



UFRPE

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

INVESTIGAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE BIOMARCADORES DE
PETRÓLEO SUBMETIDOS A DERRAMES SIMULADOS EM AMBIENTES
AQUÁTICOS

MILTON NETO NASCIMENTO DE OLIVEIRA

RECIFE – 2021

MILTON NETO NASCIMENTO DE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE BIOMARCADORES DE
PETRÓLEO SUBMETIDOS A DERRAMES SIMULADOS EM AMBIENTES
AQUÁTICOS

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do Curso de Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo como orientador o Professor Dr. Jandyson Machado Santos.

RECIFE - 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48i Oliveira, Milton Neto Nascimento de
INVESTIGAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE BIOMARCADORES DE PETRÓLEO SUBMETIDOS A
DERRAMES SIMULADOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS / Milton Neto Nascimento de Oliveira. - 2021.
50 f. : il.
- Orientador: Jandyson Machado Santos.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Licenciatura em Química,
Recife, 2022.
1. Petróleo. 2. Biomarcadores. 3. Derrames. 4. CG/EM. 5. espectroscopia no infravermelho. I. Santos, Jandyson
Machado, orient. II. Título

CDD 540

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

MILTON NETO NASCIMENTO DE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE BIOMARCADORES DE
PETRÓLEO SUBMETIDOS A DERRAMES SIMULADOS EM AMBIENTES
AQUÁTICOS

Apresentada em: 15 de Dezembro de 2021.

Banca Examinadora

Jandyson Machado Santos – Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Marcilio Martins de Moraes

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Nattany Tayany Gomes de Paula

Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

A cadeia do petróleo também caracteriza uma fonte de riscos ao meio ambiente. Diante disso, estudos que visam compreender as suas alterações químicas em situações de derrames estão ganhando uma maior atenção devido aos recorrentes desastres ambientais, como o ocorrido na costa litorânea do Brasil, no final do ano de 2019. A finalidade desse estudo foi a construção e aplicação de um sistema para simulação em laboratório de derrames de petróleo em ambientes aquáticos, para avaliar possíveis alterações na composição química de petróleos utilizando a técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) e espectroscopia no infravermelho (IV). Para as simulações, foi utilizado um sistema tipo *homemade* constituído com lâmpadas branca, azul e ultravioleta, referente a comprimentos de onda similares aos emitidos pela radiação solar, ao qual uma amostra de petróleo foi misturada com água do mar 1:80 (*m/v*), e durante o processo de simulação de derrame, alíquotas do óleo foram retiradas em diferentes tempos. As alíquotas foram analisadas por CG/EM, buscando uma análise comparativa do óleo bruto inicial (controle) e o mesmo óleo após as exposições ao derrame, onde foram avaliadas as possíveis mudanças químicas de biomarcadores de petróleo e suas razões diagnósticas. Os cromatogramas apontaram uma redução nas áreas dos picos dos *n*-alcanos com menor massa molecular nas primeiras horas de exposição ao derrame simulado, entretanto, não foi observada alterações significativas nas razões diagnósticas para os biomarcadores das classes dos esteranos e terpanos, mostrando serem classes que não se modificam quimicamente em um processo de derrame. Os dados por IV foram realizados na faixa espectral de 600-4000 cm^{-1} , utilizando reflectância total atenuada (ATR). Os dados do IV mostraram bandas relacionadas a composição química majoritária do petróleo, referentes aos hidrocarbonetos alifáticos. Também foi possível identificar bandas relacionadas ao aparecimento de novos estiramentos ligados as mudanças químicas associadas ao processo de foto-oxidação ocorrido na simulação de derrames, referente a compostos oxigenados, na região de 1233 cm^{-1} . Assim, o estudo conseguiu identificar algumas alterações na composição química do petróleo após derrames simulados em ambientes aquáticos, como também, mostrar que as consolidadas razões diagnósticas envolvendo os terpanos e esteranos não sofrem alterações, podendo em ambos os casos serem usadas em estudos de rastreamento de derrames de petróleos em ambientes e/ou como dados para remediação de ambientes impactados por derrames envolvendo a indústria do petróleo.

Palavras chaves: Petróleo, Biomarcadores, Derrames, CG/EM, espectroscopia no infravermelho.

ABSTRACT

The oil industry characterizes a source of risks to the environment. Studies that aim to understand the chemical modification in oil spill situations are gaining greater attention due to recurrent environmental disasters, such as the one that occurred on the coast of Brazil in 2019. The purpose of this study was to apply a laboratory simulation of oil spills in aquatic environments, to evaluate the chemical changes in composition of oils using the technique of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and infrared spectroscopy (IR). For the simulations, a homemade system was used that were a chamber with white, blue and ultraviolet lamps, referring to wavelengths like those emitted by solar radiation, where inside was allocated a mixture of oil and seawater 1:80 (*m/v*), and the oil spill simulation was performed to obtain aliquots of oil at different times of exposure. The oil aliquots were analyzed by GC/MS, in order to obtain a comparative analysis of the initial crude oil (control) and the same oil after the spill exposures, which was possible to evaluate the chemical changes of oil biomarkers and their diagnostic reasons. The chromatograms showed a decrease in the peak areas of the n-alkanes with lower molecular weight in the first hours of exposure to the simulated spill, however, no significant changes were observed in the diagnostic ratios for biomarkers of the sterane and terpane classes, showing that they are classes that do not change chemically. The IR was performed in the spectral range of 600-4000 cm^{-1} , using attenuated total reflectance (ATR). The IR data showed peaks related to the majority chemical composition of crude oils, referring to aliphatic hydrocarbon compounds. It was also possible to identify peaks related to the appearance of new stretching linked to chemical changes associated with the photo-oxidation process that occurred in the spill simulation, referring to peaks for oxygenated compounds, in the region of 1233 cm^{-1} . Thus, the study was able to identify some changes in the chemical composition of crude oils after simulated spills in aquatic environments, as well as to show that the consolidated diagnostic ratios involving terpanes and steranes do not change, and in both cases can be used in studies to track oil spills in environments and/or as data for remediation of environments impacted by spills involving the oil industry.

Keywords: Petroleum, Biomarkers, Spills, Chemical composition, GC/MS, Infrared spectroscopy.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças e não ter me deixado fraquejar em diversos momentos, pela sua graça, pois sem Ele eu não teria chegado até aqui.

À minha mãe, Luciene Rita, que sempre foi meu alicerce, minha base e fortaleza. Sem seu apoio nada disso seria possível. Me deu amor e colo quando precisei, incentivo e força. A ela eu dedico toda minha vitória. Agradeço, *in memoriam*, a meu pai, Antônio Mendes, por sempre incentivar minha educação e ter me educado e mostrado que estudar era o melhor caminho.

A minha tia Leide Cabral, que foi minha incentivadora e inspiração, que desde criança me mostrava a beleza que existe dentro da ciência. E são por momentos como esses que me fizeram querer ter chegado até aqui.

A meu namorado, Tarcisio, por sempre me incentivar, não me deixar desistir, por todo companheirismo, amor e carinho.

A meus amigos, Gabriel, Danylla, Rayane, Mar, Eduarda T., Artur, Jade, Robson e Hisla, que estiveram comigo em diversos momentos de minha graduação e compartilharam alegrias e dificuldades que juntos passamos por essa fase. Graças a eles o âmbito universitário se tornou mais leve.

A meus amigos, Mario, Fabricio, Bruno S., aos Vinicius, Ton e Guilherme, que fora do ambiente escolar, me ofereceram apoio e descontração. Me ouviram, ajudaram, incentivaram a sempre continuar, foram verdadeiros amigos.

Ao meu grupo de pesquisa, PEM, no qual pude crescer e aprender muito, pude compartilhar dificuldades e também vitórias. Foram essenciais para a realização de minha pesquisa. Em especial a Bruna e Flavia, que pude compartilhar alegrias e frustrações, que além de grandes pesquisadoras, foram e são também grandes amigas.

Por fim, quero agradecer ao meu orientador, Professor Jandyson, que foi meu guia durante toda minha pesquisa. Com muita paciência, me auxiliou, corrigiu, ensinou, se fez presente e que mesmo com tantos desafios, nunca deixou de confiar em mim. A você, professor, meu muito obrigado.

A todos, gratidão!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição química típica do petróleo	14
Figura 2. Áreas afetadas no ano de 2019 pelo derrame de material petrolífero no nordeste do Brasil	16
Figura 3. Estrutura do <i>n</i> -alcano C ₁₅ H ₃₀	18
Figura 4. Estrutura dos principais isoprenoídes: Pristano e Fitano	18
Figura 5. Estrutura de um terpano tricíclico	19
Figura 6. Estrutura de um esterano regular	19
Figura 7. Esquema de um CG-EM/EM com analisador Triplo Quadrupolo	21
Figura 8. Representação esquemática de um instrumento no infravermelho com transformada de Fourier	23
Figura 9. A esquerda o sistema piloto para simulação de derrames de petróleo em ambientes aquáticos com controle de radiação solar, temperatura, agitação e circulação de ar. A= lâmpadas brancas; B= lâmpadas de ultravioleta; C= lâmpadas azuis e D = coolers de ar. A direita o sistema construído em execução	26
Figura 10. Adaptação do fluxograma de fracionamento SARA	27
Figura 11. Cromatograma de íons totais do óleo bruto obtido por CG/EM	30
Figura 12. Comparação do TIC do óleo bruto (preto) com sua alíquota após 72 horas de exposição (rosa) no ambiente aquático. Ampliação do TIC na região correspondente ao <i>n</i> -C ₁₂ até <i>n</i> -C ₁₆	31
Figura 13. Variação da soma total das áreas dos <i>n</i> -alcanos lineares entre <i>n</i> -C ₁₂ a <i>n</i> -C ₃₅ para a amostra de óleo bruto inicial (0h) e após a simulação de derrame temporal	32
Figura 14. Valores obtidos do cálculo do CPI a partir das áreas do TIC para o óleo bruto e suas alíquotas em diferentes tempos de exposição	33
Figura 15. Cromatogramas de MRM para análise de um óleo bruto (em cima) e ampliação para um específico cromatograma referente a transição de <i>m/z</i> 372>217 referente a biomarcadores da classe dos esteranos	37
Figura 16. Comportamento da razão Gamacerano/Hopano para o ambiente aquático.....	39
Figura 17. Razões entre homohopanos para exposição ao ambiente aquático	41

Figura 18. Razões entre Colestanos (C27, Cho), Ergostanos (C28, Erg) e Estigmastanos (C29, Stg) para análise de deposição de matéria orgânica na exposição em ambiente aquático	42
Figura 19. Comportamento do somatório das áreas do naftaleno	44
Figura 20. Comportamento do somatório das áreas do fenantreno	44
Figura 21. Comportamento do somatório das áreas do metil-fenantreno	45
Figura 22. Espectro no Infravermelho para a simulação de derrame em ambiente aquático com ampliação no pico em 1090 cm^{-1}	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Materiais, reagentes e solventes	25
Tabela 2. Parâmetros cromatográficos aplicados na análise de óleos brutos e suas alíquotas da simulação de derrame em ambiente aquático por CG/EM	28
Tabela 3. Principais transições por MRM (íons precursores e íons produtos) utilizadas para a investigação e identificação de esteranos e terpanos	29
Tabela 4. Valores da soma total das áreas dos <i>n</i> -alcanos lineares entre <i>n</i> -C ₁₂ a <i>n</i> -C ₃₅ para a amostra de óleo bruto inicial (0h) e após a simulação de derrame temporal	32
Tabela 5. Valores das áreas dos picos cromatográficos das razões de isoprenóides (Pristano/Fitano, Pr/ <i>n</i> -C ₁₇ e Ft/ <i>n</i> -C ₁₈)	34
Tabela 6. Identificação dos biomarcadores da classe dos terpanos e suas abreviações.....	35
Tabela 7. Identificação dos biomarcadores da classe dos esteranos e suas abreviações.....	36
Tabela 8. Razoes diagnosticas de biomarcadores de petróleo obtidas na simulação de derrames no ambiente aquático.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas
CG-EM/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas em sequencial
CGL	Cromatografia Gás-líquido
CGS	Cromatografia Gás-sólido
IE	Ionização por Elétrons
FT	<i>Fourier Transform</i>
MRM	Monitoramento Seletivo de Íons
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
IV	Espectroscopia por Infravermelho
CPI	<i>Carbon Preferencial Index</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PIONA	Parafinas, Iso-Parafinas, Olefinas, Naftênicos e Aromáticos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. Petróleo.....	14
2.2. Derrames de petróleo e modificações químicas	15
2.3. Composição química do petróleo e seus biomarcadores	17
2.4. Técnicas Analíticas para o Estudo do Petróleo.....	19
2.4.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)	19
2.4.2 Espectroscopia no Infravermelho	21
3. OBJETIVOS	24
3.1. Geral	24
3.2. Específicos.....	24
4. MATERIAS E MÉTODOS	25
4.1. Amostras, materiais e reagentes.....	25
4.2. Experimentos de simulação de derrame	25
4.3. Preparo da amostra e análises por CG/EM	26
4.4. Análises por IV	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. <i>n</i> -alcanos lineares.....	30
5.2. Índice preferencial de carbono (CPI) e Isoprenóides	33
5.3. Esteranos e terpanos	35
5.4. Hidrocarbonetos aromáticos	43
5.5. Espectroscopia em Infravermelho	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é constituído por uma mistura química complexa que possui textura oleosa, inflamável, com cor variando entre negro e castanho escuro e odor característico (CRAPEZ *et al.*, 2002). Em 1859, no Noroeste da Pensilvânia/EUA, houve a perfuração de um poço de petróleo, na época também conhecido como o Ouro Negro, que foi o marco inicial de crescimento exponencial da indústria de petróleo. (ZONIN, 2008)

Atualmente, o petróleo se caracteriza com umas das principais fontes econômicas para diversos países, incluindo o Brasil, que está entre os maiores produtores e consumidores de petróleo do mundo. Em contrapartida, o manuseio de forma incorreta é precursor de diversos impactos negativos ao meio ambiente, em toda cadeia do petróleo desde a exploração, o refino, o transporte e armazenamento, podem ocorrer derramamentos acidentais, ocasionando a contaminação de diferentes ambientes. Assim, os derramamentos de petróleo e seus derivados constituem a principal e mais danosa causa de contaminação nos solos e águas, afetando também o meio social e econômico (AQUINO, 2011).

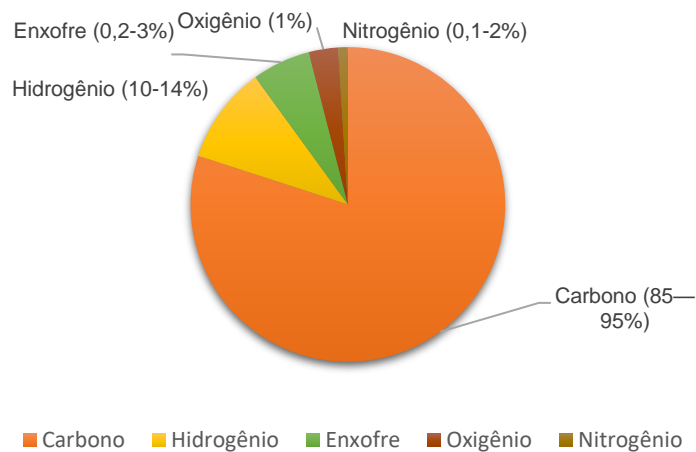
Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2019), diversos acidentes de vazamento de óleo acontecem no meio ambiente em território nacional, como por exemplo o derrame na costa nordestina no final do ano de 2019. E por casos como esses, são necessários trabalhos que visam a compreensão e estudos envolvendo o conhecimento sobre a composição química de petróleos em ambientes de derrames. Assim, o presente trabalho busca investigar se há e quais as modificações químicas ocorridas em petróleos (óleo bruto) submetidos a derrames, em um estudo temporal, utilizando a identificação de diversas classes de biomarcadores do petróleo. Ordenando como pontos iniciais à presente pesquisa, partiu-se do seguinte questionamento: **Quais modificações químicas ocorrem em um óleo bruto submetido a um derrame simulado em ambiente aquático?**

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Petróleo

O petróleo é um material natural fóssil constituído de uma mistura química complexa composta majoritariamente de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e naftênicos, além de outros compostos em menores frações, como o enxofre, oxigênio e nitrogênio como observado na Figura 1 (LOZANO, 2020). De forma geral, a parte líquida do petróleo é comumente denominado de óleo bruto (DA CRUZ E MARSAIOLI, 2012).

Figura 1. Composição química típica do petróleo.



Fonte: O autor, 2021.

A origem do petróleo está relacionada à deposição por milhares de anos da matéria orgânica depositada nas bacias sedimentares. Com o progressivo soterramento, a matéria orgânica passa por uma série de transformações físico-químicas que podem ser agrupadas de acordo com os seguintes estágios evolutivos: diagênese, catagênese e metagênese (TISSOT & WELTE, 1984). A diagênese é o processo inicial de alteração da matéria orgânica sob baixas condições de soterramento e baixa temperatura, nessa fase os hidrocarbonetos apresentam características estruturais relacionadas com a sua origem biogênica. A catagênese é o estágio da formação do óleo, se dá pela degradação térmica do querogênio e dos compostos orgânicos associados. A metagênese é a última fase de evolução da matéria orgânica, nesta ocorrem mudanças mais severas no material orgânico devido as altas temperaturas que resultam na formação de hidrocarbonetos gasosos, principalmente o metano (SILVA, 2007).

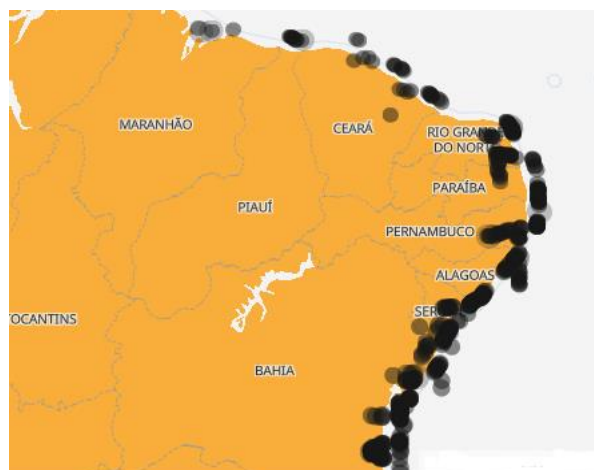
2.2. Derrames de petróleo e modificações químicas

É indiscutível o fato de que o petróleo é uma das maiores fontes do desenvolvimento econômico no mundo. Mas, além de promover desenvolvimento, a indústria do petróleo se caracteriza como uma fonte de riscos e impactos negativos ao meio ambiente (QUEIROZ, 2001). A preocupação com o meio ambiente fez com que o impacto pela exploração de petróleo fosse bastante discutido nas últimas décadas, pelo fato de ser um produto altamente poluidor. Mesmo com tantas tecnologias, este produto causa grandes transtornos, quando foge do controle do ser humano. Assim, vazamentos de óleos vêm sendo um grave problema vinculado aos impactos provenientes desses derramamentos, que podem impactar sistemas aquáticos e/ou terrestres, por exemplo, e acontecem devido a falhas humanas ou de equipamentos (ALONSO, 2002).

O vazamento de petróleo ou de seus derivados geralmente está atrelado a um impacto ambiental e isso se torna uma questão alarmante para o contexto social, econômico e principalmente ambiental. Os derrames de óleo ocorridos em ambientes marítimos e terrestres são causadores da formação de manchas de óleo que se espalham pela superfície das águas, carregadas por correntes marítimas, chegando à orla e impactando rapidamente o ecossistema daquela região. Esses derramamentos sempre causam grandes impactos aos seres que fazem parte do ecossistema, causando morte direta da fauna e flora marinha, como também, o bloqueio da passagem da luz, impossibilitando o processo de fotossíntese.

Como exemplo, temos o imensurável derrame de material petrolífero ocorrido em 30 de agosto de 2019, que atingiu ao longo das semanas seguintes toda a costa litorânea do Nordeste brasileiro, como observado na Figura 2, sendo considerado o maior desastre ambiental provocado por vazamento de petróleo na história do país, o qual afetou diretamente o setor ambiental e econômico local, além de deixar a população, fauna e flora das regiões atingidas expostas ao contato com o óleo e seus possíveis danos nocivos (IBAMA, 2019).

Figura 2. Áreas afetadas no ano de 2019 pelo derrame de material petrolífero no Nordeste do Brasil.



Fonte: IBAMA, 2019

É estimado que quantidades significativas de petróleo atingem ambientes aquáticos a cada ano a partir de diversas fontes. O impacto ambiental da contaminação por petróleo em tais ambientes é potencialmente grave e, portanto, se faz necessária uma maior atenção no destino do óleo no meio ambiente e os mecanismos naturais pelos quais o petróleo é degradado (GARRETT, 1998).

Dentre os processos envolvidos nas mudanças químicas da composição do petróleo em ambientes de derrames está a foto-oxidação. Segundo Fathalla (2011), a foto-oxidação é um processo potencialmente significativo associado à degradação e mudança composicional do óleo bruto derramado no meio ambiente. A radiação solar que corresponde à radiação na faixa do Ultravioleta (≈ 190 a 400 nm), seguida da faixa de luz visível (≈ 400 nm a 700 nm) é uma das principais responsáveis por modificar as propriedades físicas e químicas dos hidrocarbonetos que compõem o óleo bruto (THOMINETTE *et al.*, 1984).

Bobinger e Andersson (2009) mostram em seu estudo que a foto-oxidação de componentes do petróleo é um importante processo para a sua modificação química em ambientes de derrames, visto que é encontrado em grande quantidade compostos policíclicos aromáticos, os quais são conhecidos por serem tóxicos para muitas formas de vida e que estão associados a diversos processos fotoquímicos. Ainda, D'Auria *et al.* (2009) complementa que após o óleo bruto sofrer irradiação direta pelo sol, os compostos da classe dos alcanos lineares, em sua maioria, não são afetados e em contrapartida a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos são convertidos em resinas ou moléculas polares.

2.3. Composição química do petróleo e os seus biomarcadores

Uma das formas de análise do petróleo é por classe de hidrocarbonetos, denominada de classificação PIONA, devido à divisão em cinco grupos: Parafinas, Iso-Parafinas, Olefinas, Naftênicos e Aromáticos (SANTOS, 2013), seguindo as definições abaixo:

- Parafinas: também conhecidos como alcanos e apresentam como fórmula geral a C_nH_{2n+2} , são hidrocarbonetos saturados com cadeias lineares (SANTOS, 2013).
- Iso-parafinas: são hidrocarbonetos parafínicos de cadeias ramificadas que iniciam sua estrutura com o isobutano (VILAS, 2012).
- Olefinas: são os hidrocarbonetos acíclicos e insaturados, contem ligações duplas e/ou triplas entre seus átomos de carbono. Uma das formas de produção de olefinas são em refinarias por meios de reações de craqueamento (VILAS, 2012).
- Naftênicos: são hidrocarbonetos cíclicos saturados que possuem em sua estrutura formula geral C_nH_{2n} (VILAS, 2012). Eles foram inicialmente identificados como ácidos carboxílicos em óleos brutos com um ou múltiplos anéis saturados, e é a expressão livremente utilizada para incluir todos os componentes ácidos que possam conter funcionalidade aromática (HSU *et al.*, 2000).
- Aromáticos: são hidrocarbonetos caracterizados pela presença de um ou mais núcleos aromáticos em sua estrutura, podendo estar ligados com outro núcleo aromático ou a cadeias parafínicas (SANTOS, 2013).

Dentre os vários constituintes químicos do petróleo, estão aqueles denominados de biomarcadores ou marcadores biológicos. Os biomarcadores são compostos orgânicos detectados na geosfera, que possuem estrutura molecular relacionada aos compostos presentes nos organismos que lhes deram origem. A distribuição dos biomarcadores tem sido também de grande utilidade para avaliar o grau de maturação geoquímica de uma amostra geológica, isto é, a intensidade que a mesma foi submetida aos efeitos de soterramento, e, conseqüentemente da temperatura. Desse modo, os biomarcadores estão divididos em classes, de acordo com a estrutura dos materiais de origem, como descrito a seguir:

• ***n*-alcanos:**

São hidrocarbonetos saturados acíclicos, como observado na Figura 3, usados como biomarcadores devido à sua abundância e facilidade de detecção por cromatografia gasosa (WIEDEMANN, 2006). Por estarem presentes em diversas fontes de matéria orgânica (plantas, bactérias e fitoplânctons) é possível caracterizar o petróleo quanto a origem da matéria orgânica através do cromatograma de íons totais (PRATA, 2016).

Figura 3. Estrutura do *n*-alcano C₁₅H₃₀

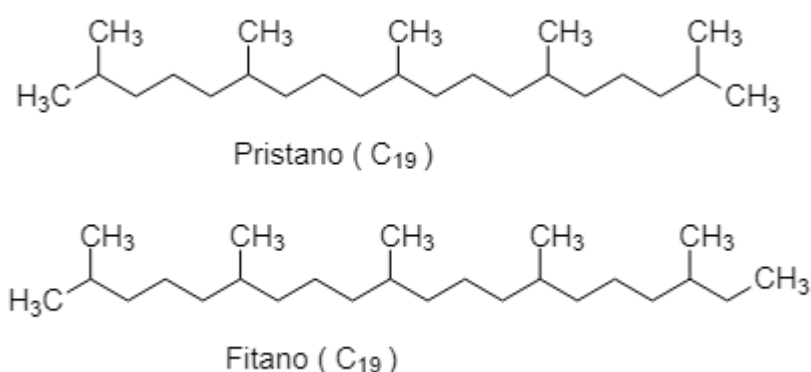


Fonte: o autor, 2021.

• **Isoprenóides:**

São os alcanos ramificados formados de várias combinações decorrentes da ligação de unidades de isopreno. O pristano e fitano, derivados do fitol, são os principais representantes desta classe e são indicativos do grau de biodegradação do óleo em estudos de geoquímica orgânica (WIEDEMANN, 2006) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura dos principais isoprenoides: Pristano e Fitano

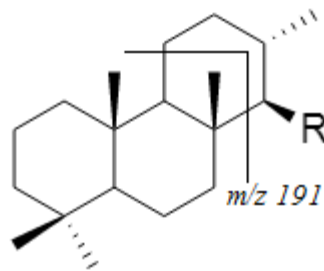


Fonte: o autor, 2021.

• **Terpanos:**

São derivados de organismos procariontes (ARAÚJO, 2007) e podem ser encontrados em óleos de diferentes origens, em que óleos de origem lacustre apresentam alta intensidade destes compostos quando comparado a óleos de origem marinha. Podem ser divididos em três grupos principais: tricíclicos (Figura 5), tetracíclicos e pentacíclicos (SANTOS, 2013).

Figura 5. Estrutura de um terpano tricíclico.

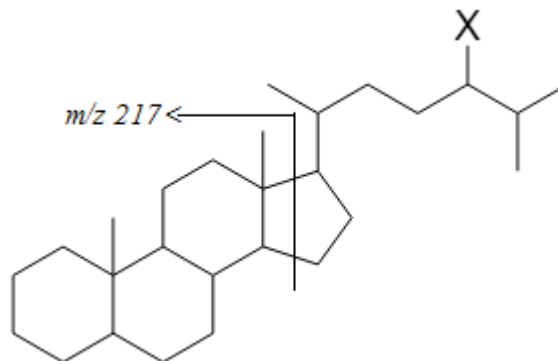


Fonte: o autor, 2021.

• **Esteranos:**

Compostos derivados de esteróis, comumente encontrados em organismos eucariontes (SANTOS, 2013). Os esteranos podem ser utilizados para investigação do ambiente de deposição de sedimentos ricos destes compostos, maturidade e biodegradação do óleo (PRATA, 2016) e seus principais biomarcadores são os referentes à relação m/z 217, 259 e 231 nas análises por espectrometria de massas (SANTOS, 2013) (Figura 6).

Figura 6. Estrutura de um esterano regular.



Fonte: o autor, 2021.

2.4. Técnicas Analíticas para o Estudo do Petróleo

2.4.1. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais utilizadas para análises qualitativas e quantitativas, nesta técnica os componentes vaporizados são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro de uma coluna (WILLET, 1987). Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada na extremidade da coluna cromatográfica, onde a eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage quimicamente com as moléculas do analito, sua única função é transportar o analito através da coluna (SKOOG, 2006).

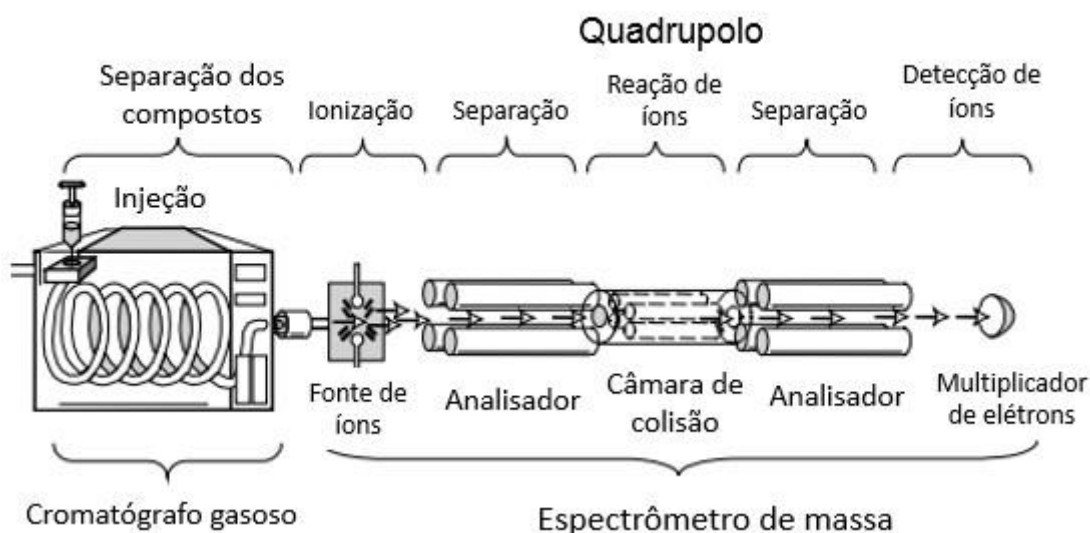
Dois tipos de cromatografia gasosa são encontrados: cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS). Na cromatografia gás-líquido, a fase móvel é um gás, enquanto a fase estacionária é um líquido retido na superfície de um sólido inerte por adsorção ou ligação química. Na cromatografia gás-sólido, a fase móvel é um gás, ao passo que a fase estacionária é um sólido que retém os analitos por adsorção física (WILLET, 1995).

A cromatografia gasosa pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção e análise, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas (CG/EM) combina as vantagens da cromatografia, tais como alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas, que são a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade (VÉKEY, 2001). A CG/EM é aplicável a análise de compostos voláteis e termicamente estáveis nas temperaturas empregadas durante o processo de separação cromatográfica, sendo essas características cruciais para o sucesso do emprego da técnica para o estudo de biomarcadores de petróleo (WILLET, 1995).

A Figura 7 mostra um esquema referente a um sistema de cromatografia gasosa com analisador de m/z do tipo triplo quadrupolo (CG-EM/EM), método de aquisição sequencial utilizado para a análise seletiva de biomarcadores do petróleo que foram estudados aqui. A amostra é inserida pelo sistema de injeção, que será encaminhada para as colunas capilares no cromatógrafo e quando o eluente da coluna atravessa o primeiro capilar, grande parte do gás carregador é bombeado para fora dos capilares, enquanto as moléculas de analito mantêm-se em fluxo linear e penetram no segundo capilar que as direciona para a fonte de íons do espectrômetro de massas (KITSON, 1996). O método de ionização empregado geralmente é a ionização por elétrons (IE) que é um método simples de converter o analito em íons. Na IE é

emitido um feixe de elétrons de alta energia, no qual se colidem com as moléculas em fase gasosa gerando íons radicais. Depois que a molécula é ionizada, o feixe de íons é acelerado por um campo magnético e então é direcionado para o analisador de massa, que se trata de um quadrupolo, que é composto de quatro barras solidas paralelas na direção do feixe de íons, nele os íons são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z) desejada. No caso do sistema descrito na Figura 7, trata-se de uma combinação de três quadrupolos sequencial, onde o primeiro quadrupolo (Q1) filtra os íons vindo da fonte de ionização de acordo com a m/z selecionada; o segundo quadrupolo (q2), opera na fragmentação dos íons selecionados; já o terceiro quadrupolo seleciona as m/z específicas proveniente da fragmentação. Assim esses íons atravessam o analisador chegando no detector gerando o cromatograma da amostra (PAVIA, 2015).

Figura 7. Esquema de um CG-EM/EM com analisador do tipo Triplo Quadrupolo.



Fonte: PETER, 2005

2.4.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A espectroscopia compreende o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é o da determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares (ARAUJO, 2007). Praticamente todos os compostos, orgânicos ou inorgânicos, que possuam ligações covalentes absorvem frequências da radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Essas regiões

envolvem comprimentos de onda entre àqueles associados à luz visível e a micro-ondas (VOGEL et al., 2002).

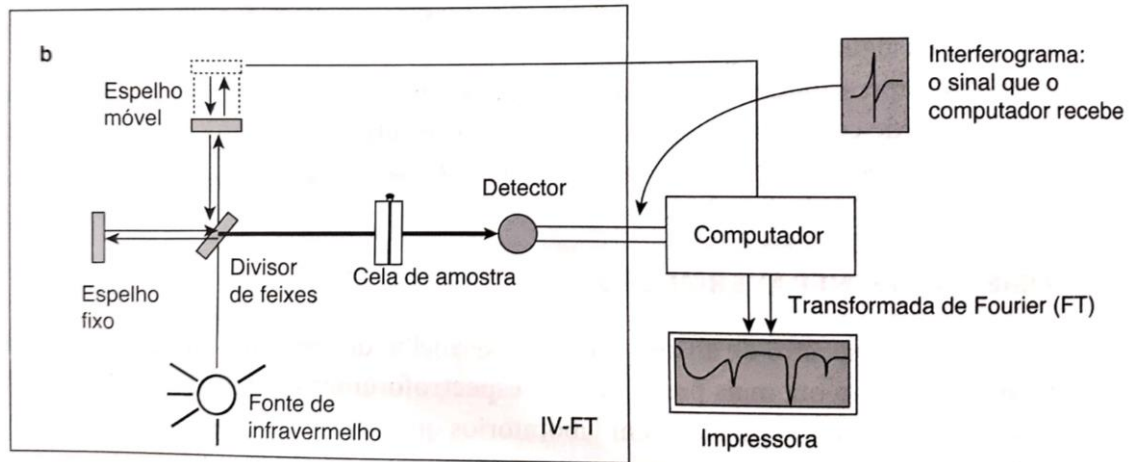
A região do infravermelho do espectro eletromagnético pode ser dividida em três partes principais: infravermelho próximo (NIR – *Near Infrared* - região das harmônicas) de 12500 – 4000 cm^{-1} ; infravermelho médio (MIR – *Middle Infrared* - região de vibração-rotação) de 4000 – 200 cm^{-1} e infravermelho distante (FIR – *Far Infrared* - região de rotação) de 200 – 10 cm^{-1} (MENDHAM et al., 2002).

Na utilização do IV na análise do petróleo é possível obter dados quantitativos referente aos compostos presentes nas amostras, assim observando as frequências e intensidades e relacionando a suas bandas específicas (POVEDA *et al.*, 2016).

Dois tipos de espectrômetros de infravermelho são os mais comuns em laboratórios, que são os: instrumentos dispersivos e com transformada de Fourier (FT), no qual o espectrômetro de infravermelho com FT produz um espectro muito mais rápido. O traçado do caminho óptico produz um padrão chamado interferograma, que é um sinal complexo, porém, a FT pode separar as frequências das absorções individuais contidas nesse interferograma, simplificando-o. Na Figura 8, pode ser observado um esquema geral de um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, que usa o interferômetro para manipular a energia enviada a amostra. No interferômetro, a energia da fonte atravessa um divisor de feixes, um espelho posicionado em um ângulo de 45° em relação a radiação que entra, separando-a em dois feixes. No qual um feixe vai para um espelho fixo e é refletido de volta, enquanto o outro segue na direção original, não sofrendo desvio, atingindo o espelho móvel que faz variar sua trajetória. Quando os dois feixes se encontram, eles se recombinaem, mas as diferenças entre os caminhos (diferentes extensões de onda) dos feixes causam interferências tanto construtivas quanto destrutivas. O feixe combinado que contém esses padrões origina o interferograma (PAVIA, 2010).

Após ocorrer a combinação dos feixes, é gerado um novo que irá atravessar a amostra, que por sua vez irá absorver os comprimentos de onda encontrados em seu espectro. As informações que chega ao detector são provenientes do sinal do interferograma, que contém as quantidades de frequência absorvida em cada comprimento. É feito a comparação dos dados do interferograma modificado com um padrão. Por fim, é utilizado o processo computacional matemático de transformada de Fourier para extrair as frequências individuais que foram absorvidas e desenhar o gráfico típico do espectro de infravermelho (PAVIA, 2010).

Figura 8. Representação esquemática de um instrumento de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.



Fonte: PAVIA, 2010

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as modificações químicas de diferentes classes de biomarcadores do petróleo frente a simulações em laboratório de derrames em ambientes aquáticos, utilizando estratégias de análise de dados com a técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM) e espectroscopia no infravermelho (IV).

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer condições de simulação de um sistema piloto de bancada para a realização de ensaios simulados de derrames de petróleo em ambientes aquáticos;
- Desenvolver novas estratégias no campo da espectrometria de massas por CG/EM para o estudo de fontes de óleos poluidoras de ambientes aquáticos contaminados com derrames de óleos em função de simulações realizadas em laboratório;
- Avaliar de forma temporal as mudanças químicas de biomarcadores do petróleo e suas razões diagnósticas em um processo simulado de derrame de óleo em ambientes aquáticos por análises de CG/EM e IV;
- Obter informações sobre os efetivos biomarcadores de petróleo e quais razões diagnósticas possuem efetividade ou não para o uso na busca de correlação para resolução de derrames de óleos brutos;
- Contribuir para a implementação junto ao Departamento de Química da UFRPE da linha de pesquisa em geoquímica orgânica do petróleo.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Amostras, materiais e reagentes

A amostra de óleo bruto utilizada neste trabalho é proveniente da Bacia Sedimentar Sergipe-Alagoas e foi cedida pela Unidade Operacional de Exploração e Produção de Sergipe e Alagoas da Petrobras (UO-SEAL). O óleo foi coletado direto da linha de produção em uma garrafa de vidro com capacidade para 20 L. Aguardaram-se alguns instantes até a separação natural da fase aquosa a qual foi retirada pela parte inferior da garrafa. O óleo sobrenadante foi então transferido para uma bombona plástica com capacidade para 5 L e em seguida as amostras foram encaminhadas ao laboratório. No laboratório uma alíquota de ~40 mL do óleo foi imediatamente centrifugada à 2500 rpm, a fim de retirar os resíduos de água advindos do procedimento de exploração e finalmente acondicionados em frasco de vidro hermeticamente vedados com septo de PTFE/Silicone (SANTOS, 2017). Diversos materiais e reagentes foram utilizados durante toda pesquisa, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Materiais, solventes e reagentes.

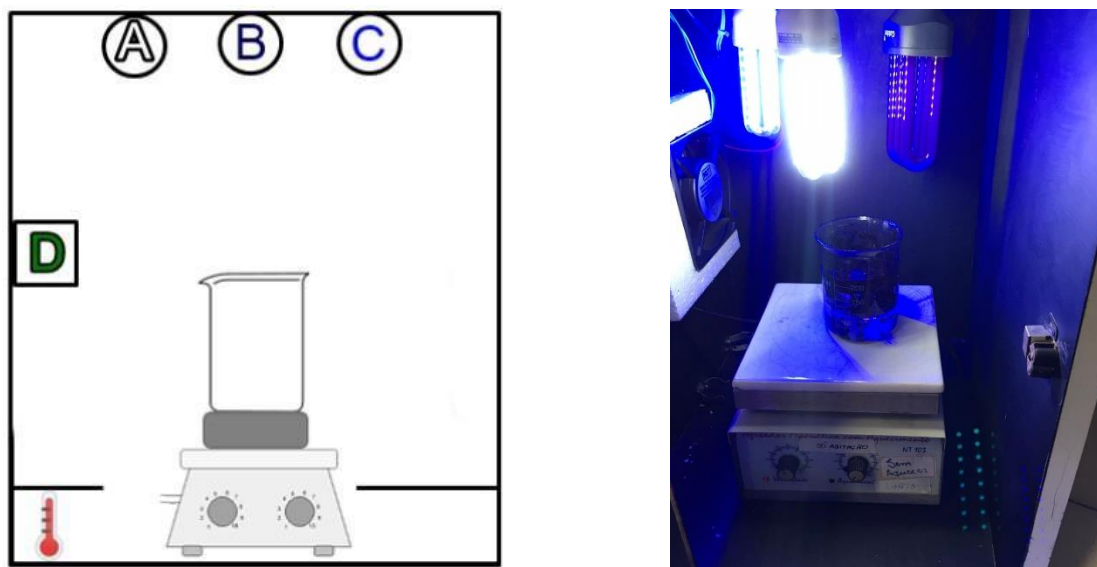
<i>Materiais e Reagentes</i>	
Água do mar	Hexano PA
Béquer	Heptano PA
Agitador	
Magnético	
Coluna	
cromatográfica	
de vidro	
Sílica G60	
Vials de vidro	

4.2. Experimentos de simulação de derrame

As simulações do derrame foram realizadas em laboratório, utilizando uma mistura 80:1 (*v/m*) de água do mar:óleo. Para a simulação em ambiente aquático foi utilizado um béquer e adicionado a água do mar e imediatamente colocado sobre exposição com o óleo bruto. A simulação foi realizada em uma câmara com incidência direta de luz por lâmpadas com luz branca, azul e no ultravioleta, simulando a intensidade e distribuição espectral da radiação solar, compreendendo uma região do espectro eletromagnético na faixa de 350-800 nm, em sistema

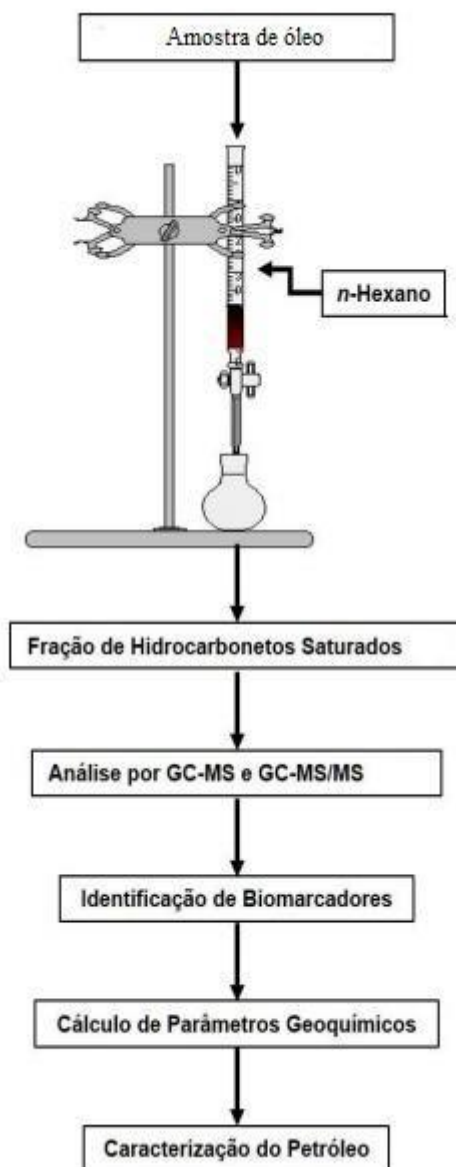
de escala piloto (Figura 9). Durante a simulação do derrame, alíquotas do óleo foram retiradas do sistema em 1, 3, 6, 12, 24, 36 e 72 horas, visando uma avaliação temporal.

Figura 9. A esquerda o sistema piloto para simulação de derrames de petróleo em ambientes aquáticos com controle de radiação solar, temperatura, agitação e circulação de ar. A= lâmpadas brancas; B= lâmpadas de ultravioleta; C= lâmpadas azuis e D = coolers de ar. A direita o sistema construído em execução.



4.3. Preparo de amostras e análises por CG/EM

Para o óleo bruto e suas alíquotas submetidas à simulação de derrame em ambiente aquático, foi realizado um fracionamento. O processo de fracionamento, como pode ser observado na Figura 10, foi realizado em coluna cromatográfica aberta de vidro, sendo preenchida com 500 mg de sílica G60 (70-230 mesh). Um total de 10 mg da amostra foi transferida para o topo da camada de sílica, sendo posteriormente eluída com 5 mL de hexano, obtendo assim a fração de saturados, que foi seca à temperatura ambiente.

Figura 10. Adaptação do fluxograma de fracionamento SARA

Fonte: PRATA, 2013.

Para análise, a fração de saturados foi dissolvida em *n*-heptano, aferida para uma solução de 10 mg mL^{-1} . As análises foram realizadas em um CG/EM (modelo TQ8040, Shimadzu co., Japan), utilizando ionização por elétrons (IE) com 70 eV, de acordo com condições apresentadas na Tabela 2. As amostras foram analisadas nos modos: varredura linear (SCAN), e monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para a análise no modo SCAN, foi utilizado uma faixa de detecção de 40 a 550 Daltons.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos aplicados na análise de óleos brutos e suas alíquotas da simulação de derrame em ambiente aquático por CG/EM

PARÂMETROS	CONDIÇÃO EMPREGADA
Coluna	DB - 5MS (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano) com 30 m; 0,25 mm ID; 0,25 µm
Programação de temperatura do forno	60°C (3,0 min); 7 °C até 310 °C (14,0 min)
Temperatura do Injetor	250 °C
Modo de Operação	Splitless – 1,0 min
Gás de arraste	Hélio (99,999% de pureza)
Fluxo do gás de arraste	1,20 mL min ⁻¹ (71,8 kPa)
Temperatura da Interface	300 °C
Volume de injeção	1 µL
Tempo de Análise	52,71 min

Para a análise dos biomarcadores das classes dos terpanos e esteranos foi realizado uma aquisição de dados no modo MRM, no qual os compostos foram identificados através do monitoramento de específicas m/z a partir da análise por meio de um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo (CG-EM/EM), o que proporciona uma maior seletividade na identificação dos compostos químicos. A Tabela 3 mostra as principais transições para a identificação dos compostos das classes dos esteranos e terpanos.

Tabela 3. Principais transições por MRM (íons precursores e íons produtos) utilizadas para a investigação e identificação de esteranos e terpanos.

<i>Compostos</i>	<i>Íon precursor (m/z)</i>	<i>Íon produto (m/z)</i>
Esteranos C27	372	217
Esteranos C28	382	217
Esteranos C29	400	217
Esteranos C30	414	217
Metilesteranos C30	414	231
Trisnoropanos C27	370	191
Bisnoropanos C28	384	191
Hopanos C20	412	191
Homoopanos C31	426	191

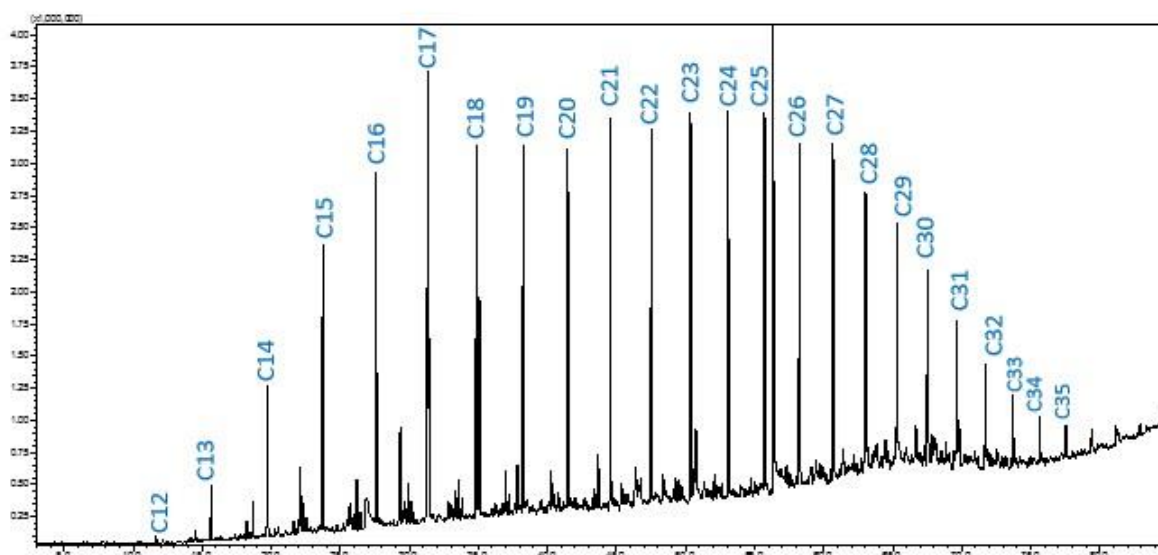
4.4. Análises por IV

Uma nova simulação de derrame foi realizada como descrito no item 4.2, para um óleo bruto submetido a uma análise temporal de 5 dias aumentando o tempo de exposição na câmara de simulação de derrame, onde foram retiradas alíquotas nos tempos de 1, 3, 24, 72 e 120 horas. As alíquotas foram analisadas diretamente por IV na faixa espectral de 600-4000 cm^{-1} utilizando reflectância total atenuada (ATR) em equipamento da marca Shimadzu, modelo IR TRACER-100 com Transformadora de Fourier, com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros do IV foram normalizados e processados utilizando o software Origin Pro 8.0 (*versão trial*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do óleo bruto e das alíquotas gerou aproximadamente 50% da fração de saturados, que foi então analisada por CG/EM. Como resultado da análise no modo de aquisição SCAN, obtivemos o cromatograma de íons totais (TIC, do inglês, *Total Ion Chromatogram*) típico para um óleo bruto ou suas alíquotas após exposição de derrame, sendo um deles representado na Figura 11. No TIC é possível obter o perfil químico característico da distribuição de *n*-alcanos lineares de *n*-C₁₂ a *n*-C₃₅. Assim, nossa discussão aqui será baseada nas diferentes classes de biomarcadores e estratégias de investigação utilizadas na geoquímica orgânica do petróleo.

Figura 11. Cromatograma de íons totais do óleo bruto obtido por CG/EM



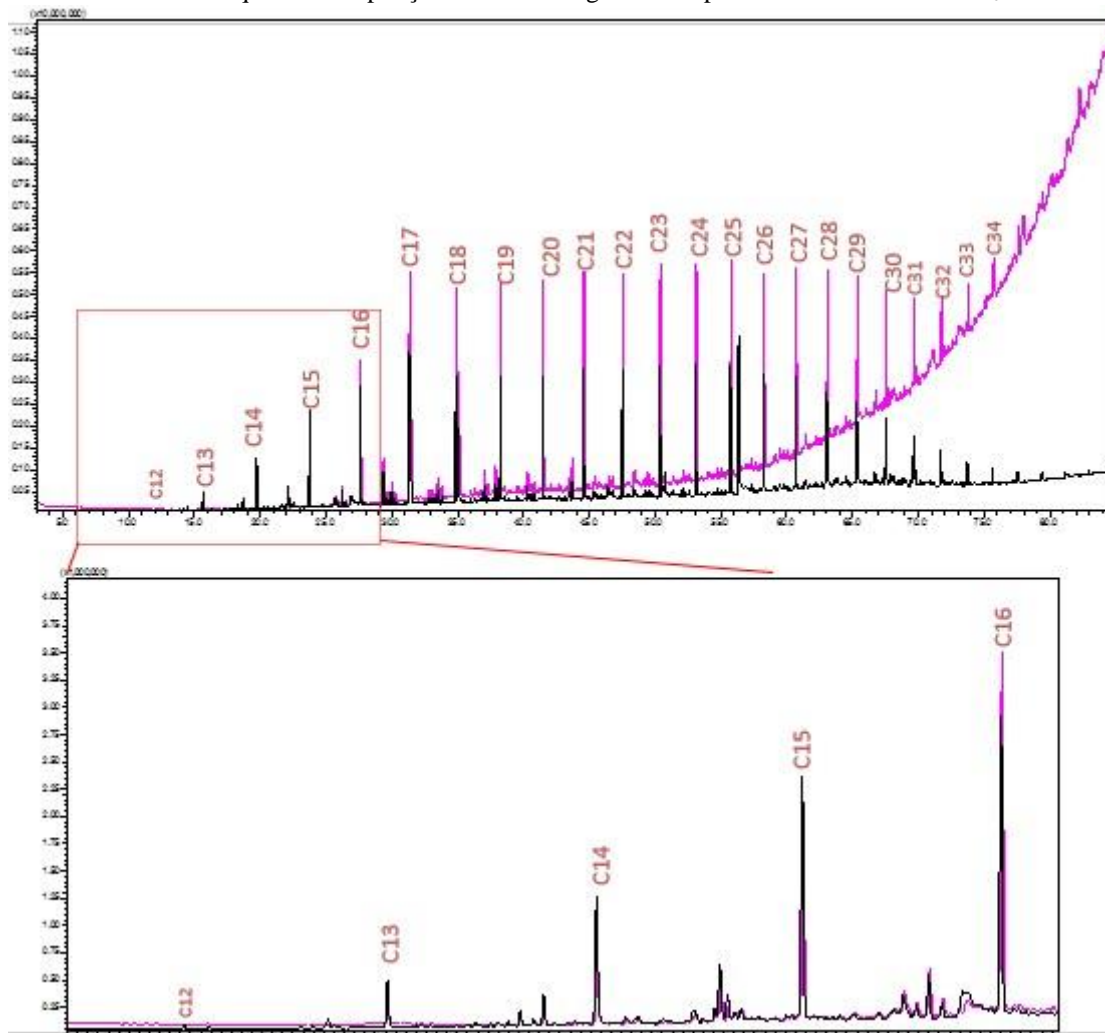
Fonte: O autor, 2021.

5.1. *n*-alcanos lineares

Os primeiros biomarcadores a serem avaliados foram os *n*-alcanos lineares, como mostra a comparação dos TIC do óleo bruto (em preto) e sua exposição no processo de simulação após 72 horas (em rosa) na Figura 12. É possível notar que há um claro processo de evaporação dos *n*-alcanos de menores cadeias durante a aplicação do processo de exposição, no qual as áreas dos picos do óleo bruto para *n*-C₁₂ a *n*-C₁₅ (expansão da Figura 12) no cromatograma diminuem em relação a 72 horas de exposição, tal resultado está associado ao processo de evaporação.

Em contrapartida, é observada um aumento das áreas de hidrocarbonetos de maior massa, a partir de $n\text{-C}_{16}$ até $n\text{-C}_{35}$ na amostra após 72h de exposição.

Figura 12. Comparação do TIC do óleo bruto (preto) com sua alíquota após 72 horas de exposição (rosa) no ambiente aquático. Ampliação do TIC na região correspondente ao $n\text{-C}_{12}$ até $n\text{-C}_{16}$.

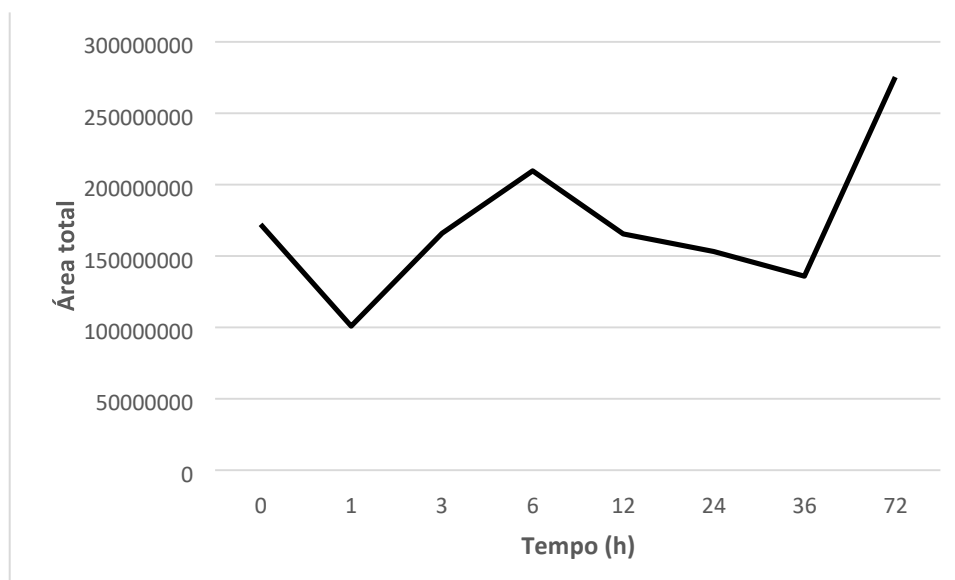


A partir dos dados coletados para todos os TIC, foi organizada uma tabela com os valores da soma total das áreas dos n -alcanos lineares entre $n\text{-C}_{12}$ a $n\text{-C}_{35}$, como sumarizado na Tabela 4. É possível notar que houve um aumento da área total de n -alcanos com o passar do tempo de exposição, sendo o maior valor obtido após 72h, o que significou um aumento de aproximadamente 60% na área em relação ao óleo bruto inicial, como visualizado na Figura 13. Este fato pode estar associado as modificações químicas ocorridas no processo de simulação de derrame, que causou o aumento na quantidade de n -alcanos lineares de maior massa molecular durante o processo simulado de derrame.

Tabela 4. Valores da soma total das áreas dos *n*-alcanos lineares entre *n*-C₁₂ a *n*-C₃₅ para a amostra de óleo bruto inicial (0h) e após a simulação de derrame temporal.

Área total de <i>n</i>-alcanos lineares	
Óleo	172071427
1 Hora	100782552
3 Horas	165819233
6 Horas	209570973
12 Horas	165337318
24 Horas	153177314
36 Horas	135936721
72 Horas	275231452

Figura 13. Variação da soma total das áreas dos *n*-alcanos lineares entre *n*-C₁₂ a *n*-C₃₅ para a amostra de óleo bruto inicial (0h) e após a simulação de derrame temporal.



5.2. Índice Preferencial de Carbono (CPI) e Isoprenóides

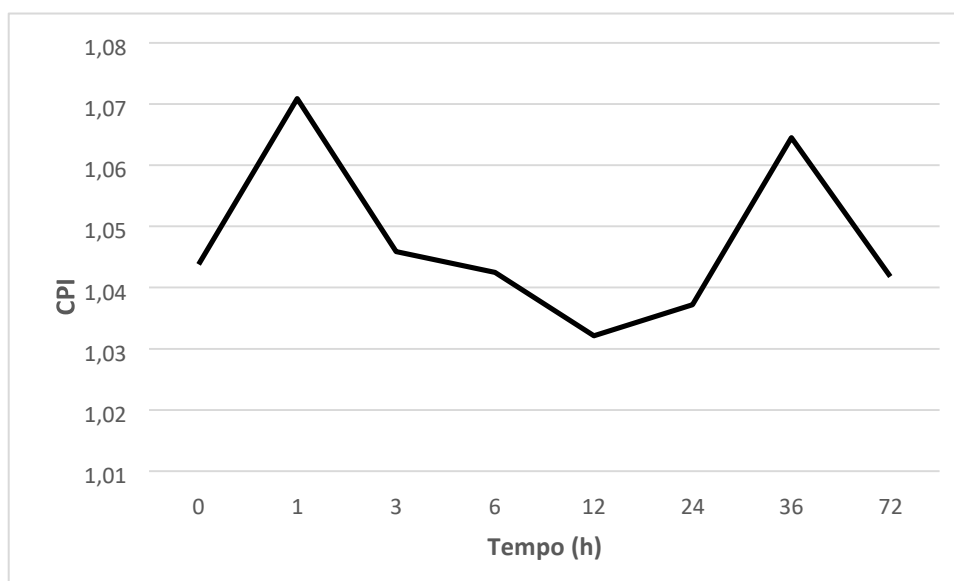
Também foi avaliado o CPI, que indica informações sobre a rocha geradora, apontando a predominância de *n*-parafinas pares ou ímpares. Na química do petróleo, valores de $CPI > 1$ mostram predominância de *n*-parafinas ímpares sobre as pares e características de óleos de origem lacustres, enquanto $CPI < 1$ indicam a predominância de *n*-parafinas pares em relação as ímpares e características de óleos de origem marinha. O CPI é obtido a partir do cálculo mostrado na equação 1.

Equação 1. Equação do CPI

$$CPI = \frac{\frac{C_{25}+C_{27}+C_{29}+C_{31}+C_{33}}{C_{26}+C_{28}+C_{30}+C_{32}+C_{34}} + \frac{C_{25}+C_{27}+C_{29}+C_{31}+C_{33}}{C_{24}+C_{26}+C_{28}+C_{30}+C_{32}}}{2}$$

Assim, é possível verificar a partir dos dados da Figura 14, que não houve alteração significativa nos valores de CPI durante os tempos de exposição do óleo no ambiente aquático, onde os valores de CPI para todas as amostras variaram entre 1,03 até 1,07, o qual sugere a predominância de *n*-parafinas (*n*-alcanos) ímpares sobre os pares, caracterizando o óleo como de origem lacustre.

Figura 14. Valores obtidos do cálculo do CPI a partir das áreas do TIC para o óleo bruto e suas alíquotas em diferentes tempos de exposição.



Tidos como os principais e mais estudados isoprenóides identificados em óleos brutos, o Pristano (Pr) e Fitano (Ft) têm como origem a degradação do fitol, cadeia carbônica presente na molécula de clorofila. Para Peter *et al.* (2005), os valores desta razão maiores que 1,0 indicam que os ambientes óxidos são característicos de matéria orgânica terrestre, e para valores próximos a 0,8 é indicado para ambientes anóxicos, comumente hipersalinos ou carbonáticos. Os resultados obtidos em nosso estudo para a razão diagnóstica Pr/Ft descritos na Tabela 5, mostram uma pequena variação na razão durante o tempo de exposição, o que não é significativa nem conclusiva.

Tabela 5. Valores das áreas dos picos cromatográficos das razões de isoprenóides (Pristano/Fitano, Pr/n-C₁₇ e Ft/n-C₁₈)

	Pr/Ft	Pr/n-C₁₇	Ft/n-C₁₈
Óleo	0,79	0,66	1,03
1 Hora	0,73	0,66	1,03
3 Horas	0,75	0,64	1,03
6 Horas	0,75	0,65	1,02
12 Horas	0,77	0,66	1,03
24 Horas	0,74	0,65	1,05
36 Horas	0,70	0,65	1,03
72 Horas	0,70	0,65	1,04

Também foi observado na Tabela 5 o comportamento da razão Pr/n-C₁₇ e Ft/n-C₁₈, que indica se houve biodegradação ou evaporação no processo de derrame. Foi obtido um valor inicial de 0,66 para Pr/n-C₁₇ e 1,03 para Ft/n-C₁₈, não observando mudanças significativas com o passar do tempo de simulação de derrame. Assim, podemos concluir que os compostos isoprenóides são resistentes a degradação dos microrganismos e que não se alteram facilmente em atividades de derrames, como também citado anteriormente por Castiblanco *et al.* (2020).

5.3. Esteranos e Terpanos

A partir dos cromatogramas obtidos por CG-EM/EM no modo de aquisição MRM, foi possível realizar a identificação dos biomarcadores da classe dos terpanos e esteranos, como descrito nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Identificação dos biomarcadores da classe dos terpanos e suas abreviações.

Nome	Abreviação	Fórmula Molecular	Massa Molecular
1 18 α (H)-22,29,30-Tris-nor-neohopano	Ts	C ₂₇ H ₄₆	370
2 17 α (H)-22,29,30-Tris-nor-hopano	Tm	C ₂₇ H ₄₆	370
3 17 α ,21 β (H)-30-nor-hopano	H29	C ₂₉ H ₅₀	398
4 17 α , 21 β (H)-hopano	H30	C ₃₀ H ₅₂	412
5 17 β , 21 α (H)-hopano (Moretano)	M30	C ₃₀ H ₅₂	412
6 17 α , 21 β (H)-29-homo-hopano (22S)	H31	C ₃₁ H ₅₄	426
7 17 α , 21 β (H)-29-homo-hopano (22R)	H31	C ₃₁ H ₅₄	426
8 17 α , 21 β (H)-29-bis-homo-hopano (22S)	H32	C ₃₂ H ₅₆	440
9 17 α , 21 β (H)-29-bis-homo-hopano (22R)	H32	C ₃₂ H ₅₆	440

Tabela 7. Identificação dos biomarcadores da classe dos esteranos e suas abreviações

Nome	Abreviação	Fórmula Molecular	Massa Molecular
1 13 β , 17 α – Diacolestano 20S	Dia S	C ₂₇ H ₄₈	372
2 13 β , 17 α – Diacolestano 20R	Dia R	C ₂₇ H ₄₈	372
3 5 α , 14 α , 17 α - Colestano 20S	$\alpha\alpha\alpha$ S	C ₂₇ H ₄₈	372
4 5 α , 14 β , 17 β - Colestano 20R	$\alpha\beta\beta$ R	C ₂₇ H ₄₈	372
5 5 α , 14 β , 17 β - Colestano 20S	$\alpha\beta\beta$ S	C ₂₇ H ₄₈	372
6 5 α , 14 α , 17 α - Colestano 20R	$\alpha\alpha\alpha$ R	C ₂₇ H ₄₈	372
7 5 α , 14 α , 17 α - Ergostano 20S	$\alpha\alpha\alpha$ S	C ₂₈ H ₅₀	386
8 5 α , 14 β , 17 β - Ergostano 20R	$\alpha\beta\beta$ R	C ₂₈ H ₅₀	386
9 5 α , 14 β , 17 β - Ergostano 20S	$\alpha\beta\beta$ S	C ₂₈ H ₅₀	386
10 5 α , 14 α , 17 α - Ergostano 20R	$\alpha\alpha\alpha$ R	C ₂₈ H ₅₀	386
11 5 α , 14 α , 17 α - Estigmastano 20S	$\alpha\alpha\alpha$ S	C ₂₉ H ₅₂	400
12 5 α , 14 β , 17 α - Estigmastano 20R	$\alpha\beta\beta$ R	C ₂₉ H ₅₂	400
13 5 α , 14 β , 17 α - Estigmastano 20S	$\alpha\beta\beta$ S	C ₂₉ H ₅₂	400
14 5 α , 14 α , 17 α - Estigmastano 20R	$\alpha\alpha\alpha$ R	C ₂₉ H ₅₂	400

No modo de aquisição por MRM (esteranos e terpanos) é possível realizar a análise de diversas transições de m/z , como observado no exemplo representativo da Figura 15, que é referente aos cromatogramas de diversas transições de m/z monitoradas para uma das amostras do nosso estudo. A partir da integração e obtenção das áreas de cada pico referente aos biomarcadores, foi possível calcular as razões diagnósticas consolidadas em estudos de geoquímica orgânica, como sumarizado na Tabela 8.

Figura 15. Cromatogramas de MRM para análise de um óleo bruto (em cima) e ampliação para um específico cromatograma referente a transição de m/z 372>217 referente a biomarcadores da classe dos esteranos.

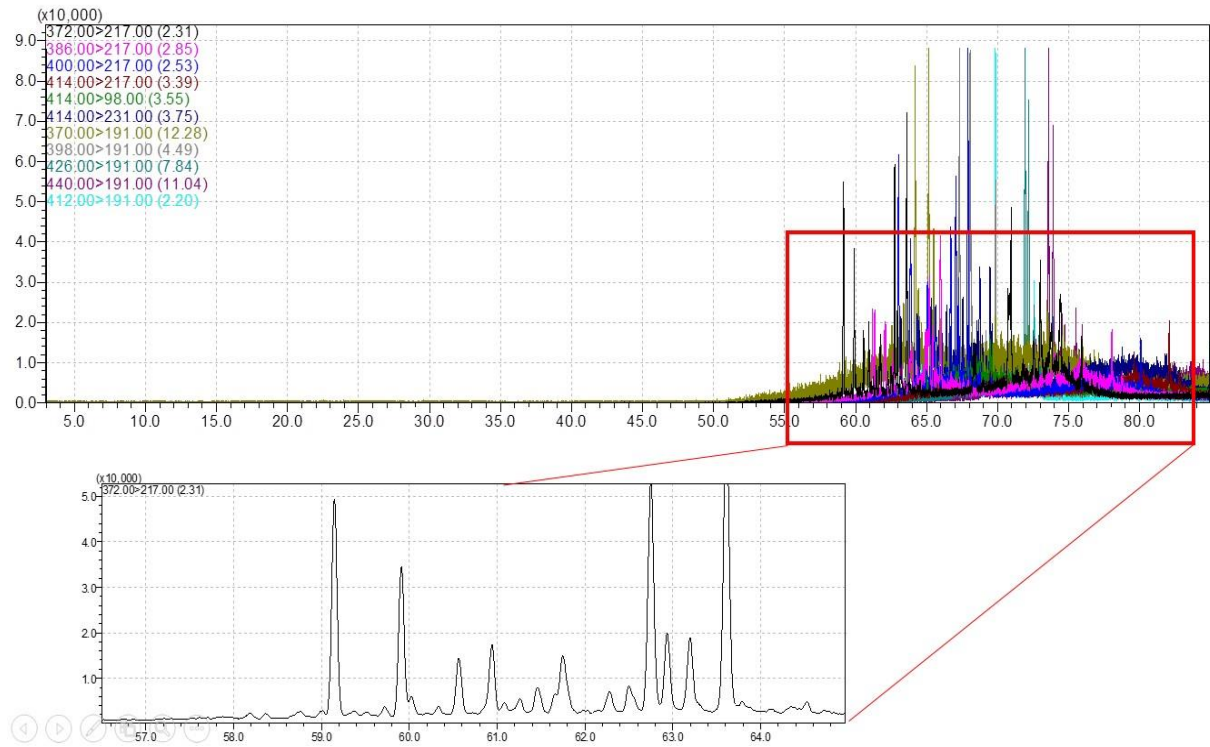


Tabela 8. Razões diagnósticas de biomarcadores de petróleo obtidas na simulação de derrames no ambiente aquático

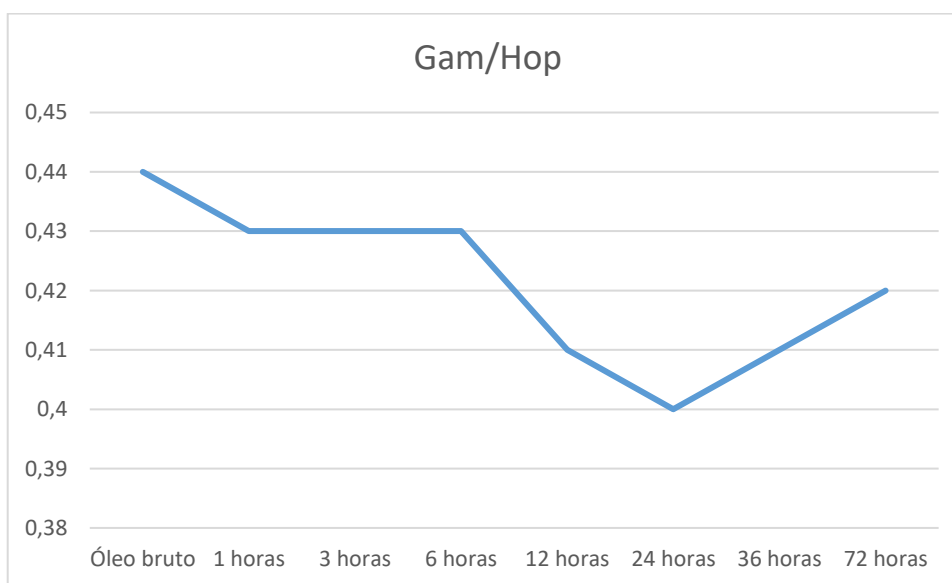
RAZÕES DIAGNÓSTICAS	AMOSTRAS							
	Óleo bruto	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	36 horas	72 horas
<i>Ts/Tm</i>	0,77	0,86	0,78	0,8	0,79	0,82	0,79	0,83
<i>Ts/(Ts+Tm)</i>	0,43	0,46	0,44	0,47	0,44	0,45	0,44	0,45
<i>Ts/Hop</i>	0,13	0,14	0,14	0,14	0,13	0,13	0,12	0,13
<i>C29H/C30H</i>	0,45	0,40	0,43	0,44	0,44	0,45	0,44	0,39
<i>C30 Diahop/Hop</i>	0,15	0,15	0,12	0,14	0,11	0,12	0,11	0,13
<i>C29Mor/C29Hop</i>	0,66	0,72	0,65	0,65	0,65	0,66	0,67	0,75
<i>C30Mor/C30Hop</i>	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,08
<i>Gam/Hop</i>	0,44	0,43	0,43	0,43	0,41	0,40	0,41	0,42
<i>C31 22S/(22S+22R)</i>	0,58	0,58	0,58	0,58	0,58	0,57	0,58	0,57
<i>C32 22S/(22S+22R)</i>	0,55	0,55	0,55	0,56	0,56	0,57	0,57	0,56
<i>Gam/Gam+C30Hop</i>	0,30	0,30	0,30	0,30	0,29	0,28	0,28	0,28
<i>C31R/C30Hop</i>	0,19	0,19	0,18	0,18	0,18	0,19	0,18	0,18
<i>Steranes/Hopanes</i>	2,34	2,26	2,26	2,25	2,30	2,32	2,34	2,32
<i>24/(24+27)</i>	0,55	0,54	0,54	0,53	0,54	0,57	0,56	0,54
<i>C27 Dia/St</i>	0,50	0,50	0,49	0,49	0,49	0,51	0,51	0,49
<i>C27 Dia/(Dia+St)</i>	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,34	0,34	0,33
<i>C27 20S/(20S+20R) Cho</i>	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
<i>C27 abb/(abb+aaa) Cho</i>	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,19	0,19	0,20
<i>C28 20S/(20S+20R) Erg</i>	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,09	0,09
<i>C28 abb/(abb+aaa) Erg</i>	0,47	0,46	0,46	0,36	0,37	0,46	0,45	0,38
<i>C29 20S/(20S+20R) Stg</i>	0,36	0,36	0,36	0,35	0,35	0,35	0,34	0,36
<i>C29 abb/(abb+aaa) Stg</i>	0,35	0,36	0,35	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
<i>C30 20S/(20S+20R) Din</i>	0,30	0,49	0,41	0,35	0,45	0,42	0,48	0,28
<i>C30 abb/(abb+aaa) Din</i>	0,10	0,07	0,01	0,17	0,06	0,08	0,11	0,06

De forma geral, é possível notar que para as razões diagnósticas da Tabela 8, quando comparamos o óleo bruto e suas diferentes horas de exposição, não existe nenhuma mudança substancial nos valores obtidos, mostrando que o processo de simulação de derrames não modifica as razões classicamente utilizadas nos estudos de geoquímica do petróleo.

Dentre as razões geoquímicas da Tabela 8, destacam-se, por exemplo, as razões T_s/T_m e T_s/T_s+T_m , que são utilizadas como indicadoras do grau de evolução térmica, tendo em vista a estabilidade térmica do composto T_s , com valores de razão menor que um ($T_s/T_s+T_m < 1$) sugerindo elevada evolução térmica para os óleos (SANTOS, 2013). Segundo Prata (2016), a baixa estabilidade do T_m em relação ao T_s , é possível sugerir que óleos com alta evolução térmica apresentem uma maior concentração do composto mais estável, enquanto petróleos com baixa evolução térmica apresenta uma maior concentração do composto metaestável em relação ao mais estável. Assim, diante dos resultados obtidos, para a razão T_s/T_m não foram observadas variações significativas.

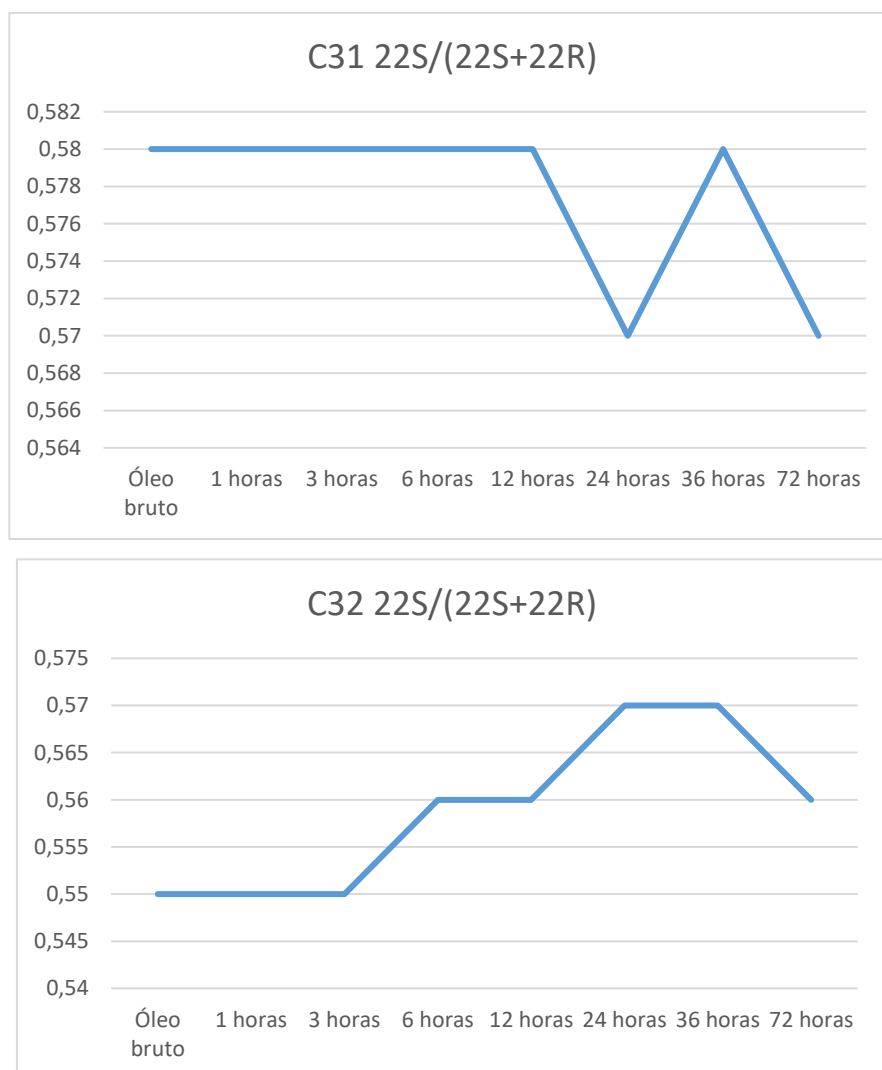
Além da razão entre os compostos T_s e T_m , outra que pode ser analisada é o índice de gamacerano, que segundo Prata (2016) é utilizado para distinguir de óleos de fontes hipersalinas, salinas, marinhas e não-marinhas. Nos resultados obtidos para razão Gamacerano/hopano foi observado uma leve tendência de diminuição da área para a exposição ao ambiente aquático quando comparado a primeira e última hora de exposição, como pode ser observado nas Figuras 16, porém, não consideramos uma mudança relevante nos valores.

Figura 16. Comportamento da razão Gamacerano/Hopano para o ambiente aquático.



A evolução térmica também pode ser medida através da razão entre alguns esteranos. Ela pode ser avaliada por meio da razão entre compostos isômeros R, S, $\alpha\alpha\alpha$ - e $\beta\beta\beta$ -5(H),14(H),17(H)-C29 (transição m/z 400>217) (PRATA, 2016), como está representado nos resultados calculados dos parâmetros na Tabela 8. Os epímeros de configuração biológica (22R) e configuração geológica (22S) pela razão $22S/(22R+22S)$ nos homohopanos são comumente utilizados para razões diagnósticas relacionadas a maturação de óleos, que através de reações de isomerização e conversão gradual de um isômero em outro resultam numa mistura das configurações (SILVA, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2009). Em nosso estudo, foram obtidos resultados que estão demonstrados também na Figura 17, o qual foi visto uma pequena variação ao longo das horas de simulação de derrame, com valores que variaram de 0,55 a 0,57 para o C32 $22S/(22S+22R)$ e de 0,57 a 0,58 para C31 $22S/(22S+22R)$, para os quais não consideramos uma mudança relevante.

Figura 17. Razões entre homohopanos para exposição ao ambiente aquático.



As razões diagnósticas que indicam condições de deposição de matéria orgânica são a razão de porcentagem entre os Colestanos (C27, Cho), Ergostanos (C28, Erg) e Estigmastanos (C29, Stg) pertencente a classe dos esteranos (SANTOS, 2013). A predominância de esterano C29 indica uma característica de deposição de matéria orgânica terrestre para o óleo, enquanto a predominância dos esteranos C27 indicaria maior contribuição de fitoplâncton marinho e para os esteranos C28, quando em maior proporção, poderiam indicar maior contribuição de algas lacustres (SILVA, 2007). Na Figura 18 está representada os resultados obtidos para tais razões na exposição de derrame em ambiente aquático, onde também consideramos não haver mudanças relevantes nos valores.

Figura 18. Razões entre Colestanos (C27, Cho), Ergostanos (C28, Erg) e Estigmastanos (C29, Stg) para análise de deposição de matéria orgânica na exposição em ambiente aquático.



A partir dos resultados obtidos, foram observadas pequenas modificações químicas da composição do óleo bruto exposto a simulação de derrame na análise dos terpanos e esteranos,

o que era esperado pois, segundo Azevedo *et al.*, 2009, algumas classes de biomarcadores possuem maior resistência as modificações químicas quando submetidas a processos naturais, como o de foto-oxidação. Os dados obtidos aqui reforçam que essas razões diagnósticas podem ser utilizadas como indicadores para monitoramento ou estudos de correlação de amostras de derrames com sua fonte poluidora, pois, não há modificação significativa durante o processo de derrame em ambiente aquático. Resultado similar foi encontrado em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, porém, com simulações de derrames realizadas em ambientes terrestres (NASCIMENTO, 2019).

5.4. Hidrocarbonetos Aromáticos

A partir dos dados obtidos no modo de aquisição SCAN, foi aplicada um filtro de m/z onde foi selecionado o cromatograma extraído para as m/z 128, 178 e 192, referentes aos hidrocarbonetos aromáticos. Para cada cromatograma obtido, foi realizado um somatório e construído gráficos de análise do comportamento das respectivas áreas somadas, como mostradas nas Figuras 19, 20 e 21. De forma geral, constatou-se um aumento na área total dos cromatogramas referente aos aromáticos com o passar das horas no processo de exposição, onde houve um aumento expressivo no tempo 72 horas, o que sugere que os processos associados ao derrame aumentam a concentração de uma série de compostos aromáticos.

Para o naftaleno e seus derivados (m/z 128) pode haver diversas alterações em sua estrutura durante o processo de derrame causados pela exposição a luz. Porém, a partir deles pode-se obter informações como evolução térmica e ambiente deposicional. O fenantreno (m/z 178) e os seus alquil derivados, são encontrados em petróleos e em matéria orgânica sedimentar, por serem derivados de esteroides e triterpenoides. O metil-fenantreno de m/z 192, por sua vez, pode variar em sua distribuição de acordo com a origem da matéria orgânica (HECKMANN; LANDAU, 2011).

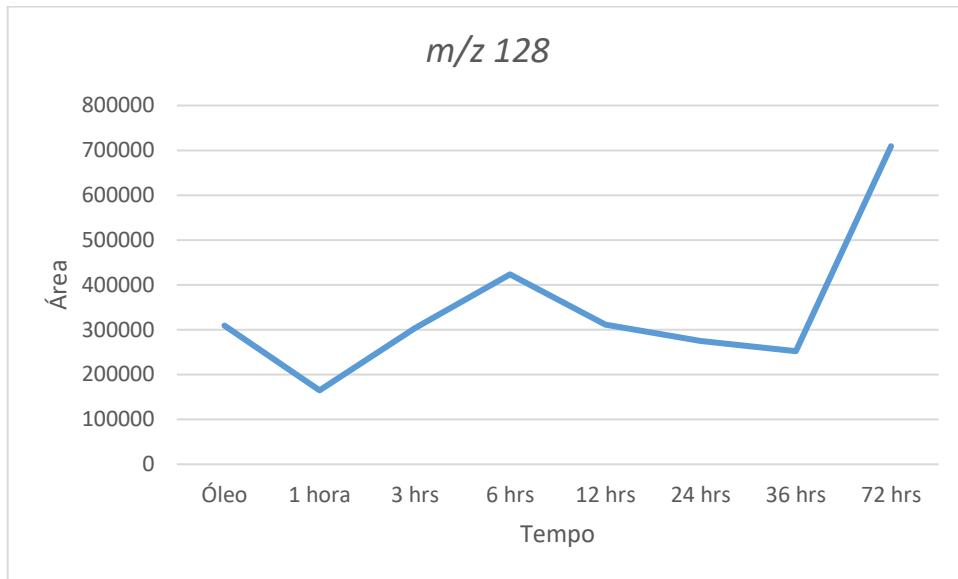
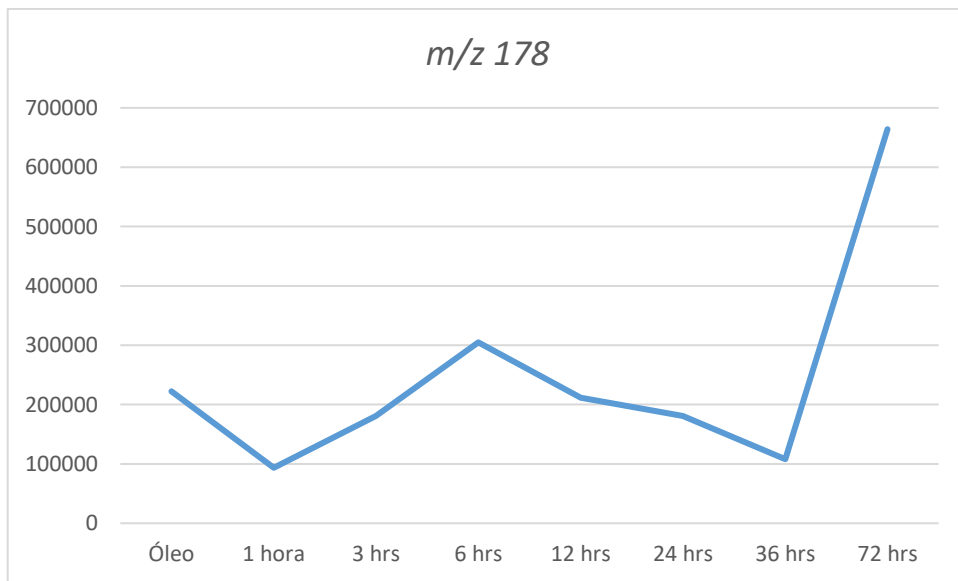
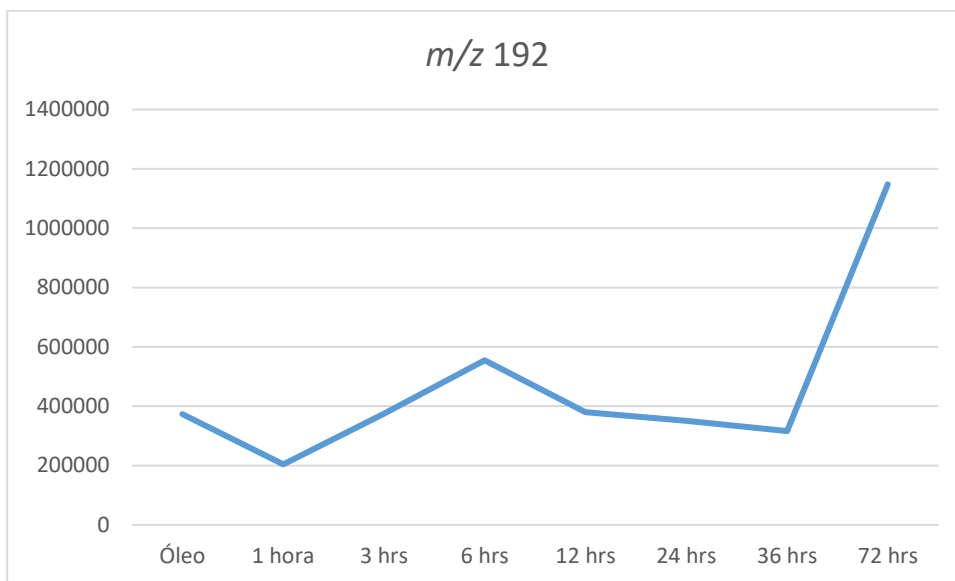
Figura 19. Comportamento do somatório das áreas do naftaleno.**Figura 20.** Comportamento do somatório das áreas do fenantreno.

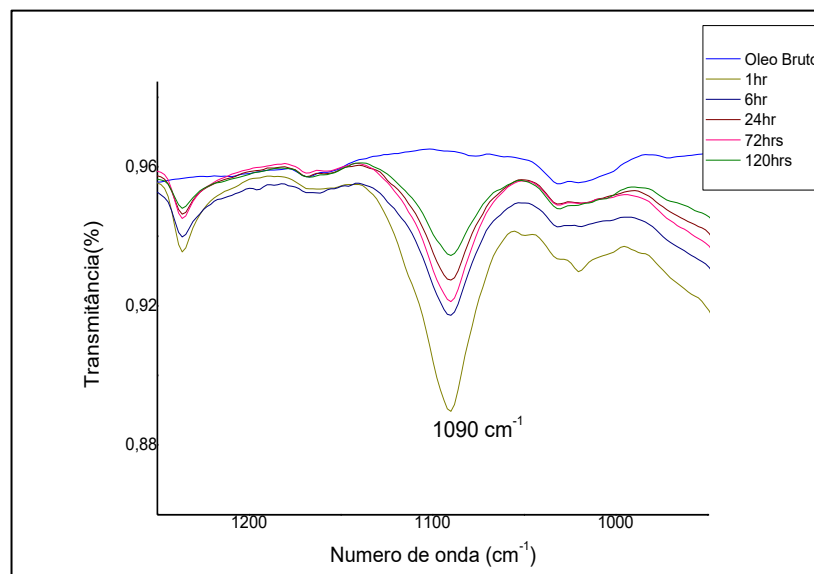
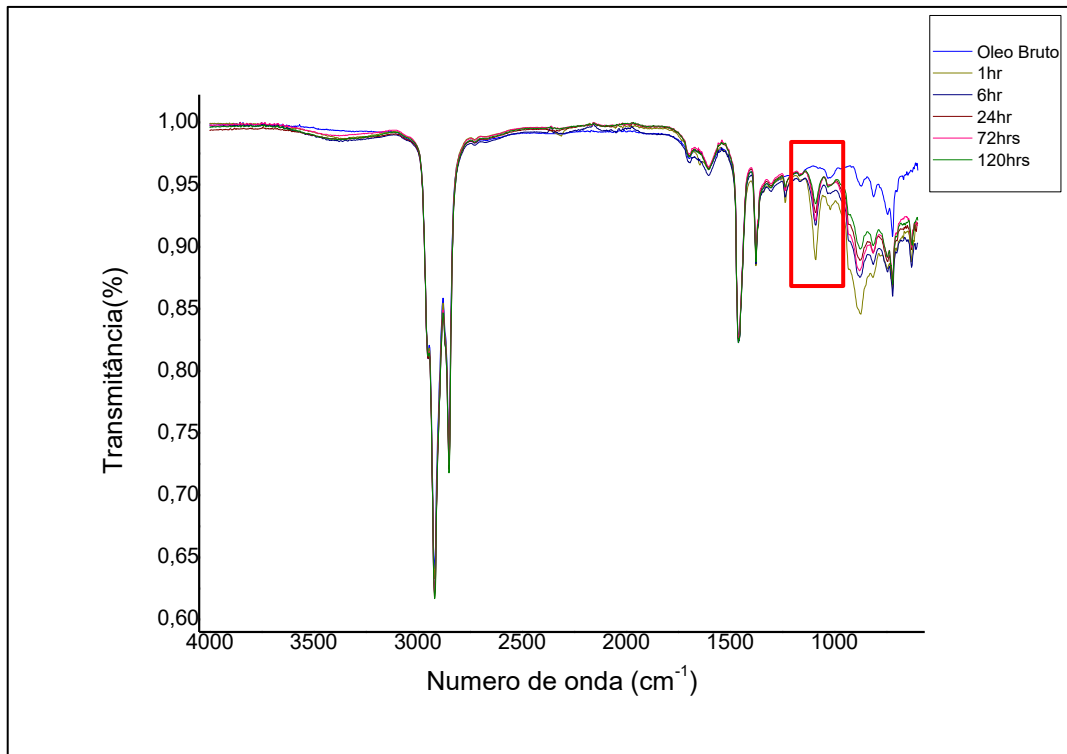
Figura 21. Comportamento do somatório das áreas do metil-fenantreno.

5.5. Espectroscopia no Infravermelho

As amostras do óleo bruto e suas alíquotas de exposição aos derrames em ambiente aquático também foram analisadas por IV, onde os resultados são mostrados na forma de espectro na Figura 22.

É possível verificar as bandas relacionadas ao que é majoritário na composição química do petróleo, que são os hidrocarbonetos alifáticos, com absorção na região de 2900 cm^{-1} referente a alifáticos simétricos e assimétricos ($-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$) e em 1500 cm^{-1} associada a vibrações rotacionais de CH_2 e CH_3 . Porém, foi possível identificar o aparecimento de novos estiramentos ligados as mudanças químicas associadas ao processo de simulação de derrames. Foram identificados estiramentos particulares, como em $1080\text{--}1090\text{ cm}^{-1}$, que segundo Poveda *et al.* (2016) é referente a deformação de aromáticos, tal estiramento não era presente no óleo bruto inicial, porém na primeira hora de exposição já foi identificado o aumento do pico nessa região, que foi aumentando sua absorbância com o passar das horas de exposição do derrame simulado, como visto na Figura 22. Já para o estiramento em 874 cm^{-1} , associado a deformações não planares de anéis benzeno substituídos, foi visualizado um aumento do pico após uma hora de exposição, tendendo a um decréscimo nas demais horas de exposição. Na região de 1233 cm^{-1} o estiramento está relacionado ao aparecimento de compostos derivados do fenol, o qual não estava presente no óleo bruto antes da exposição. Esses comportamentos citados mostram que processos foto-oxidativos podem ter ocorridos na simulação de derrame do óleo bruto, como a formação de compostos oxigenados.

Figura 22. Espectro no Infravermelho para a simulação de derrame em ambiente aquático com ampliação no pico em 1090 cm^{-1} .



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados de CG/EM para amostras de exposição do óleo bruto sob simulações de derrames em ambientes aquáticos, foi possível observar algumas modificações químicas a partir das áreas dos picos cromatográficos para diversas classes de biomarcadores do petróleo. Houve um aumento na área total de *n*-alcanos lineares, sendo de destaque a ausência de *n*-alcanos lineares de baixa massa molecular entre *n*-C₁₂ a *n*-C₁₅ já nas primeiras horas de exposição, fato explicado pelos processos de evaporação. A partir do estudo das razões diagnósticas dos terpanos e esteranos, foi concluído que o processo de simulação de derrame não altera substancialmente a composição química do óleo bruto ao longo das horas de exposição. Entretanto, para o estudo dos aromáticos, foi observada um aumento na área total dos cromatogramas extraídos para os íons de *m/z* 128, 178 e 192 aromáticos de forma temporal, o que aponta um aumento de compostos que podem estar associados a elevados efeitos tóxicos em um ambiente aquático.

As análises por IV mostraram picos referentes a composição química típica do petróleo, com estiramentos e bandas em sua maior parte referentes aos hidrocarbonetos, porém, foram observadas regiões do espectro onde foi possível identificar mudanças na composição química do petróleo causada pelo processo de simulação de derrames no ambiente estudado, como por exemplo, modificações químicas associadas aos processos de foto-oxidação no óleo bruto devido ao aumento na absorvância de picos referente a compostos oxigenados.

Deste modo, o estudo das modificações químicas aqui apresentado tem grande importância socioambiental, fornecendo uma maior compreensão dos possíveis compostos/classes que podem estar associados a contaminação a partir do derrame de óleos brutos em ambientes aquáticos. Assim, este estudo pode auxiliar trabalhos futuros que visem a avaliação de processos de remediação de ambientes que sofreram contaminação em decorrência de derrames, ou até mesmo, subsidiar estudos que visam utilizar biomarcadores e compostos numa avaliação de geoquímica forense ambiental envolvendo derrames de óleos em ambientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, Flavia Cristina de. **Caracterização geoquímica de óleos das bacias Camamu-almada e Jequitinhonha, Bahia.** 2007. 182 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
2. ARAUJO, Tiago Pucca. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise direta de tetraciclinas em leite bovino.** 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química, Campinas, 2007.
3. ARDREY, Robert e. **Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction.** Nova York: Wiley, 2003. 300 p.
4. AQUINO NETO, Francisco Radler; NUNES, Denise da Silva e Souza. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins.** Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
5. AZEVEDO, Débora de Almeida; SILVA, Tais Freitas da; SILVA, Daniel Bastos da. **Avaliação geoquímica de biomarcadores ocluídos em estruturas asfáltênicas.** Química Nova, [s.l.], v. 32, n. 7, p. 1770-1776, 2009.
6. BOBINGER, Stefan; ANDERSSON, Jan T. **Photooxidation Products of Polycyclic Aromatic Compounds Containing Sulfur.** Environmental Science & Technology, [s.l.], v. 43, n. 21, p. 8119-8125, nov. 2009. American Chemical Society (ACS).
7. CASTIBLANCO, Julian E. B.; CARREGOSA, Jhonattas C.; SANTOS, Jandyson M.; *et al.* Molecular behavior assessment on initial stages of oil spill in terrestrial environments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 11, p. 13595–13604, 2021
8. COSTA, Lucia de Fátima Lúcio Gomes da; AQUINO, Francisco Nixon Pereira de Macedo. **Riscos ambientais em uma sonda de perfuração de petróleo onshore na unidade de negócios-RN/CE- Mossoró/RN.** Holos, v. 3, p. 64, 30 jun. 2011. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN).
9. CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. **Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo.** Ciência Hoje, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.
10. DA CRUZ, Georgiana Feitosa; MARSAIOLI, Anita Jocelyne. **Processos Naturais De Biodegradação Do Petróleo Em Reservatórios.** Rio de Janeiro, 2012.

11. D'AURIA *et al.* **Photochemical degradation of crude oil: comparison between direct irradiation, photocatalysis, and photocatalysis on zeolite.** Journal Of Hazardous Materials, [s.l.], v. 164, n. 1, p. 32-38, 2009.
12. ÉKEY, Károly. **Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography.** Journal Of Chromatography A. v. 921, n. 2, p. 227-236, jul. 2001. Elsevier BV.
13. FATHALLA, Eiman M.; ANDERSSON, Jan T. **Products of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in oil spill photodegradation.** Environmental Toxicology and Chemistry, [s.l.], v. 30, n. 9, p. 2004-2012, 21 jul. 2011.
14. FARIAS, Cassia de Oliveira. **Validação da degradação de óleo em sedimentos de manguezal: estudo de caso, Baía de Guanabara, RJ.** 2006. 301 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2006.
15. GROB, Robert L; BARRY, Eugene F. **Modern Practice of Gas Chromatography.** 4. ed. New Jersey: Wiley-interscience, 2004. 1064 p.
16. HSU, C. S.; DECHER, G. J.; ROBINS, W. K.; FUKUDA, E. K. **Naphthenic acids in crude oils characterized by mass spectrometry.** Energy Fuels, v. 14, p. 217-223, 2000.
17. IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2019). Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/manchasdeoleo>.
18. KITSON, Fulton; LARSEN, Barbara; MCEWEN, Charles. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry.** London: Academic Press, 1996. 381 p.
19. LIMA, Viviane de Souza. **Avaliação da influência da temperatura de corte sobre as frações asfálticas.** 2008. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
20. LOZANO *et al.*, **Petroleomics: Tools, Challenges, and Developments.** Review in Advance - 20.1-20.26, 2020.
21. MENDONÇA, Janur. **Estudo de Resinas e Asfaltenos em Petróleos Brasileiros por Ressonância Magnética Nuclear.** 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.
22. NASCIMENTO, Rayane Maria do. **Biomarcadores do petróleo, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, avaliação temporal.** 2019. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

23. PAVIA, Donald *et al.* **Introdução a espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.
24. PAVIA, Donald *et al.* **Introdução a espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 733 p.
25. PETERS, K., WALTERS, C., & MOLDOWAN, J. **Biomarcadores e isótopos no meio ambiente e na história humana**. No *Guia do Biomarcador* (pp. 1-2). Cambridge: Cambridge University Press, 2005.
26. POVEDA, J.; VELASCO, D.; TOLEDO, N.; TORRES, M. *et al.* **Chemical characterization of the asphaltenes from Colombian "Colorado" light crude oil**. CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro, 6, p. 105-122, 06/01 2016.
27. PRATA, P. S. **Caracterização geoquímica de petróleo por cromatografia bidimensional abrangente e análise multivariada de dados**. Tese (Doutorado em Ciências) Campinas São Paulo, Unicamp, 2016.
28. REGATO, Sabrina Baptista. **Caracterização geoquímica de óleos selecionados da bacia Sergipe - Alagoas**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
29. RODRIGUES, Tânia Thibes. **Os Efeitos Do Solo Contaminado Com Petróleo Na Estrutura Anatômica E Estado Nutricional Do Lenho Jovem De Campomanesia**. 2005. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
30. SANTOS, Jandyson Machado. **Estudo Avançado para caracterização química de Petróleo do Campo de Carmópolis**. 2013. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2013.
31. SANTOS, Jandyson Machado. **Novas abordagens em petroleômica por FT-MS empregadas em óleos brutos com diferentes características físico-químicas**. 2017. 138 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP.
32. SILVA, Carla Grazieli Azevedo da. **Caracterização Geoquímica Orgânica Das Rochas Geradoras De Petróleo Das Formações Irati e Ponta Grossa Da Bacia Do Paraná**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
33. SKOOG, Douglas *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006. 1088 p.

34. THOMINETTE, F., VERDU, J. **Photo-oxidative behavior of crude oils relative to sea pollution Part I. Comparative study of various crude oils and model systems.** *Mar. Chem.*, 1984, 15, 91–104.
35. TISSOT, Bernard P; WELTE, Dietrich H. **Petroleum Formation and Occurrence.** 2. ed. New Work: 1984.
36. VÉKEY K. **Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography.** *J Chromatogr A.* 2001 Jul 6;921(2):227-36.
37. VOGEL, Arthur I *et al.* **Análise Química Quantitativa.** 6. ed. Rio de Janeiro: Ltc editora, 2002. 488 p.
38. WILLETT, John. **Gas chromatography.** 4. ed. Nova York: Chichester, 1987. 272 p.
39. ZONIN, Valdecir Jose. **Potencias e limitações da indústria de biodiesel no Brasil: um estudo de caso.** 2008. 276 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia da produção, Universidade do Vale dos Rios dos Sinos, São Leopoldo, 2008.