPs by aerosol thermostating at low temperatures. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 39, n. 9–11, p. 1171–1180, 1984.

MAESTRE, S. E.; TODOLÍ, J. L.; MERMET, J. M. Evaluation of several pneumatic micronebulizers with different designs for use in ICP-AES and ICP-MS. Future directions for further improvement. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 5–6, p. 888–899, 2004.

MAGYAR, B.; LIENEMANN, P.; VONMONT, H. Some effects of aerosol drying and oxygen feeding on the analytical performance of an inductively coupled nitrogen-argon plasma. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 41, n. 1–2, p. 27–38, 1986.

MÁRQUEZ, N.; YSAMBERTT, F.; LA CRUZ, C. DE. Three analytical methods to isolate and characterize vanadium and nickel porphyrins from heavy crude oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 395, n. 3, p. 343–349, 1999.

MCKENNA, A. M.; PURCELL, J. M.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. Identification of Vanadyl Porphyrins in a Heavy Crude Oil and Raw Asphaltene by Atmospheric Pressure Photoionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 4, p. 2122–2128, Apr. 2009.

MEAD, W.; WILDE, A. Mass spectrum of vanadyl etioporphyrin-I. **Chem Ind**, v. 33, p. 1315–1316, 1961.

MONTASER, A.; GOLIGGHTLY, D. W. (EDS.). **Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry**. 2. ed. New York: VCH, 1992.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001.

NEUE, U. D. **HPLC Columns - Theory, Technology, and Practice**.

Milford: Wiley-VCH, 1997.

OCAMPO, R. Structural determination of purpurin-18 (as methyl ester) from sedimentary organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 30, n. 2–3, p. 189–193, 1999.

OCAMPO, R.; ALBRECHT, P. Petroporphyrins as Biomarkers in Oil-Oil and Oil-Source Rock Correlations. **Energy and Fuels**, n. 11, p. 191–193, 1993.

OCAMPO, R.; CALLOT, H. J.; ALBRECHT, P. Identification of Polar Porphyrins in Oil Shale. **Journal of the Chemical Society**, n. 198, p. 198–200, 1985.

OCAMPO, R.; REPETA, D. J. Isolation and structure determination of two novel C(132)-OH bacteriopheophytin a allomers from a coastal salt pond sediment. **Organic Geochemistry**, v. 33, n. 7, p. 849–854, 2002.

OCAMPO, R.; REPETA, D. J. 132(S)-OH methyl bacteriopheophorbide a allomer in sedimentary organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 35, n. 2, p. 209–214, 2004.

OLIVEIRA, E. C. DE. Comparação das diferentes técnicas para a exclusão de “outliers.” **Congresso da Qualidade em Metrologia**, 2008.

PESSOA, H. M.; HAUSER-DAVIS, R. A.; CAMPOS, R. C. DE; CASTRO, E. V. R. DE; CARNEIRO, M. T. W. D.; BRANDÃO, G. P. Determination of Ca, Mg, Sr and Ba in crude oil samples by atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 9, p. 1568, 2012.

POIRIER, L.; NELSON, J.; LEONG, D.; BERHANE, L.; HAJDU, P.; LOPEZ-LINARES, F. Application of ICP-MS and ICP-OES on the Determination of Nickel, Vanadium, Iron, and Calcium in Petroleum Crude Oils via Direct Dilution. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 5, p. 3783–3790, 2016.

PREMOVIĆ, P. I.; DORDEVIĆ, D. M.; PAVLOVIĆ, M. S. Vanadium of petroleum asphaltenes and source kerogens (La Luna Formation, Venezuela): Isotopic study and origin. **Fuel**, v. 81, n. 15, p. 2009–2016, 2002.

QIAN, K.; EDWARDS, K. E.; MENNITO, A. S.; WALTERS, C. C.; KUSHNERICK, J. D. Enrichment, resolution, and identification of nickel porphyrins in petroleum asphaltene by cyclograph separation and

atmospheric pressure photoionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 1, p. 413–9, Jan. 2010.

QIAN, K.; MENNITO, A. S.; EDWARDS, K. E.; FERRUGHELLI, D. T. Observation of vanadyl porphyrins and sulfur-containing vanadyl porphyrins in a petroleum asphaltene by atmospheric pressure photoionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 22, p. 2153–2160, 2008.

RODGERS, R. P.; HENDRICKSON, C. L.; EMMETT, M. R.; MARSHALL, A. G.; GREANEY, M.; QIAN, K. Molecular characterization of petroporphyrins in crude oil by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 551, n. 850, p. 546–551, 2013.

SADEK, P. C. **The HPLC Solvent Guide**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996.

SAKAIRI, M.; YERGEY, A. L.; SIU, K. W.; BLANC, J. C. LE; GUEVREMONT, R.; BERMAN, S. S. Electrospray mass spectrometry: application of ion evaporation theory to amino acids. **Analytical chemistry**, v. 63, n. 14, p. 1488–1490, 1991.

SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ, C.; TODOLÍ, J. L.; LIENEMANN, C. P.; MERMET, J. M. Quantification of nickel, vanadium and manganese in petroleum products and biofuels through inductively coupled plasma mass spectrometry equipped with a high temperature single pass spray chamber. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 242, 2014.

SÁNCHEZ, R.; TODOLÍ, J. L.; LIENEMANN, C. P.; MERMET, J. M. Universal calibration for metal determination in fuels and biofuels by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry based on segmented flow injection and a 350 °C heated chamber. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 6, p. 937, 2012.

SÁNCHEZ, R.; TODOLÍ, J. L.; LIENEMANN, C. P.; MERMET, J. M. Determination of trace elements in petroleum products by inductively coupled plasma techniques: A critical review. **Spectrochimica Acta Part**

**B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 104–126, 2013.

SELLEY, R. C. **Elements of Petroleum Geology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOUZA, J. R. **Determinação elementar em óleo lubrificante e óleo combustível por ICP OES e DR-ICP-MS**. 2011. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2011.

SOUZA, J. R. DE; DUYCK, C. B.; FONSECA, C. O.; SAINT, T. D. Multielemental determination in oil matrices diluted in xylene by ICP-MS with a dynamic reaction cell employing methane as reaction gas for solving specific interferences. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, p. 1280–1286, 2012.

SPEIGHT, J. G. **Handbook of Petroleum Product Analysis**. 1. ed. New Jersey: A JOHN WILEY & SONS, 2001.

SUNDARARAMAN, P AND BOREHAM, C. J. Vanadyl 3-nor C30DPEP: Indicator of depositional environment of a lacustrine sediment. **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 55, p. 389–395, 1991.

SUNDARARAMAN, P. High-performance liquid chromatography of vanadyl porphyrins. **ANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 57, n. 12, p. 2204–2206, 1985.

SUNDARARAMAN, P.; RAEDEKE, L. D. Vanadyl porphyrins in exploration: maturity indicators for source rocks and oils. **Applied Geochemistry**, v. 8, p. 245–254, 1993.

TANNER, M.; GÜNTHER, D. Short transient signals, a challenge for inductively coupled plasma mass spectrometry, a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, n. 1, p. 19–28, 2009.

TEIXEIRA, H. M. F. **Desenvolvimento e aplicação de metodologias para caracterização multielementar de água conata em amostras de petróleo**. 2007. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2007.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L.-G.; MUNTAU, H.; LEEUWEN, H. P. VAN; LOBIŃSKI, A. R. Clinical chemistry section, commission on toxicology guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements, definitions, structural aspects,

and methodological approaches guidelines for terms related to chemical speciation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1453–1470, 2000.

THOMAS, R. **Practical Guide to ICP-MS**. 2. ed. New York: CRC Press, 2008.

TISSOT, B. P. Recent Advances in Petroleum Geochemistry Applied to Hydrocarbon Exploration. **AAPG Bulletin**, v. 68, n. 5, p. 545–563, 1984.

TORMEN, L.; CHAVES, E. S.; SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Determination of trace elements in fuel ethanol by ICP-MS using direct sample introduction by a microconcentric nebulizer. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, n. 9, p. 1300, 2008.

TREIBS, A. Chlorophyll und Hämin-derivate in organischen Mineralstoffen. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 88, p. 682–686, 1936.

WILHELM, S. M.; BLOOM, N. Mercury in petroleum. **Fuel Processing Technology**, v. 63, p. 1–27, 2000.

XU, H.; QUE, G.; YU, D.; LU, J. R. Characterization of Petroporphyrins Using Ultraviolet - Visible Spectroscopy and Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Energy and Fuels**, v. 19, n. 2, p. 517–524, 2005.

XU, H.; YU, D.; QUE, G. Characterization of petroporphyrins in Gudao residue by ultraviolet-visible spectrophotometry and laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Fuel**, v. 84, p. 647–652, 2005.

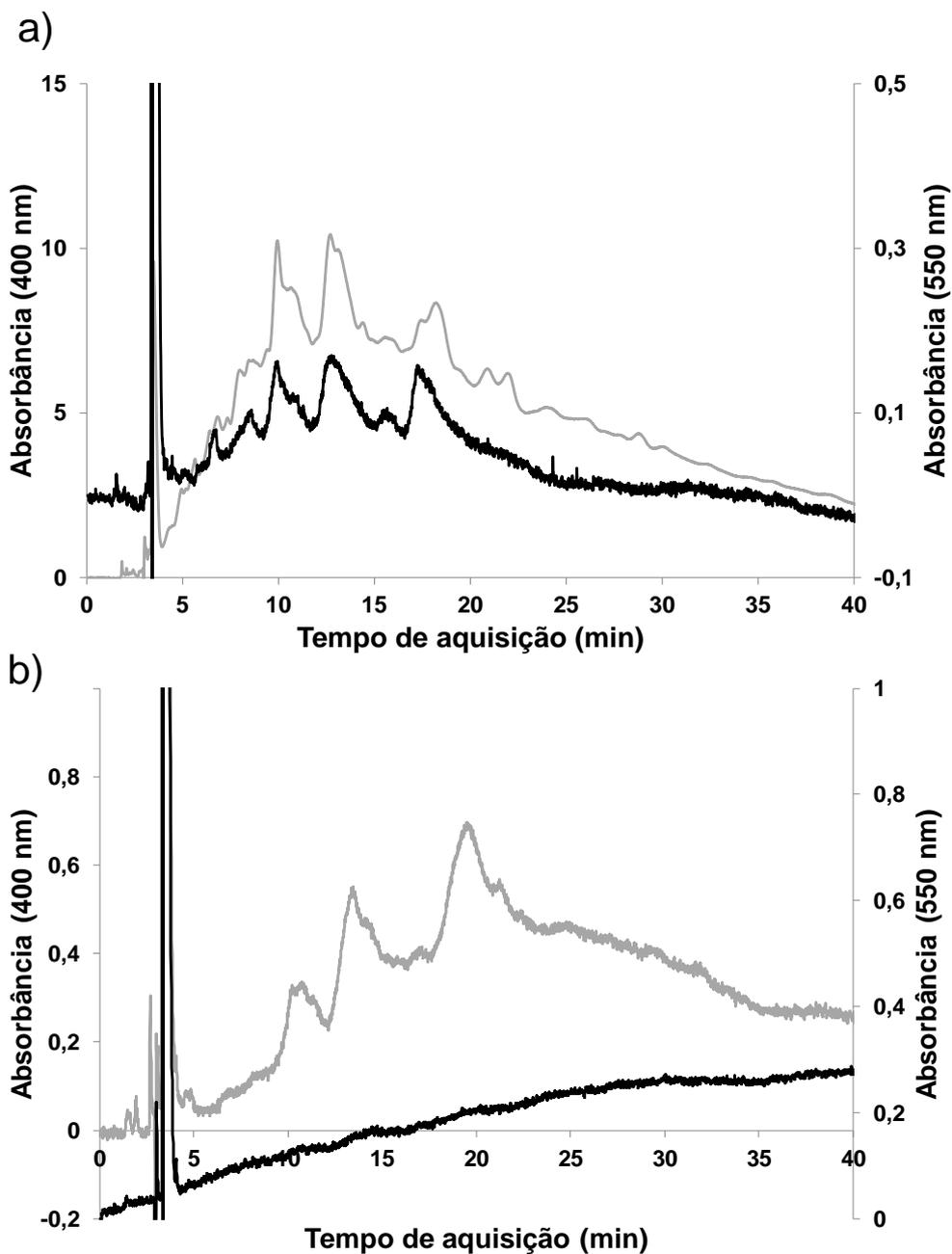
YEN, T. F. **Role of trace metals in petroleum**. 1. ed. Ann Arbor Science, 1975.

ZHAO, X.; LIU, Y.; XU, C.; YAN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHAO, S.; CHUNG, K.; GRAY, M. R.; SHI, Q. Separation and Characterization of Vanadyl Porphyrins in Venezuela Orinoco Heavy Crude Oil. **Energy and Fuels**, n. 27, p. 2874–2882, 2013.

ZHAO, X.; XU, C.; SHI, Q. Porphyrins in Heavy Petroleums: A Review. . **Structure and Modeling of Complex Petroleum Mixtures**. 1. ed. 2015. 39–70 p.

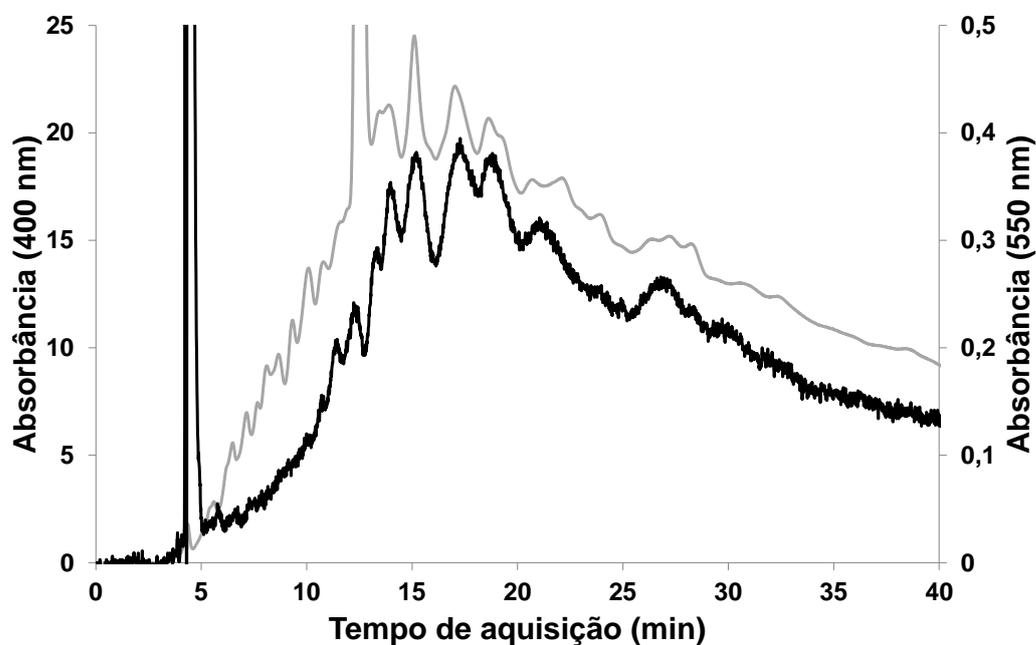
## 9 Anexos

Anexo 1: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise das frações do óleo teste de referência interna O1: a) fração 1; b) fração 2.

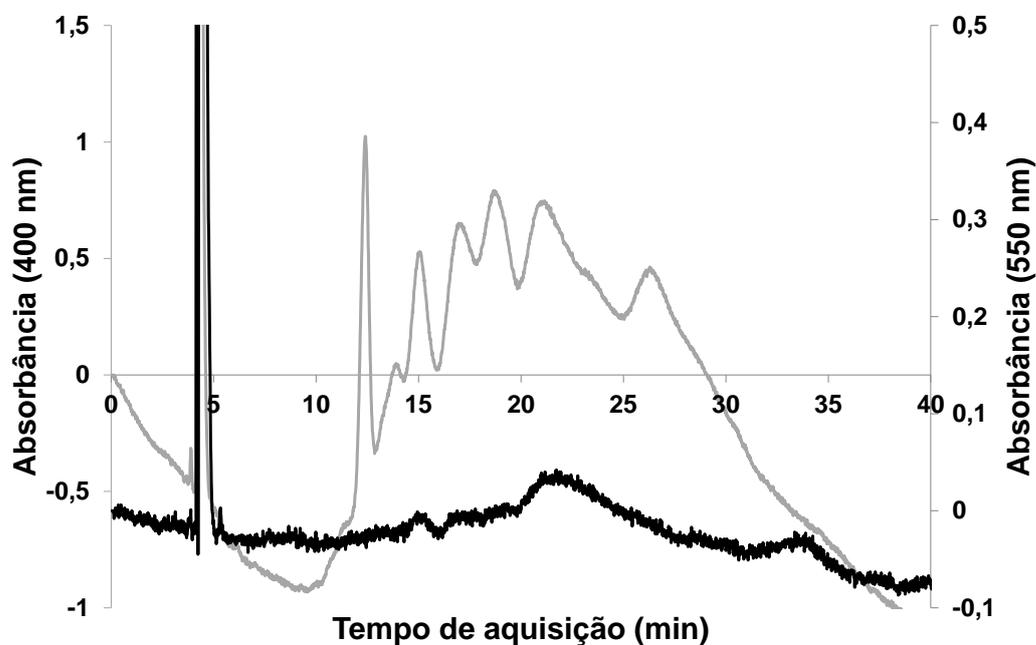


Anexo 2: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise das frações do óleo O2: a) fração 1; b) fração 2.

a)

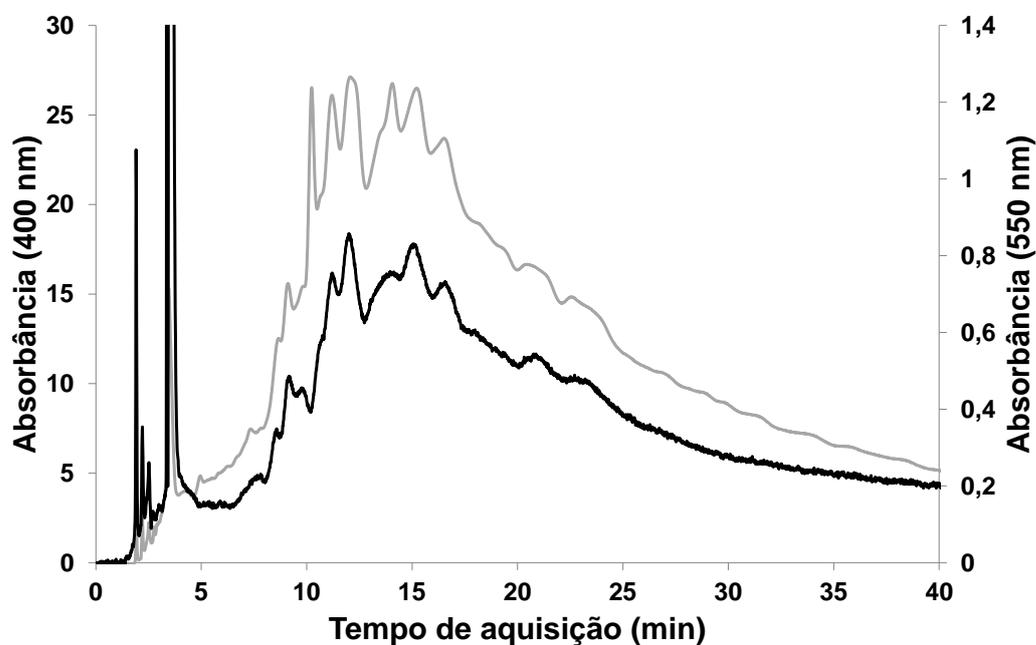


b)

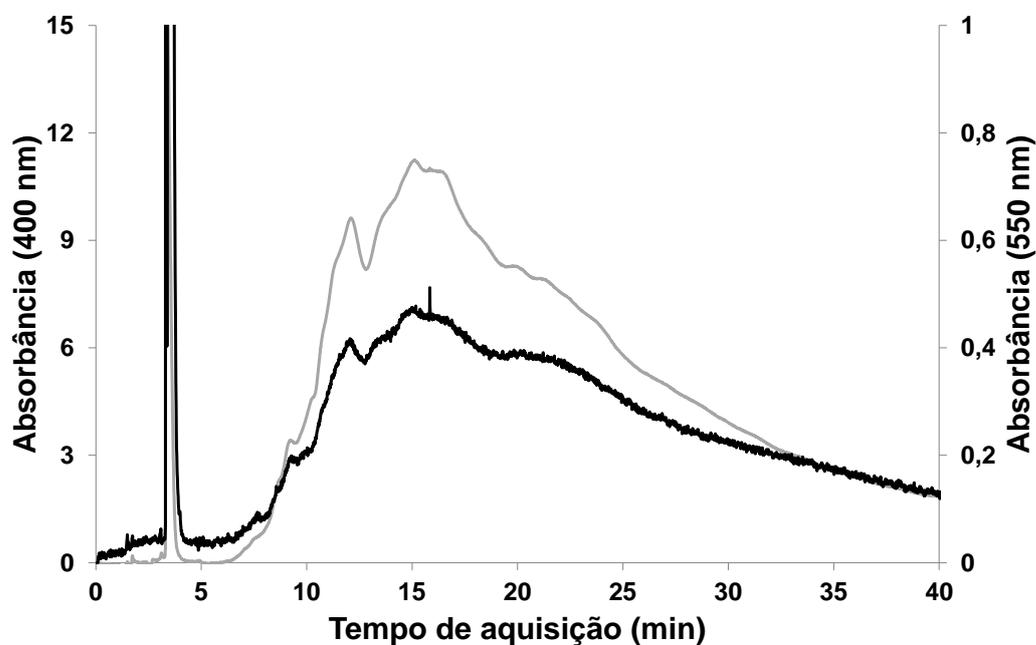


Anexo 3: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise das frações do óleo certificado 8505: a) fração 1; b) fração 2.

a)

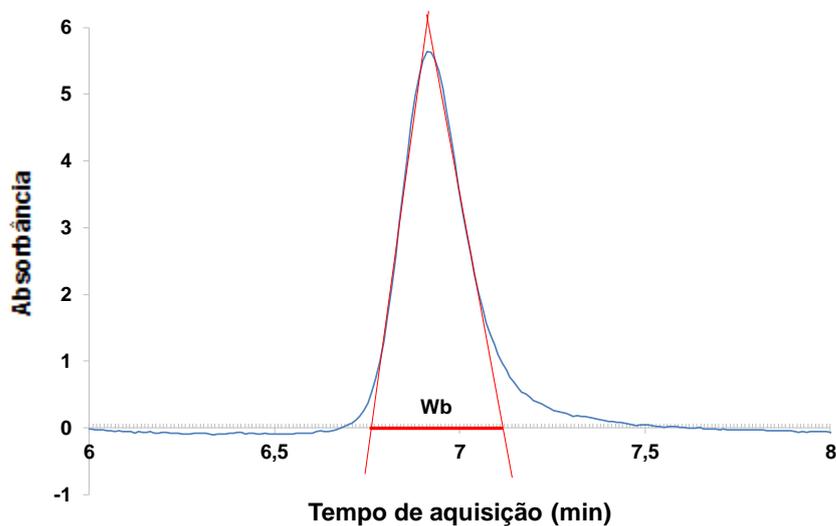


b)

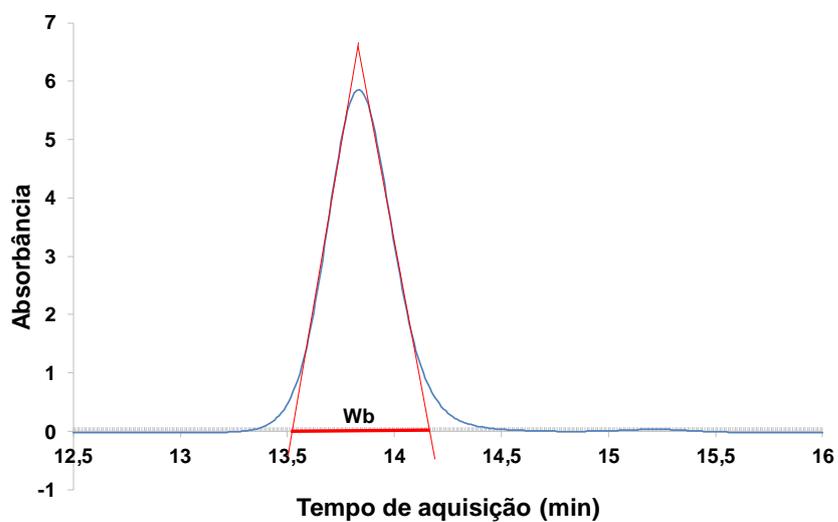


Anexo 4: Espectros da injeção do padrão VO-OEP ( $\sim 20 \mu\text{g L}^{-1}$ ), para calcular N e HETP em: a) uma única coluna (250 mm); b) duas colunas em série (150 mm e 125 mm).

a)



b)

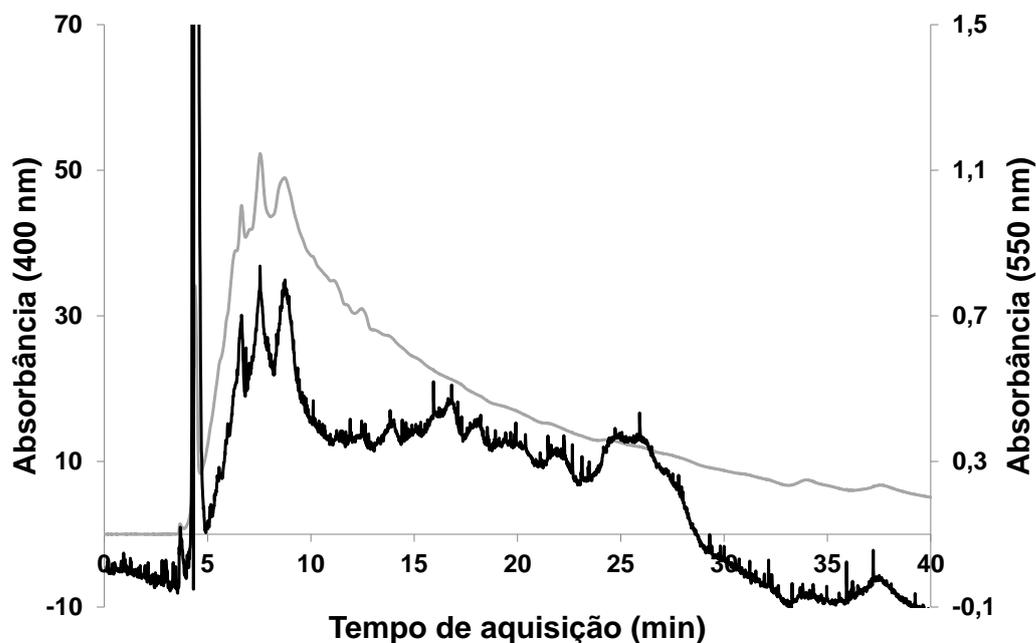


Anexo 5: Cálculo do número de pratos teóricos (N) para os sistemas testados.

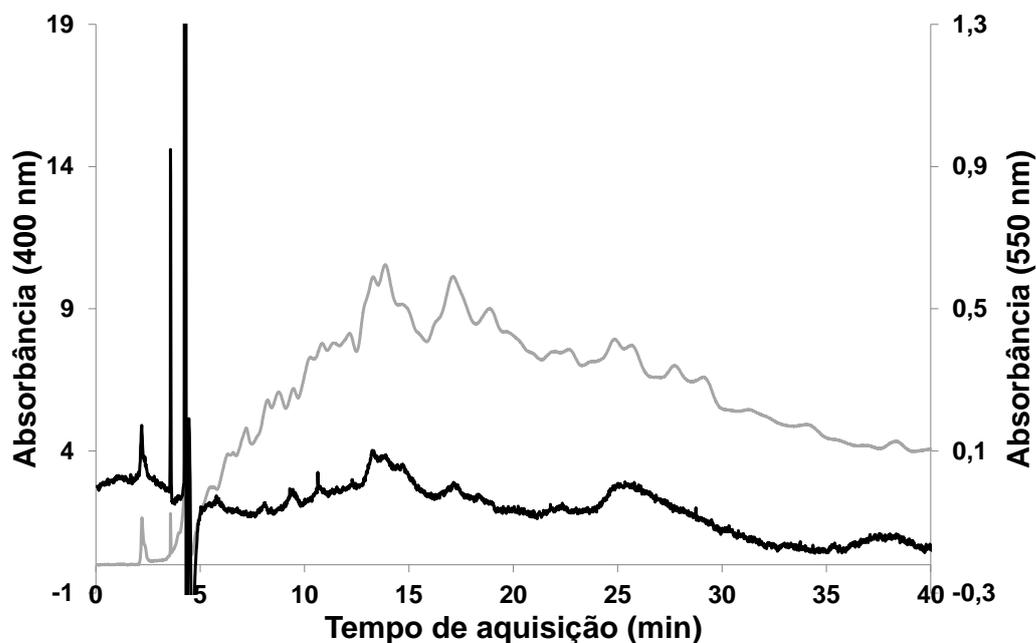
	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>W<sub>b</sub> (min)</b>	<b>N</b>	<b>HEPT</b>
Coluna (250 mm)	6,912	0,34	6613	0,0038
Colunas em série (150 e 125 mm)	13,835	0,60	8507	0,0032

Anexo 6: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise da fração 1 do óleo teste O1 em metanol como fase móvel, usando: a) uma única coluna (250 mm); b) duas colunas em série (150 mm e 125 mm).

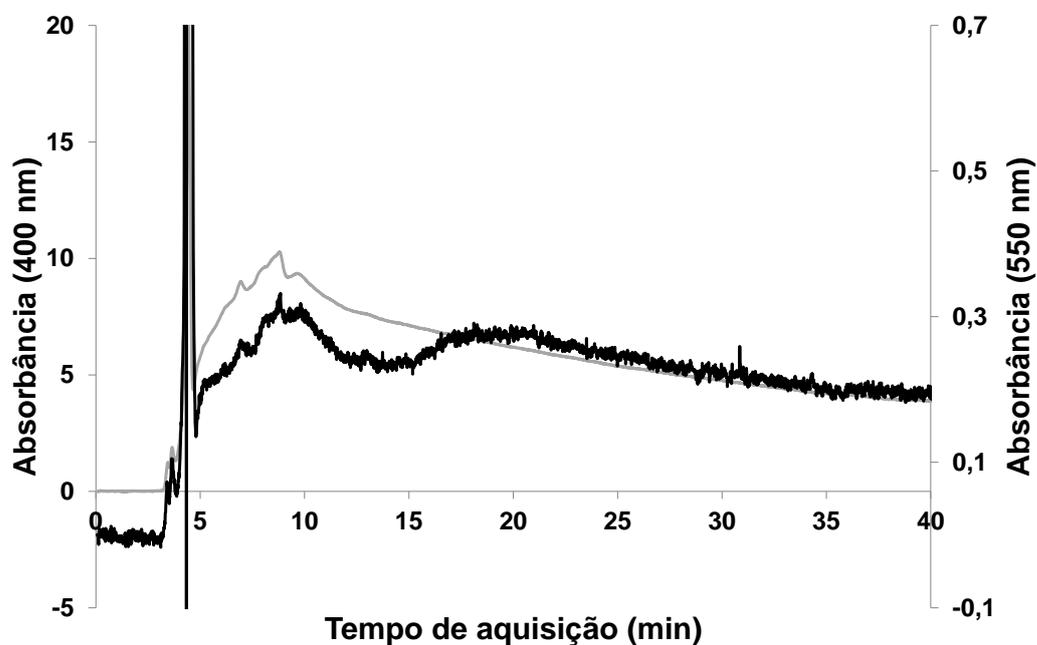
a)



b)



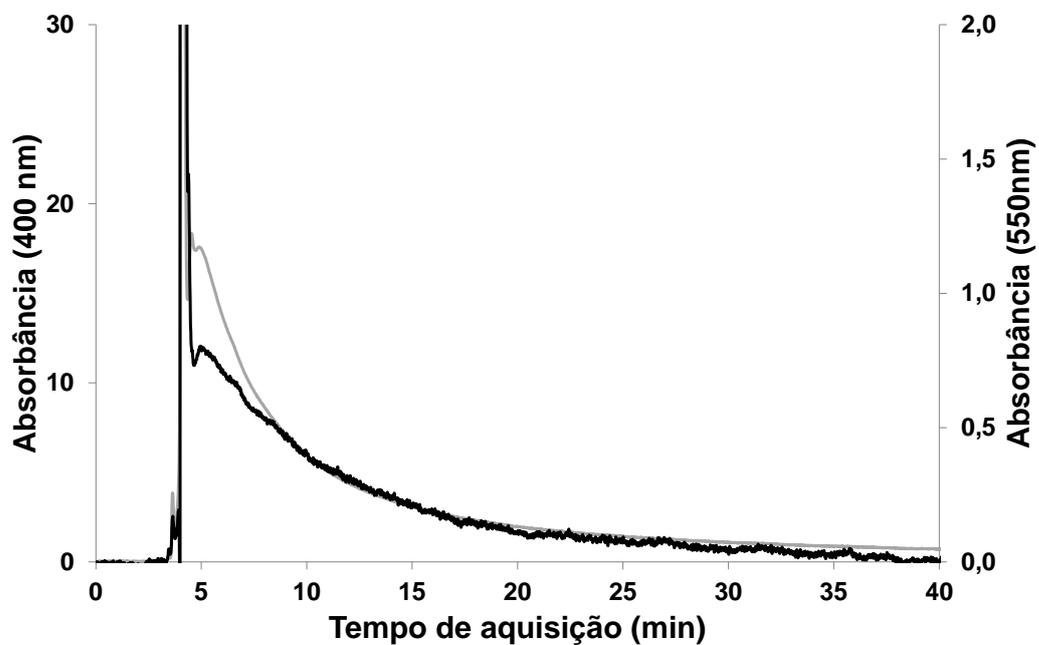
Anexo 7: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (\_\_\_ 400 nm) e pico  $\beta$  (\_\_\_ 550 nm) para a análise da fração 2 do óleo teste O1, usando metanol como fase móvel.



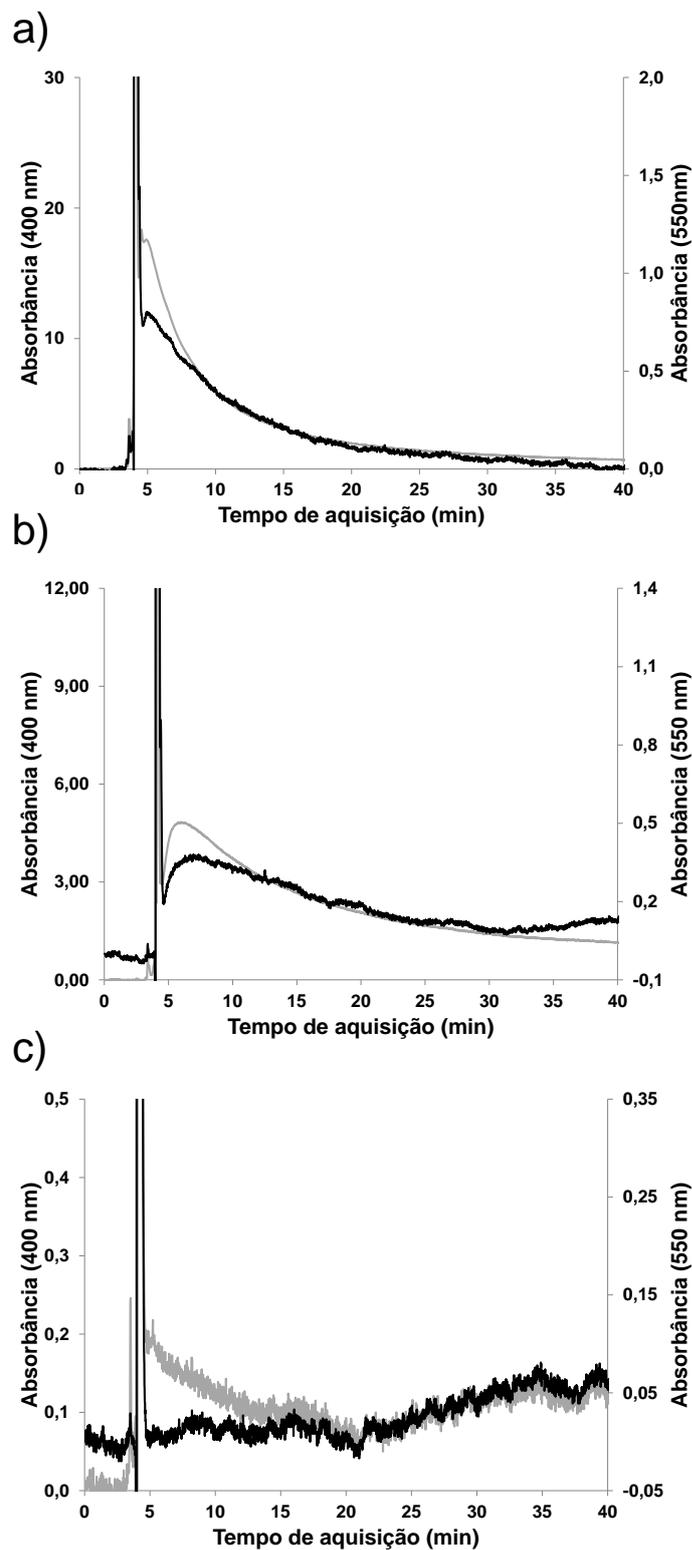
Anexo 8: Propriedades dos solventes usados no desenvolvimento do método para separações dos compostos de V, presentes em porfirinas do petróleo, por HPLC (SNYDER et al., 1997).

<b>Solvente</b>	<b>Corte UV (nm)</b>	<b>Viscosidade (C<sub>p</sub>)</b>	<b>Ponto de ebulição (°C)</b>	<b>Número de miscibilidade</b>	<b>Polaridade (P')</b>
Água	190	1,00	100	-	10,2
Metanol	205	0,55	64,7	12	5,1
Tolueno	284	0,59	110,62	23	2,4

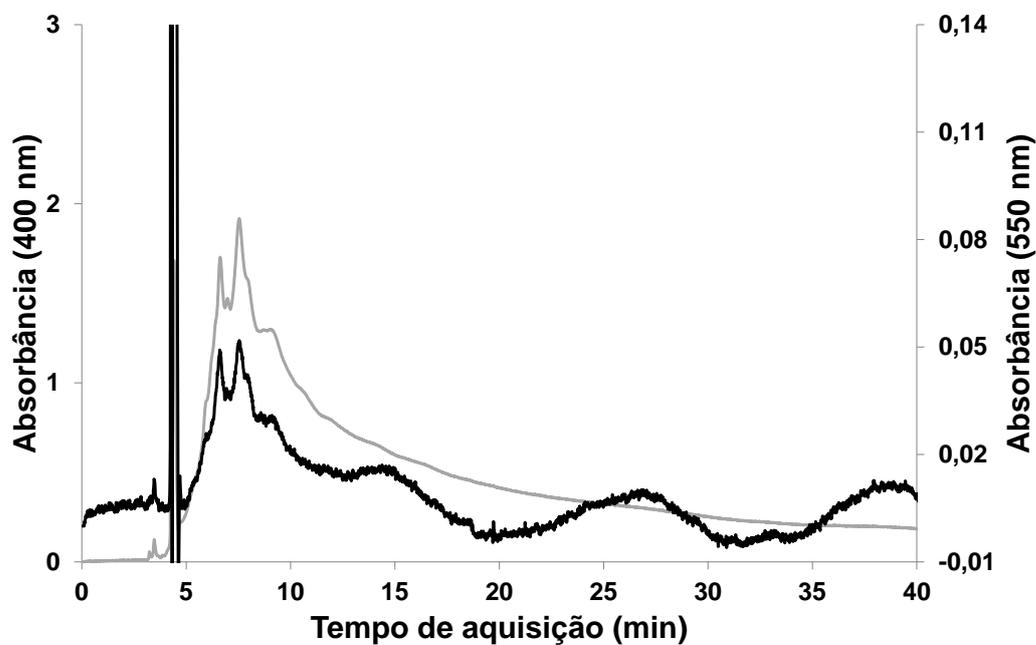
Anexo 9: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise da fração 1 do óleo teste O1, usando metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel.



Anexo 10: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise das frações da resina do óleo teste O1, usando metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel: a) fração 3 (0,2 mg injetado); b) fração 4 (0,1 mg injetado); c) fração 5 (0,1 mg injetado).

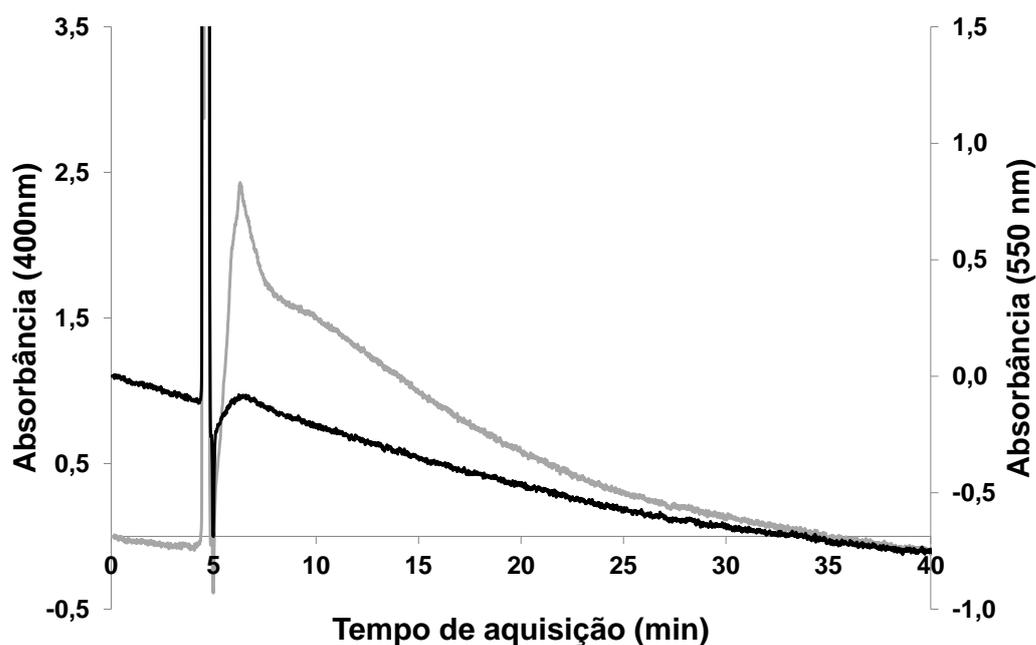


Anexo 11: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise da fração 1 do óleo certificado NIST 8505 (0,07 mg injetados) usando metanol como fase móvel.

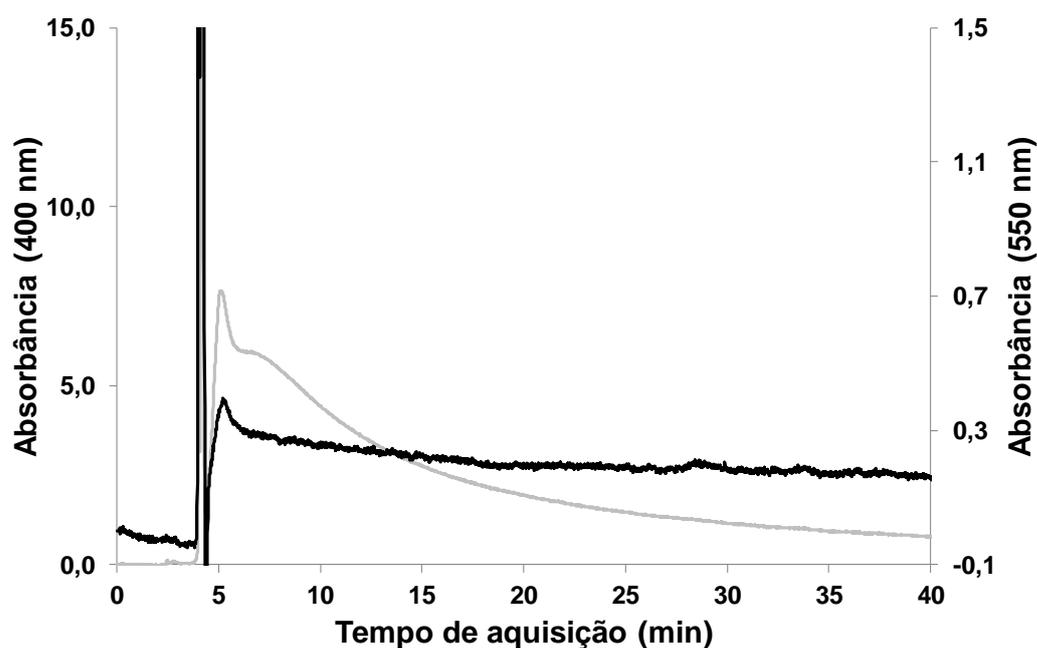


Anexo 12: V-porfirinas detectadas por meio do seu espectro de UV-Vis na banda de Soret (— 400 nm) e pico  $\beta$  (— 550 nm) para a análise das frações do óleo certificado NIST 8505 usando metanol:tolueno (80:20; v:v) como fase móvel: a) fração 1 (0,08 mg injetada); b) fração 2 (0,07 mg injetada).

a)

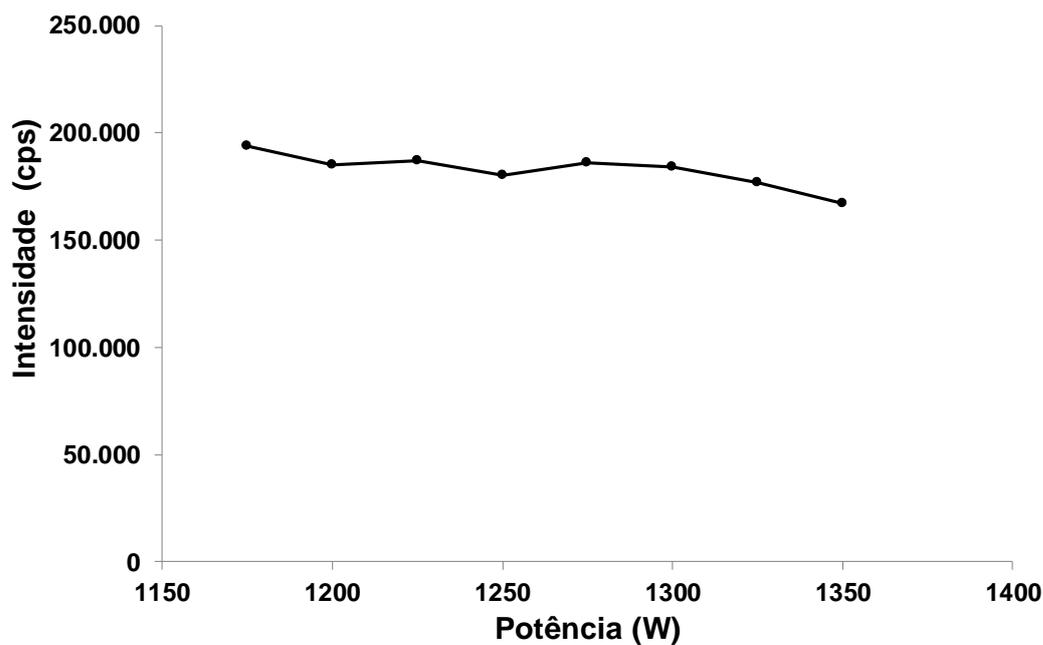


b)

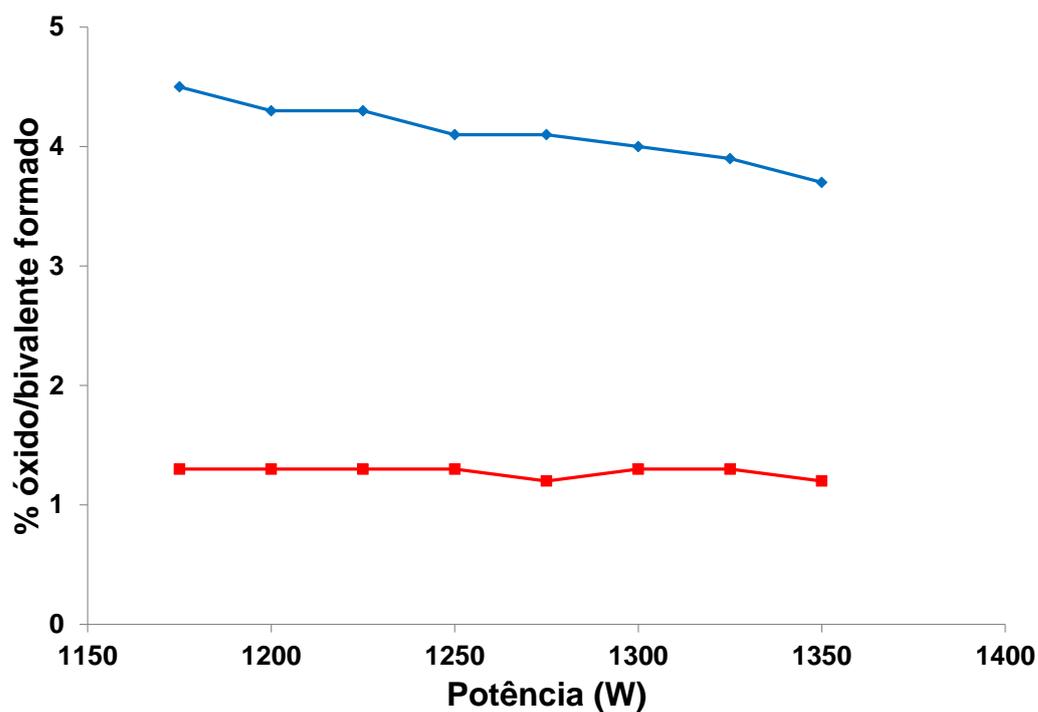


Anexo 13: Otimização univariada da potência (W) em metanol: a) Resposta em função da intensidade (—  $^{115}\text{In}$ ); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxido (—  $\text{LaO}^+$ ) ou bivalente (—  $\text{Ba}^{2+}$ ) formados no plasma.

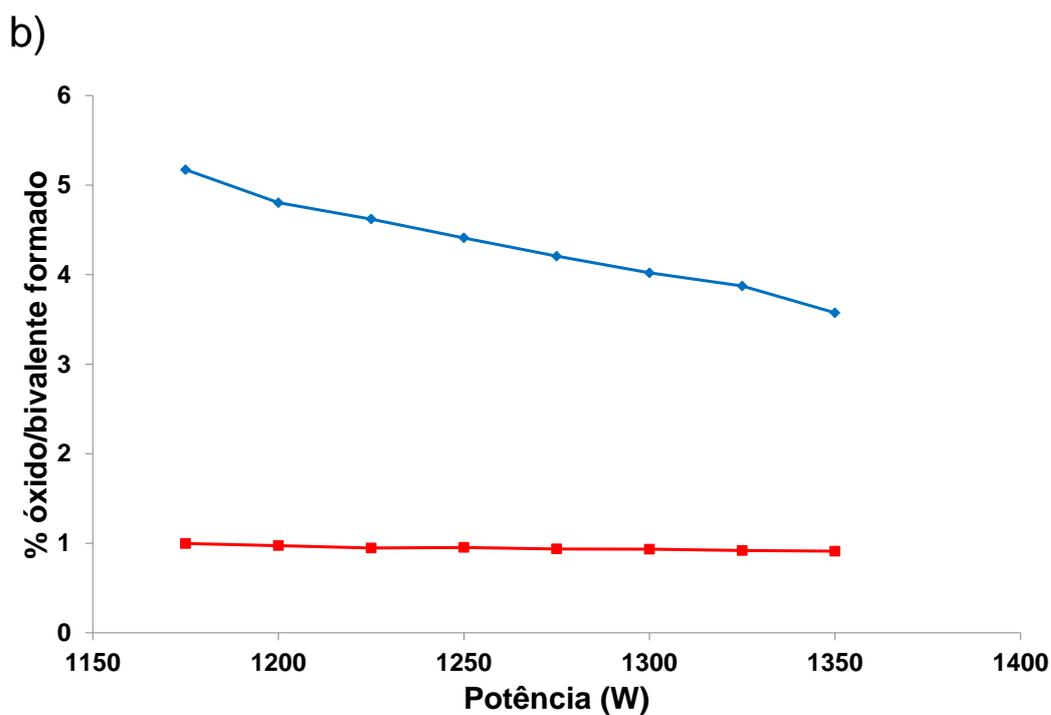
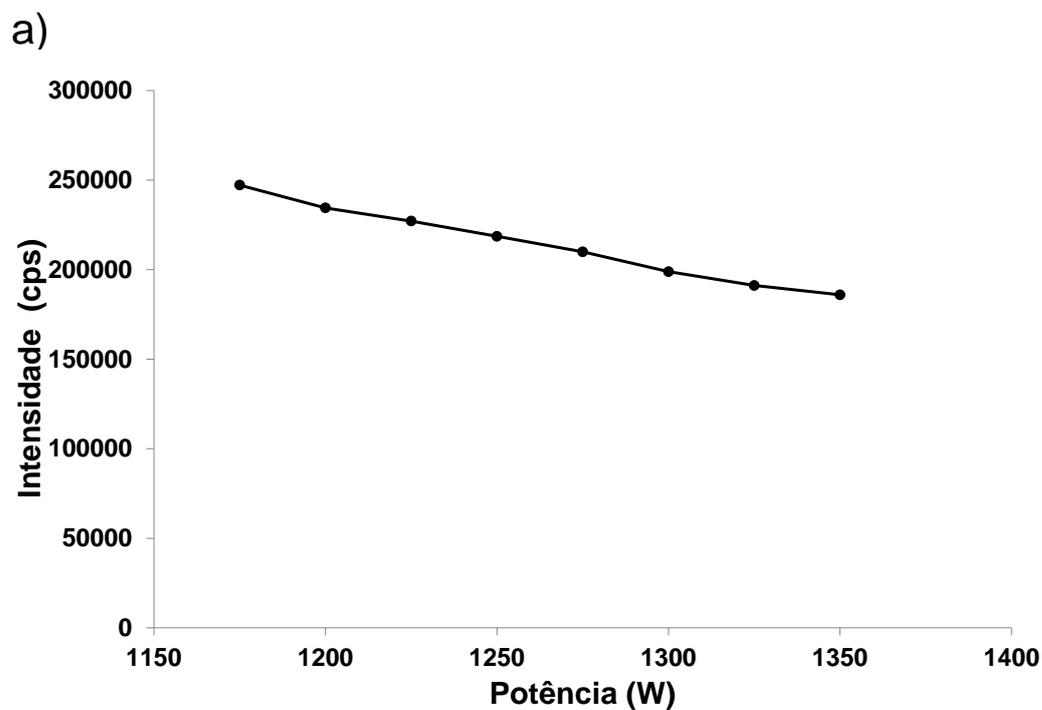
a)



b)



Anexo 14: Otimização univariada da potência (W) em metanol:tolueno (80:20;v:v): a) Resposta em função da intensidade (—  $^{115}\text{In}$ ); b) Resposta em função da porcentagem (%) de óxidos (—  $\text{LaO}^+$ ) e íons bivalentes (—  $\text{Ba}^{2+}$ ) formados no plasma.





Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/sab](http://www.elsevier.com/locate/sab)



## Method for the quantification of vanadyl porphyrins in fractions of crude oils by High Performance Liquid Chromatography–Flow Injection–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry☆



Flávia G. Wandekoken<sup>a</sup>, Christiane B. Duyck<sup>ab</sup>, Teresa C.O. Fonseca<sup>c</sup>, Tatiana D. Saint-Pierre<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Rua Marquês de São Vicente 225, CEP: 22451-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Federal Fluminense (UFF), Quarta São João Batista s/n, Centro, CEP: 24020-150 Niterói, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Pesquisa Leopoldo A. de Miguez de Mello da Petróleo (CENPES), Av. Alcides Miranda, 950, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ 21941-915, Brazil

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 16 November 2015  
Received in revised form 2 March 2016  
Accepted 4 March 2016  
Available online 5 March 2016

**Keywords:**  
Vanadium  
Porphyrin  
Crude oil  
HPLC  
ICP-MS

### ABSTRACT

High performance liquid chromatography hyphenated by flow injection to inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC–FI–ICP–MS) was used to investigate V linked to porphyrins present in fractions of crude oil. First, the crude oil sample was submitted to fractionation by preparative liquid chromatography with UV detection, at the porphyrin Soret band wavelength (400 nm). The obtained porphyrin fractions were then separated in a 250 mm single column, in the HPLC, and eluted with different mobile phases (methanol or methanol:toluene (80:20; v/v)). The quantification of V-porphyrins in the fractions eluted from HPLC was carried out by online measuring the <sup>51</sup>V isotope in the ICP-MS, against vanadyl octaethylporphyrin standard solutions (VO-DEP), prepared in the same solvent as the mobile phase, and injected post-column directly into the plasma. A 20 µg L<sup>-1</sup> Ge in methanol was used as internal standard for minimizing non-spectral interference, such as short-term variations due to injection. The mathematical treatment of the signal based on Fast Fourier Transform smoothing algorithm was employed to improve the precision. The concentrations of V as V-porphyrin were between 2.7 and 11 mg kg<sup>-1</sup> in the fractions, which were close to the total concentration of V in the porphyrin fractions of the studied crude oil.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The investigation of petroleum composition in studies related to prospection and refinery of heavy and biodegraded crude oils, has gained interest because of the recent advances on heavy fuel hydroprocessing [1,2]. It is well known that heavy oils concentrate sulfur and metals, with high contents of Ni and V linked to porphyrins [3,4]. The porphyrins commonly found in crude oils are homologous series of two well documented primary structures, the deoxophylloerythrotoporphyrin (DPEP) and the etioporphyrins (Etio), with possible naphthenic or aromatic substitutions [5]. The substitution groups of the porphyrin nucleus and the concentration and distribution of the series are related to the origin, maturity and biodegradation of the crude oils, making them potential biomarkers in biodegraded fields where isoprene and terpene derivatives give limited information [6–9]. In addition, the knowledge of vanadium porphyrin concentrations in crude oils is important for the oil industry, regarding the processes known as downstream (refining-related) [10]. These compounds are detrimental to most refinery operations, causing catalyst poisoning and corrosion in cracking units and furnaces [11].

Studies in the 1980's on vanadium porphyrins in oil and shales used High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for their separation and mass spectrometry for their identification [12–14]. The employed methodologies used extensive liquid chromatographic separations for purification that required high amounts of sample (10 g of oil and up to 10 kg of shale). The use of UV–Vis detection during HPLC analysis gave a quantitative estimate of the DPEP and Etio global content in a crude oil, however vanadium porphyrin content could not be informed, due to the low specificity of the technique for the determination of V compounds in the presence of other porphyrin compounds. As a result, it was observed that the DPEP series was more abundant than the Etio series, the latter being formed during maturity processes [15,16].

Vanadium porphyrins present in petroleum can be quantified by their metal content. To this end, the authors have hyphenated HPLC or Gas Chromatography to Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry (ICP-MS) [17–24], but the hyphenation of HPLC with ICP-MS appeared as a more adequate technique, due to the high boiling point and heavy masses of the investigated compounds. The hyphenation is quite straightforward and HPLC flow rates are compatible with ICP-MS, however the introduction of organic solvents into ICP techniques present particular difficulties. Even with a proper operational setup of the spectrometer for organic compound introduction, the determination of elements in solvents is prone to interferences due mainly to polyatomic

☆ Selected Paper from the Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX (CSI 2015), Figueira da Foz, Portugal, 30 August–3 September 2015.

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 35271128.

E-mail address: [tsaintpierre@puc-rio.br](mailto:tsaintpierre@puc-rio.br) (T.D. Saint-Pierre).

ions of Ar with O, C and H; in particular,  $^{51}\text{V}^+$  is interfered by  $^{39}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ . In order to reduce these interferences, the presence of oxygen in the plasma is necessary for carbon removal as CO and CO<sub>2</sub>. The first study using HPLC coupled to ICP-MS was reported in the 1990s and used a reversed phase C<sub>18</sub> column as the stationary phase, resulting in the separation of nickel and vanadium porphyrins in shale extracts [18]. The study employed methanol, an oxygenated solvent, in the mobile phase and used 3.5% oxygen in the argon nebulizer flow. The concentrations of Ni porphyrins were reported, however no data about precision and accuracy of the HPLC-ICPMS methodology was included with the reported results and the quantification of vanadium compounds was not attempted.

Size Exclusion Chromatography (SEC) has been recently employed for the determination of V and Ni porphyrins in low and high molecular weight and boiling point fractions of petroleum [19–21]. A specific coupling system was developed by Caunette et al. [19] which allowed splitting of the mobile phase before its introduction into the ICP-MS, for the use of solvents with high vapor pressure, such as tetrahydrofuran (THF) that resulted in a low oxygen percent (about 5.6%) in the argon nebulizer flow. The use of this solvent was necessary for the complete elution of the V and Ni compounds that concentrate in the high molecular weight fractions of crude oils (asphaltenes). Quantitative results were reported as percentage of the total metal collected. Normal phase HPLC was used with the SEC as bi-dimensional separations and the vanadium compounds detected were suggested to be non-porphyrinic, however no additional information regarding UV-Vis or mass spectrometry, supporting this suggestion, was presented. Recently Desprez et al. overcame spectral interferences using high resolution ICP-MS and reported a study on the size distribution of V, Ni and S compounds in petroleum and petroleum products during thermal processes [22].

The quantification of vanadium porphyrins in crude oils using reversed phase HPLC hyphenated to ICP-MS was recently proposed by Dayck et al. [23,24]. The authors used the Saturated Aromatic Resin and Asphaltene (SARA) separation step in Preparative Liquid Chromatography for the pre-concentration of porphyrins [23]. Vanadium porphyrins were eluted with methanol while Ni porphyrins elution needed a mixture of chloroform-methanol that could not be used for vanadium, due to the  $^{51}\text{V}^{16}\text{O}^+$  interference on  $^{51}\text{V}^+$ . A flow injection system was used between the HPLC and the ICP-MS for inorganic standard compound introduction and quantification by HPLC-FI-ICP-MS with 6.5% precision in calibration [24]. Recovery was evaluated for one porphyrin fraction injected but the elemental mass balance between the oil and the fraction was not investigated.

The present study made changes in the HPLC-FI-ICP-MS quantification previously cited, by introducing an online internal standard and a mathematical treatment of both signal and noise by Fast Fourier Transform (FFT) smoothing, in order to improve the transient signal/noise ratio for  $^{51}\text{V}$ , which is the principal limitation for vanadium porphyrins quantification in crude oil fractions. The mobile phase composition was also investigated for resolution and recovery of compounds, supported by elemental mass balance between vanadium porphyrins concentrations and total vanadium concentration in oil and oil fractions as determined by an independent methodology recently developed by the group [25].

## 2. Experimental

### 2.1. Samples, standards and reagents

A Brazilian internal reference crude oil (D1) and the Venezuelan certified crude oil, NIST 8505 (Gaithersburg, MD, USA) were used in this study.

The solvents methanol, toluene, chloroform, n-heptane and dichloromethane were of HPLC grade (JT Baker, USA) and xylene (Vetec, Brazil) was PA grade. Deionized water was used for preparing the buffer and other aqueous solutions. The buffer solution (pH = 4.1), employed

in the mobile phase to test the separations of the V-porphyrins, was prepared with acetic acid (1 mol L<sup>-1</sup>) and sodium acetate (1 mol L<sup>-1</sup>) solutions, in water.

Monoelemental organometallic Ba, La and In (Conostan, Conoco, Ponca City, OK, USA) standards solutions, at 20 µg kg<sup>-1</sup> in xylene, were used for the optimization of the ICP-MS equipment. An organic multielemental standard (SPC 21, Conostan, Canada) diluted in xylene from 5 to 50 ng mL<sup>-1</sup> of V, approximately, was used for the determination of total V in crude oil samples and their fractions, by direct introduction in ICP-MS, according to the method developed by Souza et al. [24].

The use of a V-porphyrin standard, vanadyl octaethyl porphine (VO-OEP) (Sigma Aldrich, MI, USA), was necessary because of the low stability of inorganic V in mixtures of methanol and toluene. About 3 mg of it was diluted in 100 mL methanol and the exact concentration of V as VO-OEP in this solution was determined by ICP-MS through external calibration with inorganic multielemental standard solutions in methanol (PerkinElmer, 29 elements in 5% HNO<sub>3</sub>). This solution was further diluted in the same solvent composition as the HPLC mobile phase, at approximate concentrations of 50–100–200–400 µg L<sup>-1</sup> and used for V-porphyrins determination in the fractions by HPLC-FI-ICP-MS.

Inorganic monoelemental Ge, Se, V, Nb, Rh and Ta, at 20 µg L<sup>-1</sup> in methanol (PerkinElmer), and the organic monoelemental In at 50 µg L<sup>-1</sup> in xylene (Conostan), were tested as internal standards.

Argon 99.996% (Linde Gas, Brazil) was used in the ICP-MS. Oxygen 99.5% purity (White Martins, Brazil) was used to avoid carbon deposits and interference in the introduction of organic solvents into the plasma.

### 2.2. Sample preparation – oil fractionation

The oil samples were fractionated by preparative chromatography, involving two steps: first, about 0.6 g of crude oil was fractionated on a gravimetric column (50 cm × 2.5 cm) filled with silicagel® (63–200 µm, Merck, Germany). A sequence of n-heptane, toluene and dichloromethane and their mixtures was used to obtain the PAP (Paraffins, Aromatics and Polar compounds) and resin fractions, as described by Dayck [23,24]. In the second step, a medium pressure LC system was used, in which a peristaltic pump forced the mobile phase into the column (250 mm × 25 mm, Omnitri Supelco, Cambridge, USA). The PAP or the resin were manually injected and a sequence of methanol, methanol:toluene (50:50; v/v) and toluene was used. When the eluent at the exit of the column absorbed at 400 nm, which is the porphyrin's Soret band, it was separately collected. Two concentrated porphyrins fractions were obtained from PAP and three from the resin, as presented in Fig. 1. The obtained fractions (Fr 1 to Fr 5) were filtered (0.45 µm, Teflon, Millipore, USA), evaporated and stored in a refrigerator at 2 °C until analysis by HPLC-FI-ICP-MS for the determination of V-porphyrins.

### 2.3. Instrumentation

In all the analysis (HPLC-FI-ICP-MS and ICP-MS direct analysis), V concentrations were determined using a Nexlon 300X ICP-MS spectrometer equipped with collision/reaction cell (PerkinElmer, Toronto, Canada). The device for organic analysis was constructed using an introduction system composed of nebulizer (chosen according to the kind of analysis, as described below) and an Isomist™ cyclonic spray chamber (Glass Expansion, Pocasset, MA, USA), which temperature was fixed according to the solvent. The injector i.d. was 0.8 mm and oxygen was added at the injector entrance. Oxygen flow was regulated by means of a mass flow controller (MKS Instruments Inc., USA).

For the direct analysis of xylene solutions by ICP-MS, the nebulizer was a microconcentric PFA-100 (Elemental Scientific, USA) adequate for organic solvents, because it allows lower solvent load into the

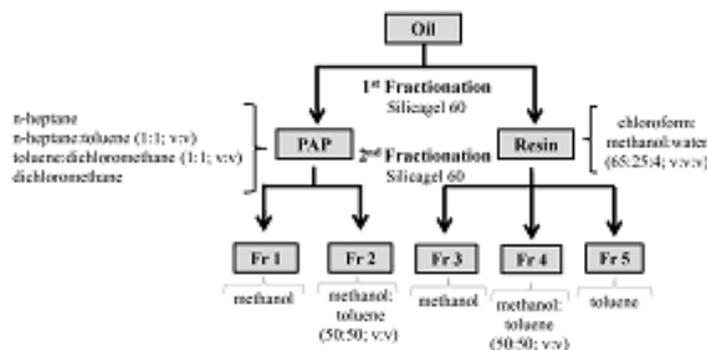


Fig. 1. Scheme of sample fractionation.

plasma, and the isomist™ spray chamber temperature was fixed at 5 °C. The spectrometer was optimized with a solution of Ba, La and In in xylene, by firstly fixing the oxygen flow rate at the minimum value (0.1 L min<sup>-1</sup>) and varying the Ar nebulizer flow rate, in order to obtain the lowest intensities of LaO<sup>+</sup>/La<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup>/Ba<sup>+</sup> (<3X) and the highest intensity of In (>5.10<sup>4</sup> cps).

A Conical nebulizer (Glass Expansion, USA) was employed for the direct introduction of methanol solutions into the ICP-MS and for the HPLC-ICP-MS analysis, since the HPLC output flow rates are higher than those allowed for the PFA-100, and the isomist™ spray chamber temperature was fixed at -5 °C. The internal standard was introduced online, employing a T-junction (Fig. 2). The optimization was done in the same way, with Ba, La and In standards diluted in methanol.

The instrument used for HPLC separations was a LC-20 model (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Photo Diode Array (PDA) detector. The injection volume was 20 µL and the mobile phase flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Optimization studies were carried out with two Lichrospher columns (150 × 4.6 mm, Supelco, and 125 × 4 mm, Merck) and one Hypersil Gold column (250 × 4.6 mm, Termo Scientific, USA), all composed by C<sub>18</sub> stationary phase (reversed phase) with 5 µm of particle diameter. V-porphyrins were detected by means of their UV-Vis spectra at the Soret band (400 nm) and at the α (550 nm) and β (570 nm) peaks.

The HPLC outlet tube was connected to a 6-port injection valve (7125 N, Rheodyne, USA), equipped with a 20 µL sample loop, which was used as flow injection device (FI) into the ICP-MS for

the introduction of the VO-OEP calibration solutions during the quantification of V-porphyrins in the fractions, or for the introduction of the fractions in the recovery tests, as described in a previous study [24].

The limit of detection was estimated by the Minimum Detectable Concentration (MDC), determined as 3 times the amplitude of the baseline. The solution with this concentration was injected for verification of the accurate value.

The general scheme of the HPLC-ICP-MS is represented in Fig. 2 and ICP-MS instrumental parameters are reported in Table 1. All areas obtained were processed by Origin®.

### 3. Results

#### 3.1. Optimization of V-porphyrin separation

For the separation of metallo-porphyrin compounds, other authors have used reversed or normal phase columns, connected in series or not [18–20]. In this study, the performances of two columns (150 mm and 125 mm), connected in series, or a single column (250 mm) were compared, for the separation and quantification of V-porphyrins in fraction 1 separated from the internal reference crude oil O1, by elution with methanol (see Section 2.2). As shown in Fig. 3, the resolution between the peaks was not adequate for either of the two settings; however, the single 250 mm column had the advantage of decreasing the total analysis time in about 20 min and the pressure of the system in

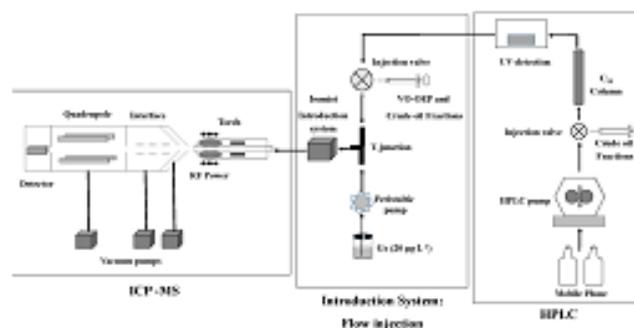


Fig. 2. Scheme of the hybridization of HPLC with ICP-MS using flow injection for on-line quantification.

Table 1  
Instrumental parameters.

	ICP-MS	HPLC-Fl-ICP-MS
RF power (W)	1250	1250
Argon plasma gas (L min <sup>-1</sup> )	17	17
Argon auxiliary gas (L min <sup>-1</sup> )	1.2	1.2
Argon nebulizer (L min <sup>-1</sup> )	0.4	0.6
Oxygen gas (L min <sup>-1</sup> )	0.1	0.1
Dwell time (ms)	50	120
Internal standard	–	<sup>75</sup> Ge

70 bar. This resulted in less compounds retained in the column, as observed by the higher peak intensities and total peak area (+40%).

The effect of mobile phase composition on the separation of V-porphyrins in fractions obtained from crude oil O1 was evaluated with the 2 columns in series and with the single column, by considering the recovery of the compounds and peak resolution. Each fraction was either injected into the ICP-MS, using the flow injection

device (Fig. 2) or into the HPLC-Fl-ICP-MS. The recovery was calculated as  $100 \times A_1/A_0$ , being  $A_0$  the area of the V peak obtained with direct injection of the fraction by flow injection and  $A_1$ , the total area of V peaks eluted from the HPLC-Fl-ICP-MS.

The recovery of V-porphyrins calculated for fraction 1 was 85% when methanol was used as the HPLC mobile phase, which was satisfactory; however, peak separation was not good, as mentioned. It is expected that, changing the polarity of the mobile phase, better separation can be obtained. In the case of fraction 1, which is eluted with methanol, an increase in the mobile phase polarity was obtained by adding an acetate buffer (pH = 4) to methanol. This effect is presented in Fig. 4. The resulting chromatograms presented similar profiles, but better resolution between peaks was obtained for the earlier eluted compounds with a 90:10 (v:v) methanol:acetate buffer mobile phase (Fig. 4b). However, the retention of late eluted compounds resulted in loss of detection capability between peak and baseline, longer analysis time and lower recovery of V-porphyrins (35%). Therefore, since the objective of the study was to quantify V

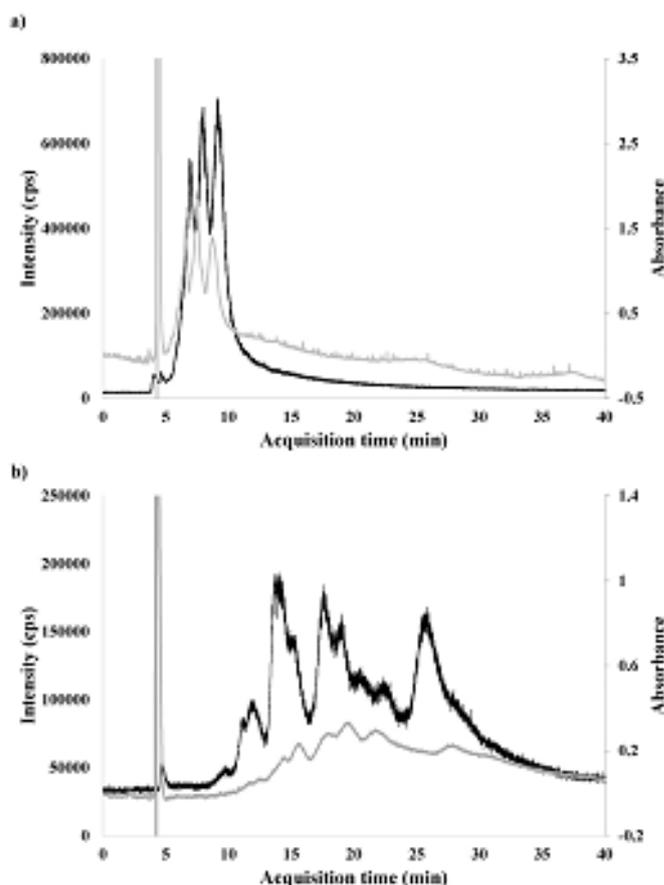


Fig. 3. Detection of V-porphyrins by ICP-MS (—<sup>51</sup>V) or by UV-Vis (— 570 nm), during elution of fraction 1 from crude oil O1 (4.1 mg injected) with methanol, using: a) a single column; or b) two columns in series.

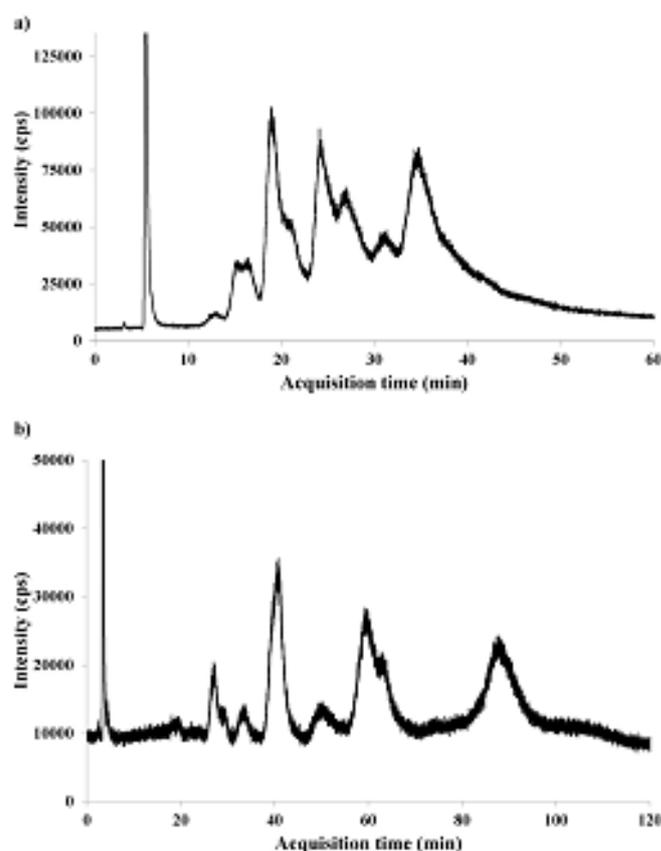


Fig. 4. Effect of mobile phase polarity on the elution of fraction 1 (4.5 mg injected) obtained from PAP (crude oil O1): a) methanol:acetate buffer (90:10, v/v); b) methanol:acetate buffer (90:10, v/v).

as V-porphyrins, the use of acetate buffer was not further investigated, which we intend to do in future qualitative studies involving compound identification.

In the case of fraction 2, separated from the PAP fraction of the crude oil O1 (see Section 2.2), when methanol was used as the HPLC mobile phase, less than 50% of V-porphyrins was recovered. This indicates the presence of compounds with medium polarity retained in the column. Therefore, a decrease in the mobile phase polarity was tested by adding up to 20% of toluene in methanol; this is the maximum percentage of toluene that can be employed, since larger quantities destabilizes the plasma and can create carbon deposits within the equipment. A methanol:toluene (80:20) mobile phase resulted in better recovery (74%), but the peaks were not well-separated and information might be lost in the case of compound identification (Fig. 5). Since the objective is to obtain better recoveries, in order to quantify V-porphyrins, the methanol:toluene (80:20) solution was employed as mobile phase in the subsequent experiments. Using the same procedure, the fractions obtained from resin gave acceptable recoveries, except fraction 5 (34%), possibly due to the complexity and residual characteristics of this fraction.

### 3.2. Internal standardization and transient signal processing

The transient signal obtained for the determination of an element by hyphenation of chromatography to ICP-MS is prone to several issues. A systematic signal drift is observed, mostly due to the time response of the detector's amplifier [26]. As well, the presence of the co-eluting matrix can cause a difference in the response factor of the instrument [27]. The elution of compounds in HPLC requires long time intervals, up to several minutes, allowing a sufficient number of readings for a statistical distinction of the signal (peak) upon the noise (baseline) [28]. In this study, the time interval, calculated as the peak width, was about 70 s for the VO-OEP standard elution in methanol with the single column. A 120 ms dwell time resulted in an average of 60 readings at  $m/z = 51$  during peak acquisition for the standard solutions, which generated a baseline with lower amplitudes, without compromising the statistics of signal acquisition.

The use of an internal standard was considered, in order to minimize the above-mentioned issues. All internal standards gave similar profiles and  $^{76}\text{Ge}$  was chosen, because of the mass proximity to  $^{51}\text{V}$  (compared to other internal standards studied) and the low concentration of this

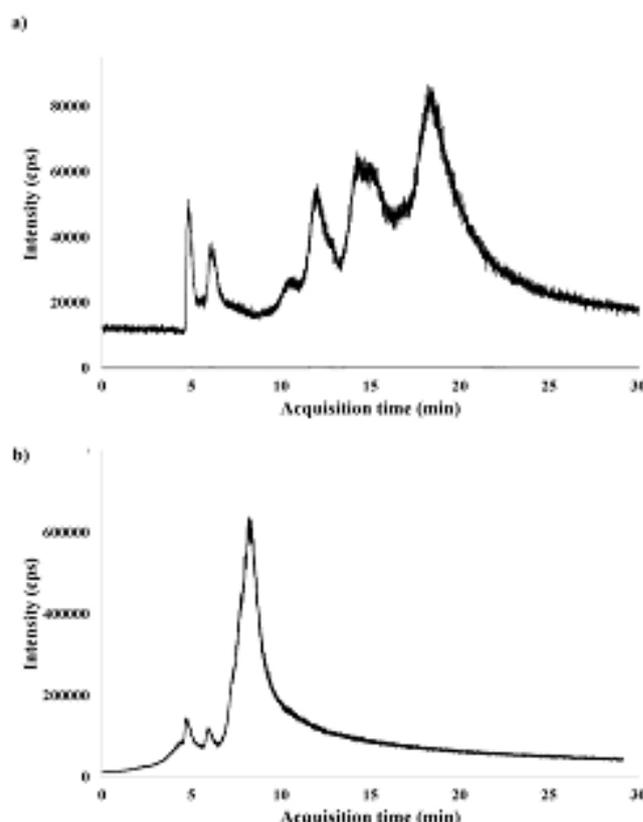


Fig. 5. Effect of mobile phase polarity on the elution of fraction 2 (3.7 mg injected) obtained from FNP (crude oil O1): a) methanol b) methanol:toluene (80:20; v/v).

element in the crude oils and their fractions. Although the internal standard minimized short-term variations due to injection, it was not enough for correcting noise variation in the baseline (Fig. 6a), clearly indicating that an additional treatment of the obtained results was necessary.

When working with transient signal, such as in HPLC measurements, a proper distinction between the baseline and the peak can be done by the software. However, in this study, two pumping systems (HPLC and FI) caused noise with varying frequency and high amplitudes in the baseline of the  $^{51}\text{V}$  transient signal. Therefore, a Fast Fourier Transform smoothing algorithm (FFT) was used for the mathematical treatment of the signals. The transient signal for each isotope ( $^{51}\text{V}$  and  $^{76}\text{Ge}$ ) was the average of 5 injections of a  $94 \mu\text{g L}^{-1}$  VO-OEP standard solution in methanol into the HPLC-FI-ICP-MS. The peak area ( $0.60 \pm 0.06$ ) was calculated for the relative signal ( $^{51}\text{V}/^{76}\text{Ge}$ ) after applying the FFT smoothing on the transient signal of each isotope, and showed acceptable repeatability of 10% (Fig. 6b). The FFT smoothing of the relative signal was applied to all V-porphyrins quantifications.

### 3.3. Quantification results

The accuracy of the direct analysis by ICP-MS after dilution in xylene was confirmed by the determination of V ( $380 \pm 20 \mu\text{g g}^{-1}$ ) in the

certified sample NIST 8505 ( $V = 390 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$ ). This methodology was employed to determine V concentrations in the internal reference crude oil O1 and in Fr1 to Fr5 fractions, obtained after separation of this oil by preparative chromatography (2.2) and the results are listed in Table 2. The determination of elements in the fractions is difficult, due to the low masses and complexity of the matrix. In this aspect, the mass balance (MB) can be used as an additional validation test [23] and was calculated by the following equation:

$$\text{MB (\%)} = \left[ \frac{m_{\text{Fr1}}C_{\text{Fr1}} + m_{\text{Fr2}}C_{\text{Fr2}} + m_{\text{Fr3}}C_{\text{Fr3}} + m_{\text{Fr4}}C_{\text{Fr4}} + m_{\text{Fr5}}C_{\text{Fr5}}}{m_{\text{O}}C_{\text{O}}} \right] \times 100$$

where  $m$  is the mass (g) and  $C$  is the V concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in oil (O) and in the fractions (Fr1 to Fr5).

The calculated MB was 70%, which is reasonable, considering that the applied separation procedures are prone to material loss on the preparative columns. Then, it can be assumed that V present in crude oil O1 was quantitatively recovered after the oil fractionation.

The fraction Fr1 was enriched with  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  of the VO-OEP standard diluted in methanol and submitted to separation by HPLC-FI-ICP-MS. As shown in Fig. 7, this standard is representative of the V-porphyrins in the sample, since it co-eluted with one of the compounds at approximately 13 min. V-porphyrins were quantified using

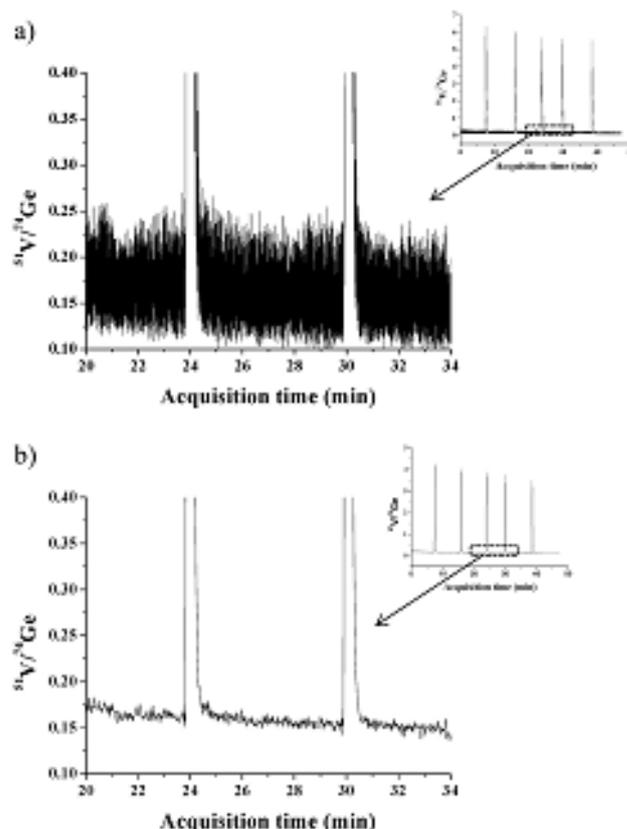


Fig. 4. Zoom view of the baseline of 2 peaks obtained for 5 injections of a VO-OEP standard solution in methanol injected into the HPLC-ICP-MS, with  $^{74}\text{Ge}$  as internal standard: a) without or b) with IFT smoothing.

the VO-OEP solutions (see Section 2.1) injected into the FI valve and the external calibration curve was constructed using the average area resulting of five injections of each standard, considering their respective standard deviations (Fig. 8). The Minimum Detectable Concentration (MDC, see Section 2.3) for  $^{51}\text{V}$  was  $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Each fraction was analyzed by HPLC-FI-ICP-MS and the results obtained are listed in Table 2. In all analyzed fractions, the concentrations of V in porphyrins forms were between 2.7 and  $11 \text{ mg kg}^{-1}$ . The V (%)

corresponds to V-porphyrins determined by HPLC-FI-ICP-MS in the fraction, relative to the V concentration measured in the fraction by direct ICP-MS analysis. In the case of Fr4, a lower V (%) value was obtained and for Fr5, V-porphyrins could not be quantified. This limitation was

Table 2

V concentration (average  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ) in crude oil O1 and in its fractions, by ICP-MS and V linked to porphyrins in crude oil O1 fractions, by HPLC-FI-ICP-MS. The V (%) is the percentage of V in the fraction relative to V concentration measured in the oil.

Samples	Mass (g)	ICP-MS V ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	HPLC-FI-ICP-MS V-porph. ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	V (%)
Crude oil O1	0.5	$9.0 \pm 0.5$	-	-
PAP Fr 1	0.2	$4.8 \pm 0.4$	4.0	83
PAP Fr 2	0.08	$3.7 \pm 0.5$	3.4	92
Resin Fr 3	0.06	$3.4 \pm 0.3$	3.7	109
Resin Fr 4	0.03	$18 \pm 1$	11	61
Resin Fr 5	0.03	$30 \pm 5$	n.d.	n.d.

n.d.: not determined.

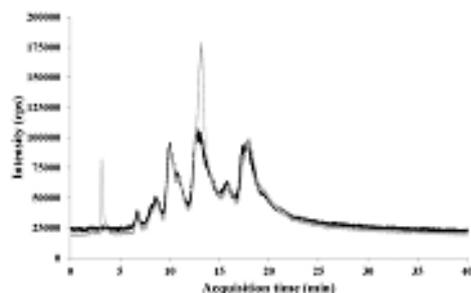


Fig. 7. Chromatograms of (—) fraction 1 (from crude oil O1) and of (---) fraction 1 enriched with VO-OEP standard.

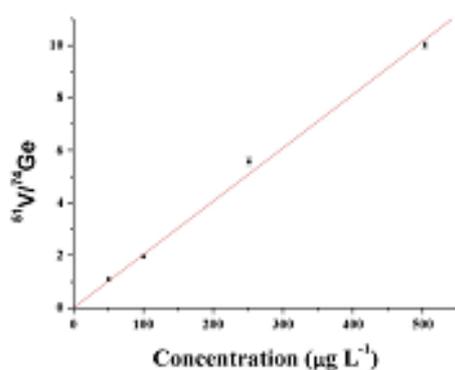


Fig. 8. Calibration curve constructed with VO-OEP standard in the same mobile phase as the samples, employed for the determination of V-porphyrins in the fractions, by HPLC-FI-ICP-MS (linear correlation coefficient,  $R^2$  as 0.992). The error bars are the standard deviation of 3 measurements of each standard solution.

attributed to the strong retention of compounds in the column that required a mobile phase with higher percentage of toluene for elution, which was not possible, due to the carbon load into the plasma, as already mentioned in 3.1.

The overall results (Table 2) indicate that V present in the fractions Fr1 to Fr4 is linked to porphyrin structures. It can be observed that the concentrations of V-porphyrins separated from the PAF with polar (Fr1) and neutral (Fr2) characteristics are similar. However, for the heavier resin fractions (Fr3 to Fr5), polar V-porphyrins (Fr3) are less present (about 6% of total V). We attribute this fact to the higher masses and complexity of the compounds in the resin fractions, as observed in the studies using Size Exclusion Chromatography coupled to ICP-MS [19–22], which difficult their elution from the HPLC column, even with a 20% toluene in the mobile phase.

#### 4. Conclusion

HPLC-FI-ICP-MS was successfully used to quantify V linked to porphyrin forms in crude oil fractions. The optimization of the V-porphyrins separation showed that the best conditions were obtained with a 250 mm × 4.6 mm reversed phase Hypersil C<sub>18</sub> column, using methanol as the mobile phase for the more polar fraction (Fr1) and methanol:toluene (80:20; v:v) for the other fractions. A solution of 20 mg L<sup>-1</sup> Ge in methanol introduced on line was employed as internal standard to minimize the short-term variations due to injection. The fast Fourier transform smoothing algorithm (FFT) was applied to the transient signal of each isotope, then the relative intensities (<sup>61</sup>V/<sup>74</sup>Ge) were calculated, in order to decrease the baseline noise, resulting in much lower standard deviation for the integrated area (about 10%). The calibration curve was constructed using VO-OEP standard solutions, prepared in the same solvent as the mobile phase. The VO-OEP standard proved to be representative of the samples and its exact concentration was determined directly by ICP-MS against an inorganic standard diluted in methanol. The crude oil fractions were analyzed by HPLC-FI-ICP-MS and the concentrations of V as V-porphyrins were between 2.7 and 11 mg kg<sup>-1</sup>. The mass balance for V was considered adequate, taking into account the complexity of the samples. V was found quantitatively linked to porphyrin structures in the studied fractions of crude oil and its distribution was similar between polar and non-polar compounds in the Paraffins, Aromatics and Polars (PAF) fractions but compounds with neutral characteristics were predominant in the resin fractions. Further studies will include the identification of the V-porphyrins.

#### Acknowledgments

The authors thank Petrobras (TCBB-DE-282/2012), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 306501/2014-7) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, E\_17/2012 - Jovem Cientista do Nosso Estado) for financial support and to the staff of LABSPECTRO at PUC-Rio, in special to Álvaro J. Pereira, Isabel F. Moreira and Rafael C. C. Rocha, for technical support.

#### References

- [1] S.K. Maity, V.J. Pilco, J. Ancheyta, M.S. Rana, Catalyst deactivation during hydrotreating of Maya crude in a batch reactor, *Energy Fuel* 21 (2007) 636–639.
- [2] M.S. Rana, J. Ancheyta, S.K. Sahoo, P. Ray, Carbon and metal deposition during the hydrotreating of Maya crude oil, *Catal. Today* 220–222 (2014) 87–90.
- [3] M.F. Ali, S. Abbas, A review of methods for the demetallization of residual fuel oils, *Fuel Process. Technol.* 87 (2006) 573–584.
- [4] G.P. Delchambre, M.R. Gray, Chemistry and association of vanadium compounds in heavy oil and bitumens, and implications for their selective removal, *Energy Fuel* 24 (2010) 2795–2808.
- [5] G. Caumette, C.P. Livemmann, L. Merdrignac, B. Bouyssiers, R. Lobinski, Element speciation analysis of petroleum and related materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 263–276.
- [6] C. Dupuy, N. Mielieley, T.C.D. Fonseca, P. Sazman, E.V.D.S. Neta, Trace element distribution in biodegraded crude oils and fractions from the Potiguar Basin, Brazil, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 939–946.
- [7] A. Alinku, A. Sigdel, T. Buthelizi, O.A. Fadpe, Trace element geochemistry of crude oil and condensates from South African basins, *Mar. Pet. Geol.* 59 (2015) 286–293.
- [8] M. Escobar, G. Márquez, V. Anaya, A. Da Silva, R. Tocco, Use of biomarkers, porphyrins, and trace elements to assess the origin, maturity, biodegradation, and migration of Alburquerque oils in Venezuela, *Fuel* 97 (2012) 186–196.
- [9] R. Fernando-Varela, J.M. Andrade, S. Munizaga, D. Prado, Selecting a reduced suite of diagnostic ratios calculated between petroleum biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons to characterize a set of crude oils, *J. Chromatogr. A* 121 (2010) 8279–8289.
- [10] S. Le Bouegues, R. Quémener, Biotechnological processes for the refining of petroleum, *Fuel Process. Technol.* 81 (2003) 155–160.
- [11] T. Liu, J. Lu, X. Zhao, Y. Zhou, Q. Wu, C. Xu, Y. Zhang, S. Ding, T. Zhang, X. Tao, L. Ju, Q. Shi, Distribution of vanadium compounds in petroleum vacuum residuum and their transformations in hydrodemetallization, *Energy Fuel* 29 (2015) 2089–2096.
- [12] R. Orcampo, H.J. Calvo, P. Albrecht, Identification of polar porphyrins in oil shale, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1985) 198–200.
- [13] P. Sundaraman, High-performance liquid chromatography of vanadyl porphyrins, *Anal. Chem.* 57 (1985) 2204–2206.
- [14] E.J. Callegos, P. Sundaraman, Mass spectrometry of geoporphyries, *Mass Spectrom. Rev.* 4 (1985) 55–85.
- [15] A. Doukhal, A. Sakhli, A. Zineb, et al., Separation and identification of porphyrins extracted from the oil shales of Tartar: geochemical study, *Fuel* 81 (2002) 467–472.
- [16] P. Sundaraman, L.D. Boudrie, C. Pedersen, Vanadyl porphyrins in exploration: maturity indicators for source rocks and oils, *Appl. Geochem.* 8 (1993) 245–254.
- [17] J. Ellis, C. Rochetier, M. Moir, S. Willner, Determination of volatile nickel and vanadium species in crude oil and crude oil fractions by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1674–1678.
- [18] L. Ebdon, S.H. Evans, W.G. Prvorovic, S.J. Rowland, Analysis of geoporphyries by high-temperature gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry and high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 939–943.
- [19] G. Caumette, C.P. Livemmann, L. Merdrignac, H. Faucot, B. Bouyssiers, R. Lobinski, Sensitivity improvement in ICP-MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow nebulizer and heated spray chamber sample introduction, *Talanta* 80 (2009) 1030–1043.
- [20] G. Caumette, C.P. Livemmann, L. Merdrignac, B. Bouyssiers, R. Lobinski, Fractionation and speciation of nickel and vanadium in crude oils by size exclusion chromatography-ICP-MS and normal phase HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1123–1129.
- [21] J. Rabier, J. Marques, G. Caumette, L. Merdrignac, B. Bouyssiers, R. Lobinski, C.P. Livemmann, Monitoring the behaviour and fate of nickel and vanadium complexes during vacuum residue hydrotreatment and fraction separation, *Fuel Process. Technol.* 119 (2014) 185–189.
- [22] A. Desprez, B. Bouyssiers, C. Arnaudguilhem, C. Ririe, L. Vernez-Loutet, P. Guert, Study of the size distribution of sulfur, vanadium, and nickel compounds in four crude oils and their distillation cuts by gel permeation chromatography inductively coupled plasma high-resolution mass spectrometry, *Energy Fuel* 28 (2014) 3730–3737.
- [23] C. Dupuy, N. Mielieley, C.J.P. da Silveira, P. Sazman, Trace element determination in crude oil and its fractions by inductively coupled plasma mass spectrometry using ultrasonic nebulization of toluene solutions, *Spectrochim. Acta B* 57 (2002) 1979–1990.
- [24] C.B. Dupuy, T.D. Saint-Vierre, N. Mielieley, T.C.D. da Fonseca, P. Sazman, High-performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass

- spectrometry for V and Ni quantification as tetraglyoxals, *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.* 66 (2011) 362–367.
- [25] J.R. de Souza, C.B. Dreyck, T.C.D. Fonseca, T.D. SainPiero, Multielemental determination in oil matrices diluted in xylene by ICP-MS with a dynamic reaction cell employing methane as reaction gas for solving specific interferences, *J. Anal. At. Spectrom.* 37 (2012) 1286–1286.
- [26] A. Gougeons, S. Miral, P. Louvat, H. Inard, J. Mourou, A. Nonell, G. Marbès, J.L. Blouk, J. Caillardet, C. Nicheyran, F. Charrier, O.F.X. Donard, Method for isotope ratio drift correction by internal amplifier signal synchronization in MC-ICPMS transient signals, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1607–1617.
- [27] M. Andler, E.J. Marshall, D.A. Dulod, Online standard additions calibration of transient signals for inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 688–694.
- [28] M. Tasser, D. Günther, Short transient signals, a challenge for inductively coupled plasma mass spectrometry, a review, *Anal. Chim. Acta* 623 (2008) 19–28.