



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JHONATTAS DE CARVALHO CARREGOSA

**NOVA ESTRATÉGIA MULTICAMADA DE APLICAÇÃO DA
ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA QUÍMICA FORENSE DE
PETRÓLEO**

***NEW MULTILAYER STRATEGY OF MASS SPECTROMETRY IN
PETROLEUM FORENSIC CHEMISTRY***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JHONATTAS DE CARVALHO CARREGOSA

**NOVA ESTRATÉGIA MULTICAMADA DE APLICAÇÃO DA
ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA QUÍMICA FORENSE DE
PETRÓLEO**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Wisniewski Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Jandyson Machado Santos

***NEW MULTILAYER STRATEGY OF MASS SPECTROMETRY IN
PETROLEUM FORENSIC CHEMISTRY***

*Thesis presented to the Post-Graduate
Program in Chemistry of the Federal
University of Sergipe to obtain the
doctorate degree in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C314n Carregosa, Jhonattas de Carvalho
Nova estratégia multicamada de aplicação da espectrometria de massas na química forense de petróleo / Jhonattas de Carvalho Carregosa ; orientador Alberto Wisniewski Júnior. - São Cristóvão, 2023.
161 f. :il.

Tese (doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Derramamento de óleo. 2. Fourier, Transformada de. 3. Marcadores bioquímicos. 4. Análise multivariada. I. Wisniewski Júnior Alberto, orient. II. Título.

CDU 54-032.32



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 Programa de Pós-Graduação em Química
 PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Jhonattas de Carvalho Carregosa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 07/02/2023.

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior
 Departamento de Química- UFS

Prof. Dr. Sandro Navickiene
 Departamento de Química- UFS

Prof.ª Dr.ª Flaviana Cardoso Damasceno
 Departamento de Química – UFS

Dr. Alexandre de Andrade Ferreira
 Químico de Petróleo - PETROBRAS

Prof.ª Dr.ª Debora de Almeida Azevedo
 Universidade Federal do Rio de Janeiro

RESUMO

Em 2019, a costa nordeste do Brasil foi impactada pelo aparecimento de um grande volume de óleo, registrado como o maior desastre ambiental do país envolvendo este tipo de material. Amostras deste óleo foram coletadas entre os estados de Sergipe e Pernambuco, bem como amostras das principais correntes produtoras da bacia Sergipe-Alagoas; e amostras de dois tambores que aportaram no litoral de Sergipe e um no Rio Grande do Norte. Com o objetivo de avaliar a existência de relação entre estes materiais, o presente trabalho propôs a caracterização geoquímica das amostras por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX); bem como a aplicação de uma nova estratégia multicamada empregando a técnica de espectrometria de massas nas suas duas formas mais desenvolvidas de análise, o modo sequencial por monitoramento de reações múltiplas (MRM) e ultra-alta resolução (UHRMS) para atribuição das relações de similaridade/dissimilaridade entre as amostras da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento. A proposta foi baseada nos recentes avanços da espectrometria de massas e nas limitações do método proposto pelo Comitê Normativo Europeu (*CEN method*). As análises dos biomarcadores hopanos e esteranos, realizada por GC/MS/MS-MRM, EDX, e as informações obtidas a partir do cromatograma reconstruído para o íon m/z 85 apontaram que os óleos do derramamento são oriundos do mesmo evento. As razões de biomarcadores de evolução térmica e o aporte de matéria orgânica, com ênfase na presença do biomarcador 18(H)-oleanano sustentam essa afirmação. A utilização dos dados de UHRMS, como uma nova e adicional camada analítica, contribuiu para a atribuição inequívoca de similaridade/dissimilaridade entre as amostras, quando tratados estatisticamente por análises de componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico (HCA). Com base nos resultados, sugere-se que os óleos do derramamento não compartilham semelhanças com óleos produzidos na bacia Sergipe-Alagoas; e apresentaram similaridade com os óleos contidos nos tambores.

Palavras-chave: derramamento de óleo no Brasil, Orbitrap, biomarcadores, petroleômica, análise multivariada.

ABSTRACT

In 2019, the northeast coast of Brazil was impacted by the appearance of a large volume of oil, which was recorded as the largest environmental disaster in the country involving this type of material. Samples of this oil were collected between the states of Sergipe and Pernambuco, as well as Samples of the main producing currents of the Sergipe-Alagoas Basin and two drums that landed on the coast of Sergipe and Rio Grande do Norte. In order to evaluate the existence of a relationship between these materials, the present work proposed the geochemical characterization of Samples by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and X-ray dispersive energy spectroscopy (EDX), as well as the application of a new multilayered strategy employing the mass spectrometry technique in its two most developed forms of analysis, the sequential mode by monitoring multiple reactions (MRM) and ultra-high resolution (UHRMS), to assign similarity relationships between the samples from Sergipe-Alagoas basin, barrel and spilled oil samples. The proposal was based on recent advances in mass spectrometry and the limitations of the method proposed by the European Normative Committee (Cen Method). Hopanes and steranes biomarker analyses by GC/MS/MS-MRM, EDX, as well as the data obtained from the reconstructed chromatogram to the m/z 85 ion, indicated that the spilled oils originated from the same event. The diagnostic ratios for thermal evolution and the contribution of organic matter, with emphasis on the presence of 18(H)-oleanane biomarker, support this statement. The use of UHRM data, as a new and additional analytical layer, contributed to the unambiguous attribution of similarity or dissimilarity between Samples when statistically treated by principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA). Based on the results, it is suggested that the spilled oils do not share similarities with oils produced in the Sergipe-Alagoas basin and present similarities with the oils contained in the drums.

Keywords: Brazilian oil spill, Orbitrap, biomarkers, petroleomics, multivariate analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Formação do petróleo	4
1.2	Composição Química do Petróleo	5
1.2.1	Hidrocarbonetos	6
1.2.2	Não-hidrocarbonetos.....	8
1.3	Biomarcadores.....	8
1.3.1	n-alcenos e isoprenóides.....	10
1.3.2	Hopanos.....	11
1.3.3	Esteranos.....	13
1.4	Derramamento de petróleo e técnicas de caracterização	14
1.4.1	Métodos cromatográficos aplicados à análise de petróleo e derivados	15
1.4.1.1	Fracionamento SARA.....	16
1.4.1.2	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador de íons tipo quadrupolo.....	19
1.4.1.3	Cromatografia gasosa sequencial em análises forenses de petróleo	20
1.4.2	Espectrometria de massas de ultra-alta resolução (UHRMS)..	20
1.4.2.1	Petroleômica	22
1.4.2.1.1	Diagrama de Kendrick.....	24
1.4.2.1.2	Diagrama de distribuição de classes.....	27
1.4.2.1.3	Diagrama de van Krevelen.....	29
1.5	Tratamentos estatísticos para análise de similaridade entre amostras de óleo em caso de derrame não reportado.....	31
1.5.1	Desvio padrão relativo, limite de repetibilidade e diferença crítica	31
1.5.2	Análise multivariada de dados	33
1.5.2.1	Análise hierárquica de agrupamento	33

1.5.2.2	<i>Análise de componentes principais (PCA)</i>	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	<i>Objetivo geral</i>	37
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	<i>Coleta das amostras dos óleos do derramamento, da bacia Sergipe-Alagoas (SE-AL) e do tambor</i>	38
3.2	<i>Preparo das amostras dos óleos do derramamento</i>	39
3.3	<i>Separação das frações SARA dos óleos investigados</i>	40
3.4	<i>Aquisição dos dados de GC/MS e GC/MS/MS para os óleos investigados</i>	40
3.4.1	<i>Obtenção dos dados por MRM e SIM para os óleos investigados</i>	41
3.5	<i>Determinação do teor total de enxofre por Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) dos óleos investigados</i>	42
3.6	<i>Aquisição dos dados de H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para os óleos investigados</i>	42
3.7	<i>Análise multivariada dos dados de GC/MS-SIM, GC/MS/MS-MRM e UHRMS</i>	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	<i>Avaliação de similaridade das amostras do derramamento no litoral sergipano</i>	45
4.1.1	<i>Perfis cromatográficos de n-alcenos para amostras de óleo do derramamento e biomarcadores por GC/MS</i>	45
4.1.2	<i>Identificação de esteranos e terpanos por GC/MS-SIM, e distribuição das razões de biomarcadores para as amostras dos óleos analisados</i>	48
4.2	<i>Avaliação de similaridade entre amostras do derramamento e óleos suspeitos</i>	52

4.2.1	<i>Comparação dos dados obtidos por GC/MS-RIC dos óleos do derramamento, tambor e produzidas em Sergipe-Alagoas.....</i>	53
4.2.2	<i>Comparação dos perfis de biomarcadores e razões de biomarcadores por GC/MS-SIM</i>	57
4.2.3	<i>Tratamento multivariado para análise de similaridade a partir das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM.....</i>	62
4.2.4	<i>Tratamento univariado para análises de similaridade a partir das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM.....</i>	66
4.3	<i>Avaliação de similaridade entre as amostras do derramamento, dos óleos da bacia SE-AL e do tambor por GC/MS/MS-MRM</i>	68
4.3.1	<i>Tratamento multivariado para análise de similaridade por GC/MS/MS-MRM</i>	68
4.3.2	<i>Comparação dos perfis de esteranos e hopanos obtidos por GC/MS/MS-MRM para os óleos do tambor e do derramamento</i>	74
4.3.3	<i>Comparação univariada das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS/MS-MRM</i>	78
4.4	<i>Caracterização e comparação das amostras por EDX</i>	82
4.5	<i>Avaliação de similaridade/dissimilaridade das amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.....</i>	84
4.5.1	<i>Tratamento multivariado para análise de similaridade entre as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento a partir dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.....</i>	86
4.5.2	<i>Caracterização das amostras do derramamento e dos óleos da bacia SE-AL, do tambor via análise gráfica dos dados obtidos por UHRMS</i>	89
5	CONCLUSÃO	96
	ARTIGOS PUBLICADOS	97

REFERÊNCIAS.....	99
ANEXOS	113
APÊNDICES	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de estruturas pertencentes à classe de hidrocarbonetos.....	7
Figura 2. Representação do hopano C ₃₅ formado a partir da decomposição do C ₃₅ bacteriohopanotetrol.....	12
Figura 3. Fontes biológicas e estruturas dos esteranos C ₂₉ e C ₂₇	14
Figura 4. Proposta de fracionamento SARA adaptada de Castiblanco <i>et al.</i> (2021).	17
Figura 5. Composição de óleos brutos com base na distribuição das frações de saturados, aromáticos e compostos polares (resinas + asfaltenos). .	18
Figura 6. Organização esquemática de espectrômetro de massas.	21
Figura 7. Espectro de massas obtido por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para uma amostra de resina.	23
Figura 8. Diagrama de Kendrick gerado a partir dados de FTMS para a classe N ₁ de uma amostra de resina (eixo Y referente aos valores dos KDM; eixo X referente aos valores das NKM).	26
Figura 9. Diagrama de DBE vs. Número de Carbono obtido via H-ESI(-)-FT-Orbitrap MS para monitoramento da evolução da classe N ₁ de óleo sergipano submetido a intemperismo artificial.	27
Figura 10. Diagrama de van Krevelen obtido via H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para monitoramento da evolução dos compostos oxigenados neutros e básicos de óleo sergipano submetido a intemperismo artificial.	30
Figura 11. Dendrograma ilustrando agrupamento hierárquico.	33
Figura 12. Aspecto físico das amostras coletadas nas praias de Sergipe.....	39
Figura 13. Perfil das amostras dos óleos do derramamento obtidos por GC/MS-RIC (íon <i>m/z</i> 85).	46
Figura 14. Presença de 25-norhopanos nas amostras do derramamento (representado pela Sample 3).	47
Figura 15. Perfis dos biomarcadores hopanos (<i>m/z</i> 191) e esteranos (<i>m/z</i> 217) obtidos por GC/MS-SIM dos óleos do derramamento.	50
Figura 16. Comparação dos GC/MS-RIC dos óleos da bacia SE-AL (Samples A, B, C, D) e do tambor (Sample T) com o derramado.	54

Figura 17. Avaliação do perfil de metilfenantrenos e 2-metilantraceno para as amostras do derramamento, tambor e da bacia SE-AL obtido por GC/MS-SIM.	56
Figura 18. Perfil cromatográfico dos biomarcadores tipo hopanos (m/z 191) das amostras do derramamento (Sample 2) e de óleos da bacia SE-AL (Samples A, B, C, D) e do tambor (Sample T).....	58
Figura 19. Perfil cromatográfico dos biomarcadores tipo esteranos (m/z 217) das amostras do derramamento (Sample 2), dos óleos da bacia SE-AL (Samples A, B, C e D) e do tambor (Sample T).....	59
Figura 20. Diagrama ternário de esteranos regulares para as amostras derramada, dos óleos da bacia SE-AL e do tambor.	60
Figura 21. Gráfico de escores para o conjunto de razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM para os íons m/z 191 e 217.	63
Figura 22. Distribuição de pesos da PC1 para os biomarcadores esteranos e hopanos obtidos por GC/MS-SIM.....	64
Figura 23. Gráfico de pesos da PC2 para os biomarcadores esteranos e terpanos obtidos por GC/MS-SIM.....	65
Figura 24. Gráfico de escores obtido a partir das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS/MS-MRM para os biomarcadores terpanos e esteranos.....	70
Figura 25. Gráfico de pesos da PC 1 para razões de biomarcadores obtidas via MRM.....	71
Figura 26. Gráfico de pesos da PC 2 para razões de biomarcadores obtidas via MRM.....	73
Figura 27. Cromatogramas expandidos dos esteranos representativos para as amostras do derramamento (Sample 2) e do tambor (Sample T).	76
Figura 28. Cromatogramas expandidos dos hopanos representativos para as amostras do derramamento (Sample 2) e do tambor (Sample T).	77
Figura 29. $V/(V+Ni)$ versus teor de enxofre (% em massa). Nota: I (óxico terrestre), II (marinho-terrestre hipóxico-subóxico) e III (anóxico marinho carbonato).	84
Figura 30. Dendrograma obtido a partir das fórmulas moleculares atribuídas para as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento	87

Figura 31. Gráfico de escores elaborado a partir das distribuições de NKM das amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento obtidas por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.	88
Figura 32. Histograma de classes das amostras do derramamento obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.	90
Figura 33. Histograma de classes das amostras da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento (representadas pela Sample 3) obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.	91
Figura 34. Comparação dos diagramas de Kendrick entre as amostras de óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações detalhadas sobre óleos do derramamento, amostras dos óleos da bacia SE-AL e do tambor de óleos-fonte.	38
Tabela 2. Transições (íons precursores e íons produtos) usados na investigação e identificação de esteranos e hopanos no modo MRM.	41
Tabela 3. Tratamento univariado via DPR (%) para o conjunto de razões de biomarcadores obtidos por GC/MS-SIM para os óleos do derrame no litoral nordestino.	51
Tabela 4. Razões de biomarcadores obtidas via GC/MS-SIM utilizando os íons m/z 191 e 217.	61
Tabela 5. Avaliação univariada das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM.	67
Tabela 6. Avaliação univariada das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS/MS-MRM.	69
Tabela 7. Comparação entre as amostras do derramamento e do tambor por MRM.	79
Tabela 8. Faixas de concentração das razões V, Ni (ppm), S (% em massa), V/Ni e V/(Ni+V) nos óleos estudados.	83
Tabela 9. Controle de qualidade dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento	85

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Tambor encontrado no litoral sergipano em setembro de 2019. ..	113
ANEXO 2. Cromatograma do íon m/z 191 descrito por Stout (2006)[13].	114
ANEXO 3. Cromatograma dos íons m/z 217 e 218 descrito por Stout (2006)[13].	115
ANEXO 4. Cromatogramas expandidos das amostras de petróleo no modo MRM com sua identificação por números (ver Tabela 5 em ANEXO) para as transições correspondente à família de esteranos. Fonte: Prata (2016)[46].	116
ANEXO 5. Cromatogramas expandidos correspondentes aos terpanos pentacíclicos (Hopanos) representativos para as amostras da bacia de Sergipe/Alagoas (TM2) característico de amostras marinhas e C10 representando amostras da bacia de Campos, Miranga e Potiguar. Fonte: Prata (2016)[46].	117

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C ₂₇	118
APÊNDICE 2. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C ₂₈	118
APÊNDICE 3. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C ₂₉	119
APÊNDICE 4. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C ₃₀	119
APÊNDICE 5. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C ₂₇	120
APÊNDICE 6. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C ₂₉	120
APÊNDICE 7. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C ₃₀	121
APÊNDICE 8. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C ₃₁	121
APÊNDICE 9. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C ₂₇	122
APÊNDICE 10. Comparativo das razões de biomarcadores obtidas para os óleos dos tambores por C/MS/MS-MRM.	122
APÊNDICE 11. Relação de compostos esteranos identificados pelo GC/MS-SIM.	123

APÊNDICE 12. Cromatograma obtido por GC/MS monitorando o íon de m/z 217.	124
APÊNDICE 13. Relação de compostos terpanos identificados pelo GC/MS-SIM.	125
APÊNDICE 14. Cromatograma obtido por GC/MS monitorando o íon de m/z 191.	126
APÊNDICE 15. Relação de compostos biomarcadores esteranos e hopanos identificados pelo GC/MS/MS-MRM.....	127
APÊNDICE 16. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{27} (m/z 372 > m/z 217).	128
APÊNDICE 17. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{28} (m/z 386 > m/z 217).	129
APÊNDICE 18. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{29} (m/z 400 > m/z 217).	130
APÊNDICE 19. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{30} (m/z 414 > m/z 217).	131
APÊNDICE 20. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos metilesteranos C_{27} (m/z 414 > m/z 231).....	132
APÊNDICE 21. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C_{27} (m/z 370 > m/z 191).	133
APÊNDICE 22. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C_{29} (m/z 398 > m/z 191).	134
APÊNDICE 23. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C_{30} (m/z 412 > m/z 191).	135
APÊNDICE 24. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C_{31} (m/z 426 > m/z 191).	136
APÊNDICE 25. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C_{32} (m/z 440 > m/z 191)	137

*Ao meu maior motivador, o homem
que me ensinou tudo o que sei e me
mostrou que, antes de tudo,
precisamos ser fortes. Meu querido,
saudoso e amado pai, Jussileno
Carregosa Santos (In memoriam).*

“Sempre haverá mais ignorantes que sabedores enquanto a ignorância for gratuita e a ciência dispendiosa.”

Marquês de Maricá

AGRADECIMENTOS

Agradeço as instituições de fomento CAPES, CNPq e FAPESSE que financiaram todo o projeto, bem como ao CLQM por ter propiciado um ambiente tecnológico suficientemente capaz para execução da pesquisa. Agradeço aos membros da banca de qualificação e defesa do doutorado por todas as contribuições que resultaram na melhoria deste material. Ao meu coorientador, muito obrigado pela oportunidade de trabalhar no caso envolvendo as amostras de Pernambuco, seu suporte proveu muitos frutos, e por isso obrigado. Aos meus amigos e colegas de laboratório, serei eternamente grato por toda a contribuição que vocês tiveram nesse intervalo de tempo, em especial a Antônia Gois, Mirele de Sá, Tarcísio Santos e Wenes da Silva, que participaram ativamente na aquisição, tratamento e discussão dos dados contidos neste material. Muitas vezes me faltou força pra continuar, mas em vocês eu encontrava a luz para seguir em frente, por isso deixo aqui meu muitíssimo obrigado. Ao meu orientador, não tenho palavras para agradecer o tanto que você me motivou a evoluir enquanto pessoa e profissional. Minha admiração e respeito pelo seu trabalho e a forma como você conduz o laboratório e seus orientandos é gigante. Em todas as inúmeras vezes em que cheguei desesperado e sem respostas, você agiu como bússola e apontou o Norte para que eu pudesse chegar até aqui. A você minha eterna gratidão. Aos meus familiares e amigos, sem o apoio afetivo, e por vezes, financeiro que vocês me deram ao longo desses 4 anos como bolsista de doutorado num país que não valoriza a ciência e o seus cientistas, meu sincero e singelo agradecimento. Por fim, e mais importante, gostaria de agradecer ao meu Deus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-) ou (+)	Modo Negativo ou Modo Positivo
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i>
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais, do inglês <i>American Society for Testing and Materials</i>
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos.
C₂₇R	C ₂₇ 20R– 5 α (H), 14 α (H),17 α (H)-colesterano
C₂₇S	C ₂₇ 20S– 5 α (H), 14 α (H),17 α (H)-colesterano
C₂₇$\alpha\alpha$R	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-colestano (20R)
C₂₇$\alpha\alpha$S	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-colestano (20S)
C₂₇$\beta\beta$R	5 α (H),14 β (H), 17 β (H)-colestano (20R)
C₂₇$\beta\beta$S	5 α (H),14 β (H), 17 β (H)-colestano (20S)
C₂₇$\beta\beta$S	C ₂₇ 20S– 5 α (H), 14 β (H),17 β (H)-colesterano
C₂₈R	C ₂₈ 20R– 5 α (H), 14 α (H),17 α (H)-ergosterano
C₂₈S	C ₂₈ 20S– 5 α (H), 14 α (H),17 α (H)-ergosterano
C₂₈$\alpha\alpha$R	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-ergostano (20R)
C₂₈$\alpha\alpha$S	5 α (H),14 β (H), 17 β (H)-ergostano (20S)
C₂₈$\beta\beta$R	5 α (H),14 β (H), 17 β (H)-ergostano (20R)
C₂₈$\beta\beta$R	C ₂₈ 20R– 5 α (H), 14 β (H),17 β (H)-ergosterano
C₂₈$\beta\beta$S	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-ergostano(20S)
C₂₈$\beta\beta$S	C ₂₈ 20S– 5 α (H), 14 β (H),17 β (H)-ergosterano
C₂₉R	C ₂₉ 20R–5 α (H),14 α (H),17 α (H)-estigmasterano
C₂₉S	C ₂₉ 20S– 5 α (H), 14 α (H),17 α (H)-estigmasterano
C₂₉$\alpha\alpha$R	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-estigmastano (20R)
C₂₉$\alpha\alpha$S	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-estigmastano (20S)
C₂₉$\beta\beta$R	5 α (H),14 β (H), 17 β (H)-estigmastano (20R)
C₂₉$\beta\beta$R	C ₂₉ 20R– 5 α (H), 14 β (H),17 β (H)-estigmasterano
C₂₉$\beta\beta$S	5 α (H),14 β (H), 17 β (H)-estigmastano (20S)
C₂₉$\beta\beta$S	C ₂₉ 20S–5 α (H),14 β (H),17 β (H)-estigmasterano

C30Diahop	C3017 α (H)-diahopano
CCA	Cromatografia em Coluna Aberta
CI	Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CLQM	Centro de Laboratórios de Química Multiusuários
CPI	Índice Preferencial de Carbono, do inglês <i>Carbon Preference index</i>
DIA₂₇$\alpha\beta$R	13 α (H),17 β (H)-diacolestano (20R)
DIA₂₇$\alpha\beta$R	C27 20R– 13 α (H),17 β (H)-diaesterano
DIA₂₇$\alpha\beta$S	13 α (H),17 β (H)-diacolestano (20S)
DIA₂₇$\alpha\beta$S	C27 20S– 13 α (H),17 β (H)-diaesterano
DIA₂₇$\beta\alpha$R	13 β (H),17 α (H)-diacolestano (20R)
DIA₂₇$\beta\alpha$R	C27 20R– 13 β (H),17 α (H)-diaesterano
DIA₂₇$\beta\alpha$S	13 β (H),17 α (H)-diacolestano (20S)
DIA₂₇$\beta\alpha$S	C27 20S– 13 β (H),17 α (H)-diaesterano
DIA₂₈$\alpha\beta$R	13 α (H),17 β (H)-diaergostano (20R)
DIA₂₈$\alpha\beta$S	13 α (H),17 β (H)-diaergostano (20S)
DIA₂₈$\beta\alpha$R	13 β (H),17 α (H)-diaergostano (20R)
DIA₂₈$\beta\alpha$S	13 β (H),17 α (H)-diaergostano (20S)
DIA₂₉$\beta\alpha$R	13 β (H),17 α (H)-diaestimagtano (20R)
DIA₂₉$\beta\alpha$S	13 β (H),17 α (H)-diaestimagtano (20S)
DA	Diferença Absoluta
DBE	Equivalente de Dupla Ligação, do inglês <i>Double-Bond Equivalent</i> .
DC	Diferença Crítica
DCM	Diclorometano
DPR	Desvio Padrão Relativo
DP_r	Desvio Padrão da Repetibilidade
EDX	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X, do inglês <i>Energy-Dispersive X-ray spectroscopy</i>
EI	Ionização por Elétrons, do inglês <i>Electron Impact</i>
ESI	Ionização por Eletrospray, do inglês <i>Electrospray ionization</i>

FT-ICR MS	Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>
FT-MS	Espectrometria de Massas com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Mass Spectrometry</i>
FT-Orbitrap MS	Espectrometria de Massas por Orbitrap com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Orbitrap Mass Spectrometry</i>
FWHM	Largura do pico à metade de sua altura, do inglês <i>Full Width at Half-Maximum</i>
GAM	Gamacerano
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
GC/MS/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas operando no modo sequencial, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Sequential Mass Spectrometry</i>
GC/MS-SIM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas operando no modo de monitoramento de íon selecionado, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry operating in Selective Ion Monitoring</i> .
GC/qMS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com analisador de íons tipo quadrupolo, do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry using quadrupole as ion analyzer</i> .
GC×GC/MS/MS-MRM	Cromatografia Gasosa bidimensional abrangente acoplada à Espectrometria de Massas sequencial operando no modo de monitoramento de reações

múltiplas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Sequential Mass Spectrometry operating in Multiple Reaction Monitoring*.

GC-FID	Cromatografia Gasosa com detecção por ionização em chama, do inglês <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i>
H28	17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano
H29	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano (C29Hop)
H29	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano
H30	17 α (H),21 β (H)-hopano (C30Hop)
H30	17 α (H),21 β (H)-hopano
H31R	17 α (H),21 β (H),-homohopano (22R)
H31R	22R-17 α (H),21 β (H)-30-homohopano
H31S	17 α (H),21 β (H),-homohopano (22S)
H31S	22S-17 α (H),21 β (H)-30-homohopano
H32R	17 α (H),21 β (H)-bishomohopano (22R)
H32R	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31-bishomohopano
H32S	17 α (H),21 β (H)-bishomohopano (22S)
H32S	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31-bishomohopano
H33R	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32-trishomohopano
H33S	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32-trishomohopano
H34R	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33-tetrakishomohopano
H34S	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33-tetrakishomohopano
H35S	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33,34-pentakishomohopano
HCA	Análise por Agrupamento Hierárquico, do inglês <i>Hierarchical Clustering Analysis</i>
H-ESI	Ionização por Eletronebulização Aquecida, do inglês <i>Heated-Electrospray ionization</i>
HMA s	Hidrocarbonetos Monocíclicos Aromáticos
HPA s	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ISO30R	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-24-isopropilcolestano (20R)
ISO30S	5 α (H),14 α (H), 17 α (H)-24-isopropilcolestano (20S)
ITOPF	Federação Internacional sobre a Poluição de Proprietários de Navio-petroleiro, do inglês International Tanker Owners Pollution Federation
KMD	Defeito de massa de Kendrick, do inglês <i>Kendrick Mass Defect</i>
M29	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano (norMoretano)
MOR30	17 β (H),21 α (H)-hopano (Moretano)
m/m	Relação massa/massa
m/z	Relação massa/carga
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
NKM	Massa nominal de Kendrick, do inglês <i>Nominal Kendrick Mass</i>
NOR30	17 α (H)-30-nor-29-homohopano
OEP	Preferência de Hidrocarbonetos Ímpares sobre Pares, do inglês <i>Odd-to-Even Preference</i>
OL	18 α (H)-oleanane + 18 β (H)-oleanane
PC	Componente Principal, do inglês <i>Principal Component</i>
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components Analysis</i>
Ph	Fitano
Pr	Pristano
RB	Razão de Biomarcadores
RIC	Cromatograma Reconstruído do Íon, do inglês <i>Reconstructed Ion Chromatogram</i>
S/N	Relação Sinal/Ruído, do inglês <i>Signal/Noise</i>
SARA	Frações de Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos
SCAN	Modo de varredura completa, do inglês <i>Full Scanning</i> .
SIM	Monitoramento de Íon Seleccionado, do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i>

SIR	Registro de Íon Selecionado, do inglês <i>Selected Ion Recording</i>
TICC	Cromatograma da Corrente Total de Íons, do inglês <i>Total Ion Current Chromatogram</i>
Tm	17 α (H),21 β (H)-22,29,30-trisnorhopano
Tol	Tolueno
T_R	Tempo de retenção
TR19	C19 terpano tricíclico
TR20	C20 terpano tricíclico
TR21	C21 terpano tricíclico
TR22	C22 terpano tricíclico
TR23	C23 terpano tricíclico
TR24	C24 terpano tricíclico
TR25	C25 terpano tricíclico
TR28A	C28 terpano tricíclico (a)
TR28B	C28 terpano tricíclico (b)
TR29A	C29 terpano tricíclico (a)
TR29B	C29 terpano tricíclico (b)
Ts	18 α (H),21 β (H)-22,29,30-trisnorhopano
UCM	Mistura Complexa Não Resolvida, do inglês <i>Unresolved Complex Mixture</i> .
UHRMS	Espectrometria de Massas de Ultra-Alta Resolução, do inglês <i>Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry</i>

1 INTRODUÇÃO

Desde a primeira aparição de manchas de óleo nas praias da região nordeste do Brasil, em 30 de agosto de 2019, até 19 de março de 2020, cerca de 1009 localidades (distância mínima de 1 km entre elas) foram registradas como afetadas pelo óleo[1]. Este incidente, que foi o maior desastre ambiental causado por derramamento de óleo na história do país, causou inúmeros danos aos ecossistemas e gerou impactos socioeconômicos nas áreas afetadas [2]. Estudos ambientais e relatórios sobre as consequências para a biodiversidade marinha e para as populações locais deixaram clara a extensão dos danos, bem como a falta de informações sobre a origem do material [3,4].

Os derramamentos de óleo configuram-se um problema global, por isso é importante identificar suas fontes. Dentro de um contexto investigativo, ou forense, uma série de análises físicas e químicas são utilizadas na caracterização das amostras envolvidas para determinar a natureza do produto e sugerir a provável origem do óleo do derramamento [5]. Dentre o conjunto de análises adotadas para a caracterização de petróleo e derivados, as análises químicas baseadas em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) são as mais comumente utilizadas. A partir dessa análise, inicia-se a busca por marcadores biológicos capazes de determinar as impressões digitais químicas dos óleos investigados, comumente chamados de *fingerprint* ou perfil da amostra [6].

Os biomarcadores, como também são chamados, encontrados em óleos, rochas e sedimentos brutos são estáveis e mostram pouca ou nenhuma alteração nas estruturas de seus precursores biogênicos, por exemplo: os terpenoides, esteróis e esteroides [7]. Eles são chamados de marcadores biológicos, pois, carregam consigo informações acerca da formação do petróleo, por exemplo: contribuição de matéria orgânica, era geológica de formação, estado de evolução térmica, paleoambiente de deposição e, também, o grau de biodegradação [7]. De posse destes dados, o químico forense de petróleo inicia a etapa de rastreabilidade do óleo investigado. Através da comparação dos *perfis das amostras* destes compostos, tais como os das classes de biomarcadores terpanos e esteranos, bem como um conjunto de relações destes biomarcadores, ele demonstra quaisquer ligações ou relações entre as amostras

do óleo do derramamento com as possíveis amostras de óleo suspeitas de estarem envolvidas no caso. Como esses dados podem ser importantes para determinar a fonte do derramamento e/ou a origem geoquímica do óleo, ter métodos para caracterizar, identificar e atribuir fontes de forma inequívoca é a chave para resistir ao escrutínio legal no tribunal [8–10]

Para este fim, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador de íons tipo quadrupolo (GC/qMS) tem sido uma ferramenta eficaz, que é comumente usada em dois diferentes métodos, a varredura completa (SCAN) e o monitoramento de íon selecionado (SIM) para a separação e identificação de hidrocarbonetos de petróleo [11,12]. Contudo, observa-se que o modo SIM apresenta algumas limitações relacionadas à sensibilidade e seletividade. Han et al. (2020) investigaram o desempenho dos modos de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM), SIM e SCAN para a quantificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes em amostras de óleos, o que revelou a superioridade do modo MRM para este fim, em comparação com outros modos de aquisição [13].

Recentemente, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas operando em modo sequencial (GC/MS/MS) vem sendo empregada para desenvolver métodos mais seletivos e sensíveis para análise de biomarcadores de petróleo, como HPAs, terpanos e esteranos [13,14]. Na análise por GC/MS/MS, o uso do modo de aquisição de MRM proporciona alta seletividade, permitindo a análise precisa de um grande número de transições com diferentes relações de relação massa/carga (m/z). Além disso, o modo MRM reduz problemas relacionados a picos cromatográficos interferentes e melhora a relação sinal/ruído (S/N), em comparação com o modo SIM, que é especialmente importante em análises de misturas naturais complexas, como óleos brutos sob investigação forense de derramamentos de óleo [11,12,14].

Lourenço et al. (2020), em um estudo sobre o derramamento que atingiu a costa brasileira em 2019, utilizando a cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) e GC/MS (operando nos modos SIM e SCAN) analisaram 11 amostras de manchas de óleo coletadas em diferentes praias em setembro de 2019. Os resultados para a identificação de biomarcadores e suas razões de biomarcadores indicaram um padrão de similaridade entre 10 dessas

11 amostras [15]. De acordo com a recente publicação de Zacharias, Gama e Fornaro (2021), as investigações e estudos publicados indicaram duas hipóteses sobre a procedência dos óleos do derramamento na costa brasileira: (a) um navio não identificado derramando petróleo no oceano a 700 km da costa brasileira; (b) um lento vazamento de óleo de um naufrágio antigo ou novo [16]. Outros autores divulgaram contribuições que apontam para a evidência das características do óleo dos campos petrolíferos venezuelanos [15,17].

Apesar da divulgação da provável origem venezuelana do material deste derramamento, muitas questões ainda permanecem sem respostas com relação a este desastre. Há uma falta de informações específicas sobre a origem, como a localização da bacia produtora da qual este óleo foi inicialmente extraído. Além disso, permanecem dúvidas a respeito das semelhanças do conteúdo oleaginoso dos materiais densos e viscosos encontrados nos 1009 locais nos onze estados brasileiros afetados, e se eles eram realmente do mesmo derramamento [18,19].

Sabendo-se que os derramamentos de óleos são comuns, e muitas vezes inevitáveis nos processos industriais, é necessário avaliar a possível ocorrência de derramamentos simultâneos durante o mesmo período, a partir de 30 de agosto de 2019. Devido à proximidade da bacia de Sergipe-Alagoas (SE-AL) com as costas dos estados da Bahia, Alagoas, Pernambuco e Sergipe, descrita como a mais afetada em termos de volumes de óleo que aportaram às praias [20], foi sugerido que os óleos desta bacia poderiam ter relação com o desastre. Além disso, dois tambores foram encontrados no mesmo local e período dos óleos do derramamento, um no Rio Grande do Norte e outro em Sergipe, no entanto, após caracterização e comparação via método padrão para análise de óleos derramados proposto pelo Comitê Normativo Europeu (CEN *method*), ambos foram descartados das investigações.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi propor um método multicamada (em 3 níveis), com maior seletividade devido ao uso do modo MRM para caracterização dos biomarcadores apolares; e abrangente mediante a aplicação da UHRMS para caracterização e comparação da fração polar das amostras. Desenvolvendo, assim, um método capaz de determinar com maior nível de confiabilidade as relações de similaridade/dissimilaridade entre as amostras

envolvidas no derramamento de óleo no estado de Sergipe em 2019-2020. Para isso, os perfis de *n*-alcanos por GC/MS foram avaliados a partir da reconstrução do cromatograma para íon *m/z* 85 (Nível 1); as razões de biomarcadores foram determinadas a partir da análise dos biomarcadores pertencentes às classes de esteranos e hopanos por GC/MS/MS-MRM com análises estatísticas univariadas e multivariadas (Nível 2); e a aplicabilidade da UHRMS para correlação óleo-óleo mediante aplicação de análise multivariada tipo PCA (Nível 3) foi estudada.

1.1 Formação do petróleo

O petróleo, também chamado de óleo bruto, varia em termos de coloração, odor e densidade conforme sua origem. No entanto, de forma geral, é definido como sendo uma substância oleosa, inflamável, com cheiro peculiar e coloração entre preto e castanho [21]. Adicionalmente, por definição, os fluidos ricos em hidrocarbonetos (gases e líquidos) produzidos a partir do querogênio durante a catagênese e metagênese são coletivamente denominados de petróleo [22].

Acerca da formação do petróleo, há duas correntes sobre a origem do petróleo: a abiogênica (inorgânica) e a biogênica (orgânica). A teoria de formação associada à corrente inorgânica afirma, de modo geral, que o petróleo é formado a partir de uma reserva de metano na região do manto, onde, sob condições adequadas de pressão e temperatura, são formados os hidrocarbonetos de massa molecular mais elevada que migram para níveis mais próximos da crosta terrestre [23]. Há duas teorias que emergiram no último século que sustentam a formação abiogênica do petróleo, a teoria Russo-Ucraniana e a Teoria de Thomas Gold [24,25].

A primeira explica que os compostos de hidrocarbonetos são gerados no manto da Terra e migram através das falhas profundas para a crosta terrestre. Lá são formados depósitos de petróleo e gás em qualquer tipo de rocha e em qualquer tipo de posição estrutural, e, portanto, não seria uma mistura de natureza fóssil, uma vez que não seria oriundo da deposição de organismos para a sua formação [24]. A segunda está relacionada com a origem do metano natural, tendo em vista as evidências da prevalência de gases de

hidrocarbonetos vazando pela terra, e especialmente em vista do fato de que o grande interior do planeta pode ser uma fonte de tais hidrocarbonetos [26]. Em contrapartida, a corrente da teoria orgânica afirma que o petróleo é formado a partir de um histórico e longo caminho, onde há a produção, acúmulo e acomodação da matéria orgânica. E esse material acumulado é geologicamente processado em três etapas, nomeadas diagênese, catagênese e metagênese [27].

O primeiro processo inicia-se nos sedimentos recém depositados, onde a atividade microbiológica é o principal agente de transformação. Esse processo termina com a formação do querogênio como produto final. O segundo processo deriva de um incremento de temperatura durante a sedimentação do material gerado. Com o aumento da temperatura inicia-se a degradação térmica, ou craqueamento térmico do querogênio, responsável pela produção da maioria dos hidrocarbonetos na forma líquida. No terceiro processo, é alcançada uma profundidade maior, deste modo, as condições de pressão e temperatura se elevam ainda mais, além disso, as rochas são expostas à influência do magma e dos efeitos hidrotérmicos. Assim, dá-se início ao ordenamento cristalino, onde o carvão produzido começa a ser transformado em meta-antracito e os constituintes do querogênio residual são convertidos em carbono grafite [22,28–30].

O petróleo é encontrado em um sistema que envolve: rocha geradora, caminho de migração primário e secundário, e reservatório. Consequentemente a composição química do petróleo depende do tipo da matéria orgânica da rocha geradora, da evolução térmica da rocha de origem, dos caminhos de migração primária e secundária e das alterações que ocorrem no reservatório. Portanto, os óleos originados de diferentes reservatórios de petróleo podem possuir características distintas, variando cor, viscosidade, odor, densidade e acidez [22,31,32].

1.2 Composição Química do Petróleo

Os produtos petrolíferos geralmente recebem nomes diferentes, como cortes de óleo bruto. Os principais produtos das refinarias de petróleo em ordem

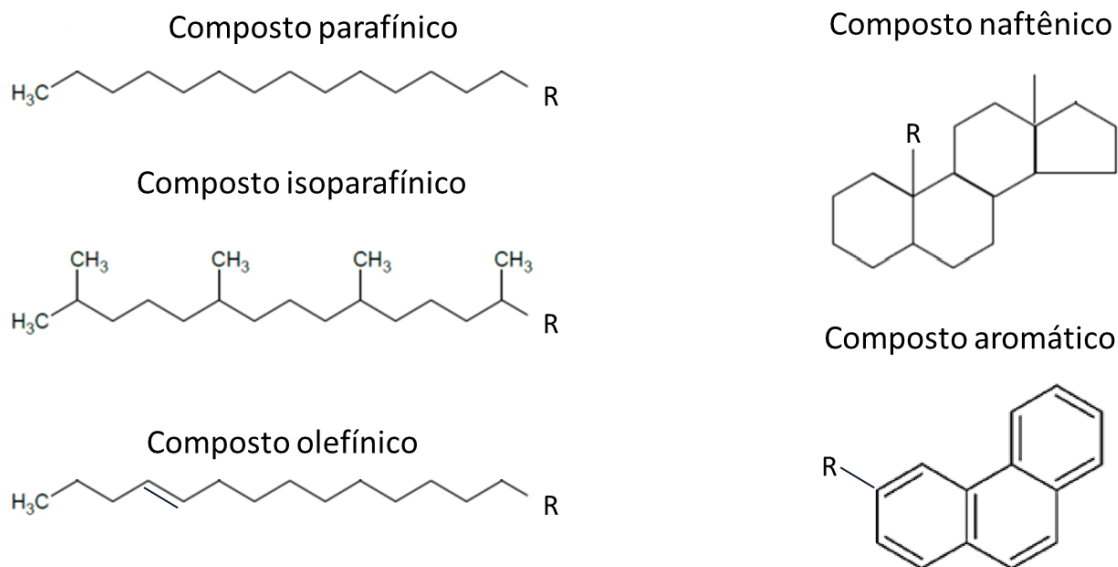
crescente de peso molecular são os seguintes: gases combustíveis leves, gás liquefeito de petróleo, gasolina, nafta, combustível para aviação e turbinas, querosene, óleo diesel, óleo lubrificante, óleos de motor, óleos cilíndricos, ceras, óleo combustível pesado, asfalto e coque [33]. Assim, o petróleo é uma mistura multicomponente de ocorrência natural. Sua maior parte é composta por hidrocarbonetos (alcanos, naftênicos e aromáticos), que variam entre 30% e 100% da composição do óleo. Os mais importantes entre os compostos do tipo não-hidrocarbonetos são pertencentes às classes das resinas e dos asfaltenos [28]. A sua composição química pode variar não apenas em relação ao local ou região, mas, também, de acordo com a profundidade em um mesmo poço. Diante da complexidade de sua composição, não existem dois óleos idênticos [21].

De modo geral, a composição elementar do petróleo é majoritariamente de carbono e hidrogênio, já os minoritários são: nitrogênio (0,1 - 2,0% *m/m*), enxofre (0,05–6,0% *m/m*) e oxigênio (0,05–1,5% *m/m*), além de traços de metais, como vanádio, níquel, ferro e cobre, presentes em partes por milhão. Observa-se, também, que o teor de carbono é relativamente constante (83,0 – 87,0% *m/m*), sendo os teores de hidrogênio e heteroátomos o que confere distinção entre os óleos [34].

1.2.1 Hidrocarbonetos

O petróleo é majoritariamente composto por hidrocarbonetos, os quais podem, de acordo com classificação PIONA, serem divididos em parafinas (*n*-alcanos), isoparafinas (*iso*-alcanos), olefinas (alcenos), naftênicos (cicloalcanos) e aromáticos [35]. Exemplos dessas classes de hidrocarbonetos estão apresentados na Erro! Fonte de referência não encontrada..

Figura 1. Representação de estruturas pertencentes à classe de hidrocarbonetos.



Fonte: Própria.

As parafinas são hidrocarbonetos alifáticos acíclicos, não ramificados, e ocorrem em proporções variáveis na maioria dos óleos brutos. Um óleo considerado parafínico contém entre 20 e 50% em massa de *n*-parafinas na fração gasóleo [34]. Isoparafinas se diferem das *n*-parafinas devido à presença de ramificações em sua constituição. Sua ocorrência se dá ao longo do intervalo de ebulição das frações do óleo bruto e são encontradas na fração da gasolina. Como há uma imensa variedade, devido à possibilidade de ocorrência de diversos isômeros, não existe em abundância uma única espécie [30]

As olefinas são hidrocarbonetos insaturados contendo uma ou mais ligações duplas entre os carbonos [34]. Devido à sua baixa estabilidade oxidativa, a ocorrência desta classe no óleo bruto é baixa. Contudo, sua importância para a indústria petroquímica e de polímeros cresceu nos últimos 40 anos devido à metátese de olefinas, uma reação orgânica em que é possível redistribuir fragmentos de alcenos com pouca geração de subprodutos indesejáveis [36].

Os naftênicos são cicloalcanos compostos por cinco ou seis átomos de carbono. Esta classe pode chegar até 60% da composição total de hidrocarbonetos totais nos óleos brutos [21]. Os naftenos mono e bicíclicos são geralmente os principais tipos de cicloparafinas nas frações inferiores de

ebulição do petróleo com ponto de ebulição e massa molecular maiores com a presença de ramificações parafínicas [34].

A classe de aromáticos é caracterizada pela presença de um ou mais núcleos aromáticos em sua estrutura, podendo estar ligados com outros núcleos aromáticos ou cadeias parafínicas [34]. Eles são divididos em hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos (HMAs), em que estão presentes o benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos (BTEX), conhecidos por serem altamente carcinogênicos, e os HPAs, como naftaleno, fenantreno e antraceno [37].

1.2.2 Não-hidrocarbonetos

Embora o óleo bruto seja majoritariamente constituído por hidrocarbonetos, os não-hidrocarbonetos (5 – 15%) formam uma classe importante de compostos, na qual encontram-se os compostos nitrogenados, sulfurados e oxigenados, além de concentrações traços de organometálicos. Esta classe, embora minoritária, contribui bastante para vários problemas encontrados na indústria do petróleo, como corrosão, formação de emulsões e coque. Além disso, eles também podem servir como importantes biomarcadores, uma vez que a análise abrangente da composição química de compostos de alta massa molecular e de média a alta polaridade, contendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio (NSO), amplia a janela analítica para caracterização geoquímica das amostras de óleo bruto e seus derivados [38].

1.3 Biomarcadores

Entende-se por substâncias bioquímicas, ou biomoléculas, os compostos pertencentes aos grupos dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Nesse sentido, marcadores biológicos, denominados biomarcadores, são fósseis moleculares complexos derivados de substâncias bioquímicas, principalmente lipídios, cuja origem é associada a produtos naturais provenientes de diversas fontes, como: vegetais superiores, plânctons e bactérias [31]. Essas estruturas, mesmo após terem sofrido transformações químicas, preservaram seu esqueleto carbônico original. Para ser classificado como um biomarcador, o composto precisa ter

estrutura relacionada a organismos vivos, ocorrer em alta concentração no corpo de origem e não sofrer decomposição durante a formação do óleo [22,30].

De modo geral, a ocorrência dos biomarcadores se dá ao final da diagênese, onde o material orgânico biogênico nos sedimentos é degradado e reciclado por microrganismos ou majoritariamente convertido em material polimérico insolúvel (querogênio ou carvão marrom) [22]. Assim, os indicadores de fonte molecular mais úteis neste estágio de maturidade em sedimentos antigos são biomarcadores, que estão principalmente na forma de hidrocarbonetos. Algumas informações relacionadas à fonte são perdidas com o desaparecimento de grupos funcionais (incluindo ligações C=C) e sua estereoquímica associada [22,30].

No entanto, em hidrocarbonetos cíclicos, tanto alifáticos quanto aromáticos, o número de átomos de carbono e a posição dos substituintes no esqueleto de carbono básico ainda podem transmitir algumas informações relacionadas à fonte. Além disso, a configuração conferida biologicamente na maioria dos centros estereogênicos é conservada durante a diagênese, embora a isomerização ocorra com o aumento da evolução térmica [22,39]. Os biomarcadores representam apenas uma fração pequena e variável da biomassa original dos organismos contribuintes, portanto, apenas indicações de contribuições relativas são possíveis [6]. Além disso, a distribuição de biomarcadores pode ser distorcida pela sulfurização preferencial de alguns dos lipídios funcionalizados precursores durante a diagênese inicial [22].

Como os biomarcadores podem ser medidos em óleos brutos e extratos de rochas geradoras de óleo, eles fornecem uma maneira de correlacionar as duas. Assim, os geólogos podem usá-las para interpretar as características das rochas geradoras [31]. Várias informações podem ser extraídas mediante o uso dos biomarcadores presentes no petróleo, como condições ambientais durante sua deposição (diagênese), evolução térmica experimentada pela rocha ou óleo (catagênese), matéria orgânica na rocha-geradora (fonte), o grau de biodegradação, alguns aspectos da mineralogia das rochas de origem (litologia) e idade [31,40,41].

Dentre os mais variados tipos e classes de biomarcadores, os mais conhecidos e utilizados em análises geoquímicas são os *n*-alcanos e isoprenóides acíclicos (Pristano e Fitano), hopanos e os esteranos[42,43].

1.3.1 *n*-alcanos e isoprenóides

Os *n*-alcanos, ou *n*-parafinas, mais frequentemente investigados no meio ambiente são aqueles com cadeias que variam de *n*-C₁₂ a *n*-C₃₄, dependendo da disponibilidade dos mesmos na amostra. Esses compostos são produzidos por processos biológicos ou nos estágios iniciais da diagênese [31]. As principais fontes biológicas são: plantas terrestres, fitoplâncton, animais, bactérias, macroalgas e microalgas. Por exemplo, os *n*-alcanos oriundos de fitoplâncton marinho contêm maior abundância de parafinas contendo 15, 17, 19 e 21 átomos de carbono. Já os derivados de plantas superiores são constituídos predominantemente por cadeias de átomos de carbono ímpares variando de *n*-C₁₅–C₃₇, com maior predominância de C₂₇, C₂₉ e C₃₁ [22].

Além do uso como marcadores da presença de óleo do derramamento no ambiente, os hidrocarbonetos saturados também são empregados na identificação do tipo de óleo, como indicador de origem e no monitoramento de variações da composição química do óleo devido a intemperismo e/ou biodegradação, comumente avaliados por GC-FID ou GC/MS, mediante monitoramento da corrente total de íons (SCAN) ou pelo íon *m/z* 85, via monitoramento de íon selecionado (SIM) ou cromatograma reconstruído do íon (RIC) [5].

O indicador mais importante obtido a partir dos *n*-alcanos é o Índice Preferencial de Carbono (CPI), que fornece informações sobre a predominância de cadeias moleculares de números de carbono ímpares sobre pares (ou vice-versa). O CPI, proposto por Bray e Evans (1961), foi inicialmente definido a média dos índices obtidos dividindo a soma das alturas dos picos de *n*-alcanos de carbono ímpar entre 25 e 33 por dois denominadores diferentes (a soma dos alcanos com número de carbono par entre 24 e 32 ou entre 26 e 34)[31,44], conforme **Equação 1**.

$$CPI = \frac{1}{2} \left(\frac{C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33}}{C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32}} + \frac{C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31} + C_{33}}{C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32} + C_{34}} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

Alternativamente, Scalan e Smith (1970) propuseram a predominância ímpar-par (OEP) para contornar possíveis limitações matemáticas do CPI. O OEP pode incorporar qualquer faixa necessária de números de carbono, como, descrito na **Equação 2** [31],

$$OEP = \frac{\text{Área de } (C_{21}) + 6(\text{Área de } C_{23}) + \text{Área de } C_{25}}{4(\text{Área de } C_{22}) + 4(\text{Área de } C_{24})} \quad \text{Eq. 2}$$

Com relação aos isoprenóides acíclicos pristano e fitano, esses são oriundos principalmente da decomposição da clorofila. O pristano pode ser originado por oxidação e descarboxilação do fitol, enquanto o fitano pode se originar por desidratação e redução. Assim, pristano (C₁₉) e fitano (C₂₀) são geralmente os compostos isoparafínicos mais abundantes de toda a série de isoparafinas regulares do início ao fim de um cromatograma da corrente total de íons (TICC) para uma amostra de petróleo [31].

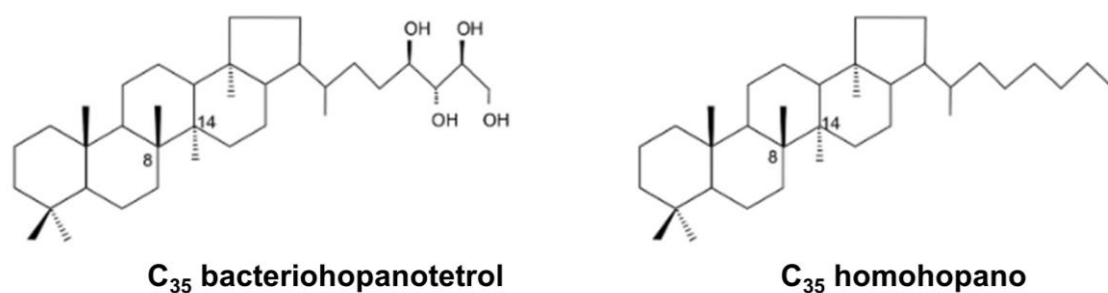
A relação pristano/fitano (Pr/Ph) menor que 1 indica deposição anóxica da rocha geradora, especialmente quando acompanhada de altos níveis de porfirina e enxofre, enquanto Pr/Ph maior que 1 indica deposição óxica. Além disso, valores altos de Pr/Ph (maiores que 3,0) indicam entrada de matéria orgânica terrígena em condições óxicas, enquanto valores baixos (menores que 0,8) tipificam ambientes anóxicos, comumente hipersalinos ou carbonáticos. A maioria dos óleos brutos tem valores de Pr/Ph dentro de uma faixa bastante estreita (0,8-3), que, embora ainda influenciada pelas condições redox de deposição, é influenciada por outros fatores. Além disso, pristano/fitano correlaciona-se fracamente com condições redox deposicionais para amostras de rocha e óleo dentro da janela de geração de óleo [31].

1.3.2 Hopanos

Os hopanos, também chamados de terpanos pentacíclicos ou triterpanos pentacíclicos, são compostos produzidos a partir da decomposição sofrida pelos bacteriohopanoides ao longo do processo geológico que conduz à formação do

petróleo. O produto dessa decomposição se organiza em estruturas naftênicas composta de quatro anéis de 6 membros e um anel de 5 membros, como mostrado na Erro! Fonte de referência não encontrada.. Geralmente, estruturas contendo entre 27 a 35 átomos de carbono são encontrados no petróleo. Contudo, alguns autores relataram ter encontrado estruturas contendo o mesmo esqueleto carbônico característicos dos hopanos em compostos com mais de 36 átomos de carbono em sua composição [45]. Esses bacteriohopanoides estão presentes na membrana celular de organismos procarióticos, sendo estes considerados precursores biológicos dos hopanos. As informações obtidas a partir dos terpanos pentacíclicos resultaram da análise das estruturas tridimensionais destes compostos [31].

Figura 2. Representação do hopano C₃₅ formado a partir da decomposição do C₃₅ bacteriohopanotetrol.



Fonte: Própria.

Os hopanos são analisados por GC/MS via monitoramento de íon selecionado de m/z 191 ou por GC/MS/MS via monitoramento de reações múltiplas (MRM) mediante acompanhamento de íons produto oriundos de íons precursores conhecidos. Por exemplo, os trisnoropanos C₂₇ são analisados mediante o monitoramento do íon produto m/z 191 oriundo da fragmentação do íon precursor m/z 370, ou seja, mediante o monitoramento da transição m/z 370 > 191. Outros hopanos analisados por MRM são: bisnoropanos C₂₈ (íon precursor m/z 384 e íon produto m/z 191), hopanos C₂₉ (íon precursor m/z 398 e íon produto m/z 191), hopanos C₃₀ (íon precursor m/z 412 e íon produto m/z 191) e homohopanos (íon precursor m/z 426 e íon produto m/z 191) [31,46].

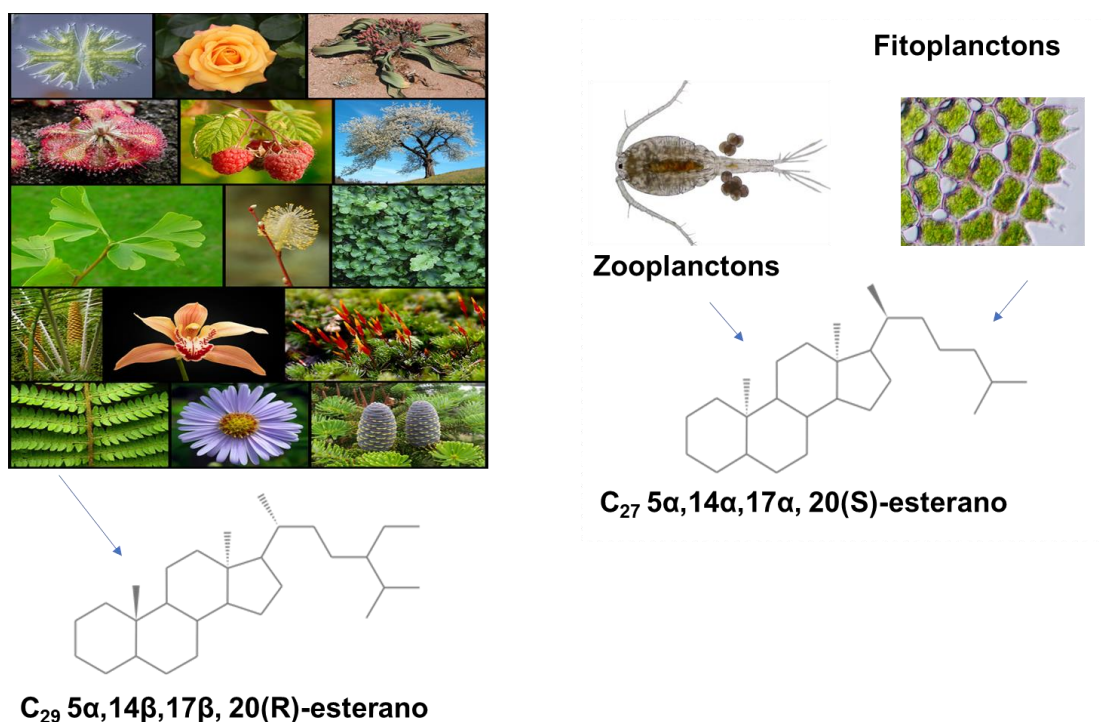
Como os hopanos possuem origem característica e variam de acordo com o grau de evolução térmica do óleo presente no sedimento, cada estereoisômero

das séries de homólogos dos hopanos carrega consigo um conjunto de informações específicas, como o oleanano e gamacerano, que indicam a era geológica em que houve deposição do sedimento para formação do óleo e a presença da coluna de estratificação de água durante o processo de sedimentação e, por consequência, o surgimento de hipersalinidade do meio, respectivamente. Outro exemplo são os homohopanos da série de homólogos de hopanos de C₃₁ a C₃₅, os quais podem ser utilizados para determinar o grau de evolução térmica do óleo, bem como a principal fonte de aporte de matéria orgânica sedimentada. Esses hopanos homólogos C₃₁–C₃₅ encontram-se em concentrações baixas. Entretanto, devido à boa resolução cromatográfica entre seus epímeros, o índice homohopano (somatório da área dos picos referentes aos C₃₅-homohopanos)/(somatório da área dos picos referentes aos C₃₁- a C₃₅-homohopanos), é frequentemente utilizado, com confiabilidade, como indicador da condição redox [5,6,47].

1.3.3 Esteranos

Os esteranos são oriundos da degradação dos esteróis provenientes de organismos eucarióticos na geosfera, principalmente plantas superiores e algas, como representado na **Figura 3**. Eles podem ser utilizados para investigação do paleoambiente deposicional onde foram depositados esses compostos, evolução térmica e biodegradação do óleo [5,37]. Devido à sua grande complexidade estereoquímica, os esteranos de C₂₇ a C₂₉ são importantes em estudos de correlações para análise de petróleo, bem como indicadores de fonte do óleo [31]. Além dos esteranos regulares, existem esteranos rearranjados (gerados por rearranjos catalíticos) e diasteranos (gerados por isomerização). Devido a essas reações, a avaliação da evolução térmica por biomarcadores tipo esteranos é possibilitada, pois, com o aumento da maturidade, ocorrem interconversões estereoquímicas entre os esteranos, como de 20R para 20S e de 28 14 α (H),17 α (H) para 14 β (H),17 β (H) até que um equilíbrio entre as abundâncias destes estereoisômeros seja estabelecido [6]

Figura 3. Fontes biológicas e estruturas dos esteranos C_{29} e C_{27} .



Fonte: Própria.

Todos esses produzem como fragmento principal o íon m/z 217. Dependendo das variações estereoquímicas nas posições C_{13} e C_{14} , pode ser formado como íon principal o fragmento com m/z 218, porém devido a quantidade de compostos que co-eluem usando um analisador de íons tipo quadrupolo, a identificação por meio de um analisador de íons do tipo triploquadrupolo no modo MRM faz-se necessário para uma maior confiabilidade na identificação [46]. As principais transições associadas aos esteranos são: esteranos C_{27} (íon precursor m/z 372 e íon produto m/z 217), esteranos C_{28} (íon precursor m/z 386 e íon produto m/z 217), esteranos C_{29} (íon precursor m/z 400 e íon produto m/z 217) e esteranos C_{30} (íon precursor m/z 414 e íon produto m/z 217) [31,46].

1.4 Derramamento de petróleo e técnicas de caracterização

Os derramamentos de petróleo podem ser classificados em dois tipos: reportados e não reportados. Os derrames reportados são aqueles que foram detectados e informados às autoridades competentes. Eles podem ocorrer por diversos motivos, como vazamentos em plataformas de perfuração, rupturas em

oleodutos ou navios petroleiros que sofrem acidentes. Esses derrames são registrados e as autoridades iniciam processos de limpeza e investigação para determinar as causas e responsabilidades [48,49].

Os derrames não reportados são aqueles que ocorrem e não são detectados ou não são informados às autoridades competentes. Esses são um problema sério, pois podem causar impactos ambientais graves sem que medidas sejam tomadas para minimizar os danos. Esses podem ocorrer em locais remotos, onde não há monitoramento, ou podem ser causados por navios que descarregam ilegalmente seus resíduos no mar [48]. Independentemente de serem reportados ou não, os derramamentos de petróleo podem causar danos significativos a fauna e flora marinha, contaminar praias e afetar a qualidade da água. Além disso, a limpeza de derrames de petróleo pode ser difícil e cara, exigindo recursos significativos. Por isso, é importante que medidas preventivas sejam adotadas para evitar derrames de petróleo e que os derrames que ocorrerem sejam reportados imediatamente às autoridades competentes, a fim de minimizar os impactos ambientais e proteger a vida marinha [49].

Nesse contexto, a caracterização do petróleo em um derramamento não reportado configura-se como um processo complexo e desafiador, pois geralmente não há informações disponíveis sobre o local do derramamento e as características do petróleo derramado. Todavia, a caracterização do petróleo em um derramamento não reportado é fundamental para avaliar a extensão do impacto ambiental e orientar as medidas de limpeza e recuperação do ambiente afetado. Além disso, a análise das características do petróleo pode ajudar a identificar sua origem e responsabilizar os responsáveis pelo derramamento [50,51].

1.4.1 Métodos cromatográficos aplicados à análise de petróleo e derivados

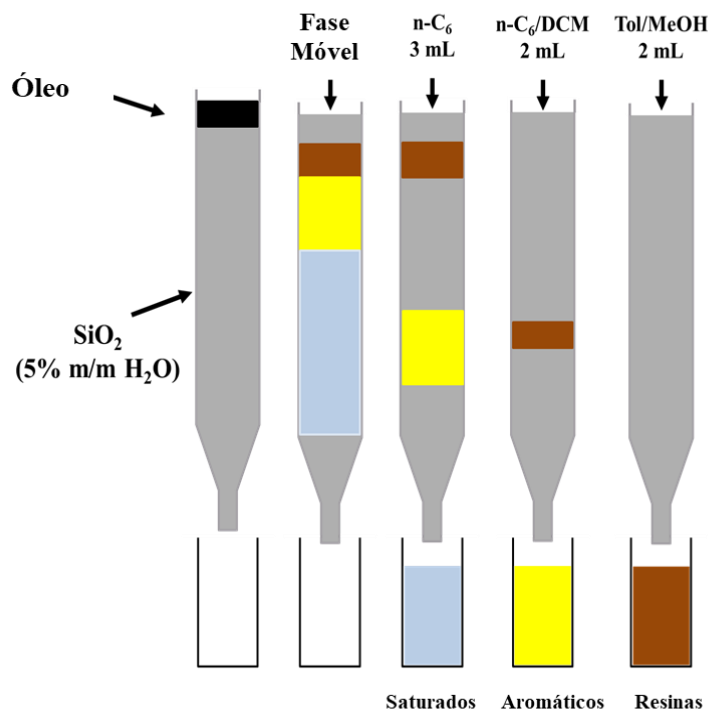
Uma das técnicas utilizadas para a caracterização do petróleo em um derramamento é a cromatografia gasosa, geralmente acoplada à espectrometria de massa, que permite separar e identificar os compostos presentes no petróleo. A cromatografia é um método bastante consolidado na separação, identificação

e determinação de componentes químicos, ou classes de componentes químicos, em uma mistura complexa [52]. Embora existam diversos modos cromatográficos, como cromatografia em coluna aberta, cromatografia de troca iônica e cromatografia por afinidade, cromatografia gasosa bidimensional abrangente, todas podem ser agrupadas em apenas dois tipos: cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Contudo, todas elas empregam os mesmos princípios básicos, sendo dividida basicamente em dois tipos: cromatografia em coluna e cromatografia planar (em papel, por exemplo). A técnica de separação cromatográfica consiste num método físico com direção definida, em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. As afinidades diferenciais (força de adesão) dos vários componentes do analito em relação à fase estacionária e móvel resultam na separação diferencial dos componentes. [53].

1.4.1.1 Fracionamento SARA

Devido à alta complexidade química, certas técnicas de separação têm sido desenvolvidas e estabelecidas visando caracterizar óleos brutos a partir de suas frações específicas. Nesse sentido, a cromatografia em coluna aberta (CCA) tem sido amplamente utilizada tanto no preparo de amostras de óleos brutos quanto para classificação do óleo com relação ao conteúdo de suas frações. A CCA consiste em uma fase estacionária (constituída, geralmente, de sílica e/ou alumina) e uma fase móvel líquida [37]. O método é baseado na separação da amostra em frações de diferentes polaridades, assim, cada fração possui composição e características diferentes. Cada fração é agrupada de acordo com a sua solubilidade, e contém uma série de diferentes categorias de massa molecular. Um exemplo de fracionamento SARA encontra-se apresentado na **Figura 4** [54–58].

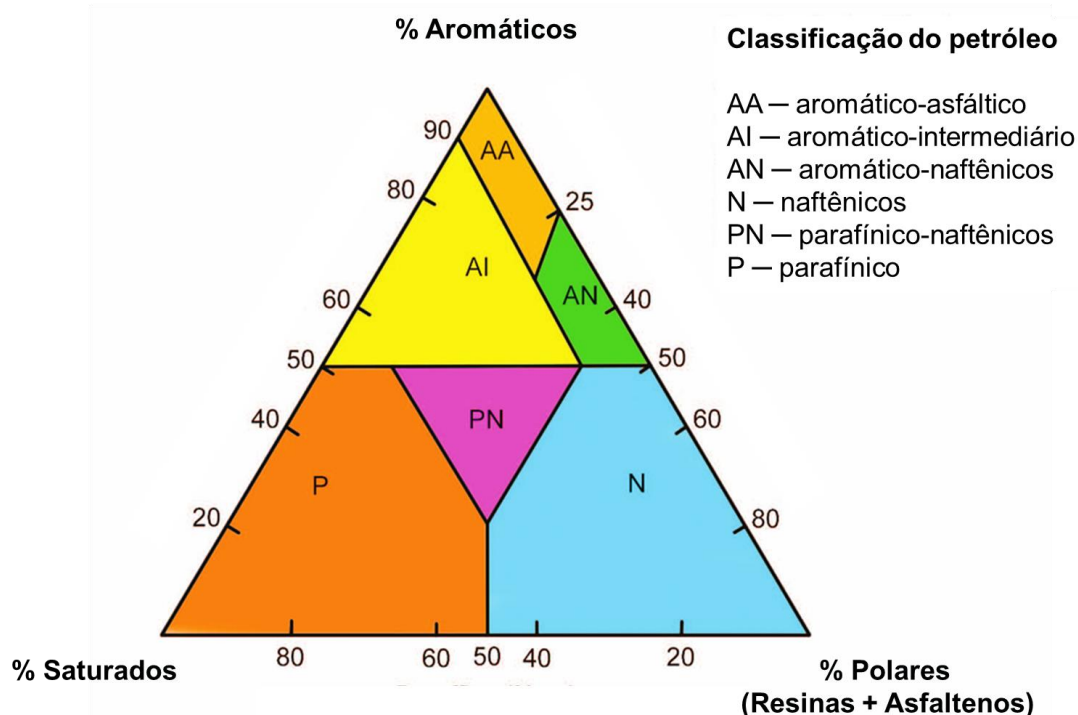
Figura 4. Proposta de fracionamento SARA adaptada de Castiblanco *et al.* (2021).



Fonte: Adaptado de Castiblanco *et al.* (2021) [59]

Neste método, o óleo bruto é inicialmente dividido em duas frações, malteno e asfaleno. O asfaleno é separado mediante precipitação promovida pela adição de um hidrocarboneto de baixa massa molecular, como: *n*-pentano, *n*-hexano, *n*-heptano ou iso-octano. O malteno, fração solúvel nesses solventes previamente mencionados, é levado a uma CCA para posterior separação cromatográfica, e várias combinações de solvente podem ser utilizadas nesta etapa. Contudo, todas elas seguem o mesmo conceito, aumento da polaridade da fase móvel para coleta das diferentes frações. Todas as frações juntas são denominadas frações SARA: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos [54]. A partir dos resultados do fracionamento SARA, pode-se elaborar um diagrama ternário com os valores obtidos e classificar o óleo como parafínico, parafínico-naftênicos, naftênicos aromático-naftênicos, aromático-intermediário ou aromático-asfáltico, como mostra a **Figura 5**.

Figura 5. Composição de óleos brutos com base na distribuição das frações de saturados, aromáticos e compostos polares (resinas + asfaltenos).



Fonte: Adaptado de Tissot e Welte. (1984) [30].

A fração de saturados é geralmente constituída de parafinas, isoparafinas e cicloalcanos. Ao passo que aromáticos contêm moléculas contendo anéis de benzeno conectados a cadeias alifáticas laterais. A fração de resinas, em relação às frações de saturado e aromáticos, é mais pesada que as frações saturadas e aromáticas. Além disso, ela pode ser dividida em quatro categorias diferentes: com maior caráter alifático, com maior caráter aromático, à base de dicitopentadieno ou à base de estireno. Por último, a fração de asfaltenos é descrita como a mais complexa fração do petróleo, sendo suas propriedades químicas não bem conhecidas. Em geral, os asfaltenos são conhecidos como uma matéria orgânica complexa, contendo carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre. Além disso, os asfaltenos possuem moléculas com elevadas massas moleculares [33,60,61].

1.4.1.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador de íons tipo quadrupolo

A GC/qMS é a técnica mais utilizada para análise qualitativa e quantitativa de petróleo, tanto na área de geoquímica de petróleo quanto na química forense de petróleo [14]. Os modos de operação do GC/qMS são: *Full Scan*, em que se obtém o espectro de massas do composto numa faixa de massa/carga pré-definida (geralmente entre m/z 40 e 550), e registro/monitoramento de íon selecionado (SIR ou SIM), que monitora massas específicas, sendo um modo bastante utilizado para quantificação [62]. Contudo, devido à interferência dos componentes da matriz e outras reações, o sinal dos compostos-alvo pode ser obscurecido usando o GC/MS no modo SCAN para componentes de baixa concentração, como é o caso dos biomarcadores de petróleo [14,62].

A GC/MS operada no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM) é de reconhecida eficácia e frequentemente adotada em estudos de derramamento de óleo [63]. Entretanto, essas análises baseadas em GC/MS-SIM de resíduos de óleo em matrizes ambientais complexas podem ser significativamente afetadas pela co-eluição de interferentes contidos na amostra [13]. Além disso, o processo de intemperismo também pode alterar a composição das moléculas alvo no resíduo de óleo, como, por exemplo, os compostos aromáticos que são passíveis de sofrerem oxidação de cadeia lateral via foto-oxidação [64], e aumentar a área relativa da mistura complexa não resolvida (UCM) na linha de base do cromatograma [65].

Nessa perspectiva, John *et al.* (2014) e Sørensen *et al.* (2016) relataram que uma fração significativa de compostos orgânicos nos óleos e resíduos de intemperismo provavelmente não foram caracterizados com precisão em análises comuns de derramamento de óleo baseadas em GC/MS-SIM [66,67]. Além disso, essas análises baseadas em GC/MS-SIM podem superestimar os níveis de alquil-HPAs em matrizes de amostras complexas (como em sedimentos e biota). Portanto, para um diagnóstico preciso de derramamento de óleo, há uma necessidade de uma técnica de análise mais seletiva que possa caracterizar com maior precisão os compostos biomarcadores em amostras com elevado efeito de matriz, bem como em óleos severamente intemperizados [68].

1.4.1.3 Cromatografia gasosa sequencial em análises forenses de petróleo

Recentemente, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizando o analisador de íons tipo triplo-quadrupolo tem auxiliado o desenvolvimento de métodos mais seletivos e sensíveis para analisar contaminantes em nível de traço [67,69]. Devido à configuração desse analisador de íons, o modo de operação que consiste no monitoramento de reações múltiplas (MRM) é possível de ser executado. O funcionamento desse modo de operação se dá mediante a escolha de um íon precursor específico, selecionado no primeiro quadrupolo, que posteriormente é fragmentado na célula de colisão (que é o segundo quadrupolo) para formar íons produtos, e então, no terceiro quadrupolo é configurado para selecionar um íon produto específico [70].

Uma vez que existem duas etapas de seleção de íons com um íon de produto ideal selecionado na segunda etapa, o modo MRM pode ser altamente sensível e gerar cromatogramas com ruído de fundo mínimo, mesmo para as amostras ambientais mais complexas. Por exemplo, os métodos MRM foram usados por John *et al.* (2014) no desenvolvimento de um método sensível para caracterizar baixos níveis de criseno e seus homólogos alquilados em amostras de óleo bruto [67]. E Adhikari *et al.* (2017) desenvolveram um modo MRM para analisar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e biomarcadores de petróleo em resíduos de derramamento de óleo [68].

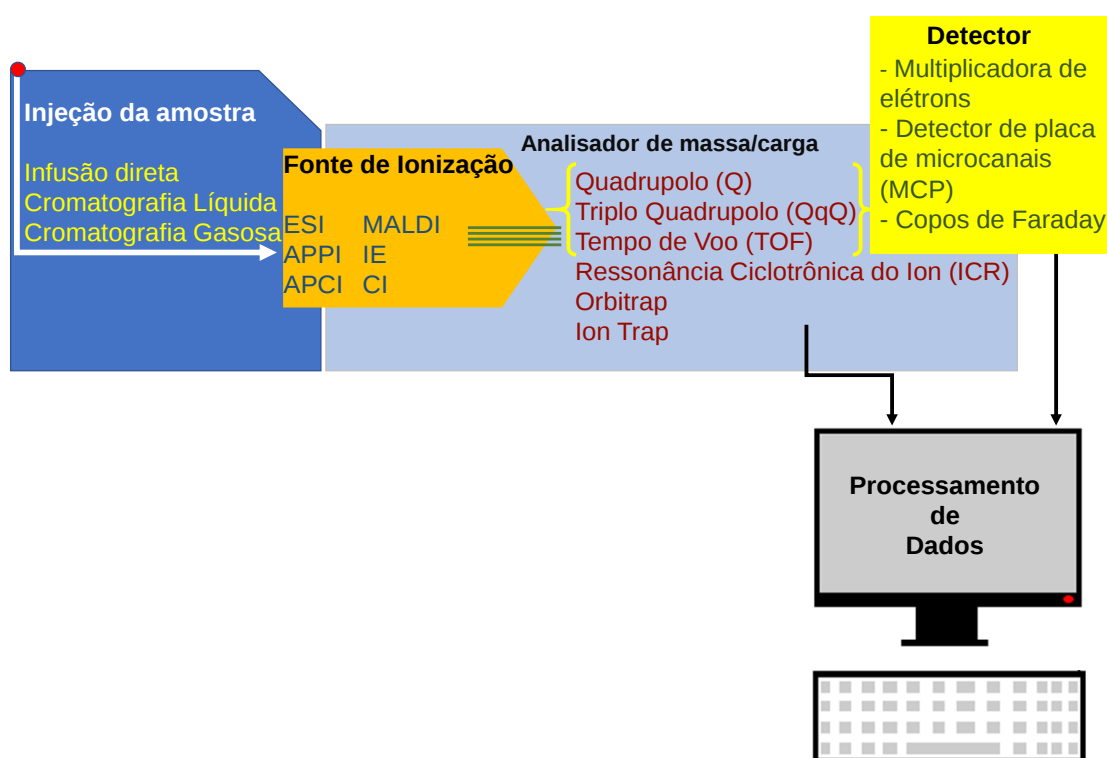
1.4.2 Espectrometria de massas de ultra-alta resolução (UHRMS)

Por definição, a espectrometria de massas consiste na geração de íons de natureza orgânica, ou inorgânica, e na subsequente distinção desses íons de acordo com as suas respectivas relações massa/carga, resultando em sinais eletrônicos referente às intensidades de ionização de cada íon separado [71]. O esquema apresentado na **Figura 6** mostra a organização básica de um espectrômetro de massas.

O esquema apresenta, inicialmente, a introdução da amostra que pode ser por infusão direta ou estar acoplado a um cromatógrafo. Em seguida, observa-se a fonte de ionização das moléculas ou acumulador de íons (no caso

da fonte por eletronebulização (ESI). Após ionizados, os íons são transportados para um analisador de íons que os separam de acordo com a m/z ou a permanência de uma quantidade específica de íons no interior do analisador. Por fim, os sinais elétricos são gerados por um detector que apresenta a magnitude do sinal em uma função de m/z . A respeito dos analisadores de íons de ultra alta resolução, como o de ressonância ciclotrônica do íon (ICR) e o Orbitrap, não há a presença de detector físico, o próprio analisador atua na detecção da corrente de imagem e produz um "transiente" que é convertido em uma função de m/z via transformada de Fourier [72–74].

Figura 6. Organização esquemática de espectrômetro de massas.



Fonte: Própria.

A UHRMS, também conhecida como espectrometria de massas por transformada de Fourier (FT-MS), está associada a dois tipos de analisadores de íons: ressonância ciclotrônica de íons e orbitrap. Devido ao seu altíssimo poder de resolução, a UHRMS tem se mostrado robusta na identificação de compostos em misturas complexas, como petróleo (via petroleômica) e conjunto de metabólitos (via metabolômica), com altíssimo grau de confiabilidade devido

à exatidão e acurácia na determinação da massa molecular. Isso ocorre porque o analisador de íons determina as massas experimentais com erro de massa na faixa de 0,5 a 1 ppm, em uma ampla faixa de m/z . Desse modo, esses analisadores apresentam poder de resolução suficiente para resolver compostos nominalmente isobáricos, melhorando a qualidade dos espectros obtidos. Em casos específicos, como é o caso dos novos modelos de Espectrômetro de Massas de Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS), com poder de resolução maior que 3.000.000 FWHM (Largura à meia-altura, do inglês *full width at Half-maximum*) em m/z 400, é tão alto que há a necessidade de considerar a massa do elétron (0,00055 Da) no cálculo das massas neutras [75–80].

1.4.2.1 Petroleômica

Petroleômica é um campo da química e da engenharia que se concentra na caracterização e análise detalhada de petróleo e seus derivados. O objetivo da petroleômica é entender melhor a composição química do petróleo, como ele é formado e como pode ser processado para produzir produtos úteis. Dentre a ampla gama de técnicas analíticas utilizadas para estudar as propriedades físicas e químicas do petróleo e seus derivados, as baseadas em espectrometria de massas têm ganhado destaque, principalmente a UHRMS [81–84] .

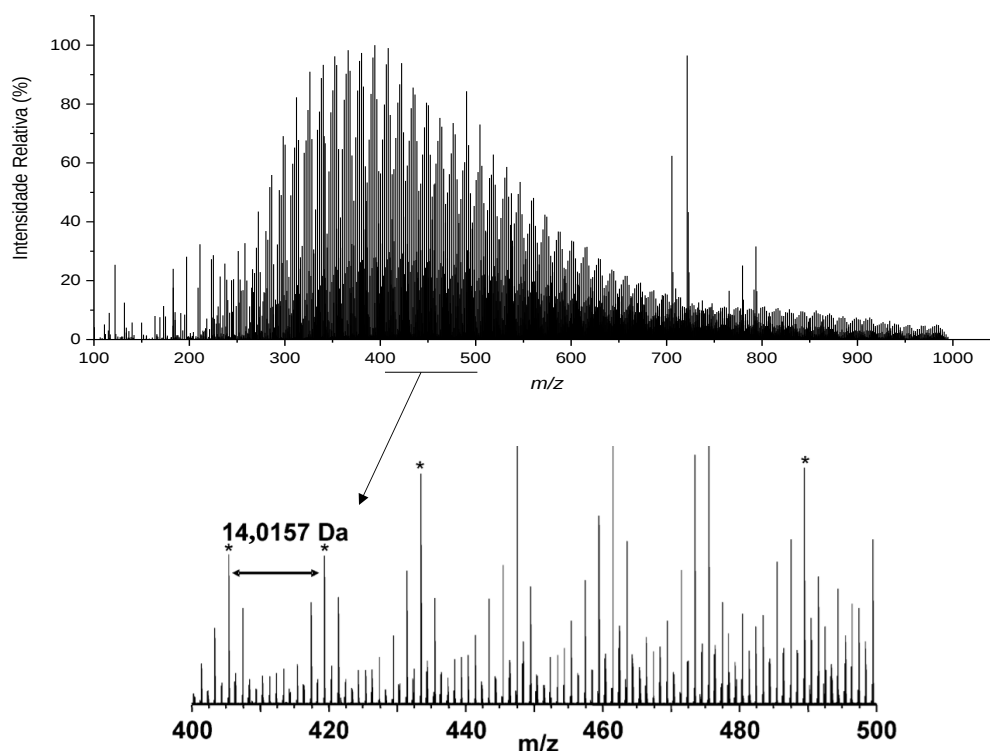
Com o surgimento dos analisadores de íons de ultra-alta resolução e de fontes de ionização, como ESI e fotoionização a pressão atmosférica/ionização química a pressão atmosférica (APPI e APCI, respectivamente), deu-se o início a uma nova área de caracterização de petróleo. Assim, a análise de dados obtidos por UHRMS é entendida como uma análise detalhada da composição e comportamento do óleo bruto e suas frações, e tem como objetivo auxiliar desde o processo de exploração do petróleo até o controle de qualidade do produto final [85–88].

Trata-se, também, de um campo de estudo importante que ajuda a entender melhor a composição e as propriedades do petróleo e seus derivados, bem como desenvolver novos métodos e materiais para sua utilização mais eficiente e sustentável [89,90]. Além disso, ela também está envolvida no desenvolvimento de novos métodos para processar o petróleo e produzir

produtos mais limpos e eficientes. Por exemplo, a petroleômica pode ser usada para projetar catalisadores específicos que possam transformar moléculas de petróleo em produtos específicos com mais eficiência e menor impacto ambiental. Ela também desempenha um papel importante no desenvolvimento de novos materiais poliméricos e biocombustíveis a partir de matérias-primas derivadas do petróleo [91,92].

Devido à grande quantidade de íons no espectro de massas obtido pela análise por UHRMS, **Figura 7**, torna-se inviável a interpretação isolada de cada um. Portanto, o processamento desse quantitativo de íons é feito mediante o uso de programas de tratamento de dados capazes de realizar o gerenciamento de dados de alta complexidade. Em resumo, o tratamento de dados de petroleômica é um processo essencial que envolve a pré-processamento, análise e interpretação de grandes conjuntos de dados para fornecer informações precisas e confiáveis sobre a composição química do petróleo e seus derivados.

Figura 7. Espectro de massas obtido por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para uma amostra de resina.



Fonte: Própria.

A alta resolução apresentada pela UHRMS lhe confere uma alta exatidão na atribuição da massa molecular experimental. Com base nessa massa, e em outros parâmetros selecionados pelo analista, os programas computacionais específicos para tratamento desse tipo de dado atribuem as fórmulas moleculares mais provável para os milhares de íons detectados. De modo geral, o funcionamento do programa de processamento de dados se dá a partir de um algoritmo capaz de combinar os elementos previamente selecionados na tabela periódica, comumente carbono (C), oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S), em fórmulas moleculares contendo erros menores que 5 ppm em relação à massa/carga experimental, conforme a **Equação 3** [93].

$$\text{Erro} = 10^6 \times \frac{m/z \text{ (teórica)} - m/z \text{ (experimental)}}{m/z \text{ (teórica)}} \quad \text{Eq. 3}$$

A partir da atribuição das fórmulas moleculares exatas, os compostos são agrupados de acordo com suas respectivas composições elementares $C_cH_hN_nO_oS_s$. Desta forma, por exemplo, um íon ao qual for atribuída a fórmula molecular “**C₁₆H₃₂O₂**” será agrupado molecularmente ao grupo heteroatômicos **O₂**, juntamente com a molécula “**C₆H₆O₂**”. Após os agrupamentos, os dados são apresentados em formas de diagramas e histogramas gerais (todas as classes) e de classes (classe específica, exemplo: **O₂**) [93].

O exemplo dado acima é para agrupamento de compostos por classes heteroatômicas, gerando dados que são apresentados na forma de histogramas. Além do agrupamento por composição heteroatômica, os dados são apresentados em gráficos comumente chamados de diagrama de Kendrick, diagrama de distribuição de classes e diagrama de van Krevelen [93].

1.4.2.1.1 Diagrama de Kendrick

O número de possíveis composições elementares para um determinado m/z aumenta exponencialmente com um aumento da massa e do número de elementos químicos envolvidos. Assim, as atribuições de uma única fórmula molecular nem sempre podem ser realizadas, especialmente para amostras contendo diferentes quantidades de heteroátomos. Desta forma, a análise de

defeitos em massa Kendrick tem sido aplicada para a caracterização UHRMS dos combustíveis de petróleo, biocombustíveis e lipídeos [94,95].

Para a construção do diagrama de Kendrick são necessárias as determinações da massa nominal de Kendrick (NKM) e defeito de massa de Kendrick (KMD). A NKM usa um grupo de átomos como um bloco de construção (ou unidade de base) enquanto aplica o princípio da definição de ^{12}C da IUPAC. Assim, NKM pode ser definida a partir da massa de um isótopo de um grupo molecular específico arredondado para o número inteiro mais próximo. Normalmente, para o bloco de construção em função da subunidade de $^{12}\text{C}_1^1\text{H}_2$, o NKM é 14. A NKM pode ser extrapolada para todos os outros blocos de construção e seus isótopos, por exemplo, para o composto $^{12}\text{C}_1^1\text{H}_2$ é esperado um padrão isotópico formado por $^{12}\text{C}_1^1\text{H}_1^2\text{H}_1$, $^{12}\text{C}_1^2\text{H}_2$ e $^{13}\text{C}_1^1\text{H}_2$. Para maior clareza, a massa de Kendrick pode ser definida também como a massa monoisotópica. Portanto, a massa de Kendrick (KM) de um composto pode ser dada pela equação abaixo [96]:

$$\text{massa de Kendrick} = \text{massa experimental} \times \frac{14,0000}{14,01565} \quad \text{Eq. 4}$$

Após determinada a massa de Kendrick para a referida molécula, o cálculo do seu defeito de massa de Kendrick (KMD) é feito mediante a subtração da massa nominal de Kendrick pela sua massa de Kendrick, como mostrado na **Equação 5**.

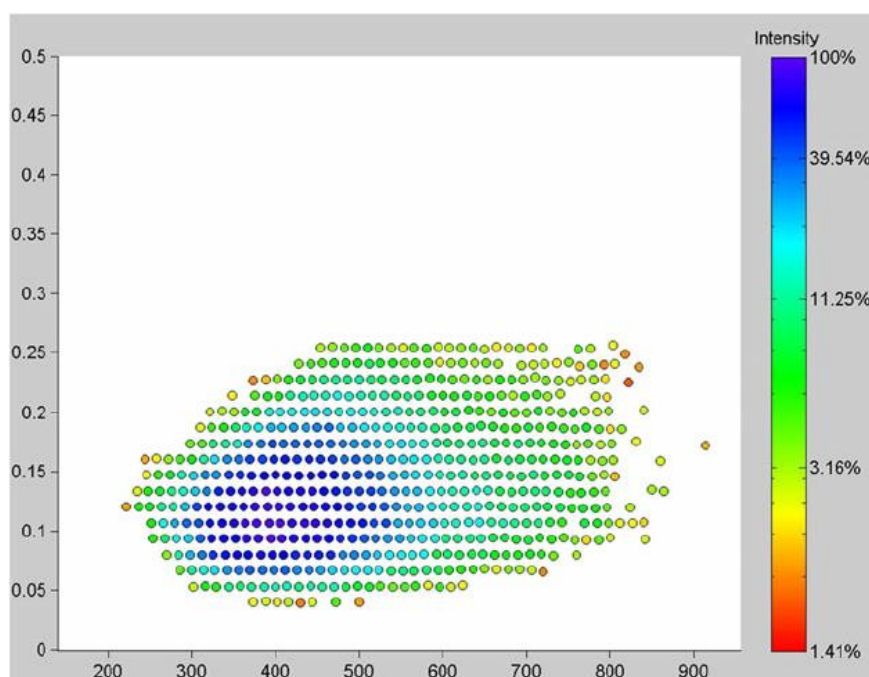
$$\text{KMD} = \text{NKM} - \text{massa de Kendrick} \quad \text{Eq. 5}$$

Desse modo, a deficiência ou defeito de massa resultante pode ser usado para discriminar classes moleculares que contêm deficiências de massa variadas. Por exemplo, para as moléculas de benzeno ($^{12}\text{C}_6^1\text{H}_6$) e tolueno ($^{12}\text{C}_7^1\text{H}_8$) é observado o mesmo valor de KMD porque sua composição elementar é diferente em CH_2 , mas quando comparados com o fenol ($^{12}\text{C}_6^1\text{H}_6^{16}\text{O}_1$), se diferem no valor de KMD. Em resumo, cada série de picos que diferem apenas por $(\text{CH}_2)_n$ terá o mesmo e valor de KMD exclusivo [89,94].

Os diagramas de Kendrick,

Figura 8, são uma ferramenta gráfica usada na análise de petróleo que permite visualizar e comparar as composições químicas de diferentes amostras de petróleo. Esses diagramas foram desenvolvidos por John Kendrick em 1981 e são amplamente usados em estudos petroleômicos para identificar tendências e padrões em grandes conjuntos de dados de composição de petróleo.

Figura 8. Diagrama de Kendrick gerado a partir dados de FTMS para a classe N_1 de uma amostra de resina (eixo Y referente aos valores dos KDM; eixo X referente aos valores das NKM).



Fonte: Ponthus *et al.* (2013) [97].

Dentre as aplicabilidades do diagrama de Kendrick, observa-se, por exemplo, que uma vez que alguns membros de uma classe em baixa massa (<400 Da) tenham sido identificados, a extensão ao longo da linha horizontal de dados com KMD idêntico permite a atribuição de composição elementar confiável de espécies que, de outra forma, estariam fora da faixa de atribuição de fórmula molecular inequívoca com base unicamente na medição de massa precisa [98]. Ademais, petróleo com diferentes estados de evolução térmica ou de fracionamento e processamento, com diferentes contribuições de matérias orgânica apresentam perfis de distribuição distintos, assim, a partir das informações da interpretação dos gráficos das amostras, eles podem ser diferenciados entre si. Portanto, a determinação das composições elementares

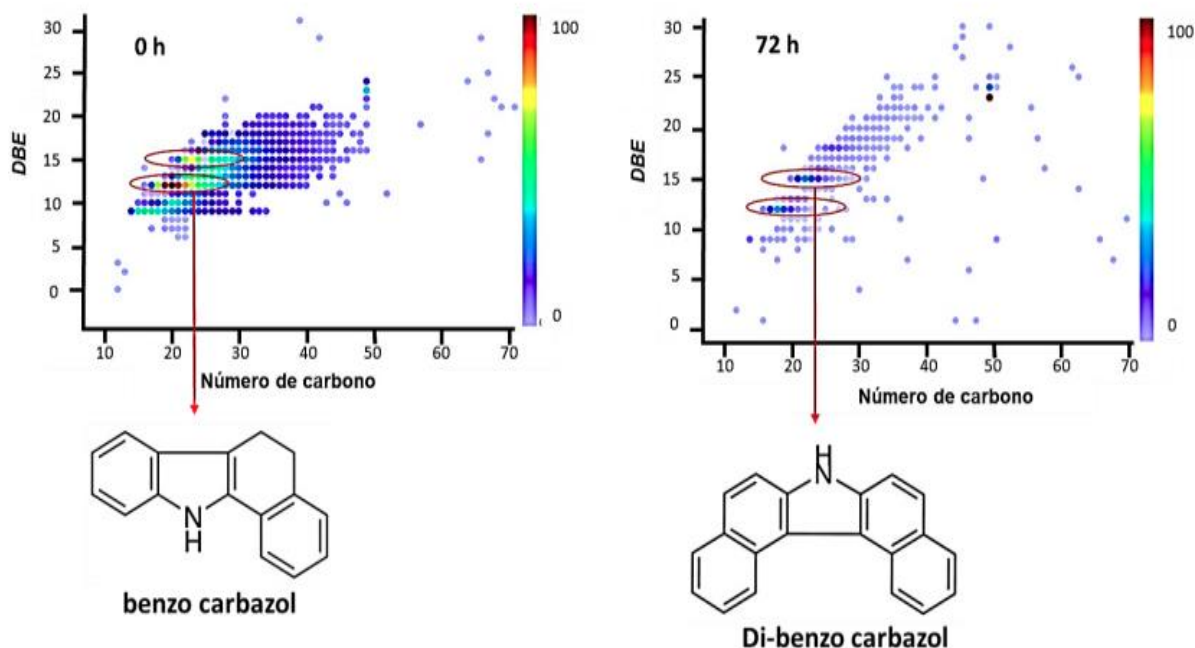
define a assinatura única e característica dos óleos, promovendo a determinação de um perfil químico mais abrangente, com potencial aplicação na geoquímica forense [83,84,99]

1.4.2.1.2 Diagrama de distribuição de classes

Uma das informações mais importantes na caracterização molecular é quantidade de duplas ligações, pois a partir dela é possível determinar quais prováveis estruturas moleculares estariam associadas à fórmula determinada. Essa informação em conjunto com a quantidade de átomos de carbono, permite ao analista propor classes químicas possam estar associadas à molécula, ou conjunto de moléculas. Assim, os diagramas de distribuição de classes, **Figura 9** Eles são amplamente utilizados para analisar a distribuição dos compostos detectados em amostras de petróleo bruto, frações e derivados [64,79,83].

Figura 9, também vistos como diagramas de DBE *versus* número de carbono, são gráficos de contorno construídos a partir do número de carbono, eixo X; equivalente de dupla ligações (DBE), eixo Y; e a intensidade relativa, eixo Y2. Eles são amplamente utilizados para analisar a distribuição dos compostos detectados em amostras de petróleo bruto, frações e derivados [64,79,83].

Figura 9. Diagrama de *DBE* vs. Número de Carbono obtido via H-ESI(-)-FT-Orbitrap MS para monitoramento da evolução da classe N₁ de óleo sergipano submetido a intemperismo artificial.



Fonte: Carregosa (2019) [60].

Para uma determinada classe de heteroátomo (no exemplo abaixo, O_2 , normalmente consistindo principalmente de ácidos carboxílicos), observa-se uma distribuição de valores de DBE e número de carbono. O DBE, a variável que representa o número de ligações duplas e anéis em uma dada fórmula molecular, considerando a composição molecular como sendo " $C_cH_hN_nO_oS_s$ " o DBE pode ser calculado pela **Equação 6** [93].

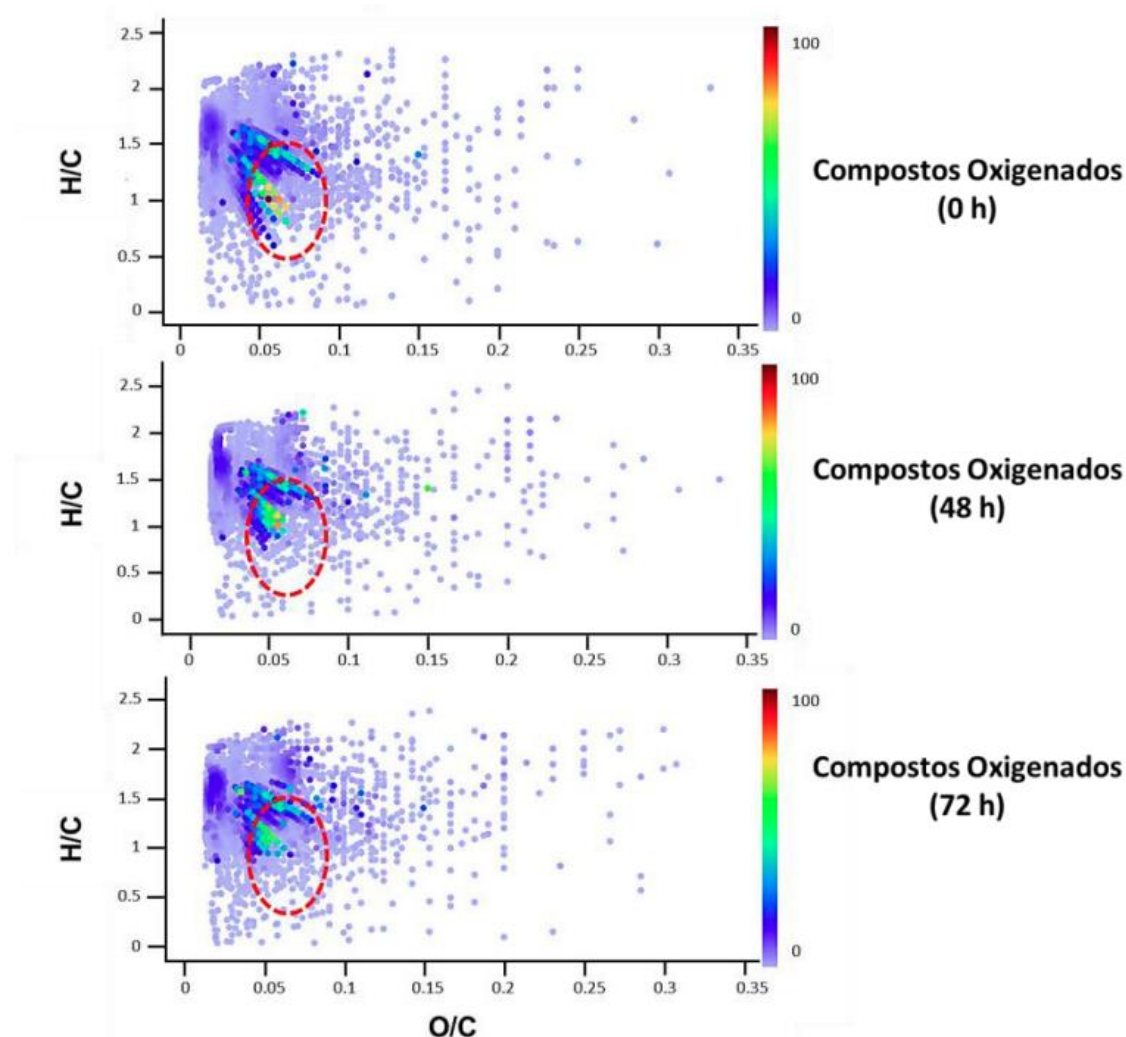
$$DBE = c - \frac{h}{2} + \frac{n}{2} + 1 \quad \text{Eq. 6}$$

De igual modo, para cada classe detectada e atribuída pode ser construído um gráfico desse tipo e exibir sua distribuição em função das duas variáveis. Os gráficos de DBE vs Número de Carbono são uma ferramenta útil na análise de petróleo porque permitem a caracterização do petróleo com base em sua estrutura molecular, o que pode fornecer informações valiosas sobre as propriedades e composição do petróleo. Ele tem provado ser especialmente útil na caracterização dos ácidos naftênicos como estabilizantes de sistema de emulsão [100], material interfacial de óleos de Athabasca [101], do produto das frações SARA [58] e de produtos de fotoxidação de óleos do derramamento em ambientes terrestres [59].

1.4.2.1.3 Diagrama de van Krevelen

O diagrama de van Krevelen, como mostra a **Figura 10**, é um gráfico bidimensional (ou tridimensional, quando considerada a intensidade relativa do íon analisado) baseado na relação entre a razão hidrogênio-carbono (H/C) em função de uma razão contendo um outro heteroátomo presente na molécula, como a razão oxigênio-carbono (O/C) ou a razão nitrogênio-carbono (N/C). Cada ponto no gráfico representa uma fração ou classe química específica para a amostra [89]. O diagrama é dividido em várias regiões que correspondem a diferentes classes de compostos químicos, como hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, compostos oxigenados, compostos nitrogenados e compostos sulfurados. Cada região é caracterizada por uma inclinação e uma interceptação específicas na reta que representa a proporção C/H ideal para cada tipo de composto [95].

Figura 10. Diagrama de van Krevelen obtido via H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para monitoramento da evolução dos compostos oxigenados neutros e básicos de óleo sergipano submetido a intemperismo artificial.



Fonte: Carregosa (2019) [60].

O diagrama de van Krevelen pode ser usado para estimar as principais classes químicas, como fenóis, ácidos lineares, lipídeos e carboidratos, observados em espectros de massa complexos [102]. Além de ser uma ferramenta valiosa na proposição de mecanismos de hidrotratamento de óleos brutos e bio-óleos [103]. Além de ser uma ferramenta útil para avaliar a qualidade e a maturidade das amostras de petróleo, bem como para identificar as fontes de origem do petróleo e as possíveis alterações sofridas durante a migração e deposição. Em petroleômica tal ferramenta tem sido amplamente utilizadas para uma melhor visualização e interpretação química e geoquímica dos dados [88,89,103].

1.5 *Tratamentos estatísticos para análise de similaridade entre amostras de óleo em caso de derrame não reportado*

Uma das técnicas estatísticas que pode ser utilizada para analisar a similaridade entre dois óleos é a diferença crítica, a qual permite determinar a probabilidade de que a diferença observada entre duas amostras seja devida a flutuações aleatórias ou se ela representa uma diferença real [5]. Num contexto onde haja mais de duas amostras envolvidas na investigação, a análise de componentes principais (PCA, na sigla em inglês) permite a redução da dimensionalidade dos dados e identificação das principais características que explicam a variação dos óleos analisados. Com base nesses resultados, é possível comparar os diferentes óleos e identificar semelhanças e diferenças entre eles [104].

Outra técnica que pode ser utilizada é a análise de agrupamento (cluster analysis). Essa técnica é capaz de agrupar os óleos em diferentes clusters com base em suas propriedades químicas e físicas. Essa abordagem permite identificar grupos de óleos com características semelhantes e, assim, definir estratégias de resposta mais específicas para cada grupo. O importante é que a análise estatística seja realizada de forma cuidadosa e criteriosa para que os resultados obtidos possam ser utilizados de forma efetiva para guiar a resposta ao derrame [105].

1.5.1 Desvio padrão relativo, limite de repetibilidade e diferença crítica

Após aquisição dos biomarcadores por GC/MS ou GC/MS/MS, e consequente tabulação das razões de biomarcadores, as amostras precisam ser comparadas. Para isso, alguns métodos são propostos ou descritos na literatura. Entretanto, todos partem do mesmo princípio: “É necessário admitir que as amostras são idênticas”. A partir dessa prerrogativa, os autores empregam vários testes de similaridade para comprovar se as amostras são idênticas, possuem similaridades ou não são correlacionadas [106,107]. Os métodos de análise podem ser multivariados ou univariados.

Dentre os métodos de análise de similaridade univariada, há a correlação individual mediante comparação do desvio padrão relativo (DPR) para cada

razão de biomarcadores (RB). Ou seja, admite-se que as amostras são iguais, e calcula-se o DPR entre a razão 1 de A e razão 1 de B. Recomenda-se diferenças relativas entre as razões de biomarcadores para amostras consideradas idênticas de até 5%, contudo há autores que relatam até 10% como o valor máximo de DPR permitido entre duas razões [5,107,108]. Outra abordagem foi proposta por Faksness *et al.* (2002), que aplicaram o teste-*t* para determinar correspondência entre amostras [109]. Contudo, segundo Hansen *et al.* (2016), a abordagem não é robusta, pois a análise pode resultar em diferenças críticas pequenas e, portanto, taxas de não-correspondência (ou seja, falso negativo) [106].

Outra forma de estimar se as amostras são idênticas é a partir do método de repetibilidade (*r*). A repetibilidade (*r*) é aplicada como método de teste para comparar individualmente as razões de biomarcadores [106]. A validação do limite de repetibilidade é baseado na distribuição normal padrão. A determinação do desvio padrão da repetibilidade DP_r de um método analítico depende do controle de qualidade do laboratório. A partir do cálculo do desvio padrão, ou DPR, gera-se o “*r*”. O limite de repetibilidade $r_{95\%}$ (ou seja, nível de confiança de 95%) é calculado multiplicando o DPR fixo (DP_r) por um fator de 2,8, como mostrado na **Equação 7**.

$$r_{95\%} = 2,8 \times DP_r \quad \text{Eq. 7}$$

Geralmente, adota-se como DP_r um valor igual a 5%, assim gerando um valor de correção de 14%. Já o coeficiente de 2,8 é derivado de $\sqrt{2} \times 1,96$, onde 1,96 é o fator de probabilidade para 95% de probabilidade de uma mudança verdadeira em ambas as direções numa distribuição normal padrão, a multiplicação por $\sqrt{2}$ é adotada pois sempre serão duas amostras a serem comparadas pela diferença crítica (*DC*). O valor de correção ($r_{95\%}$) pode ser utilizado para calcular a diferença crítica individual de cada razão de biomarcadores. O cálculo da diferença crítica individual é feito a partir da multiplicação do limite de repetibilidade a 95% de nível de confiança (14%) pela relação entre a diferença dos valores obtidos para a razão de biomarcadores avaliada (*z*) dos óleos A e B e a média desses valores, como mostra a **Equação 8**.

$$DC = \frac{|RB \text{ z de } A - RB \text{ z de } B|}{\bar{X} \text{ RB z de } A \text{ e } B} \times r_{95\%} \quad \text{Eq. 8}$$

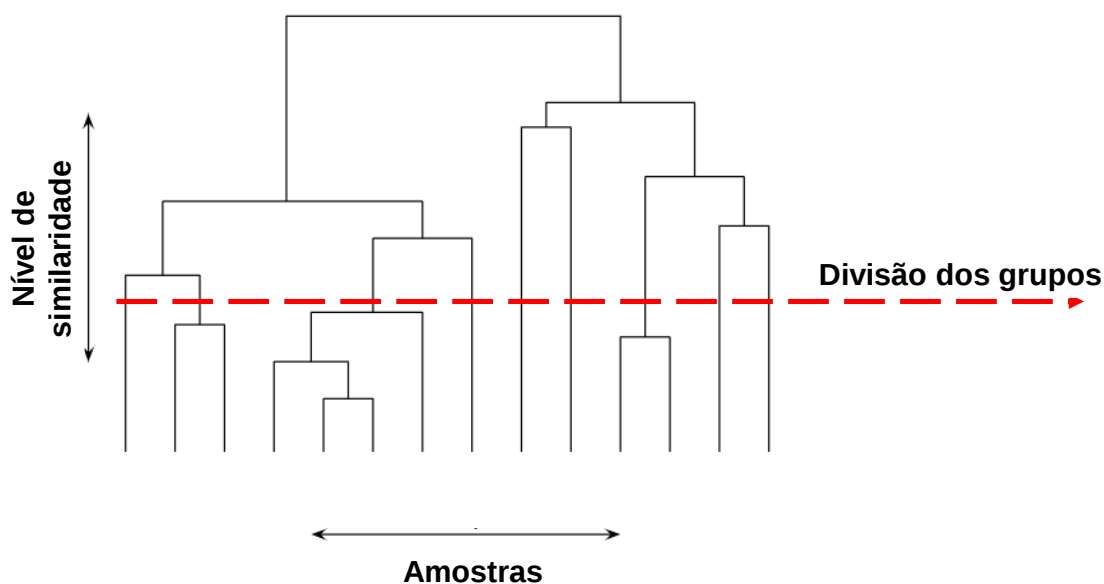
A prerrogativa do teste é que, se a diferença crítica for excedida, não há dúvida que as razões de biomarcadores são idênticas. Ou seja, para que duas razões sejam correspondentes (idênticas), a diferença absoluta (DA) entre duas razões não deve ser superior ao valor da diferença crítica para a mesma razão [106]. Assim, num contexto investigativo, atribui-se força ao argumento de que dois óleos são iguais quanto maior for o número de razões de biomarcadores cuja a diferença absoluta ultrapasse o valor da diferença crítica a 95% de nível de confiança.

1.5.2 Análise multivariada de dados

1.5.2.1 Análise hierárquica de agrupamento

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é um método que examina a organização de amostras dentro e entre grupos com base em métodos descritivos de similaridade. O resultado do HCA geralmente é apresentado em um dendrograma, também chamado de gráfico de árvore. Um dendrograma é o resultado de um procedimento hierárquico no qual cada objeto é colocado em um eixo e o outro eixo representa as etapas do procedimento hierárquico, de modo que cada objeto representado como um agrupamento separado é combinado em cada etapa do procedimento até que todos os objetos estão contidos em um grupo [44,110], conforme mostrado na **Figura 11**.

Figura 11. Dendrograma ilustrando agrupamento hierárquico.



Fonte: Própria.

Existem duas abordagens básicas para resolver o problema de agrupamento em HCA, aglomerativo ou divisivo. Na primeira, cada amostra é primeiramente considerada como um grupo e posteriormente os pares de grupos são combinados. O agrupamento é obtido usando uma métrica de distância de amostra apropriada (geralmente a distância Euclidiana ou Manhattan) e critérios de ligação entre os agrupamentos. A distância euclidiana é a medida de similaridade mais comumente usada entre dois objetos. Basicamente, é uma medida do comprimento de uma linha traçada entre dois objetos quando exibidos em um gráfico [44,110].

Após escolher a métrica mais adequada para descrever os resultados, é admissível avaliar a similaridade entre os objetos. Na HCA, a similaridade entre os objetos de correspondência ou associação baseada em uma variável estatística de agrupamento. A similaridade pode ser medida de duas maneiras. Primeiro, por associação, com coeficientes de correlação positivos maiores representando maior similaridade. E segundo, por proximidade, em que a proximidade entre cada par de objetos pode avaliar a similaridade, na qual são usadas medidas de distância, ou diferença, com distâncias menores representando maior similaridade [44,110].

1.5.2.2 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica de ordenação baseada em distância usada principalmente para exibir padrões em dados multivariados. O PCA foi inicialmente introduzido como um método para encontrar "linhas e planos de ajuste mais próximo a sistemas de pontos no espaço" por Pearson, no início de 1900. O PCA é capaz de transformar o conjunto de dados de entrada em um conjunto de dados mais compacto sem a perda das informações principais. Em outras palavras, pode-se dizer que se trata de um método usado para maximizar a soma dos quadrados das correlações [111–113].

O PCA assume que as relações entre as variáveis dependentes são lineares. Isso implica que o PCA deve ser aplicado quando a maioria das variáveis dependentes tiver valores diferentes de zero na maioria das amostras. Este método permite ao pesquisador acessar o vetor do primeiro fator principal. Este fator está linearmente relacionado com as variáveis principais e possui a maior soma dos quadrados correlacionados com as variáveis. O vetor específico correspondente ao valor específico máximo fornece a matriz de correlação de peso desejada. O PCA transforma a matriz de dados originais $X_{n \times p}$ formada por n objetos e p variáveis, no produto de duas matrizes menores, conforme mostra a **Equação 9**.

$$X = TP^t + E \quad \text{Eq. 9}$$

onde T é a matriz de escores de dimensões n por q , P é a matriz dos pesos, de dimensões q por p (que evidencia a correlação entre as variáveis e retém a quantidade de informações possível) e E é a matriz dos resíduos com dimensão n por p . Após isso, é possível efetuar a detecção de amostras anômalas (*outliers*) e seleção de variáveis importantes em determinado sistema [114].

A PCA para análise das impressões digitais químicas dos óleos do derramamento tem sido aplicada desde meados da década de 1990. Na PCA, o método mais direto e intuitivo para avaliação de dados é por meio da inspeção visual da distribuição dos pontos no gráfico de escores e mediante avaliação dos

gráficos de pesos [105]. Contudo, nem sempre é fácil efetuar a comparação. Portanto, a objetividade do processo de correspondência de amostras de óleo do derramamento e fonte pode ser melhorada por comparações numéricas e testes estatísticos.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Desenvolver uma estratégia multicamada por espectrometria de massas aplicável a análise de petróleo que correlacione, positiva ou negativamente, as amostras envolvidas no caso do derramamento no litoral brasileiro no período de 2019 e 2020.

2.2 *Objetivos específicos*

- Determinar se as amostras do derramamento foram oriundas de uma única fonte;
- Determinar se há correlação (positiva ou negativa) entre os óleos envolvidos mediante aplicação do método proposto pela CEN;
- Aplicar a GC/MS/MS na avaliação de similaridade entre os óleos envolvidos;
- Determinar, por EDX, os teores de níquel, vanádio e enxofre dos óleos estudados, para avaliação de similaridade;
- Aplicar a UHRMS na avaliação de similaridade entre as frações de resina dos óleos envolvidos;
- Aplicar ferramentas estatísticas multivariadas para avaliação do conjunto de dados obtidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras dos óleos do derramamento, da bacia Sergipe-Alagoas (SE-AL) e do tambor

Três amostras de óleo relacionadas ao derramamento foram fornecidas ao Grupo de Pesquisa em Petróleo e Energia da Biomassa (PEB) pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e PEB pelo Grupo de Pesquisa em Espectrometria de Massas (PEM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dentre elas, duas delas foram coletadas em diferentes pontos da costa de Sergipe, enquanto a última foi coletada no litoral de Pernambuco.

Com relação as cinco amostras suspeitas de terem envolvimento com o caso, quatro são referentes às principais correntes produtoras de petróleo na região da bacia Sergipe-Alagoas (SE-AL), e foram fornecidas por uma empresa petrolífera que opera na bacia. A última foi coletada dentro de um tambor encontrado no litoral sergipano encontrado simultaneamente aos óleos associados ao derramamento mencionado anteriormente, a imagem encontra-se no **ANEXO 1**. Sobre as amostras fornecidas pela empresa, informações acerca do local e data de coleta foram consideradas confidenciais. As informações sobre o local da amostra, o código e a data em que foram adquiridas estão resumidas na **Tabela 1**.

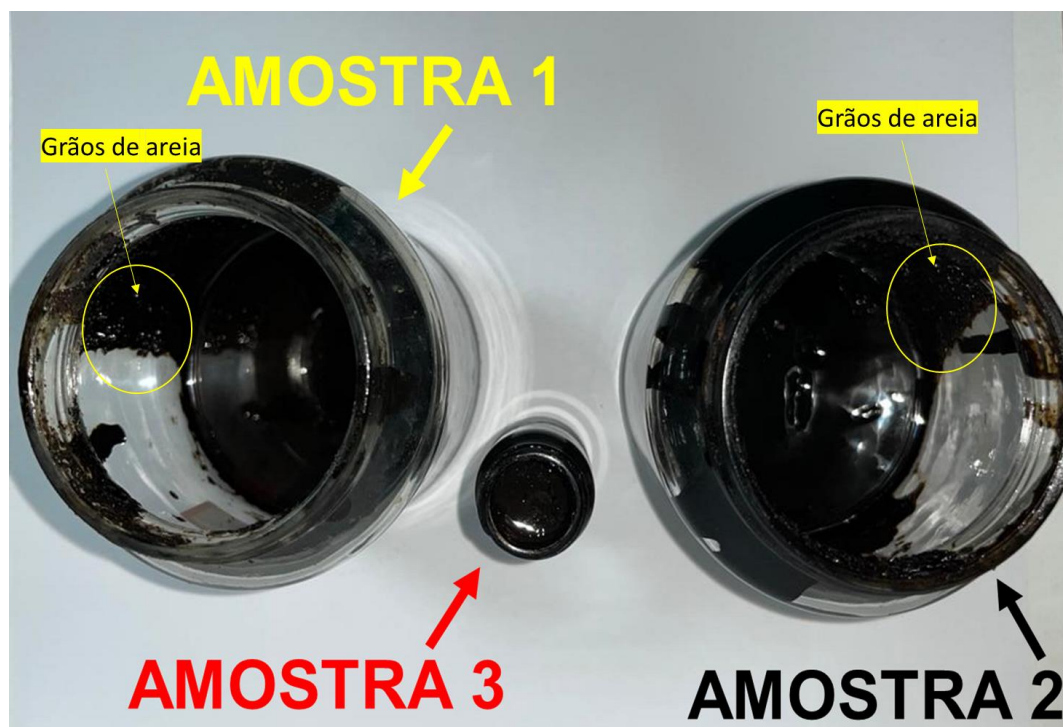
Tabela 1. Informações detalhadas sobre óleos do derramamento, amostras dos óleos da bacia SE-AL e do tambor de óleos-fonte.

Nome	Código	Estado	Local	Data
Amostra 1	Sample 1	Sergipe	10°43'57.05"S; 36°50'29.02"W	28/09/2019
Amostra 2	Sample 2	Sergipe	10°52'49.04"S; 36°58'39.01"W	28/09//2019
Amostra 3	Sample 3	Pernambuco	08°23'16.00"S; 34°57'55.00"W	20/10/2019
Amostra T	Sample T	Sergipe	10°48'48.00"S; 36°55'11.00"W	28/09//2019
Amostra A	Sample A	Sergipe	Off-shore (Sergipe)	Confidencial
Amostra B	Sample B	Alagoas	On-shore (Alagoas)	Confidencial
Amostra C	Sample C	Sergipe	Off-shore (Sergipe)	Confidencial
Amostra D	Sample D	Sergipe	On-shore (Sergipe)	Confidencial

3.2 Preparo das amostras dos óleos do derramamento

Seguindo as orientações internacionais divulgadas pela federação internacional sobre a poluição de proprietários de petróleo (abreviada em inglês pela sigla ITOFF) [115], as amostras foram coletadas com a menor quantidade possível de sólidos. Contudo, ainda foi observada a presença de areia no óleo, como mostrado na **Figura 12**, portanto, optou-se por efetuar um procedimento de limpeza das amostras, previamente às análises. Para isso, aproximadamente 2 g da mistura óleo/areia foram diluídas em 5 mL de tolueno e levados à centrífuga para sedimentação da porção sólida. O sobrenadante foi armazenado em funil de separação para posterior remoção de água residual contida na amostra. Esse processo foi repetido até se observar ausência de coloração no solvente, sendo cinco vezes a quantidade máxima necessária neste caso. Em seguida, a parte orgânica foi separada usando um funil de separação. O tolueno foi removido usando um evaporador rotativo produzindo um resíduo oleoso marrom. O óleo extraído foi armazenado em frasco âmbar à temperatura de 8 °C para manter a amostra com o menor grau de alteração possível até sua posterior caracterização.

Figura 12. Aspecto físico das amostras coletadas nas praias de Sergipe.



Fonte: Própria.

3.3 Separação das frações SARA dos óleos investigados

Para promover uma diminuição na complexidade dos óleos investigados (óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento) foi feito um fracionamento SARA. O método adotado foi adaptado do descrito por Silva (2018)[116]. Primeiramente, foi feita a remoção dos voláteis submetendo 200 mg do óleo numa estufa a 70 °C, até que não fosse observada variação na massa. Em seguida, a fração de asfaltenos foi removida. Para tanto, em um frasco de vidro borossilicato de 40 mL, foram adicionados 200 mg do óleo, em seguida, o mesmo foi misturado com 10 mL de *n*-hexano de grau HPLC e agitado manualmente por 10 segundos. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação por 5 minutos e a uma rotação de 2400 rpm para separar a fase líquida da sólida. Posteriormente, o precipitado foi submetido a sucessivas lavagens com *n*-hexano até o solvente ficar incolor. A fração coletada (malteno) foi evaporada num evaporador rotativo e armazenada em balão de fundo chato previamente aferido para determinação do seu teor e posterior fracionamento SAR (Saturados, Aromáticos e Resinas).

Para obtenção das frações SAR, 10 mg do malteno foram diluídas em 100 µL de *n*-hexano e, em seguida, com o auxílio de uma pipeta de vidro, a solução resultante foi transferida para o topo de uma coluna cromatográfica (12,5 cm de comprimento e 0,6 cm de diâmetro), preenchida com 500 mg de sílica flash G60, peneirada a 115 *mesh*. A sílica foi previamente levada a mufla a 400 °C por 4 h, em seguida, misturada com uma quantidade de água destilada equivalente a 5% (m/m) em relação a massa de sílica utilizada. O empacotamento da sílica na coluna cromatográfica foi feito com *n*-hexano. Para coleta das frações SAR foram utilizados frascos de vidro borossilicato de 5 mL. As fases móveis utilizadas foram: 3 mL de *n*-hexano, 2 mL de *n*-hexano:diclorometano (7:3) e 2 mL de tolueno:MeOH (1:1). As frações coletadas foram secas sob fluxo de nitrogênio.

3.4 Aquisição dos dados de GC/MS e GC/MS/MS para os óleos investigados

As frações de saturados dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento foram diluídas para uma concentração de 10 mg mL⁻¹ com diclorometano. As soluções das frações de saturados das amostras dos óleos

da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento foram analisadas em um sistema GC/MS com analisador de íons tipo triplo quadrupolo (GCMS-TQ8040 - Shimadzu) e Ionização por Elétrons (EI), disponibilizado pelo Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM). A coluna capilar é composta por 5% de difenil e 95% dimetilsilfenileno-siloxano (Crossbond, 30 m de comprimento, 0,25 mm id, 0,25 μ m de espessura de filme, Restek, EUA). O volume de injeção da amostra foi de 1 μ L no modo *splitless* e temperatura do injetor de 300 °C. A temperatura do forno foi programada de 70 °C a 325 °C a 3 °C min⁻¹. O hélio (99,999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. Quanto às condições de MS: a temperatura da fonte de íons foi de 280 °C e a temperatura da interface, de 290 °C. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 85 min.

3.4.1 Obtenção dos dados por MRM e SIM para os óleos investigados

Com base nos métodos de GC/MS/MS-MRM de Prata (2016) e Mei *et al.* (2018), os íons extraídos das moléculas-alvo foram monitorados por tempos de retenção absolutos para a confirmação dos íons no modo MRM, e do íon precursor para a análise no modo SIM [46,117]. No modo SIM, foram escolhidos íons *m/z* 171, *m/z* 191 e *m/z* 217. Quanto às análises GC/MS/MS, o argônio (99,999% de pureza) foi utilizado como gás de colisão e energia de colisão para cada uma das transições foi de 12 eV [46]. As transições monitoradas estão apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Transições (íons precursores e íons produtos) usados na investigação e identificação de esteranos e hopanos no modo MRM.

Compostos	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)
Esteranos C ₂₇	372	217
Esteranos C ₂₈	386	217
Esteranos C ₂₉	400	217
Esteranos C ₃₀	414	217
Trisnorhopanos C ₂₇	370	191
Hopanos C ₂₉	398	191
Hopanos C ₃₀	412	191

Continuação da Tabela 2Homohopanos C₃₁

426

191

3.5 Determinação do teor total de enxofre por Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDX) dos óleos investigados

O teor de enxofre no óleo bruto foi determinado em um espectrômetro de fluorescência de raios-X por energia dispersiva, da marca Shimadzu, modelo EDX-720/800HS, disponibilizado pelo CLQM. A faixa de trabalho do equipamento foi entre os átomos S-K (15 kV) com tempo de análise total de 100 s, operando na forma quantitativa. A eficiência do equipamento foi testada a partir da comparação dos resultados da análise de uma amostra referencial composta por Cr=18,395%, Mn=1,709%, Fe=70,718%, Ni=8,655%, Cu=0,278% e Mo=0,245%.

A determinação do teor de enxofre foi feita por curva de calibração, de acordo com a ASTM D4294 [118]. Para a obtenção da curva, foram utilizadas 9 soluções de sulfeto de dibutila em óleo mineral com as seguintes concentrações: 0,01, 0,03, 0,05, 0,07, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9 e 1%. Para as análises, foi utilizado um filme de polipropileno (0,05 mm) para adaptação na parte inferior do porta-amostra e sua selagem, uma pequena quantidade da amostra oleosa foi adicionada ao porta-amostra, de modo a formar um filme uniforme. Os resultados das análises estão expressos nas médias das triplicatas dos valores fornecidos automaticamente pelo equipamento.

3.6 Aquisição dos dados de H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para os óleos investigados

As análises das frações de resinas dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento foram realizadas em um sistema Exactive HCD Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), disponibilizado pelo CLQM. O método de introdução da amostra foi por infusão direta utilizando uma seringa de 500 µL (Thermo Scientific, NJ, EUA) a um fluxo de 35 µL min⁻¹. A fonte de ionização utilizada foi o eletronebulização aquecida (H-ESI). A amostra foi dissolvida numa

mistura de tolueno:metanol (1:3 v/v) produzindo uma solução de 150 µg mL⁻¹. As condições de análise para o modo H-ESI(+) foram: resolução do equipamento a 140.000 em m/z 200, voltagem do spray de 4,0 kV, aquecimento da região de vaporização a 110 °C, temperatura capilar de 320 °C, gás de bainha e gás auxiliar em 7 au (unidade arbitrária), S-lens em 70 rf. Para as composições elementares observadas simultaneamente nos espectros da amostra e do branco, as intensidades finais foram determinadas como a diferença entre as intensidades dos espectros da amostra e do branco.

Os resultados obtidos foram processados em uma abordagem avançada de processamento de dados. O programa Xcalibur Qual Browser foi utilizado para atribuir as fórmulas moleculares para os íons. Nesta etapa, foram levadas em consideração até 10 fórmulas moleculares possíveis para cada *m/z* com erro inferior a 3 ppm. Os critérios para a atribuição de composições elementares foram: ¹³C₀₋₁, ¹²C₅₋₁₀₀, ¹H₅₋₂₀₀, ¹⁴N₀₋₄, ¹⁶O₀₋₈ e ³²S₀₋₃. Em seguida, a lista de íons foi transportada para o Microsoft Excel em que, por meio de um algoritmo de processamento avançado desenvolvido pelo grupo de pesquisa em Petróleo e Energia da Biomassa (PEB), foi selecionada a fórmula molecular mais provável. Para tanto, foram analisados o padrão isotópico de ¹³C e os defeitos de massa de Kendrick (tolerância ±0,001) para confirmar a exatidão das atribuições de composições elementares [91]. Picos de massa relevantes para distribuições isotópicas foram identificados e deletados. Somente os íons com relação sinal/ruído maior que 3 foram considerados.

3.7 *Análise multivariada dos dados de GC/MS-SIM, GC/MS/MS-MRM e UHRMS*

A análise de componentes principais (PCA) e a análise por agrupamento hierárquico (HCA) foram utilizadas para identificar tendências de agrupamentos entre as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento. Para a PCA, foi utilizado o programa RStudio 3.6.1. Com relação aos dados obtidos por GC/MS-SIM e GC/MS/MS-MRM, inicialmente, as razões de biomarcadores das amostras de derramamento de óleo (amostras DP) foram organizadas em matrizes (6 x 23) e (6 x 36), respectivamente. Nelas, os objetos estão nas linhas (amostras DP) e as variáveis (razões de biomarcadores) nas

colunas. O pré-processamento utilizado foi de autoescalamento dos dados, que consistiu na subtração da variável pela média do conjunto e divisão do resultado pelo desvio padrão do conjunto.

Para os espectros de massa das amostras de derramamento de óleo obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS, os dados foram organizados em matrizes para o KMN (8 x 8425) e para o KDM (8 x 464), em que os objetos estão nas linhas (amostras DP) e as variáveis (intensidades m/z) nas colunas. Para esse conjunto, o pré-processamento utilizado foi centralizar na média. Em ambos os casos, para os dados obtidos por GC e por UHRMS. Os procedimentos operacionais padrão do pacote *mdatools* foram seguidos para execução do tratamento via PCA e HCA. Os códigos utilizados encontram-se disponíveis em: <https://cran.r-project.org/web/packages/mdatools/mdatools.pdf>.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

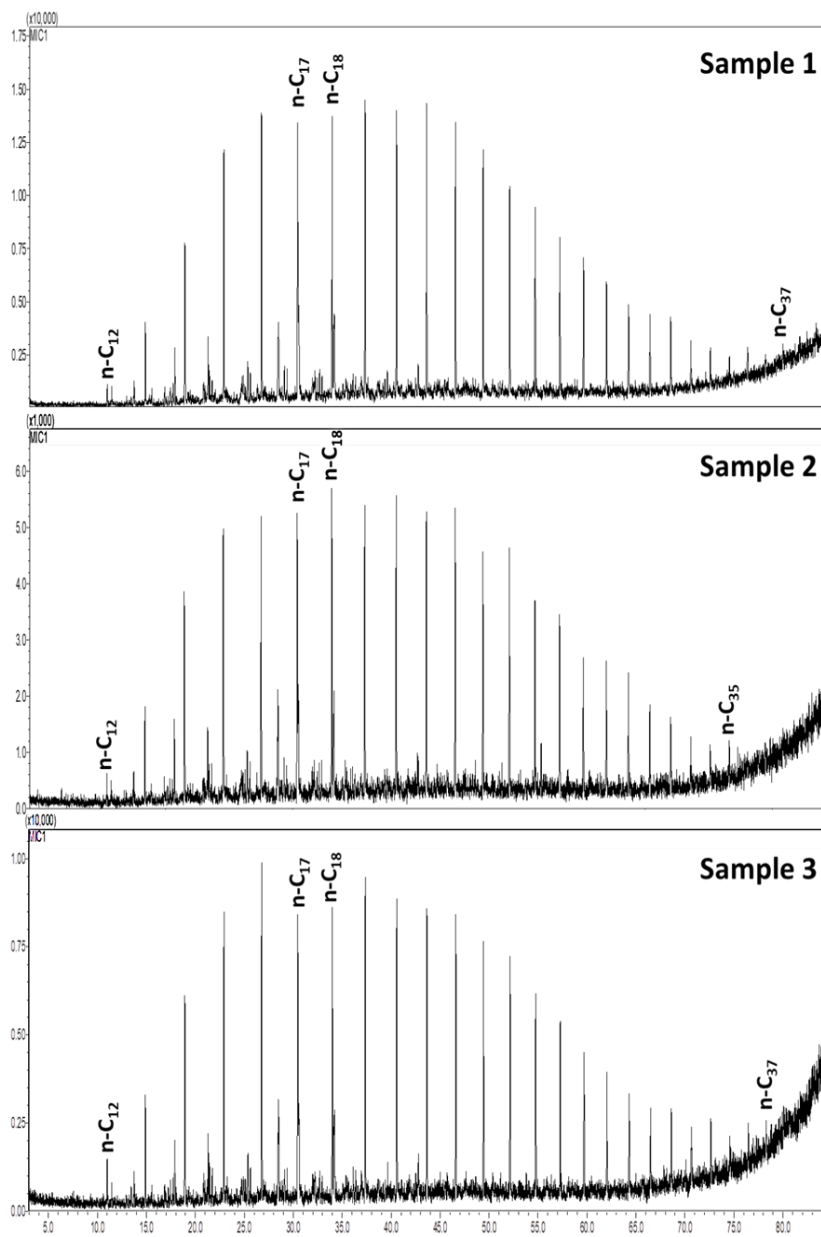
4.1 *Avaliação de similaridade das amostras do derramamento no litoral sergipano*

4.1.1 Perfis cromatográficos de *n*-alcanos para amostras de óleo do derramamento e biomarcadores por GC/MS

A impressão digital química da fração de *n*-alcanos de um óleo é uma das principais abordagens para distinguir e diferenciar as fontes de óleo desconhecido e produtos refinados associados aos derramamentos nos ambientes [108]. Geralmente, no primeiro estágio para investigar as correlações óleo-óleo, o GC-FID é usado. No entanto, os TICC's no GC/MS são equivalentes, e, portanto, fornecem as mesmas informações sobre os perfis das amostras. Além disso, a GC/MS permite operar no modo de reconstrução do cromatograma a partir de um íon específico (RIC, do inglês, *reconstructed ion chromatogram*), reduzindo os efeitos de *background* e aumentando a intensidade dos compostos contendo o íon selecionado [119].

Os cromatogramas reconstruídos do íon *m/z* 85 extraído do TICC para análise de hidrocarbonetos saturados dos óleos do derramamento apresentaram a mesma faixa de *n*-alcanos, de *n*-C₁₃ até *n*-C₃₄₋₃₅, com uma distribuição unimodal inclinada para parafinas de cadeia média (entre 7 e 12 átomos de carbono) e longa (mais que 12 átomos de carbono), característica de contribuição de matéria orgânica de origem terrestre para a sua formação (**Figura 13**). Além disso, os *n*-alcanos no intervalo *n*-C₁₇ a *n*-C₂₂ com alturas similares corrobora essa afirmação, uma vez que este tipo de distribuição é semelhante àquelas encontrados em betumes relacionados aos querogênios do tipo II formados a partir de matéria biogênica planctônica/bacteriana ou bacteriana/terrígena [120,121].

Figura 13. Perfil das amostras dos óleos do derramamento obtidos por GC/MS-RIC (íon m/z 85).

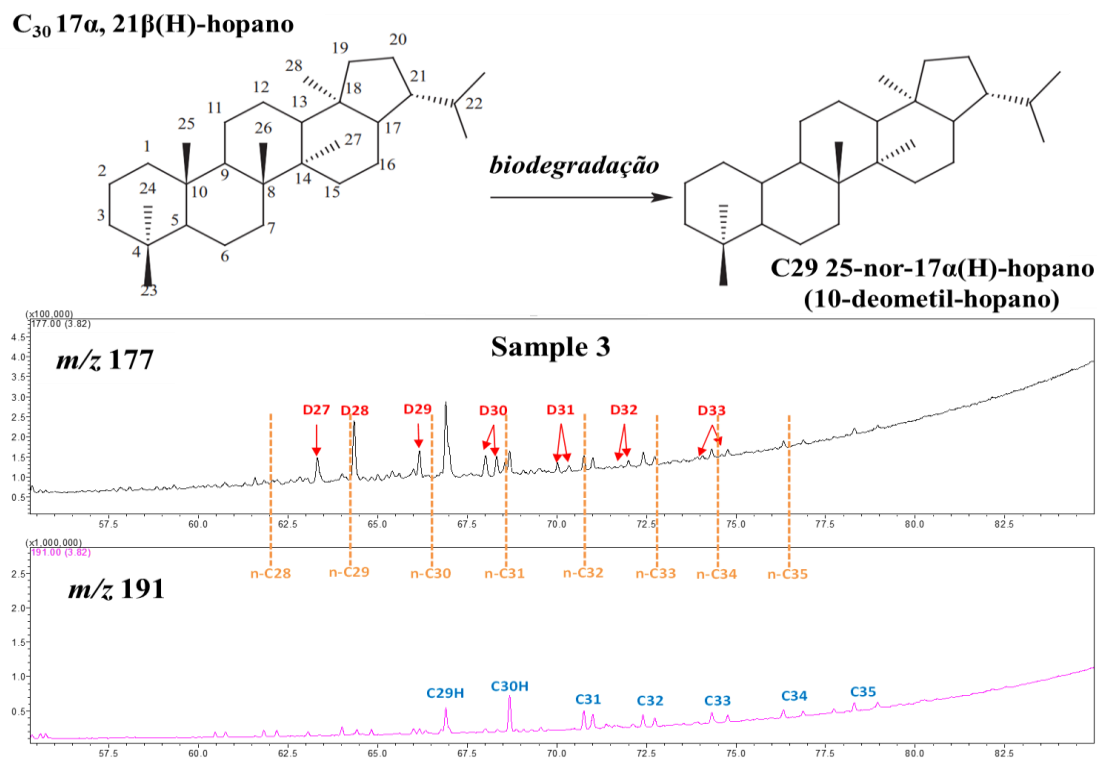


Fonte: Própria.

Em consonância, os valores moderados de Preferência de Hidrocarbonetos Ímpares sobre Pares (OEP), igual a 0,94 para a Sample 1, igual a 1,04 para a Sample 2 e igual a 1,06 para a Sample 3, sugerem aporte de matéria orgânica misto, derivado de algas e plantas superiores. Ademais, a distribuição de parafinas não apresentou preferência de carbono par ou ímpar, como visto nos valores de OPE, o que indica que as amostras são provavelmente evoluídas termicamente [30,120,122]

De acordo com o índice de biodegradação proposto por Peters *et al.* 2005, a presença da *n*-alcanos classifica os óleos como levemente biodegradados (nível 1 – 3). No entanto, 25-norhopanos foram detectados por GC/MS-SIM monitorando o íon m/z 177 para amostras de óleo do derramamento, indicando grau de biodegradação moderado (nível 4 e 5) ou pesado (nível 6 e 7) (**Figura 14**) [123]. Contudo, não é apropriado dizer que este grau de biodegradação seja resultante do processo de intemperismo, uma vez que o ambiente aquático ao qual o óleo foi exposto é o ambiente marinho, e seu tempo de exposição é desconhecido [124]. No entanto, a coexistência de 25-norhopanos e *n*-alcanos nas amostras pode ser resultado da mistura natural de dois ou mais petróleos em estágios diferentes de biodegradação, que pode ter ocorrido durante o processo de enchimento do reservatório ou fruto de um processo de *blending* (mistura de óleos com diferentes graus API), comumente realizado nas unidades produtoras de petróleo para redução de viscosidade e aumento do valor de mercado de um óleo mais pesado [125].

Figura 14. Presença de 25-norhopanos nas amostras do derramamento (representado pela Sample 3).



Fonte: Própria.

Quanto às razões Pristano/Fitano (Pr/Ph) dos óleos do derramamento, foram observados os valores de 1,71 para a Sample 1, para a Sample 2 foi de 1,65 e para a Sample 3 igual a 1,88. Esses valores indicam que a rocha do reservatório foi depositada em condições subóxicas [6,120]. Esses óleos também exibiram baixas razões de $Pr/n-C_{17}$ e $Ph/n-C_{18}$, corroborando os indicativos de alta maturidade, principalmente, devido à mudança na distribuição de *n*-alcano dos componentes de maior massa molecular para os de menor massa molecular, processo que ocorre no estágio final da catagênese [126].

4.1.2 Identificação de esteranos e terpanos por GC/MS-SIM, e distribuição das razões de biomarcadores para as amostras dos óleos analisados

A composição do óleo pode variar, dependendo da fonte, do estado térmico durante o processo de produção, e das condições geológicas da migração e do reservatório. Como tal, os óleos brutos podem apresentar grandes diferenças nos padrões de distribuição dos perfis de *n*-alcanos e da mistura complexa não resolvida (UCM), proporções relativas significativamente diferentes de isoprenóides em relação aos alcanos normais e, também, grandes diferenças nos padrões de distribuição e concentrações de biomarcadores [107,127,128].

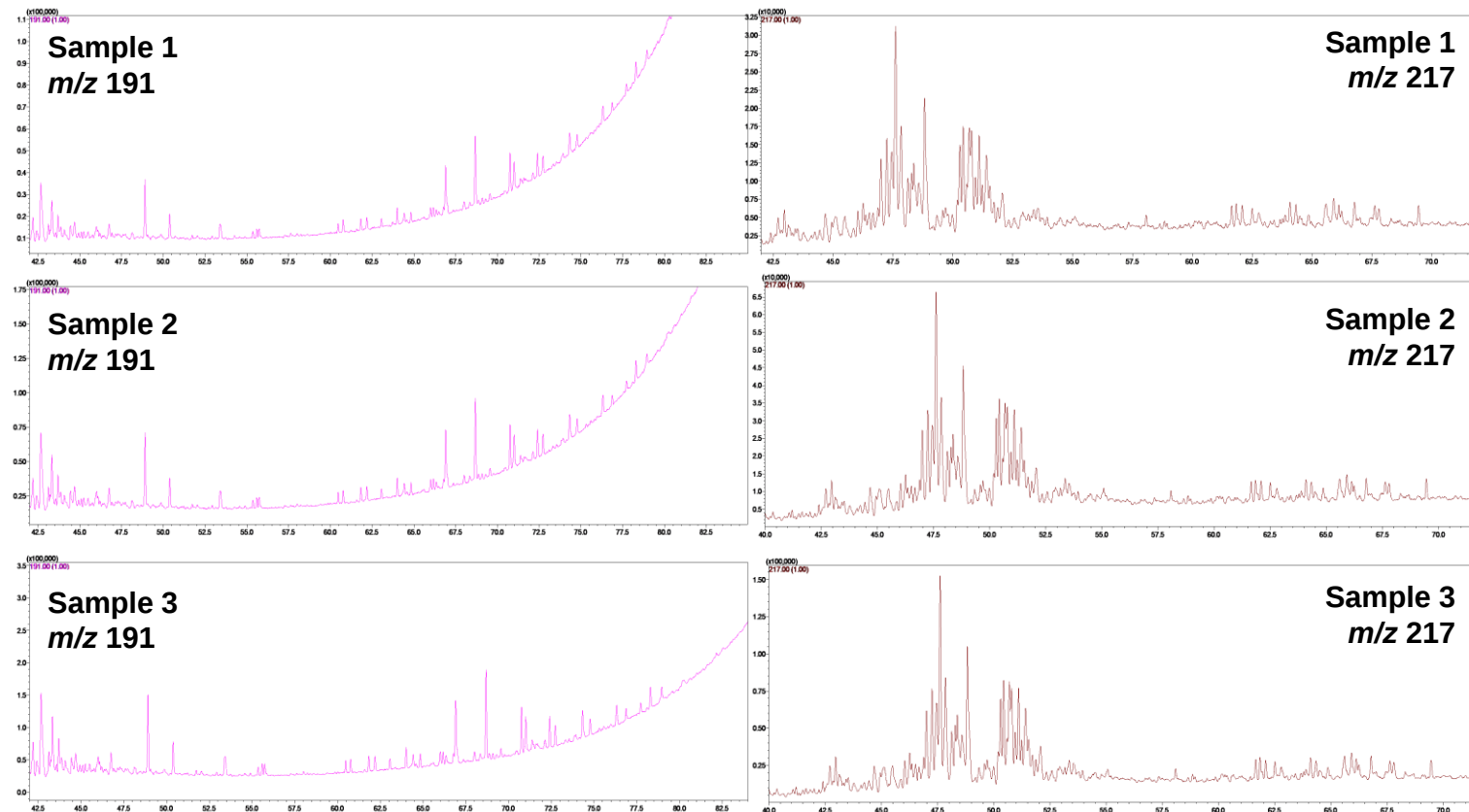
Os geoquímicos de petróleo tratam biomarcadores saturados e aromáticos como qualquer outro composto-alvo, ou seja, são montados histogramas de distribuições para comparações visuais e/ou estatísticas das amostras. As razões de biomarcadores comumente usadas, derivadas de biomarcadores saturados e aromáticos, são quase idênticas as usadas na geoquímica de petróleo; elas incluem: Ts/Tm, terpanos tricíclicos C_{23}/C_{24} , terpano tricíclico C_{23} e C_{24} em hopano, hopano C_{28}/C_{30} , hopano C_{29}/C_{30} , oleanano/ C_{30} hopano, gamacerano/ C_{30} hopano, hopano C_{35}/C_{30} [42,122].

Os hopanos e os esteranos, que são tipicamente resistentes à degradação, mudanças e transformações no ambiente, são importantes biomarcadores para correlações óleo-óleo [6,41,127]. Além disso, os

biomarcadores cíclicos resistem à biodegradação, tornando-os compostos ideais para identificar a origem dos óleos do derramamento [122,129,130].

Deste modo, após avaliação do perfil de *n*-alcanos, mediante método proposto por Stout (2016) [5], as amostras foram caracterizadas quanto ao conteúdo de biomarcadores geoquímicos utilizando a GC/MS-SIM, mediante seleção dos íons *m/z* 217 e 191, para identificar os esteranos e terpanos, respectivamente. Os resultados estão apresentados na **Figura 15**. Com base nos cromatogramas de referência e nos tempos de retenção, o pico individual de cada biomarcador foi atribuído (**ANEXO 2 e ANEXO 3; APÊNDICES 11–13**) [13,42,110].

Figura 15. Perfis dos biomarcadores hopanos (m/z 191) e esteranos (m/z 217) obtidos por GC/MS-SIM dos óleos do derramamento.



Fonte: Própria.

Com relação à distribuição de biomarcadores dos óleos do derramamento obtidos a partir do monitoramento de hopanos pelo modo SIM (**Tabela 3**), ao analisar as razões de biomarcadores, foi observado que eles têm uma distribuição bastante semelhante. O desvio padrão relativo (DPR%) maior de 10% é um indicativo de derramamento de óleo misto; no entanto, qualquer valor menor que isso é uma confirmação de apenas um tipo de fonte de óleo [131]. Portanto, comparando-as com base no DPR% para cada razão de biomarcadores, observou-se que, para a 92% delas, as variações encontradas não excederam 5% em relação às medidas. Entre as 25 razões utilizadas, apenas H33S/H33R e C₂₈ (20S)/C₂₈ (20R) apresentaram DPR% acima desse valor.

Tabela 3. Tratamento univariado via DPR (%) para o conjunto de razões de biomarcadores obtidos por GC/MS-SIM para os óleos do derrame no litoral nordestino.

Razão de biomarcadores	Sample 1	Sample 2	Sample 3	DPR (%)
OEP	0,94	1,04	1,06	6%
Pr/Ph	1,71	1,65	1,88	7%
TR19/TR23	0,58	0,52	0,54	6%
TR21/TR23	0,314	0,343	0,309	6%
TR23/TR24	2,406	2,473	2,369	2%
TR23/H30	0,810	0,858	0,858	3%
TR24/H30	0,336	0,347	0,362	4%
Ts/Tm	0,520	0,494	0,499	3%
H28/H30	0,126	0,132	0,143	7%
H29/H30	0,533	0,526	0,536	1%
OL/H30	0,068	0,083	0,078	10%
M30/H30	0,096	0,099	0,094	3%
GAM/H30	0,061	0,061	0,058	3%
(TR19-TR26)/H30	3,313	3,730	3,780	7%
H31S/H31R	1,360	1,260	1,228	5%
H32S/H32R	1,412	1,372	1,389	1%
H33S/H33R	1,566	2,173	2,061	17%
C ₂₇ αββ/C ₂₉ αββ	1,108	1,189	1,148	4%
C ₂₈ αββ/C ₂₉ αββ	1,129	1,150	1,197	3%
C ₂₇ ββ/(C ₂₇ +C ₂₈ +C ₂₉)ββ	0,342	0,356	0,343	2%
C ₂₈ ββ/(C ₂₇ +C ₂₈ +C ₂₉)ββ	0,349	0,344	0,358	2%
C ₂₉ ββ/(C ₂₇ +C ₂₈ +C ₂₉)ββ	0,309	0,299	0,299	2%
C ₂₇ (20S)/C ₂₇ (20R)	1,191	1,259	1,342	6%
C₂₈ (20S)/C₂₈ (20R)	0,312	0,258	0,326	12%
C ₂₉ (20S)/C ₂₉ (20R)	1,193	1,194	1,134	3%
C ₂₇ -C ₂₈ -C ₂₉ esteranos/H30	0,431	0,446	0,459	3%

A similaridade observada entre os perfis de esteranos e terpanos corroboram os resultados dos *perfis das amostras* de *n*-alcanos dos óleos do derramamento. Além disso, as razões de biomarcadores apresentaram valores próximos, com DPR (%) abaixo de 10, como pode ser visualizado na **Tabela 3**. Os principais esteranos identificados nas amostras de óleos foram isômeros ópticos de C₂₇ a C₂₉. Dentre esses, os esteranos C₂₉αββR e C₂₉αββS apresentaram os maiores valores. A principal razão de biomarcadores nos esteranos foi C₂₉ (20S)/C₂₉ (20R). Todos os picos reconhecidos para os terpanos foram hopanos de C₁₉ a C₃₅. A principal razão de biomarcadores para os terpanos foi (TR19-TR26)/H30.

Embora a relação OL/H30 seja geralmente considerada um indicador robusto de maturidade térmica, a interpretação dos valores da relação pode ser afetada por vários fatores, incluindo a idade geológica das rochas geradoras e a origem do material orgânico. Ela é considerada uma razão de biomarcador exclusiva, e pode ser utilizada para identificar a fonte do petróleo, pois a sua presença e a sua concentração variam de acordo com a origem geográfica e a idade do petróleo [12]. Assim, considerando os DPR's determinados para 92% das razões de biomarcadores e a presença de oleanano, com 10% de DPR, sugere-se que esse derramamento de óleo encontrado no litoral de Sergipe tenha sido originado de uma fonte única, essa afirmação é corroborada pela descrita por Lourenço [15].

4.2 Avaliação de similaridade entre amostras do derramamento e óleos suspeitos

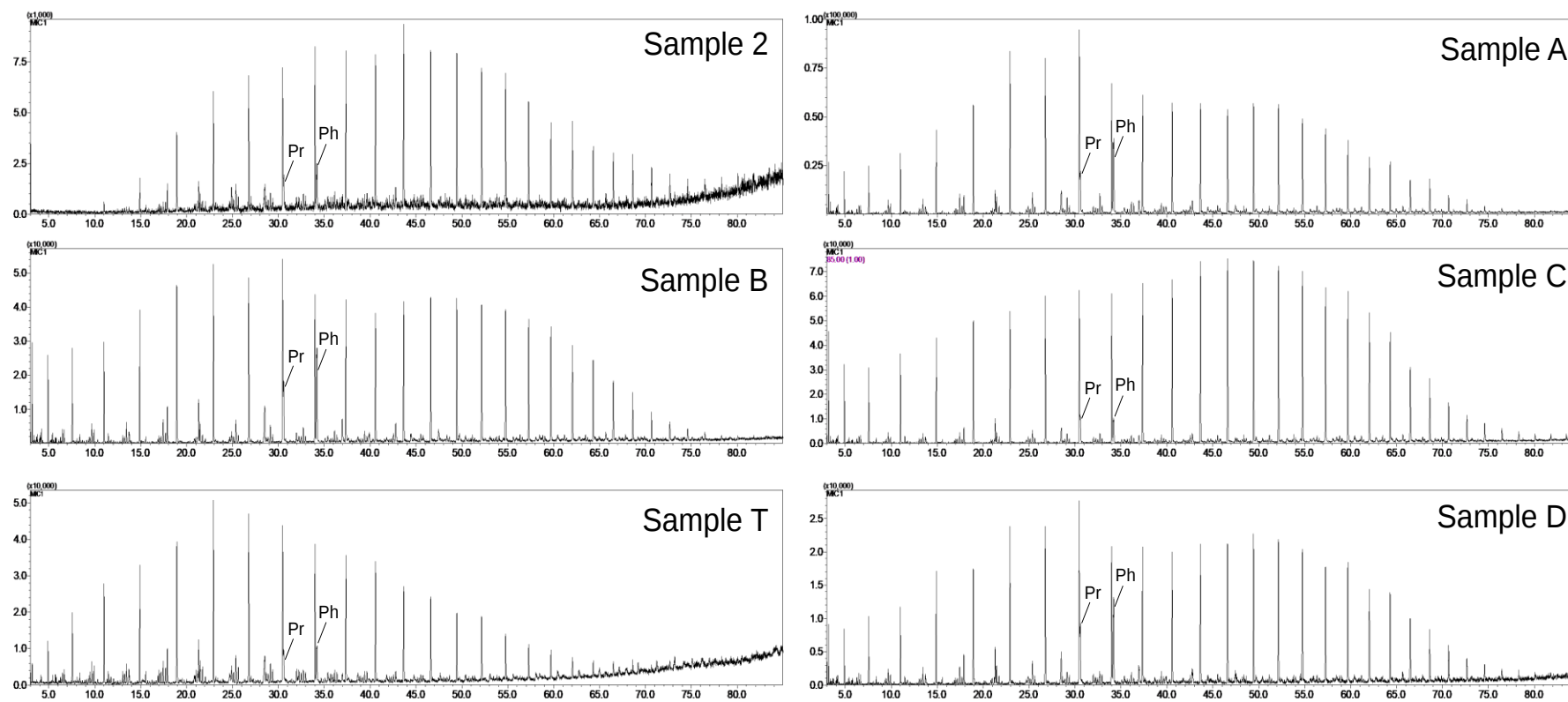
Seguindo o mesmo protocolo aplicado no tópico 4.1 para a investigação de similaridade entre as amostras do derramamento no litoral sergipano, as amostras de óleos produzidos em Sergipe foram comparadas com as amostras do derramamento. Os resultados obtidos foram posteriormente submetidos a tratamento estatístico multivariado, e duas possibilidades foram consideradas: (i) pelo menos uma das amostras de óleos produzidas em Sergipe estaria relacionada ao derramamento; e (ii) nenhuma amostra, entre as produzidas em Sergipe, estaria relacionada ao derramamento.

4.2.1 Comparação dos dados obtidos por GC/MS-RIC dos óleos do derramamento, tambor e produzidas em Sergipe-Alagoas

A respeito dos perfis dos óleos de Sergipe-Alagoas, **Figura 16**, foram observadas distribuições semelhantes, com padrões bimodais inclinados para *n*-alcanos de cadeia média e curta (menor que 7 átomos de carbono), com exceção do óleo “C” (Sample C), para o qual a distribuição apresentou um padrão bimodal inclinado para *n*-alcanos de cadeia longa. Distribuições bimodais, principalmente, as com predominância da faixa de *n*-C₂₃ a *n*-C₃₁ são geralmente associados a ceras de plantas superiores terrígenas, conforme observado para óleo C.

Para os óleos “A”, “B” e “D” (Sample A, Sample B e Sample D, respectivamente) a distribuição inclinada para parafinas mais leves indica contribuição de ambas origens, terrígena e marinha, com maior contribuição de biomassa marinha [30,122,132]. E com relação ao óleo do tambor (Sample T), observou-se um perfil destoante dos demais, apresentando uma distribuição unimodal com predominância de compostos de cadeia curta. Tal distribuição é fortemente característica de aporte de matéria orgânica de algas [30,31].

Figura 16. Comparação dos GC/MS-RIC dos óleos da bacia SE-AL (Samples A, B, C, D) e do tambor (Sample T) com o derramado.



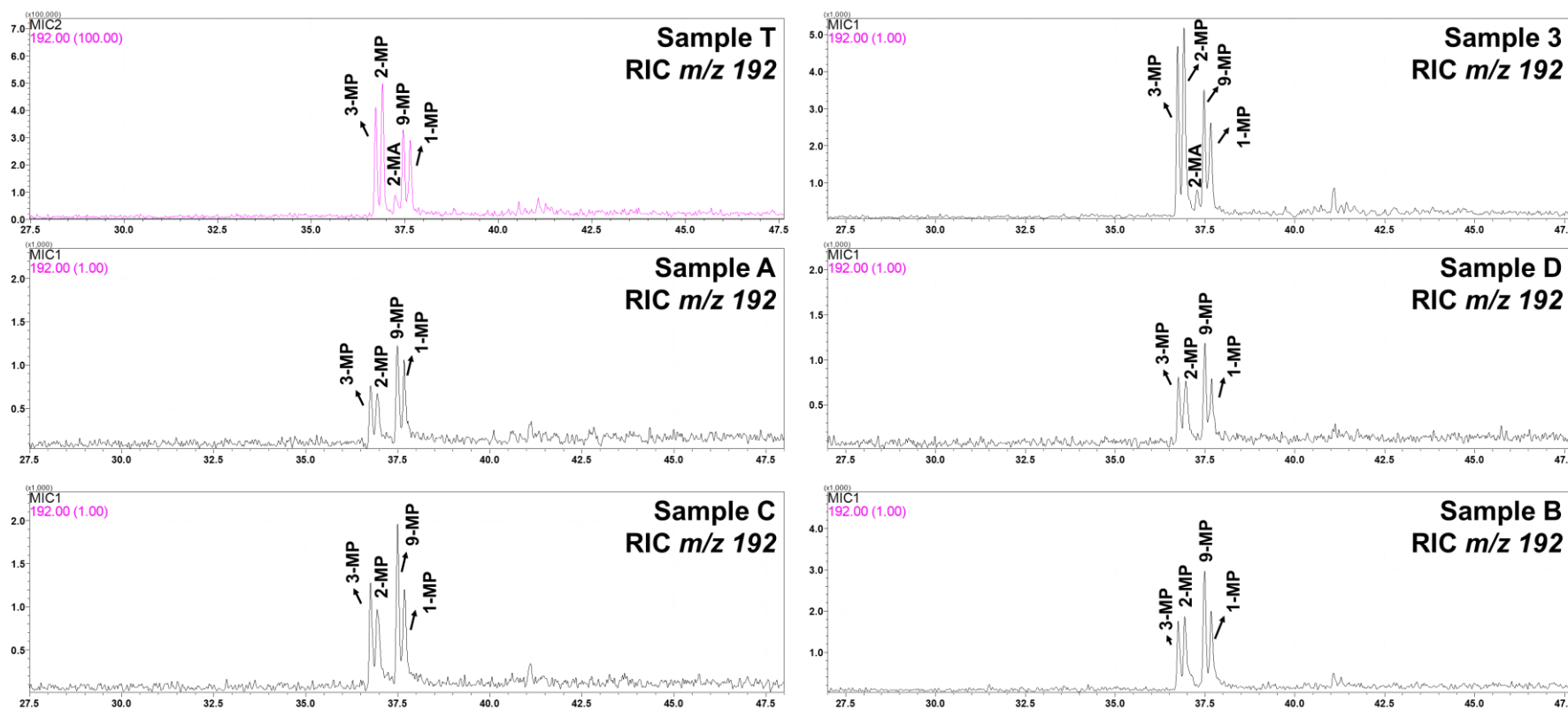
Fonte: Própria.

Comparando os perfis dos compostos parafínicos dos óleos do derramamento (representados pela Sample 2) e produzidos em Sergipe, foi observado que, enquanto as amostras do derramamento apresentaram o padrão de compostos parafínicos variando de $n\text{-C}_{12-13}$ a $n\text{-C}_{33-34}$, com uma distribuição bimodal enviesada para n -alcanos de cadeia média e longa, os perfis dos óleos brutos da bacia de SE-AL mostraram-se numa faixa mais extensa de compostos parafínicos, variando de $n\text{-C}_7$ a $n\text{-C}_{37}$, e, embora apresentassem um comportamento bimodal, não compartilham similaridades com as amostras do derramamento. De igual modo, o perfil do óleo no tambor também não apresentou similaridade com as amostras do derramamento quando avaliada a distribuição de n -alcanos (nível 1).

Estudos anteriores acerca da classificação dos óleos aportados nas praias brasileiras, mediante avaliação das distribuições de isômeros de $\text{C}_{1\text{-}}$ fenantrenos/antracenos e C_1 -dibenzotiofenos, indicaram que o óleo do derramamento é algum material termicamente alterado [133]. Com base nisso, o cromatograma reconstruído do íon m/z 192, **Figura 17**, foi elaborado para visualização da distribuição dos metilfenantrenos e, consequente, classificação dos óleos do derramamento, tambor e da bacia SE-AL.

Para óleos brutos tratados termicamente, os compostos 2- e 3-metilfenantreno (2-MP e 3-MP, respectivamente), mais termicamente estáveis em relação aos 9/4- e 1-metilfenantreno (9-MP e 1-MP, respectivamente), apresentam maior altura do pico em relação ao 9-MP e 1-MP [5]. Além disso, o biomarcador 2-metilantraceno (2-MA) foi detectado acima do ruído do cromatograma apenas nas amostras Sample T e Sample 3. A presença desse composto é visualizada em concentrações traço em óleos brutos e derivados, contudo, tem sua concentração elevada em óleos termicamente tratados[133]. Em terceiro lugar, a razão de biomarcadores obtida a partir da relação de 2-metilantraceno para o total de metilfenantrenos foi de 0,04 e 0,05 para as amostras Sample 3 e Sample T, respectivamente, dentro da faixa de 0,04 a 0,09 em óleos combustíveis pesados modernos que contêm materiais craqueados [133]. Esse resultado corrobora o descrito por Reddy et al. (2022), o qual afirmou que tais descobertas indicam que o óleo do derramamento do Brasil contém materiais refinados e não apenas um óleo bruto virgem.

Figura 17. Avaliação do perfil de metilfenantrenos e 2-metilantraceno para as amostras do derramamento, tambor e da bacia SE-AL obtido por GC/MS-SIM.



Fonte: Própria.

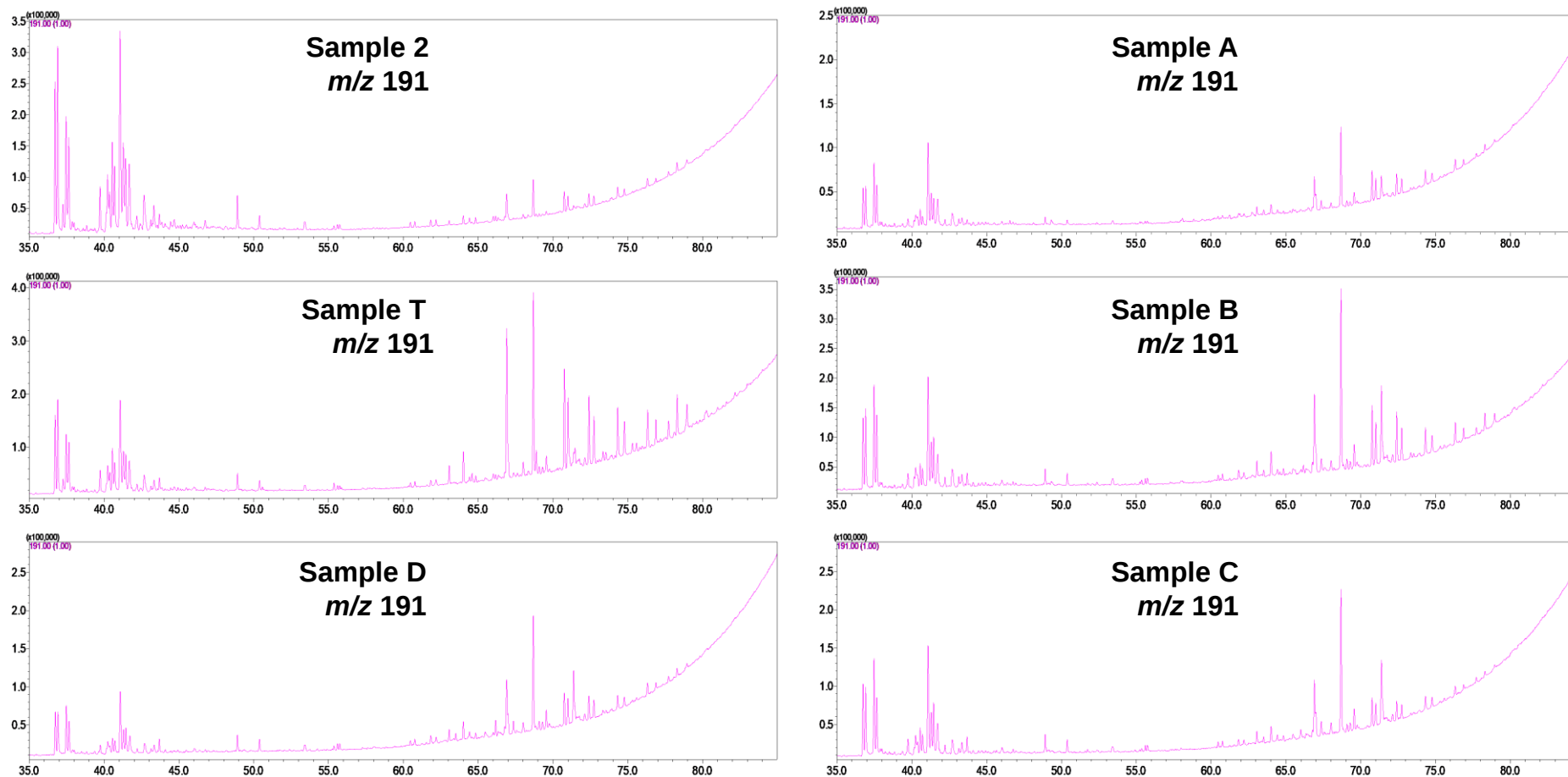
4.2.2 Comparação dos perfis de biomarcadores e razões de biomarcadores por GC/MS-SIM

Ao comparar os perfis de biomarcadores terpanos (**Figura 18**), observou-se que a altura dos picos referentes aos terpanos tri- e tetracíclicos (tempo de retenção entre ~40 e ~62 min) em relação aos pentacíclicos ($T_R > 62$ min) é superior nas amostras do derramamento (representada pela Sample 2). Esse perfil não é observado nas demais amostras, as quais apresentaram uma relação inversa a essa observada. Dentre elas, destacam-se as amostras de óleo Sample T e Sample D que demonstraram maior disparidade entre as alturas das regiões dos hopanos e terpanos.

Segundo Peters, Walter e Moldowan (2005), terpanos tricíclicos mais abundantes, comumente se correlacionam com rochas de elevada paleolatidade e ricas em tasmanitas, sugerindo uma origem dessas algas, como *Prasinophyte algae*, embora outras fontes sejam possíveis [31]. Além disso, como mostrado no trabalho de Philip *et al.* (2021), o aumento na proporção dos terpanos tricíclicos em relação aos 17 α (H)-hopanos está relacionado com o aumento da evolução térmica [134]. Nesse sentido, a partir dos perfis de biomarcadores obtidos pelo íon m/z 191 para as amostras do derramamento, dos óleos da bacia SE-AL e do tambor, pode-se afirmar que tanto o aporte de biomassa, quanto o grau de evolução térmica são diferentes entre as amostras de óleos da bacia SE-AL e do derramamento.

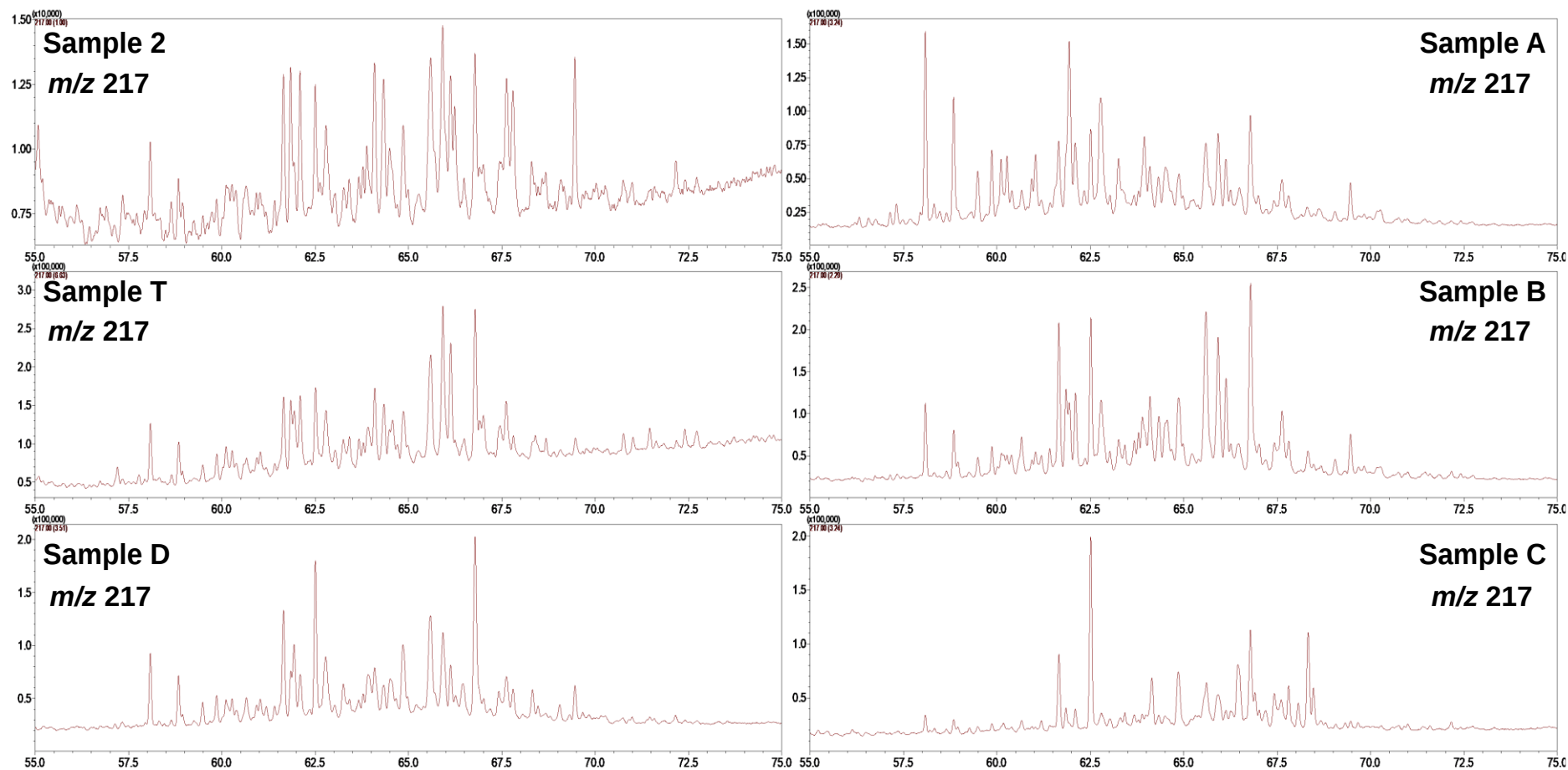
Com relação aos perfis de biomarcadores obtidos para os esteranos (íon m/z 217), **Figura 19**, observou-se que em relação a amostra do derramamento (representada pela Sample 2) nenhuma das amostras apresentaram perfil similar. Ademais, visualmente, tornou-se complexo a extração de informações dos cromatogramas. Assim, viu-se a necessidade de avaliar algumas razões de marcadores importantes na comparação geoquímica dos óleos.

Figura 18. Perfil cromatográfico dos biomarcadores tipo hopanos (m/z 191) das amostras do derramamento (Sample 2) e de óleos da bacia SE-AL (Samples A, B, C, D) e do tambor (Sample T).



Fonte: Própria.

Figura 19. Perfil cromatográfico dos biomarcadores tipo esteranos (m/z 217) das amostras do derramamento (Sample 2), dos óleos da bacia SE-AL (Samples A, B, C e D) e do tambor (Sample T).

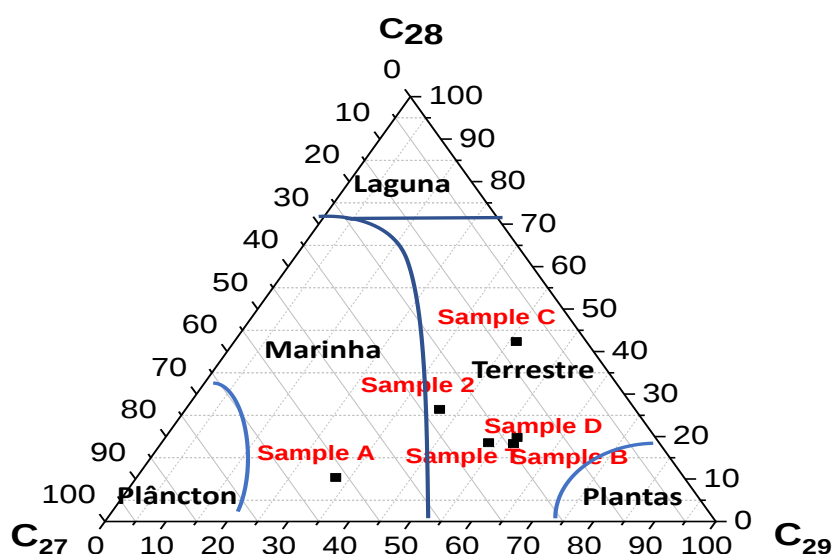


Fonte: Própria.

As abundâncias relativas de esteranos C_{27} - C_{28} - C_{29} ($\%C_{27}$, $\%C_{28}$ e $\%C_{29}$) são relacionadas ao aporte de matéria orgânica. Nesse sentido, um diagrama ternário pode ser usado para correlação de óleos, e betumes, com o tipo de matéria orgânica depositada. Por exemplo, altos valores de $\%C_{29}$ geralmente estão associados ao aporte principal de esteróis de plantas superiores, enquanto que de $\%C_{28}$ está usualmente associado a entrada de matéria orgânica oriunda de fitoplanctons. Por fim, altos valores de $\%C_{27}$ estão atrelados com aporte de matéria orgânica de zooplanctons. Vale ressaltar que este diagrama pode ser utilizado para diferenciar diversos ecossistemas e distinguir grupos de óleos brutos a partir de uma mesma rocha geradora [6,85,122].

Os dados obtidos para distribuições relativas de esteranos C_{27} - C_{28} - C_{29} (**Tabela 4**) foram utilizados para construir o referido diagrama. Dessa forma, avaliando o digrama ternário (**Figura 20**) construído para o referido conjunto de amostras, observou-se que, apesar de não apresentarem perfis de esteranos semelhantes, com exceção da Sample A que apresentou maior contribuição de matéria orgânica marinha, todas as demais possuem maior contribuição de matéria orgânica de origem terrestre [135].

Figura 20. Diagrama ternário de esteranos regulares para as amostras derramada, dos óleos da bacia SE-AL e do tambor.



Fonte: Própria.

Tabela 4. Razões de biomarcadores obtidas via GC/MS-SIM utilizando os íons m/z 191 e 217.

Razão de biomarcadores	Sample 2	Sample T	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
TR21/TR23	0,343	0,244	0,485	0,263	0,203	0,055
TR23/TR24	2,473	1,685	1,743	1,343	1,513	1,486
TR23/H30	0,858	0,087	0,078	0,081	0,116	0,133
TR24/H30	0,347	0,052	0,045	0,06	0,077	0,089
Ts/Tm	0,494	0,594	0,839	0,637	0,736	0,645
H28/H30	0,132	0,025	0,023	0,012	0,063	0,022
H29/H30	0,526	0,979	0,229	0,321	0,23	0,309
OL/H30	0,083	0,027	0,000	0,000	0,000	0,000
M30/H30	0,099	0,078	0,135	0,122	0,142	0,147
GAM/H30	0,061	0,04	0,208	0,5	0,546	0,509
(TR19-TR26)/H30	3,73	0,409	0,567	0,454	0,524	0,587
H31S/H31R	1,26	1,629	1,348	1,339	1,062	1,247
H32S/H32R	1,372	1,389	1,553	1,445	1,328	1,406
H33S/H33R	2,173	1,604	1,493	1,681	1,171	1,519
C ₂₇ αββ/C ₂₉ αββ	1,189	0,516	0,537	0,66	1,199	0,522
C ₂₈ αββ/C ₂₉ αββ	1,15	0,524	0,483	0,511	0,852	0,494
%C ₂₇ ^a	32,02%	27,90%	57,03%	23,94%	11,47%	22,63%
%C ₂₈ ^b	26,37%	18,53%	10,35%	18,31%	42,33%	19,78%
%C ₂₉ ^c	41,60%	53,57%	32,62%	57,74%	46,20%	57,59%
C ₂₇ (20S)/C ₂₇ (20R)	1,259	0,971	0,269	1,523	3,898	1,361
C ₂₈ (20S)/C ₂₈ (20R)	0,258	0,373	0,247	0,197	0,12	0,114
C ₂₉ (20S)/C ₂₉ (20R)	1,194	1,181	0,707	0,892	0,668	0,554
C ₂₇ -C ₂₈ -C ₂₉ esteranos/H30	0,446	0,298	1,049	1,248	0,438	1,115

^a C₂₇20R/(C₂₇+C₂₈+C₂₉)20R; ^b C₂₈20R/(C₂₇+C₂₈+C₂₉)20R; ^c C₂₉20R/(C₂₇+C₂₈+C₂₉)20R.

4.2.3 Tratamento multivariado para análise de similaridade a partir das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM

A análise de dados é uma parte importante para avaliação de casos reais de derramamento de óleo. Técnicas de avaliação de dados para identificação de derramamento/fonte, correlação e diferenciação de óleo têm, tradicionalmente, centrado em métodos de comparação de desvios padrões relativos e perfis, como feito no **Tópico 4.1** [12]. Contudo, tratamentos estatísticos univariados são complexos de serem feitos quando há muitas amostras diferentes. Nesse sentido, a partir dos dados da **Tabela 4**, foram executados tratamentos estatísticos multivariados, uma vez que os dados apresentados até aqui apontam para amostras diferentes.

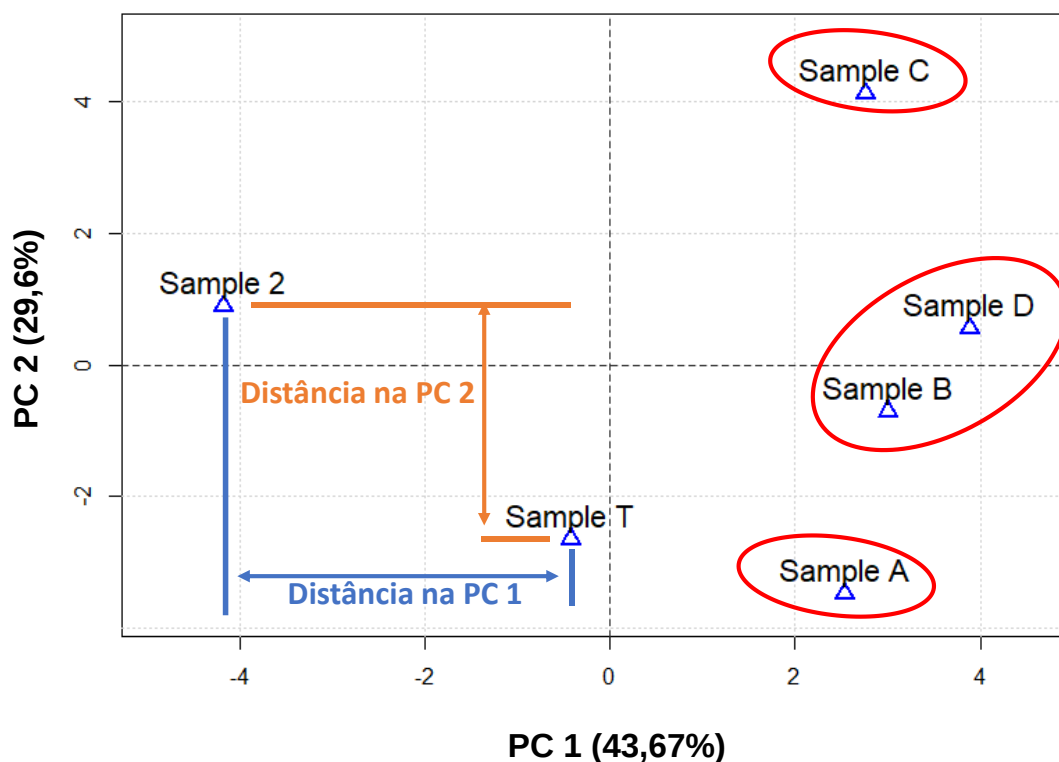
O PCA assume distribuição multinomial do conjunto de dados, sendo necessária a transformação ou padronização prévia dos dados. Além disso, as métricas também afetam os resultados do PCA e, se as variáveis não forem padronizadas para escalas relativas, o PCA pode ser dominado por poucas variáveis com grandes unidades de medida [136].

Assim, devido aos diferentes valores observados para cada razão de biomarcadores, foi necessário efetuar uma operação de padronização de colunas para remover tais diferenças. O escalonamento automático, também chamado de padronização de coluna, é uma operação de pré-processamento que remove as diferenças entre o intervalo das variáveis e lhes dá a mesma importância em uma análise de dados multivariada. O procedimento é executado subtraindo a média da coluna correspondente de cada ponto de dados e dividindo por seu desvio padrão da coluna. Desta forma, os dados padronizados apresentam, ao final deste tratamento, a mesma significância (peso) [113].

Vinte e três razões de biomarcadores, compostas por índices baseados em biomarcadores, foram analisadas. Inicialmente, as 23 razões foram comparadas usando análise de componentes principais (PCA). O gráfico de pontuação do fator do primeiro e do segundo componentes principais (PC1 e PC2, respectivamente) é mostrado na **Figura 21**. PC1 e PC2 representaram 43,67% e 29,6% da variância total entre as amostras de óleo, respectivamente.

Assim, a maior parte da variância entre as amostras é expressa neste gráfico bidimensional.

Figura 21. Gráfico de escores para o conjunto de razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM para os íons m/z 191 e 217.



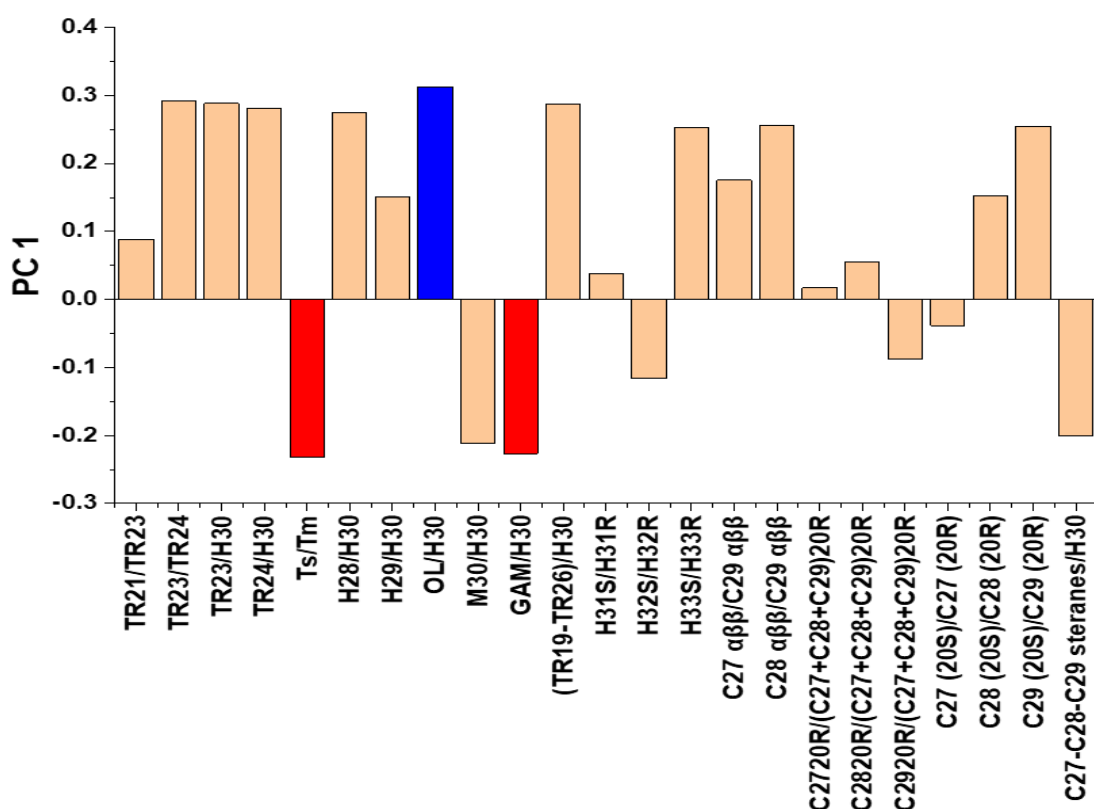
Fonte: Própria.

As distâncias euclidianas entre as amostras traçadas no gráfico de pontuação representam diferenças reais e defensáveis dos índices utilizados. Dentre as amostras de óleos suspeitos, que se aproximam da amostra de óleo do derramamento, apenas a Sample T mostrou-se candidata. No entanto, devido à distância euclidiana entre as duas, pode haver equívoco ao agrupá-las em um mesmo conjunto.

Ao avaliar os gráficos de pesos das PC1 (eixo x), **Figura 22**, observou-se que as amostras são separadas positivamente principalmente pela razão de biomarcadores OL/H30, presente apenas nos óleos “T” e “2”, e negativamente pelas razões Ts/Tm e GAM/H30. Com relação ao biomarcador Oleanano, presente em óleos brutos e extratos de rocha, ele é um biomarcador específico para aporte de matéria orgânica e idade geológica [14,137]. Este biomarcador,

que tem dois isômeros, 18α -(H)-oleanano e 18β -(H)-oleanano, é encontrado apenas em rochas e óleos do Terciário e Cretáceo (<130 milhões de anos) e é altamente específico para entradas de plantas de angiosperma [5,12,138,139]. Desta forma, as amostras de óleo Sample T e Sample 2 compartilharam aportes de matéria orgânica e idade de formação semelhantes.

Figura 22. Distribuição de pesos da PC1 para os biomarcadores esteranos e hopanos obtidos por GC/MS-SIM.

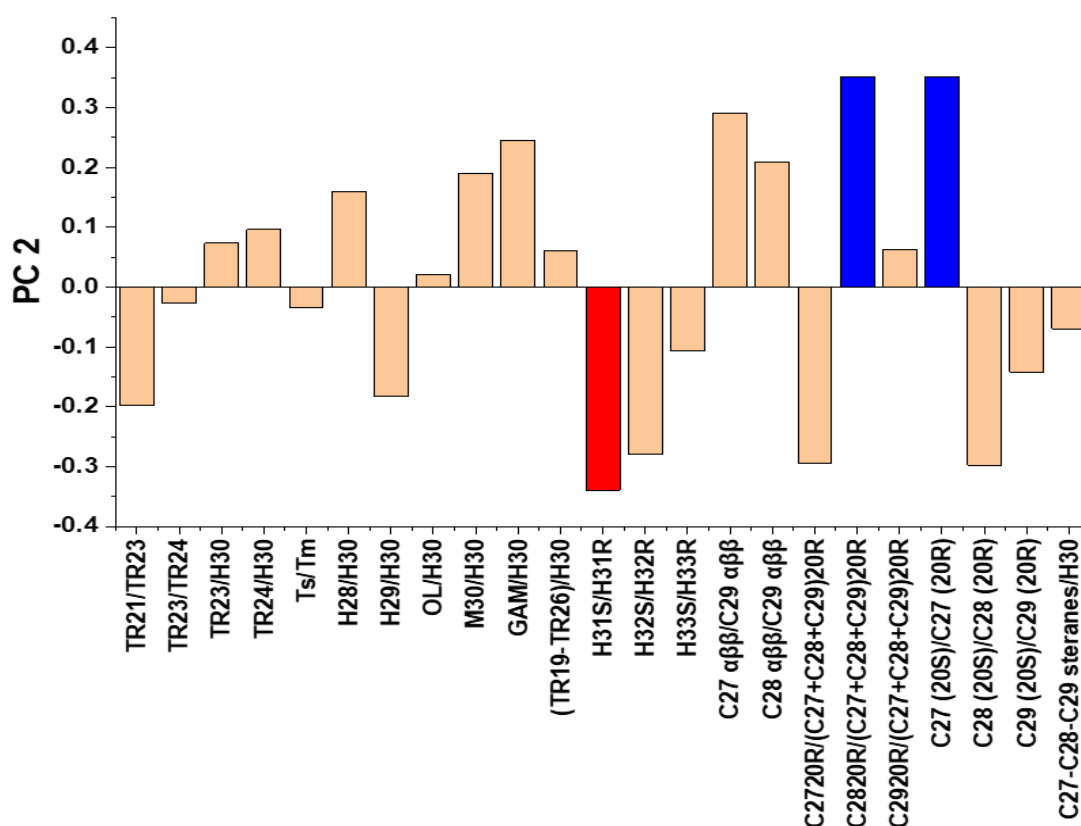


Fonte: Própria.

Com relação ao gráfico de pesos da PC2 (eixo Y), **Figura 23**, viu-se que a separação ocorreu positivamente, principalmente, devido às razões $C_{28}20R/(C_{27}+C_{28}+C_{29})20R$ e $C_{27} (20S)/C_{27}(20R)$, e negativamente devido à razão $H_{31}S/H_{31}R$. A razão $C_{28}20R/(C_{27}+C_{28}+C_{29})20R$ indica aporte de matéria orgânica, e como discutido acima, está geralmente associada a fitoplanctons, assim, as amostras de óleo Sample 2, Sample D e Sample C apresentaram maiores contribuições dessa matéria orgânica em comparação com as amostras de óleo Sample T, Sample A e Sample B. Com relação a razão de biomarcadores $C_{27} (20S)/C_{27}(20R)$, é possível diferenciar o grau de evolução térmica dos óleos,

uma vez que devido as interconversões estereoquímicas observadas para os compostos tipo esteranos, em que o esterano R isomeriza sob condições geológicas ao isômero S (termodinamicamente mais estável), esse tipo de informação pode ser coletada. Assim, as amostras de óleo Sample 2, Sample D e Sample B apresentaram evoluções térmicas intermediárias entre a Sample C (maior grau de evolução térmica por esse biomarcador) e as Sample T e Sample A (menor grau de evolução térmica por esse biomarcador) [31].

Figura 23. Gráfico de pesos da PC2 para os biomarcadores esteranos e terpanos obtidos por GC/MS-SIM.



Fonte: Própria.

Com base nos resultados acima, observou-se que a Sample T foi a que mais se assemelhou a Sample 2, por isso foi efetuado um tratamento univariado para prosseguir com a proposta de Stout (2016) para avaliação de similaridade entre óleos.

4.2.4 Tratamento univariado para análises de similaridade a partir das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM

Nesta tese, considerando as razões mostradas na **Tabela 3**, o desvio máximo permitido para a razão de biomarcadores para atribuição de similaridade foi de 10% por acreditar que não há prejuízos ao resultado final. Além deste, outro parâmetro foi levado em consideração para avaliação de similaridade entre duas amostras, o limite de repetibilidade, descrito por Hansen *et al.* (2007), o qual descreve que duas amostras são correspondentes se a diferença crítica for maior que a diferença absoluta [140]. Para o cálculo da diferença crítica foi utilizado um limite de repetibilidade igual à 14%, ou seja, foi considerando como 5% o DPr máximo, como descrito no método CEN [140], a diferença crítica foi calculada conforme **Equação 8**.

Avaliando a **Tabela 5**, observou-se que ambos os tratamentos levaram ao mesmo resultado, onde “NÃO” equivale a “Não correspondentes” e “SIM” a correspondentes. Em ambos os tratamentos apenas 3 das 21 razões de biomarcadores são correspondentes (14,3%). Analisando os dois cenários, as duas hipóteses apresentaram similaridade inferior a 50%, resultado que, segundo o método forense descrito em Stout (2016), indica que as amostras não possuem correlação positiva.

Desta forma, embora a amostra de óleo Sample T seja a mais próxima da amostra de óleo do derramamento (Sample 2), não é possível concluir que ela possua correlação positiva com as amostras do derramamento (representada pela Sample 2). Contudo, devido à especificidade do caso, onde a amostra do tambor (Sample T) chegou ao mesmo tempo que as amostras do derramamento (Sample 1, 2 e 3), e considerando a existência, em ambas amostras, de um biomarcador específico, como é o caso do Oleanano, observou-se a necessidade de aprofundar a caracterização de ambas as amostras por outras técnicas cuja aplicação pode ser associada a química forense. Assim, tornando a avaliação de similaridade/dissimilaridade mais inequívoca.

Tabela 5. Avaliação univariada das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS-SIM.

Razão de biomarcadores	Sample 2	Sample T	Média	DPR%	Diferença Absoluta	Diferença Crítica	Hansen <i>et al.</i> (2007)	DPR < 10%
TR21/TR23	0,343	0,244	0,294	24	0,099	0,041	NÃO	NÃO
TR23/TR24	2,473	1,685	2,079	27	0,788	0,291	NÃO	NÃO
TR23/H30	0,858	0,087	0,473	115	0,771	0,066	NÃO	NÃO
TR24/H30	0,347	0,052	0,200	105	0,295	0,028	NÃO	NÃO
Ts/Tm	0,494	0,594	0,544	13	0,100	0,076	NÃO	NÃO
H28/H30	0,132	0,025	0,079	96	0,107	0,011	NÃO	NÃO
H29/H30	0,526	0,979	0,753	43	0,453	0,105	NÃO	NÃO
OL/H30	0,083	0,027	0,055	72	0,056	0,008	NÃO	NÃO
M30/H30	0,099	0,078	0,089	17	0,021	0,012	NÃO	NÃO
GAM/H30	0,061	0,040	0,051	29	0,021	0,007	NÃO	NÃO
(TR19-TR26)/H30	3,730	0,409	2,070	113	3,321	0,290	NÃO	NÃO
H31S/H31R	1,260	1,629	1,445	18	0,369	0,202	NÃO	NÃO
H32S/H32R	1,372	1,389	1,381	1	0,017	0,193	SIM	SIM
C ₂₇ αββ/C ₂₉ αββ	1,189	0,516	0,853	56	0,673	0,119	NÃO	NÃO
C ₂₈ αββ/C ₂₉ αββ	1,150	0,524	0,837	53	0,626	0,117	NÃO	NÃO
%C ₂₇ ^a	32,02%	27,90%	29,96%	10	4,120	4,194	SIM	SIM
%C ₂₈ ^b	26,37%	18,53%	22,45%	25	7,840	3,143	NÃO	NÃO
%C ₂₉ ^c	41,600	53,570	47,585	18	11,970	6,662	NÃO	NÃO
C ₂₇ (20S)/C ₂₇ (20R)	1,259	0,971	1,115	18	0,288	0,156	NÃO	NÃO
C ₂₉ (20S)/C ₂₉ (20R)	1,194	1,181	1,188	1	0,013	0,166	SIM	SIM
C ₂₇ -C ₂₈ -C ₂₉ esteranos/H30	0,446	0,298	0,372	28	0,148	0,052	NÃO	NÃO
TR23/TR24	2,473	1,685	2,079	27	0,788	0,291	NÃO	NÃO

^a C₂₇20R/(C₂₇+C₂₈+C₂₉)20R; ^b C₂₈20R/(C₂₇+C₂₈+C₂₉)20R; ^c C₂₉20R/(C₂₇+C₂₈+C₂₉)20R.

4.3 Avaliação de similaridade entre as amostras do derramamento, dos óleos da bacia SE-AL e do tambor por GC/MS/MS-MRM

4.3.1 Tratamento multivariado para análise de similaridade por GC/MS/MS-MRM

A caracterização geoquímica de óleos brutos utilizando um analisador de íons tipo triplo quadrupolo operando no modo MRM permite a resolução de várias co-eluições em várias transições referente aos esteranos, hopanos e HPAs [141]. Para avaliação das razões de biomarcadores por GC/MS/MS-MRM, foi aplicado o método proposto por Prata (2016) de análise geoquímica para amostras brasileiras. Os cromatogramas obtidos para cada transição estão apresentados nos **APÊNDICE 16** ao **APÊNDICE 25**. O pico individual de cada biomarcador foi confirmado com base no tempo de retenção e nos cromatogramas de referência **ANEXO 4 e ANEXO 5**. As relações dos nomes de cada biomarcador com seu tempo de retenção podem ser visualizadas no **APÊNDICE 15**.

Para casos reais de derramamento de óleo, a técnica GC/MS/MS-MRM tem se mostrado uma ferramenta mais sensível e seletiva para análise desses biomarcadores [68]. Para avaliação de similaridade foram tabuladas 35 razões de biomarcadores. Para não gerar resultados tendenciosos, a maioria das razões de biomarcadores obtidas pelo modo SIM foram consideradas no modo MRM, com exceção dos tri-terpanos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

A avaliação de similaridade geoquímica entre as amostras do derramamento (representada pela amostra Sample 2) e as amostras de óleos da bacia SE-AL e o óleo do tambor, também foi feita após o escalonamento dos dados, **Tabela 6**. Após executado o escalonamento, foi efetuado o tratamento multivariado dos dados. Ao avaliar o gráfico de escores do PCA (**Figura 24**), viu-se que apenas duas componentes principais já explicavam 82,3% da variância dos dados, sendo a PC 1 representando 60,07% e a PC 2, 22,29%.

Tabela 6. Avaliação univariada das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS/MS-MRM.

Razão de biomarcadores	Sample 2	Sample T	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
Ts/Tm	0,888	0,731	0,832	0,910	1,121	0,992
Ts/(Ts+Tm)	0,470	0,422	0,454	0,476	0,528	0,498
H29/H30	0,473	1,044	0,226	0,291	0,215	0,323
MOR30/H30	0,015	0,040	0,055	0,062	0,057	0,081
GAM/H30	0,035	0,039	0,130	0,270	0,210	0,231
H31S/H31R	1,544	1,693	1,647	1,427	1,284	1,516
H32S/H32R	1,710	1,588	1,430	1,371	1,578	1,413
C30Diahop/H30	0,046	0,035	0,095	0,085	0,109	0,099
H31R/H30	0,311	0,301	0,177	0,205	0,121	0,165
Esteranos/Hopanos ¹	1,288	0,622	2,811	3,535	1,610	2,854
C ₂₉ ααS/(C ₂₉ ααS+C ₂₉ ααR)	0,522	0,434	0,417	0,485	0,283	0,371
C ₂₇ ββ(R+S)/C ₂₉ ββ(R+S)	0,919	0,546	0,605	0,553	0,685	0,431
C ₂₇ ααS/C ₂₇ ααR	1,425	0,933	0,883	1,093	0,526	0,879
C ₂₈ ααS/C ₂₈ ααR	1,138	1,135	0,585	0,652	0,030	0,311
C ₂₉ ααS/C ₂₉ ααS	1,091	0,767	0,717	0,943	0,395	0,590
ISO30S/ISO30S+ISO30R	0,220	0,550	0,277	0,442	0,097	0,434
DIA27αβ/DIA27βα+Dia27αβ	0,041	0,270	0,233	0,230	0,099	0,221
C ₂₇ ααS/C ₂₇ ααR	1,425	0,933	0,883	1,093	0,526	0,879
C ₂₇ ββS/C ₂₇ ββR	1,031	0,999	1,166	0,911	0,734	0,863
C ₂₇ αα(S+R)/C ₂₇ αα(S+R)+C ₂₇ ββ(S+R)	0,485	0,535	0,623	0,673	0,896	0,788
DIA28αβ(S+R)/DIA28βα(S+R)+Dia28αβ(S+R)	0,172	0,216	0,294	0,241	0,247	0,314
C ₂₈ ααS/C ₂₈ ααR	1,138	1,135	0,585	0,652	0,030	0,311
C ₂₈ ββS/C ₂₈ ββR	0,091	0,101	0,138	0,184	1,755	0,346
C ₂₈ αα(S+R)/C ₂₈ αα(S+R)+C ₂₈ ββ(S+R)	0,560	0,581	0,555	0,602	0,908	0,713
DIA29S/DIA29R	1,882	1,397	1,282	1,219	0,000	1,245
C ₂₉ ααS/C ₂₉ ααR	1,091	0,767	0,717	0,943	0,395	0,590
C ₂₉ ββS/C ₂₉ ββR	0,550	0,567	0,558	0,537	0,135	0,313
C ₂₉ αα(S+R)/C ₂₉ αα(S+R)+C ₂₉ ββ(S+R)	0,473	0,474	0,514	0,576	0,691	0,633
H32S/(H32R+H32S)	0,631	0,614	0,588	0,578	0,612	0,586
C ₂₉ ββ(S+R)/(C ₂₉ ββ(S+R)+C ₂₉ αα(S+R))	0,527	0,526	0,486	0,424	0,309	0,367
OL/(OL+H30)	0,160	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000
GAM/(GAM+H30)	0,034	0,038	0,115	0,213	0,173	0,188
Diasteranos/Esteranos ²	0,175	0,288	0,245	0,573	0,195	0,267
%C ₂₇ ααR ³	30%	31%	37%	34%	56%	35%
%C ₂₈ ααR ⁴	33%	20%	21%	22%	20%	21%
%C ₂₉ ααR ⁵	37%	49%	42%	44%	23%	44%

¹[(C₂₇-C₂₉αα (S+R) + C₂₇-C₂₉ββ (S+R))/(C₂₉-C₃₃αβ hopanos[S+R])].

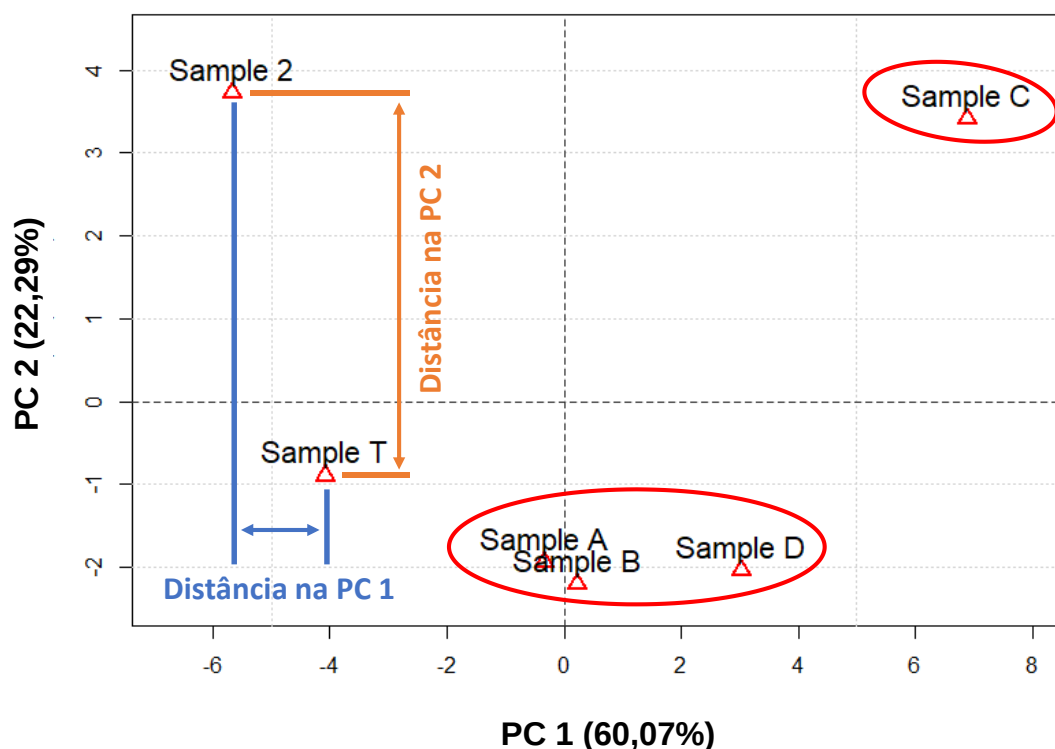
²[(DIAC27βα-DIAC29βα (S+R))/(C₂₇-C₂₉αα (S+R) + C₂₇-C₂₉ββ (S+R))].

³C₂₇ααR/(C₂₇-C₂₉)ααR;

⁴C₂₈ααR/(C₂₇-C₂₉)ααR;

⁵C₂₉ααR/(C₂₇-C₂₉)ααR;

Figura 24. Gráfico de escores obtido a partir das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS/MS-MRM para os biomarcadores terpanos e esteranos.



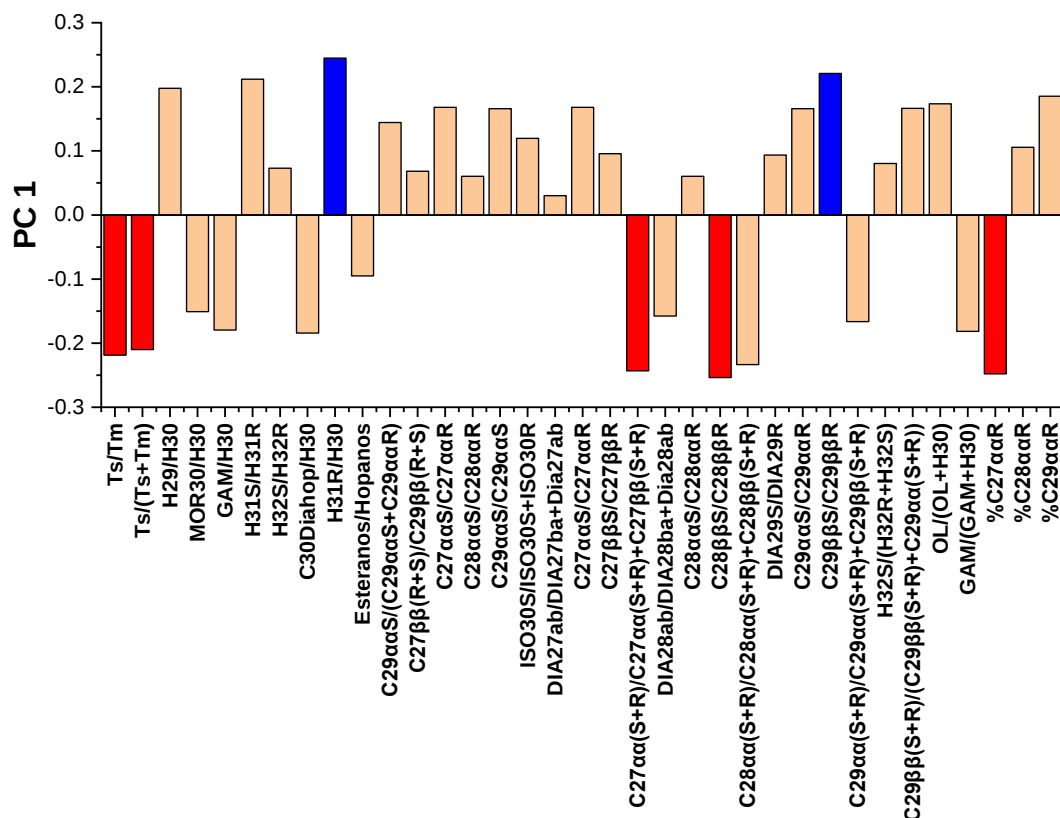
Fonte: Própria.

Na análise de dados, a distância euclidiana pode ser utilizada para avaliar a similaridade entre vetores, ou seja, entre os valores de uma variável em diferentes observações. Quanto menor for a distância euclidiana entre dois vetores, mais similar eles são. Pelo gráfico de escore observou-se que as razões obtidas por GC/MS/MS-MRM, num tratamento multivariado tipo PCA, foi capaz de agrupar e separar as amostras de Sergipe (Samples A, B e D) da amostra de Alagoas (Sample C). De modo semelhante ao observado para o tratamento multivariado com os dados obtidos por GC/MS-SIM, as amostras do tambor (Sample T) e do derramamento (Sample 2) não possuem relação com as oriundas da bacia SE-AL. Ademais, considerando que a PC 1 explica a similaridade/dissimilaridade de 60% do conjunto de variáveis selecionadas, a distância euclidiana observada no eixo da PC1 entre as amostras Sample T e Sample 2 é um indicativo de correlação entre as amostras.

O gráfico de pesos da PC 1 apresentado na **Figura 25** mostra que a separação no eixo "x" é ocasionada principalmente pelas razões de

biomarcadores H31/H30 e $C_{29}\beta S/C_{29}\beta R$ (positivamente), e as razões Ts/Tm, Ts/(Ts+Tm), $C_{27}\alpha(S+R)/C_{27}\alpha(S+R)+C_{27}\beta(S+R)$, $C_{28}\beta S/C_{28}\beta R$ e $\%C_{27}\alpha R$ (negativamente) as quais podem, subsequentemente, ser agrupadas em três parâmetros geoquímicos: aporte de matéria orgânica, evolução térmica e paleoambiente de deposição.

Figura 25. Gráfico de pesos da PC 1 para razões de biomarcadores obtidas via MRM.



Fonte: Própria.

A partir dos pesos observado na PC 1, considerando o aporte de matéria orgânica para as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento, a razão de biomarcadores $\%C_{27}\alpha R$ apontou que as amostras Sample T e Sample 2 possuem contribuições de matéria orgânica similares, com predominância de matéria orgânica terrígena, e menor contribuição de matéria orgânica marinha advinda do aporte de zooplanktons. Analisando a evolução térmica, os indicadores $C_{29}\beta S/C_{29}\beta R$, Ts/Tm, Ts/(Ts+Tm), $C_{28}\beta S/C_{28}\beta R$ mostraram que as amostras Sample 2 e Sample T passaram por processos de evolução térmica parecidos. Comparando as amostras Sample T e Sample 2

com as amostras da bacia SE-AL viu-se que as amostras Sample A, B, C e D apresentaram maior grau de evolução térmica.

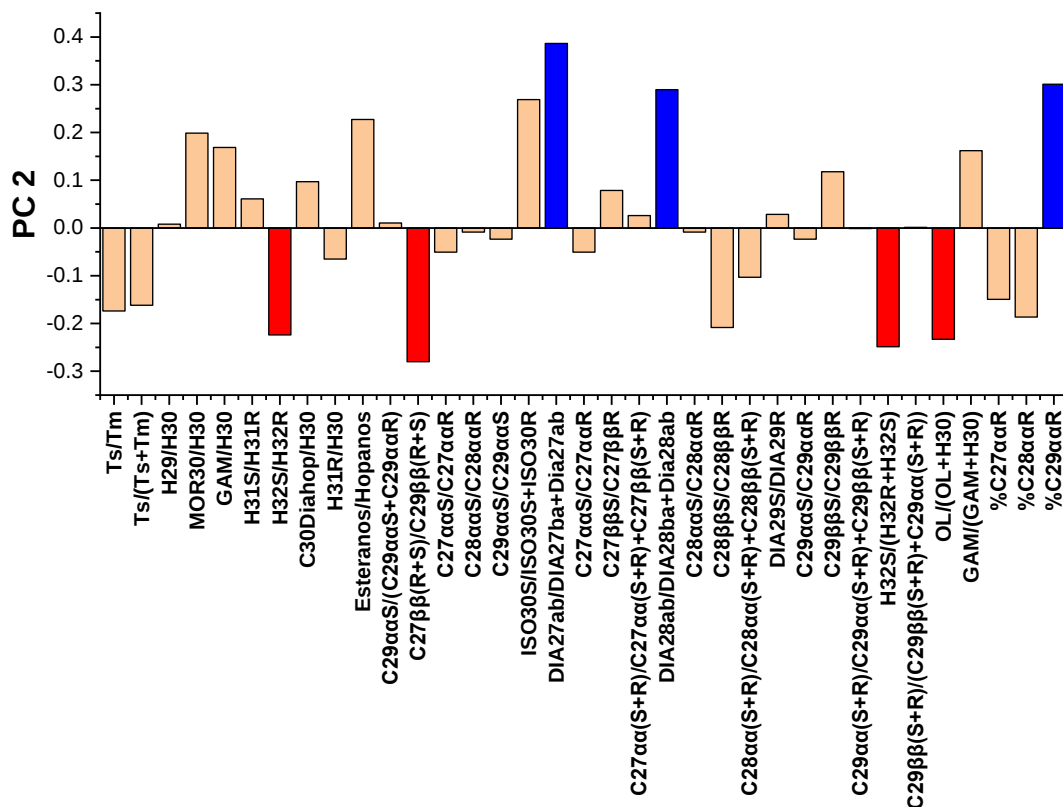
Com relação ao paleoambiente deposicional, o indicador H31/H30 foi útil na discriminação entre ambientes de deposição marinha e lacustre. Ao contrário dos óleos brutos de rochas de origem lacustres, óleos de xisto marinho, rochas carbonáticas, e rochas de origem marga mostram geralmente valores de H31R/H30 superior a 0,25. Os valores obtidos para esta razão (**Tabela 6**) variaram de 0,12 a 0,31, aonde as amostras Sample 2 e Sample T apresentaram valores superiores a 0,25. Portanto, em contraste com os óleos brutos da bacia de SE-AL, os óleos do derramamento e do tambor apresentaram origem em ambiente carbonático marinho, xisto ou marga [22,142].

Com relação ao gráfico de pesos da PC 2 apresentado na **Figura 26**, este mostrou a discriminação das amostras a partir da separação no eixo “y”. Observou-se que esta foi ocasionada, principalmente, pelas razões $\text{DIA27}\alpha\beta/\text{DIA27}\beta\alpha + \text{DIA27}\alpha\beta$, $\text{DIA28 } \alpha\beta/\text{DIA28}\beta\alpha + \text{DIA28 } \alpha\beta$ e $\% \text{C29}\alpha\alpha\text{R}$ (positivamente), e negativamente pelas razões de biomarcadores H32S/H32R, $\text{C27}\beta\beta(\text{R+S})/\text{C29}\beta\beta(\text{R+S})$, $\text{H32S}/(\text{H32R} + \text{H32S})$ e índice de Oleanano ($\% \text{OI}$), calculado por $\text{OL}/(\text{OL} + \text{H30})$. As razões de diacolestanos (DIA27), diaestigmastano (DIA28) foram tabuladas nesse material para fins de correlação óleo-óleo, já as demais mencionadas puderam ser agrupadas em dois parâmetros geoquímicos: evolução térmica e aporte de matéria orgânica.

Avaliando a diferenciação da evolução térmica, via PC 2, pelo indicador $\text{H32S}/(\text{H32R} + \text{H32S})$, têm-se que durante a maturação, os valores da razão aumentam de 0, quando há apenas o isômero R, para aproximadamente 0,6 (0,57-0,62), quando é alcançado um equilíbrio entre as concentrações dos isômeros presentes, indicando equilíbrio de maturidade [122]. Para as amostras de óleo coletadas nas praias dos estados de Pernambuco e Sergipe, representada pela amostra Sample 2, o valor dessa razão foi de 0,631, próximo da faixa de equilíbrio de maturidade, indicando o óleo é maduro. Com relação as amostras dos óleos da bacia SE-AL e do tambor, essas ficaram entre 0,58 e 0,61, todos dentro ou muito próximos da faixa de equilíbrio de maturidade. Observa-se, nesse eixo que as amostras Sample T e Sample 2 encontram-se

separadas, desse modo, vê-se que a amostra Sample 2 é mais evoluída termicamente que a amostra Sample T.

Figura 26. Gráfico de pesos da PC 2 para razões de biomarcadores obtidas via MRM.



Fonte: Própria.

Com relação à diferenciação de contribuição de matéria orgânica, via PC 2, observa-se que os indicadores %C29 α R e o %OI são os responsáveis por separar as amostras Sample T e Sample 2. Acerca desses indicadores, observa-se que ambas as amostras apresentaram maior contribuição de matéria orgânica terrestre advinda de plantas superiores em sua gênese. Contudo, observou-se uma maior contribuição desse tipo de matéria orgânica na amostra T. Com relação ao Oleanano, como já discutido no modo SIM, trata-se de um marcador específico, e, portanto, sua existência isolada indica que o aporte de matéria orgânica foi de plantas superiores (angiospermas) durante a deposição de matéria orgânica, juntamente com variações nas entradas de matéria orgânica terrígena durante a deposição das rochas geradoras desses óleos [5,12,142,143].

Assim como observado para o resultado das razões de biomarcadores via GC/MS-SIM, as razões obtidas via MRM indicaram a mesma conclusão parcial, ou seja, as amostras do derramamento não apresentaram similaridade com as amostras de SE-AL, e numa avaliação comparativa conjunta (óleos de SE-AL e óleo do tambor), assemelhou-se mais a amostra do tambor (Sample T). Portanto, para uma análise inequívoca de similaridade, prosseguiu-se para avaliação univariada para averiguar se há correlação positiva a partir dos dados obtidos por GC/MS/MS-MRM.

4.3.2 Comparação dos perfis de esteranos e hopanos obtidos por GC/MS/MS-MRM para os óleos do tambor e do derramamento

Adaptando o método proposto pela CEN, e utilizando do método de caracterização geoquímica de óleos brutos proposto por Prata (2016), as amostras foram avaliadas de acordo com os perfis e razões de biomarcadores obtidos por GC/MS/MS-MRM.

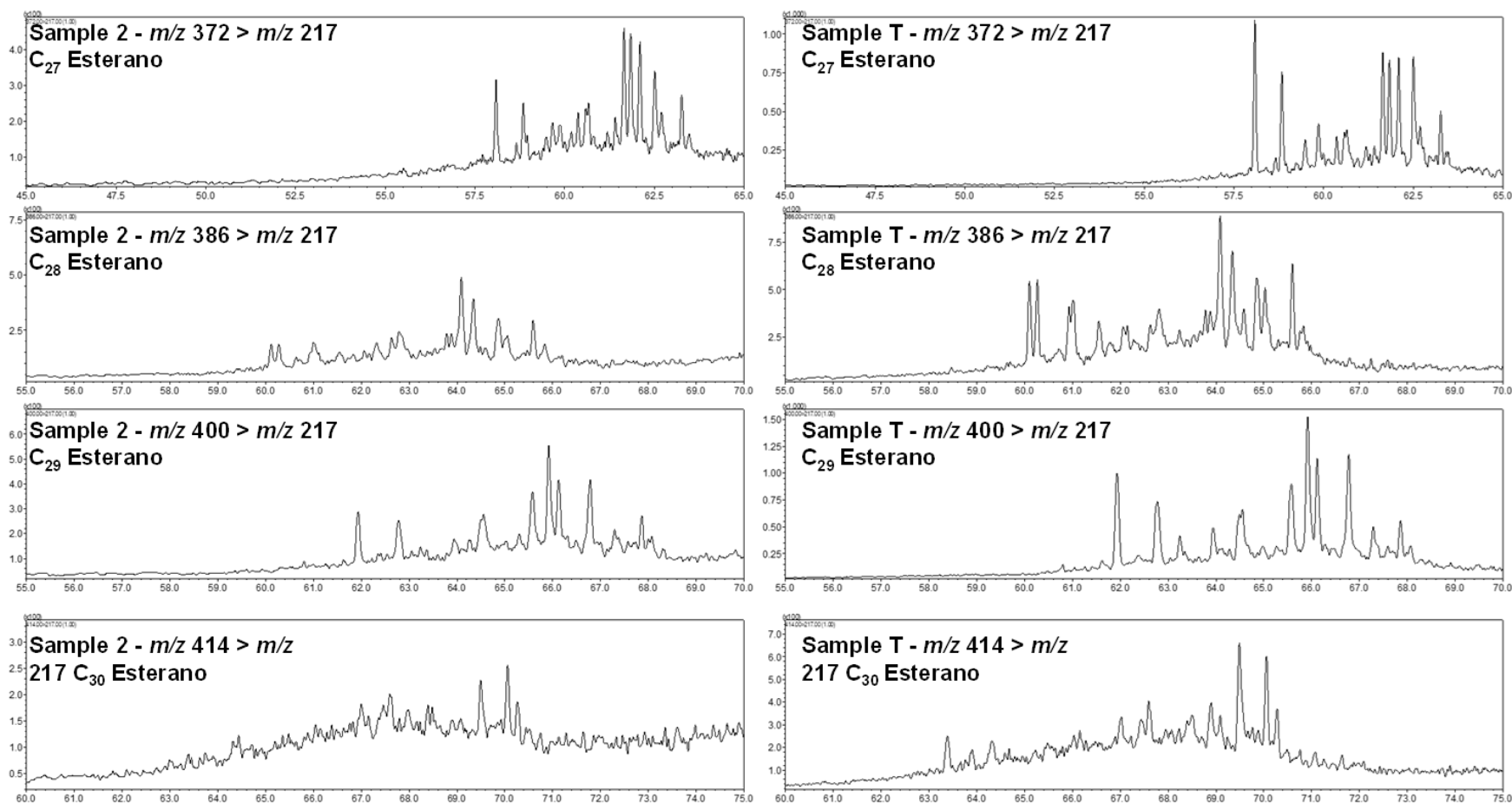
Inicialmente, foram comparados os perfis dos biomarcadores identificados. Os perfis dos esteranos (**Figura 27**) mostraram a presença dos mesmos compostos biomarcadores para os esteranos C₂₇ a C₃₀, contudo as intensidades individuais de cada biomarcador variaram consideravelmente quando comparadas as duas amostras (óleo do derramamento = Sample 2; óleo do tambor = Sample T). Dentre os compostos analisados, os pertencentes aos esteranos C₂₉ apresentam maior similaridade entre as duas amostras, enquanto que os esteranos C₃₀ foram os mais dissimilares.

Com relação aos hopanos, (**Figura 28**), complementarmente ao que foi visto para os esteranos, também foi detectada a presença dos mesmos biomarcadores, contudo, com intensidades diferentes. Ao avaliar os perfis dos hopanos foi verificada que as similaridades entre os perfis foram maiores que as encontradas para os compostos da classe dos esteranos. Os hopanos C₃₀, C₃₁ e C₃₂ mostraram perfis semelhantes. Já os hopanos C₂₇ e C₂₉ foram os que apresentaram maior dissimilaridade.

Desta forma, considerando as amostras do derramamento (representada pela amostra Sample 2) e amostra Sample T como dois conjuntos, e que os

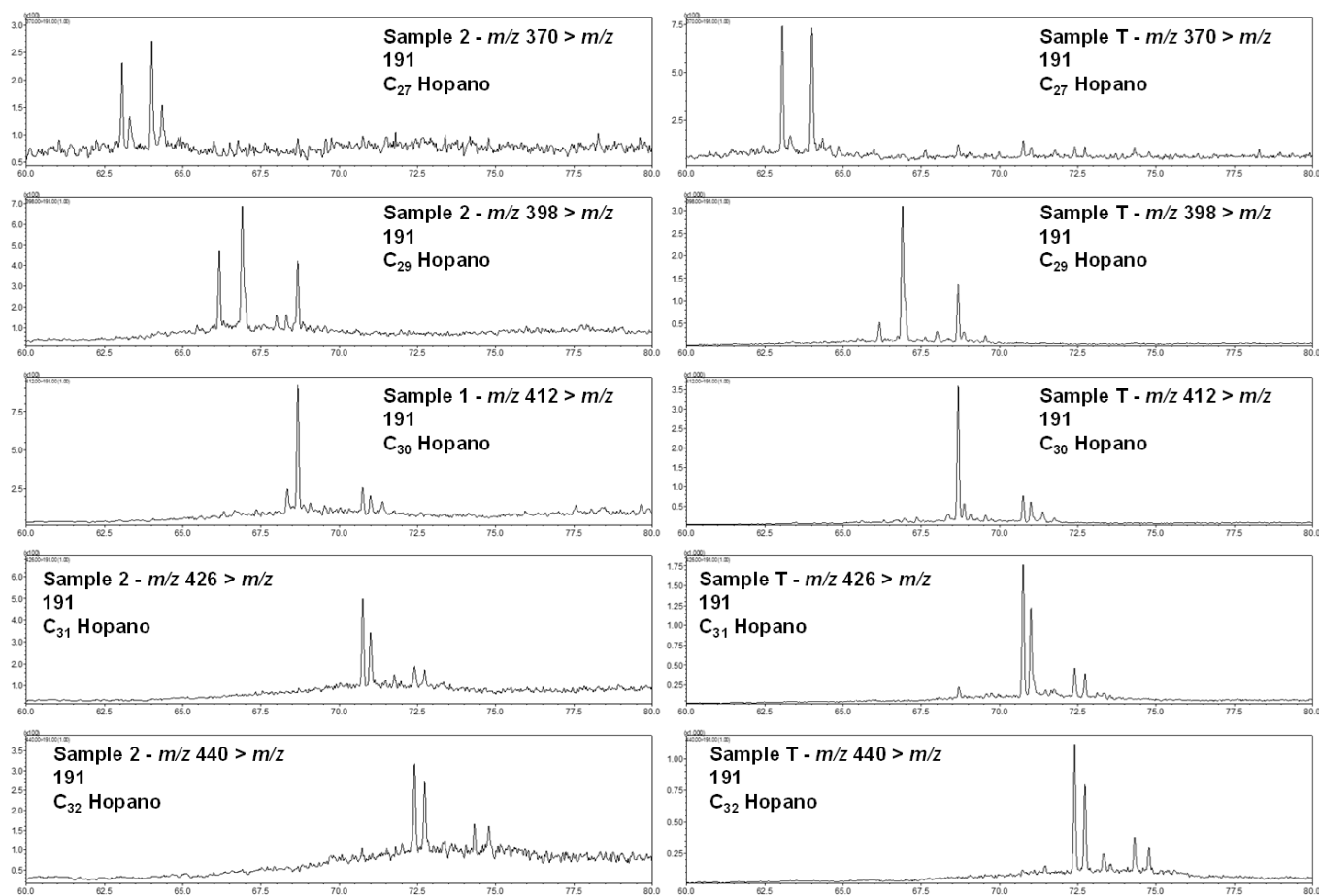
biomarcadores são os elementos de cada conjunto, pode-se inferir que a maioria dos elementos da amostra Sample T está contida na maioria dos elementos da amostra Sample 2, ou seja, a maioria dos elementos da amostra Sample T também é elemento da amostra Sample 2. Desta forma, embora sejam observadas diferenças entre os perfis, foi observado a necessidade de tabular e comparar as razões de biomarcadores de ambas as amostras para elaboração de uma conclusão parcial.

Figura 27. Cromatogramas expandidos dos esteranos representativos para as amostras do derramamento (Sample 2) e do tambor (Sample T).



Fonte: Própria.

Figura 28. Cromatogramas expandidos dos hopanos representativos para as amostras do derramamento (Sample 2) e do tambor (Sample T).



Fonte: Própria.

4.3.3 Comparação univariada das razões de biomarcadores obtidas por GC/MS/MS-MRM

Após avaliação visual dos perfis de biomarcadores, foi observado que as amostras apresentaram maiores semelhanças nos perfis dos compostos tipo hopanos que entre os compostos tipo esteranos. Com a finalidade de quantificar o nível de similaridade, foi efetuado um tratamento estatístico univariado de igual forma ao executado para as razões de biomarcadores obtidas pelo modo SIM. Para essa avaliação, foram utilizados os mesmos parâmetros de correlação utilizados para o modo SIM, DPR menor que 10% e diferença absoluta inferior a diferença crítica ($DA < DC$). Os resultados encontram-se na **Tabela 7**.

Tabela 7. Comparação entre as amostras do derramamento e do tambor por MRM.

Razão diagnóstica	Sample 2	Sample T	Média	DPR%	Diferença Absoluta	Diferença Crítica	Hansen et al (2007)	DPR < 10%
Ts/Tm	0,888	0,731	0,810	14%	16%	11%	NÃO	NÃO
Ts/(Ts+Tm)	0,470	0,422	0,446	8%	5%	6%	SIM	SIM
H29/H30	0,473	1,044	0,758	53%	57%	11%	NÃO	NÃO
MOR30/H30	0,015	0,040	0,028	63%	2%	0%	NÃO	NÃO
GAM/H30	0,035	0,039	0,037	8%	0%	1%	SIM	SIM
H31S/H31R	1,544	1,693	1,619	7%	15%	23%	SIM	SIM
H32S/H32R	1,710	1,588	1,649	5%	12%	23%	SIM	SIM
C30Diahop/H30	0,046	0,035	0,041	19%	1%	1%	NÃO	NÃO
H31R/H30	0,311	0,301	0,306	2%	1%	4%	SIM	SIM
Esteranos/Hopanos	1,288	0,622	0,955	49%	67%	13%	NÃO	NÃO
C ₂₉ ααS/(C ₂₉ ααS+C ₂₉ ααR)	0,522	0,434	0,478	13%	9%	7%	NÃO	NÃO
C ₂₇ ββ(R+S)/C ₂₉ ββ(R+S)	0,919	0,546	0,733	36%	37%	10%	NÃO	NÃO
C ₂₇ ααS/C ₂₇ ααR	1,425	0,933	1,179	30%	49%	17%	NÃO	NÃO
C ₂₈ ααS/C ₂₈ ααR	1,138	1,135	1,137	0%	0%	16%	SIM	SIM
C ₂₉ ααS/C ₂₉ ααS	1,091	0,767	0,929	25%	32%	13%	NÃO	NÃO
ISO30S/ISO30S+ISO30R	0,220	0,550	0,385	61%	33%	5%	NÃO	NÃO
DIA ₂₇ αβ/DIA ₂₇ βα+Dia ₂₇ αβ	0,041	0,270	0,156	104%	23%	2%	NÃO	NÃO
C ₂₇ ααS/C ₂₇ ααR	1,425	0,933	1,179	30%	49%	17%	NÃO	NÃO
C ₂₇ ββS/C ₂₇ ββR	1,031	0,999	1,015	2%	3%	14%	SIM	SIM
C ₂₇ αα(S+R)/C ₂₇ αα(S+R)+C ₂₇ ββ(S+R)	0,485	0,535	0,510	7%	5%	7%	SIM	SIM
DIA ₂₈ αβ/DIA ₂₈ βα+Dia ₂₈ αβ	0,172	0,216	0,194	16%	4%	3%	NÃO	NÃO
C ₂₈ ααS/C ₂₈ ααR	1,138	1,135	1,137	0%	0%	16%	SIM	SIM
C ₂₈ ββS/C ₂₈ ββR	0,091	0,101	0,096	7%	1%	1%	SIM	SIM
C ₂₈ αα(S+R)/C ₂₈ αα(S+R)+C ₂₈ ββ(S+R)	0,560	0,581	0,571	3%	2%	8%	SIM	SIM
DIA ₂₉ S/DIA ₂₉ R	1,882	1,397	1,640	21%	48%	23%	NÃO	NÃO
C ₂₉ ααS/C ₂₉ ααR	1,091	0,767	0,929	25%	32%	13%	NÃO	NÃO

Continuação da Tabela 7

$C_{29}\beta\beta S/C_{29}\beta\beta R$	0,550	0,567	0,558	2%	2%	8%	SIM	SIM
$H_{32}S/(H_{32}R+H_{32}S)$	0,631	0,614	0,622	2%	2%	9%	SIM	SIM
$C_{29}\beta\beta(S+R)/(C_{29}\beta\beta(S+R)+C_{29}\alpha\alpha(S+R))$	0,527	0,526	0,527	0%	0%	7%	SIM	SIM
$\%OI = OL/(OL+H_{30})$	16%	5,1%	10,6%	73%	11%	1%	NÃO	NÃO
$\%GI = GAM/(GAM+H_{30})$	3,4%	3,8%	3,6%	7%	0%	1%	SIM	SIM
$\%C_{27}$	30,5%	31,3%	30,9%	2%	1%	4%	SIM	SIM
$\%C_{28}$	32,8%	19,7%	26,3%	35%	13%	4%	NÃO	NÃO
$\%C_{29}$	36,7%	49,0%	42,9%	20%	12%	6%	NÃO	NÃO
Diasteranos/Esteranos	0,175	0,245	0,210	23%	7%	3%	NÃO	NÃO

Considerando apenas os biomarcadores correspondentes em ambas as amostras, pode-se inferir que, com relação à evolução térmica, os biomarcadores $Ts/(Ts+Tm)$, $H31S/H31R$, $H32S/H32R$, $C_{28}\alpha\alpha S/C_{28}\alpha\alpha R$ e $H32S/(H32R+H32S)$ e $C_{29}\beta\beta(S+R)/(C_{29}\beta\beta(S+R)+C_{29}\alpha\alpha(S+R))$ indicaram que as amostras do tambor e do derramamento são oriundas de rochas geradoras que atingiram o equilíbrio de maturidade para a geração de hidrocarbonetos [132,144,145]. Ademais, o índice de Gamacerano (%GI) entre 3% e 4% indica variações das condições de estratificação na coluna de água, o que é característico de rochas calcárias marinhas ou deltaicas [31,146]. Corroborando essa informação, a razão $H31/H30$ com valores de 0,301 e 0,311 para as amostras do tambor e do derramamento, respectivamente, indicaram que os óleos do derramamento e do tambor apresentaram origem em ambiente carbonático marinho, xisto ou marga.

Com relação ao aporte de matéria orgânica, embora seja observado que a razão $\%C_{27}$ seja positivamente correlacionada, o que indicou uma contribuição semelhante de biomassa marinha oriunda de zooplâncton, observa-se que a maior contribuição foi do esterano C_{29} . Assim, tratam-se de amostras com aporte de matéria orgânica mista, com maior contribuição de matéria orgânica terrestre. E, corroborando essa informação, o índice de Oleanano (%OI), que é um importante biomarcador derivado de plantas terrestres, indicou um aporte de matéria orgânica relacionado aos sedimentos do período Cretáceo Médio/Latino [122,144].

Considerando todos os dados contidos na **Tabela 7** observou-se que das 35 razões de biomarcadores avaliadas, 16 foram correspondentes (45,7%). Resultado distinto do observado pelo modo SIM. Han *et al.* (2020) já haviam mostrado que há uma diferença na quantificação de biomarcadores de petróleo por SIM e MRM, pois, o MRM mostrou-se mais preciso devido a diminuição da relação sinal/ruído e aumento da seletividade [13]. Nesse sentido, considerando os resultados do tratamento univariado realizado com os dados adquiridos por MRM, observou-se que a relação de similaridade passou a ser inconclusiva, diferentemente da conclusão obtida pelos dados obtidos pelo modo SIM, em que constata-se que a relação de similaridade entre a amostra do derramamento em comparação com a do tambor era inexistente.

4.4 Caracterização e comparação das amostras por EDX

As razões entre alguns elementos traço são utilizadas como um indicador para o ambiente de deposição de rochas geradoras, além disso, têm sido utilizadas para investigar correlações entre amostras de óleos em abordagens forenses. Ademais, mesmo sob condições severas de intemperismo, eles não apresentam varrições significativas, fazendo-os, assim, semelhante aos esteranos e hopanos, no que diz respeito a resistência e intempérie no ambiente marinho [12,147–149].

Dentre estes elementos, as proporções de porfirinas de níquel (Ni) e vanádio (V) são usadas como um parâmetro de fonte em correlações óleo-óleo e rocha geradora-óleo. O vanádio e o níquel são os principais metais do petróleo, mas não fazem parte dos precursores oriundos dos organismos vivos. Esses metais entram na estrutura da porfirina por complexação durante a etapa inicial da diagênese, e o ambiente de deposição é a principal influência sobre as suas respectivas proporções relativas [5,19,31]. Além disso, as razões V/Ni ou V/(Ni+V) em conjunto com o teor de enxofre (%S) permitem determinar as condições de paleo-redox ou de biodegradação [19].

A determinação das concentrações de níquel e vanádio, bem como o teor de enxofre, foram realizadas para todas as amostras em duplicata, incluindo os resultados das amostras dos principais campos produtores de óleo bruto de SE-AL, e encontram-se na **Tabela 8**. Ao comparar as amostras do derramamento, observou-se que elas corroboram o que fora exposto até aqui, ou seja, que são oriundas da mesma fonte, uma vez que suas razões de biomarcadores são equivalentes, incluindo as razões V/Ni e V/(Ni+V), bem como o percentual em massa de enxofre (%S).

Considerando as faixas de concentração dos óleos do derramamento para os elementos Vanádio e Níquel, 92,52 – 106,99 ppm e 12,07 – 15,10 ppm, respectivamente, foi observado que a amostra do tambor se encontra dentro da faixa para o níquel e com um DPR de 3 a 13% em relação aos valores mínimos e máximos detectados para o vanádio. Com relação ao teor de enxofre, as amostras do derramamento apresentaram valores entre 0,75% e 0,84%, deste modo, a Sample T também está próxima da faixa destacada, apresentando DPR

de 4 a 8% com relação aos valores mínimo e máximo. Vale ressaltar que em nada se assemelham as amostras de Sergipe as do derramamento ou a amostra de óleo Sample T, por essa técnica, exceção o teor de enxofre da amostra Sample T que é similar ao conteúdo de enxofre na amostra Sample D.

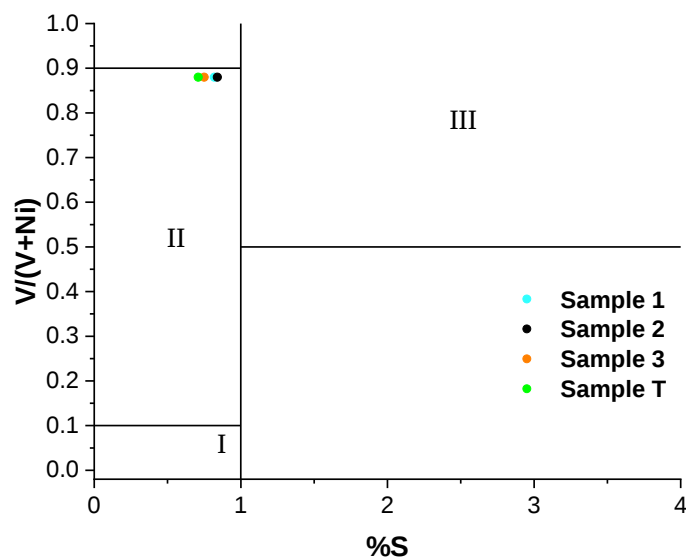
Tabela 8. Faixas de concentração das razões V, Ni (ppm), S (% em massa), V/Ni e V/(Ni+V) nos óleos estudados.

PARÂMETROS E RAZÕES DE BIOMARCADORES ^a					
AMOSTRA	V (ppm)	Ni (ppm)	V/Ni	V/(V+Ni)	%S
Sample 1	105,59 ± 1,89	14,10 ± 1,39	7,52 ± 7,52	0,88 ± 0,88	0,82 ± 0,01
Sample 2	92,52 ± 0,68	12,07 ± 0,64	7,68 ± 0,35	0,88 ± 0,00	0,84 ± 0,02
Sample 3	106,99 ± 1,09	15,10 ± 0,66	7,09 ± 0,24	0,88 ± 0,00	0,75 ± 0,00
Sample T	111,34 ± 0,20	14,83 ± 1,07	7,53 ± 0,56	0,88 ± 0,01	0,71 ± 0,01
Sample A	ND	ND	NE	NE	0,23 ± 0,01
Sample B	ND	14,74 ± 0,48	NE	NE	0,45 ± 0,01
Sample C	ND	11,78 ± 0,04	NE	NE	0,07 ± 0,10
Sample D	ND	15,92 ± 1,29	NE	NE	0,69 ± 0,01

*ND = não detectado pela análise; *NE = Não Executado; ^a análise em duplicata

Avaliando os dados das razões V/(V+Ni) e %S pelo diagrama de Lewan (1984), mostrado na **Figura 29**, observou-se que os óleos incluídos no regime 2 inclui os óleos do derramamento e do tambor ($V/(V+Ni) > 0,1$ e $< 0,9$; e $S < 1\%$). Os óleos dentro deste regime estão associados à deposição de matéria orgânica marinha-terrestre em ambiente hipóxico/subóxico, corroborando o diagnóstico da razão Pr/Ph dos óleos do derramamento. Os óleos de Sergipe não foram agrupados no gráfico devido à impossibilidade de cálculo da razão em questão dada a ausência do elemento vanádio em seus óleos.

Figura 29. $V/(V+Ni)$ versus teor de enxofre (% em massa). Nota: I (óxido terrestre), II (marinho-terrestre hipóxico-subóxico) e III (anóxico marinho carbonato).



Fonte: Própria.

Desta forma, por esta técnica, propõe-se que as amostras do derramamento e do tambor compartilham condições de formação similares no que diz respeito as condições de paleoambiente deposicional e contribuição de matéria orgânica.

4.5 Avaliação de similaridade/dissimilaridade das amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS

Com a finalidade de determinar a aplicabilidade da técnica H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para a correlação de óleos, inicialmente, foi feito o controle de qualidade dos dados [150]. Com relação a qualidade dos dados, foram detectadas entre 12-17 mil íons moleculares, dos quais ~7800 íons moleculares (~42%, em média) tiveram as fórmulas moleculares atribuídas. Dentro desse conjunto, aproximadamente 3000 fórmulas moleculares (~50%, em média) apresentaram relação sinal/ruído superior a 3 ($S/N > 3$) com erros menores que 3 ppm. Com relação ao erro associado a determinação da composição molecular, foi observado que mais de 50% dos dados foram constituídos por fórmulas moleculares com erro de atribuição menor que ± 1 ppm (~1700 fórmulas moleculares).

Tabela 9. Controle de qualidade dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS para as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento

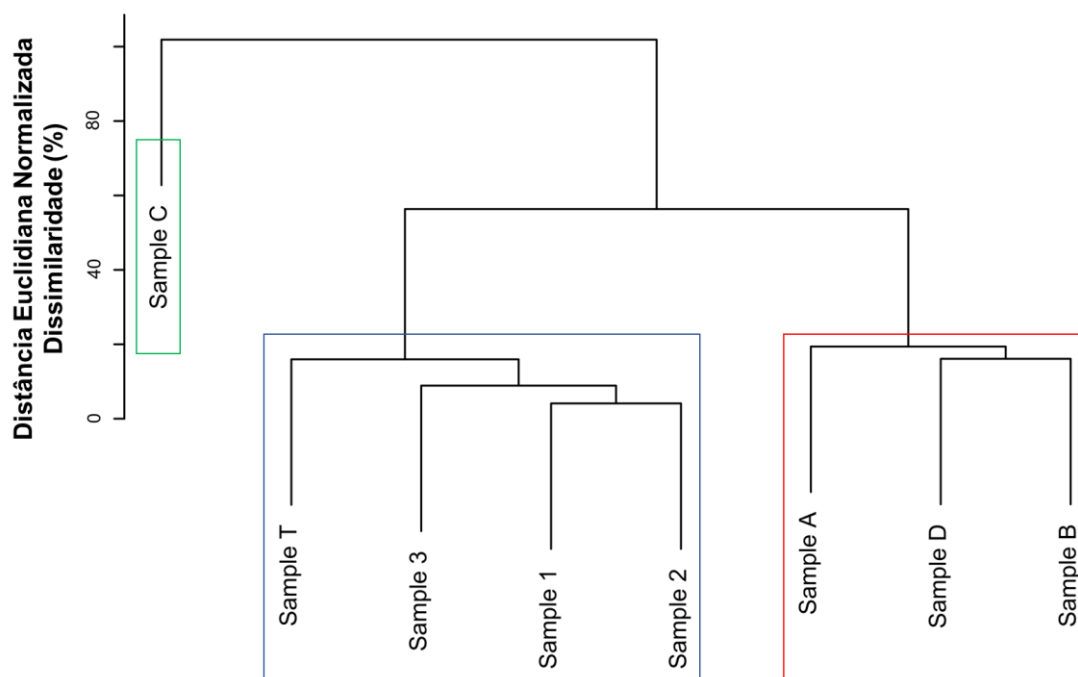
Parâmetro	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample T	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Íons detectados	16772	13710	15443	15515	12010	14430	14647	14320
Íons atribuídos	8173	7483	7579	8047	7214	7983	8268	8072
S/N > 3	4000	3847	3836	4096	3013	2436	2467	2649
Erro < ± 3 ppm	477	327	287	400	354	352	287	340
Erro < ± 2 ppm	1487	1305	1490	1512	1178	910	921	998
Erro < ± 1 ppm	2036	2215	2059	2184	1481	1174	1259	1311

4.5.1 Tratamento multivariado para análise de similaridade entre as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento a partir dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.

Após o controle de qualidade das fórmulas químicas atribuídas para os íons moleculares detectados nas amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento, foi efetuado um pré-processamento do conjunto de dados e subsequente análise multivariada via HCA e PCA para avaliação de similaridade/dissimilaridade mediante uso dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS. A análise estatística foi feita considerando cada a massa nominal de Kendrick com sua abundância absoluta em cada espectro de massa como uma variável diferente [151]. Para análise de similaridade via HCA, os critérios adotados foram o quadrado da distância euclidiana e o método de grupo de pares não ponderados com subtração da média aritmética também conhecido como agrupamento de ligação média. Além disso, a escala vertical foi normalizada para 100% [110]. Assim, quanto menor for o percentual de dissimilaridade observado, maior será a similaridade entre as amostras comparadas.

No gráfico de HCA, **Figura 30**, considerando o máximo de dissimilaridade para o conjunto como sendo 100%, 3 conjuntos foram formados a partir da análise exploratória dos dados referentes a distribuição da massa nominal de Kendrick para os compostos polares básicos das amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento. Um conjunto formado pela amostra Sample C, outro formado pelas demais amostras da bacia SE-AL (Sample A, B e D) e o outro formado pelas amostras Sample T e do derramamento

Figura 30. Dendrograma obtido a partir das fórmulas moleculares atribuídas para as amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento



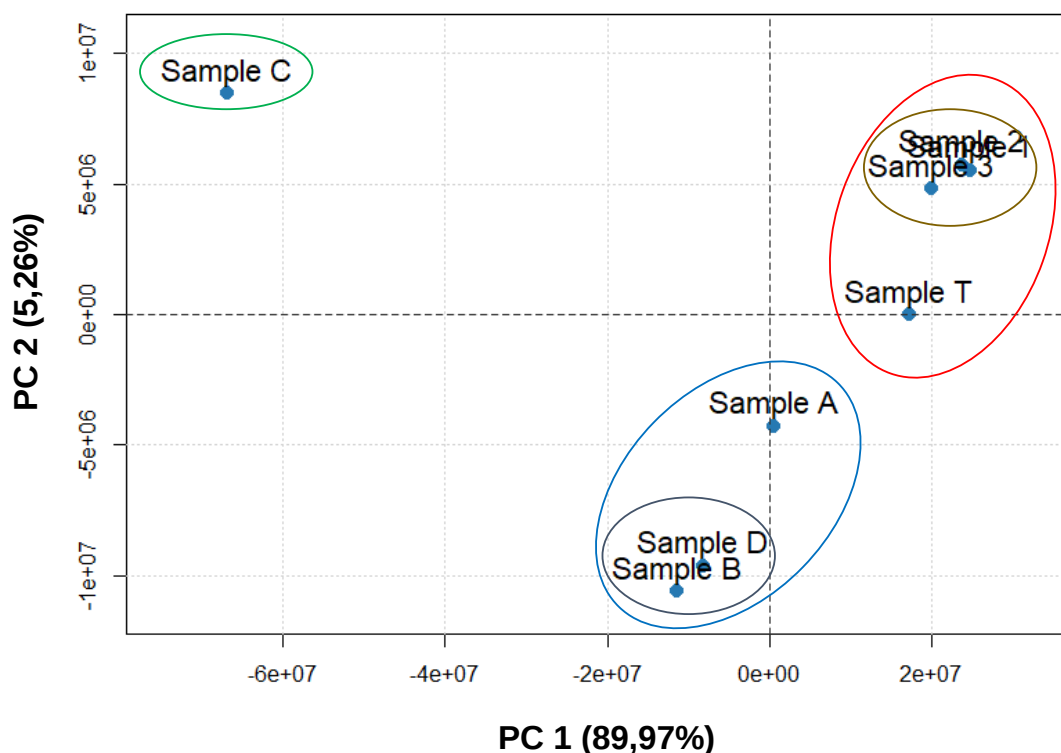
Fonte: Própria.

No tocante as relações de similaridade e dissimilaridade verificadas por HCA, foi observado que as amostras do derramamento possuem uma relação de similaridade com a amostra do tambor. Ainda dentro desse conjunto, ao considerar o segundo nível hierárquico, foi possível separar as amostras que foram encontradas em Sergipe da que foi encontrada em Pernambuco. E ao considerar o terceiro nível hierárquico em relação ao conjunto das amostras do derramamento, a amostra Sample T foi agrupada com um valor de dissimilaridade próximo a ~17%, ou seja, ~83% de similaridade considerando a distância euclidiana normalizada. Além disso, pela análise multivariada, foi verificado que a dissimilaridade entre as amostras do derramamento e do tambor em relação as de SE-AL foi ~60% para as amostras Sample A, D e B e de 100% para a amostra Sample C.

A partir da análise multivariada por PCA, **Figura 31**, em que os dois eixos correspondem aos dois primeiros componentes principais (PC 1 e 2), a PC 1 respondeu o equivalente a cerca de 90% da variância explicada e a PC 2 cerca

de 5%. Portanto, a variância total dos dois componentes responde por 95% da variação dos dados originais.

Figura 31. Gráfico de escores elaborado a partir das distribuições de NKM das amostras dos óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento obtidas por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.



Fonte: Própria.

A análise feita por PCA e HCA produzem resultados semelhantes em termos de separação e agrupamento. Com base no gráfico PCA, é possível afirmar que as amostras Sample B e Sample D possuem uma composição molecular de caráter neutro e básico semelhante à da amostra Sample A. No entanto, a amostra Sample C, que é conhecida por ser da mesma bacia, não apresentou similaridade para esse conjunto de compostos. Essa constatação pode ser explicada pelo fato da amostra Sample C ser oriunda da porção alagoana da bacia SE-AL.

Embora a amostra Sample B tenha sido extraída na mesma área geográfica das amostras Sample A e D, ela foi exibida em um quadrante diferente no gráfico PCA. Essas diferenças podem estar associadas ao aporte de matéria orgânica dessas amostras, que podem ter tido contribuições diferentes, conforme é mostrado no diagrama ternário para distribuição dos esteranos regulares na **Figura 20** [151].

A análise multivariada feita a partir dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS mostrou-se eficaz na determinação de similaridade entre as amostras do derramamento e do tambor, especialmente considerando o eixo x (PC 1), que responde isoladamente a quase 90% das variáveis. A pequena distância observada no eixo da PC 1 é uma forte evidência de que as amostras apresentam composições moleculares de natureza polar básica semelhantes. Para determinar as características químicas das amostras e identificar suas diferenças, foram elaborados gráficos de análise molecular para todas as amostras envolvidas.

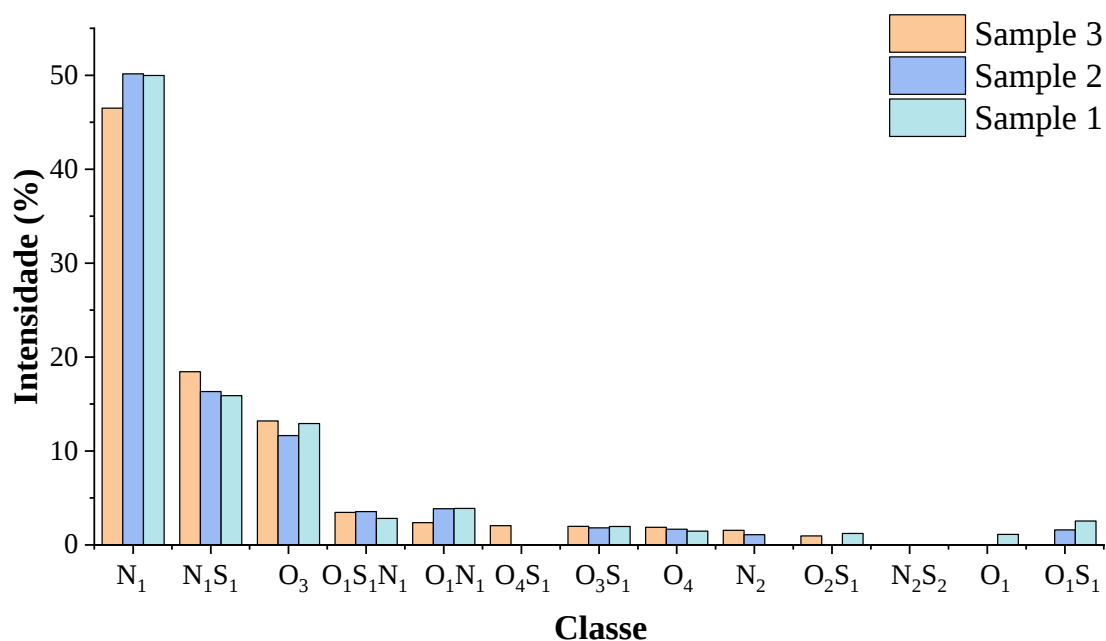
4.5.2 Caracterização das amostras do derramamento e dos óleos da bacia SE-AL, do tambor via análise gráfica dos dados obtidos por UHRMS

A análise de óleo bruto por UHRMS é um dos principais desafios, pois milhares de íons são detectados em um único arquivo bruto e, portanto, a análise individual de cada composto detectado, como é feito com os dados de GC/MS e GC/MS/MS, demandaria muito tempo. Assim, a melhor forma de visualizar os conjuntos de dados obtidos por essa técnica seria via análise gráfica.

Dentre eles, os gráficos mais comuns para visualização de dados são os gráficos de histograma de classe, os diagramas de *DBE* vs número de carbono, os gráficos de van Krevelen e os diagramas de Kendrick [150]. Assim, após avaliação da qualidade dos dados, os gráficos de histogramas de classe (**Figura 32 e Figura 33**) e os diagramas de Kendrick (contendo todas as classes contidas no histograma), apresentados na **Figura 34**, foram gerados para caracterização das amostras.

Ao avaliar o histograma de classe das amostras do derramamento **Figura 32**, observou-se que algumas classes não foram detectadas para todos os óleos, como as classes O_1S_1 , O_2S_1 e O_1 . No entanto, as classes majoritárias foram as mesmas em todas as amostras (N_1 , N_1S_1 , O_3 , $O_1N_1S_1$ e O_1N_1). Esse resultado é consistente com os descritos por Reddy et al. (2022), que também detectaram todas as classes, exceto a classe O_3 , quando analisaram amostras do derramamento em outras regiões do litoral nordestino por ESI(+)-FT-ICR MS. Com base na maior presença de classes comuns entre as amostras do derramamento, a Sample 3 foi selecionada como representante para comparação com as amostras em investigação em relação à distribuição de classes, conforme apresentado no histograma de classes na **Figura 33**. Essa abordagem permitiu uma melhor comparação entre as amostras, fornecendo informações valiosas sobre sua composição química e ajudando a identificar possíveis fontes de origem.

Figura 32. Histograma de classes das amostras do derramamento obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.



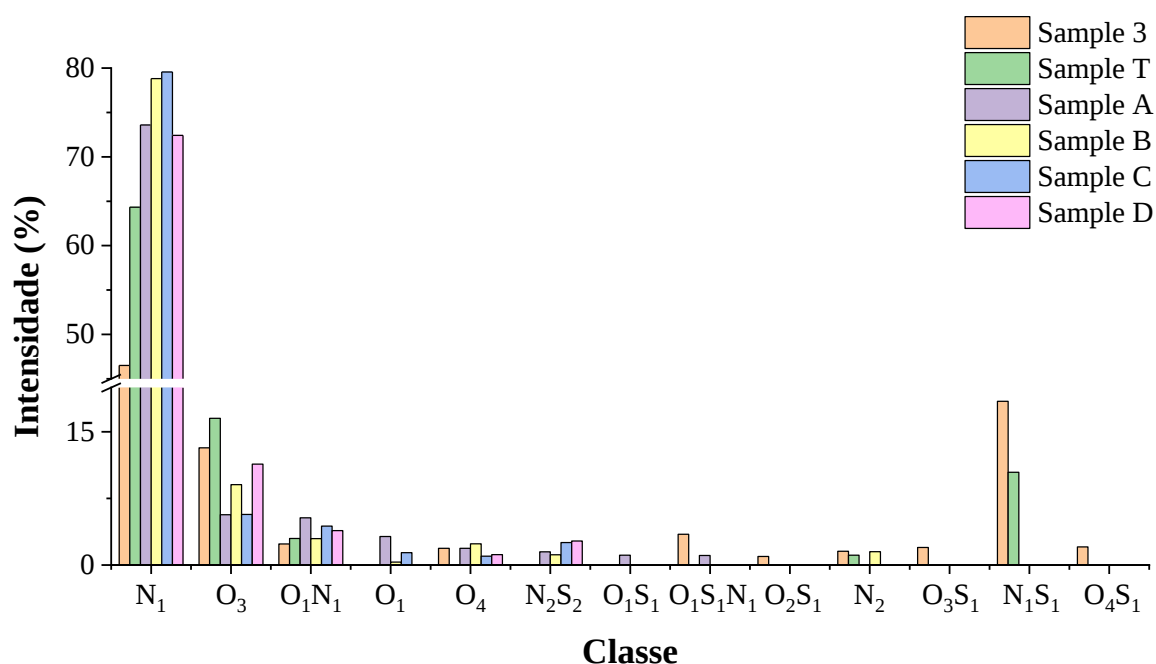
Fonte: Própria.

Ao avaliar os histogramas de classe das amostras do derramamento (representada pela Sample 3) em comparação com os histogramas obtidos para os óleos da bacia SE-AL, **Figura 33**, foi observado que dentre as cinco classes

majoritárias descritas para a amostra do derramamento (N_1 , N_1S_1 , O_3 , O_1N_1 e $O_1N_1S_1$, em ordem decrescente de intensidade), apenas a classe N_1 seguiu a ordem observada. Além disso, não foi identificada a presença da classe N_1S_1 (segunda classe majoritária) nas amostras da bacia SE-AL.

Com relação a amostra Sample T, foi observado que as amostras do derramamento e ela apresentaram as mesmas classes majoritárias (N_1 , N_1S_1 , O_3 e O_1N_1). Entretanto, para a amostra Sample T foi visualizada uma inversão da segunda e terceira classe majoritária (N_1S_1 e O_3) em comparação às amostras do derramamento. Além disso, dentre as classes comuns aos óleos do derramamento, apenas as classes $O_1N_1S_1$ e O_4 não foram detectadas para a amostra do tambor.

Figura 33. Histograma de classes das amostras da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento (representadas pela Sample 3) obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.



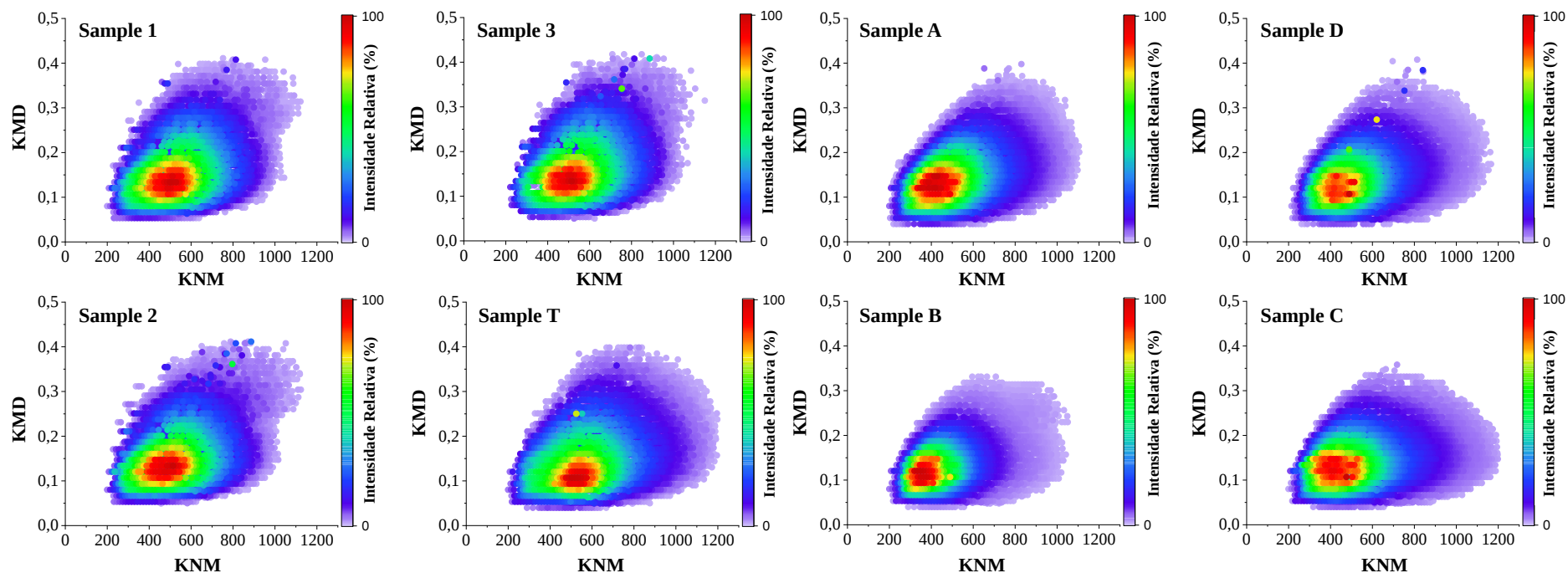
Fonte: Própria.

Uma outra abordagem utilizada para determinar a correlação entre os dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS foi a comparação dos diagramas de Kendrick. Essa técnica é baseada na ideia de que compostos com a mesma

composição (N, O, S) e o mesmo número de DBE (quantidade de anéis e/ou ligações duplas), mas números diferentes de unidades CH_2 , serão diferentes no diagrama de Kendrick e identificados como membros de uma série homóloga. No entanto, os membros de uma série homóloga terão o mesmo defeito de massa Kendrick (KMD) que é exclusivo dessa série. Por exemplo, compostos contendo um átomo de oxigênio em sua composição (classe O_1) terão um KMD característico para essa classe, enquanto compostos contendo dois átomos de oxigênio (classe O_2) terão outro KMD exclusivo para essa classe [94].

A comparação dos diagramas de Kendrick permite uma melhor visualização da distribuição dos compostos nas diferentes classes, possibilitando a identificação de padrões que podem indicar a origem e a natureza dos compostos presentes nas amostras. Essa abordagem é útil para a identificação de séries homólogas, bem como para a detecção de possíveis contaminações ou adulterações nas amostras em estudo [84]. Dessa forma, por entender que o perfil observado em um diagrama de Kendrick é exclusivo para cada óleo, o seu uso como ferramenta de correlação óleo-óleo pode ser mais eficiente que as demais formas de visualização dos dados de UHRMS. Assim, os gráficos de NKM vs KDM foram gerados a partir dos dados obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS e estão apresentados na **Figura 34**.

Figura 34. Comparação dos diagramas de Kendrick entre as amostras de óleos da bacia SE-AL, do tambor e do derramamento obtidos por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS.



Fonte: Própria.

Ao avaliar os gráficos de distribuição de Kendrick para o conjunto de amostras da bacia SE-AL, foi possível observar perfis distintos para cada amostra. A amostra Sample A apresentou uma distribuição de NKM variando de 200 a 1100 e KDM entre 0,04 e 0,49, sendo que a região de maior intensidade se encontrou na faixa de NKM entre 260 e 540 e KMD entre 0,08 e 0,24. Já a amostra Sample B apresentou uma distribuição de NKM variando de 200 a 1160 e KDM entre 0,040 e 0,46, com a região de maior intensidade na faixa de NKM entre 290 e 490 e KMD entre 0,09 e 0,15. As amostras Sample C e D apresentaram a mesma faixa de NKM (entre 200 e 1200) e KMD (0,04–0,47), porém, com regiões de maior intensidade diferentes. A amostra Sample C apresentou a maior intensidade na faixa de NKM entre 305 e 560 e KDM entre 0,08 e 0,40, enquanto a amostra Sample D apresentou a maior intensidade na faixa de NKM entre 330 e 550 e KDM entre 0,93 e 0,16.

Para as amostras do derramamento, foi constatado que as amostras Sample 1, Sample 2 e Sample 3 apresentaram um perfil similar com NKM variando de 200 a 1180 e KMD entre 0,039 a 0,46. Além disso, as regiões de maior intensidade, destacadas pelas zonas em vermelho-alaranjado (NKM entre 390 e 640; KMD entre 0,09 e 0,18), também foram as mesmas para esse conjunto de amostra. Com relação à amostra suspeita Sample T, constatou-se que a distribuição de NKM (200-1160) foi semelhante às amostras do derramamento. No entanto, foi observado que essa amostra apresentou menor aromaticidade, pois a faixa de KDM é ligeiramente menor (KDM entre 0,04 e 0,40). A região de maior intensidade para a Sample T foi visualizada na faixa de NKM entre 421 e 630 e KDM entre 0,08 e 0,14, semelhante à observada nas amostras do derramamento.

A análise comparativa das amostras do derramamento e da bacia SE-AL mostrou diferenças nítidas e significativas. A amostra Sample A apresentou uma massa molecular mais leve em 180 Da quando comparada às amostras do derramamento. Já para a Sample B, embora as distribuições de NKM e KMD fossem semelhantes, a região mais intensa era composta por moléculas com uma massa molecular mais leve, com uma diferença de cerca de 150 Da. Nas amostras Sample C e Sample D também foi observada uma diferença de

aproximadamente 100 Da na região dos compostos mais intensos. Em geral, as amostras do derramamento apresentaram uma região mais intensa constituída por compostos de maior massa molecular. Estes dados são consistentes com as técnicas anteriores utilizadas e reforçam a hipótese de que as amostras do derramamento possuem uma composição química diferente daquelas encontradas na bacia SE-AL.

5 CONCLUSÃO

Com base na metodologia multinível proposta foi possível determinar inequivocamente a relação de similaridade entre as encontradas no litoral de Sergipe, provando que todas são oriundas de um único evento. Ademais, a metodologia também foi capaz de descartar completamente a possibilidade de que os óleos da bacia de SE-AL pudessem ter contribuído para o desastre.

Com relação ao conteúdo do Tambor, a presença do biomarcador específico 18 α (H)-oleanano e a similaridade de ~45% determinada a partir das razões diagnósticas obtidas por GC/MS/MS-MRM; bem como a similaridade observada para a composição molecular dos compostos polares determinada por H-ESI(+)-FT-Orbitrap MS, ambas confirmadas por análise estatística multivariada, com destaque para a análise por HCA que apresentou ~83% de similaridade, provaram inequivocamente que o conteúdo do Tambor possui aspectos geoquímicos semelhantes aos das amostras do derrame, principalmente no que diz respeito a evolução térmica e ao tipo de matéria orgânica depositada.

Considerando a data de saída do Tambor (17/02/2019) e a data em que surgiu as primeiras manchas de óleo na costa nordestina, pode-se afirmar que o derrame tenha ocorrido entre fev/2019 e ago/2019. Desconsiderando a hipótese que o óleo seja oriundo de um navio que afundou em meados do século passado.

Portanto, esta tese demonstrou a necessidade de uma metodologia multicamada atualizada para estudos deste tipo de caso, uma vez que a metodologia clássica CEN em 3 camadas, teria descartado a relação do óleo do derrame com o óleo presente no Tambor, entretanto, ao utilizar metodologias e técnicas mais atuais, que ultrapassam as barreiras das metodologias clássicas, novas interpretações sobre o caso foram levantadas, uma vez que novos argumentos podem ser utilizados para reintroduzir o Tambor dentro das investigações federais.

ARTIGOS PUBLICADOS

1. Silva, W.R. Carregosa, J.D.C. Almeida-Couto, J.M.F. Cardozo-Filho, L. Wisniewski, A. Jr. Management of de-oiled coffee beans biomass through pyrolysis process: Towards a circular bioeconomy (2022) *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 168, art. no. 105763. DOI: 10.1016/j.jaap.2022.105763.
2. Santos, T.M. da Silva, W.R. Carregosa, J.C. Schmitt, C.C. Moreira, R. Raffelt, K. Dahmen, N. Wisniewski, A. Jr. Thermal Conversion of Sugarcane Bagasse Coupled with Vapor Phase Hydrotreatment over Nickel-Based Catalysts: A Comprehensive Characterization of Upgraded Products (2022) *Catalysts*, 12 (4), art. no. 355. DOI: 10.3390/catal12040355.
3. Santos, T.M. Silva, W.R.D. Carregosa, J.D.C. Wisniewski, A. Jr. Comprehensive characterization of cattle manure bio-oil for scale-up assessment comparing non-equivalent reactor designs (2022) *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 162, art. no. 105465. DOI: 10.1016/j.jaap.2022.105465.
4. Barros, T.V. Carregosa, J.D.C. Wisniewski Jr, A. Freitas, A.C.D. Guirardello, R. Ferreira-Pinto, L. Bonfim-Rocha, L. Jegatheesan, V. Cardozo-Filho, L. Assessment of black liquor hydrothermal treatment under sub- and supercritical conditions: Products distribution and economic perspectives (2022) *Chemosphere*, 286, art. no. 131774. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131774.
5. Castiblanco, J.E.B. Carregosa, J.C. Santos, J.M. Wisniewski, A. Jr. Molecular behavior assessment on initial stages of oil spill in terrestrial environments (2021) *Environmental Science and Pollution Research*, 28 (11), pp. 13595-13604. DOI: 10.1007/s11356-020-11555-9.
6. Garcia-Princival, I.M.R. Princival, J.L. Dias da Silva, E. de Arruda Lima, S.M. Carregosa, J.C. Wisniewski Jr, A. de Lucena, C.C.O. Halwass, F. Alves Franca, J.A. Ferreira, L.F.G.R. Hernandez, M.Z. Saraiva, K.L.A. Peixoto, C.A. Baratte, B. Robert, T. Bach, S. Gomes, D.C. Guedes Paiva, P.M. Marchand, P. Rodrigues, M.D.D. Gonçalves da Silva, T.

- Streptomyces hygroscopicus* UFPEDA 3370: A valuable source of the potent cytotoxic agent nigericin and its evaluation against human colorectal cancer cells (2021) *Chemico-Biological Interactions*, 333, art. no. 109316. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109316.
7. Carregosa, J.C. Santos, I.R.D. De Sá, M.S. Santos, J.M. Wisniewski, A. Jr. Multiple reaction monitoring tool applied in the geochemical investigation of a mysterious oil spill in northeast Brazil (2021) *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 93, art. no. e20210171. DOI: 10.1590/0001-3765202120210171.
 8. de Oliveira, L.M.C. Stefano, P.H.P. Vedana, L.A. de Carregosa, J.C. Santos, M.M.N. Wisniewski Jr, A. Pereira, F.M.C.C. A hydrogeological impact survey on the largest onshore oil field in Brazil: physicochemical and total petroleum hydrocarbon (TPH) analyses in the south of Japaratuba River Basin, Sergipe (2020) *Environmental Earth Sciences*, 79 (16), art. no. 383. DOI: 10.1007/s12665-020-09121-0.

REFERÊNCIAS

- [1] IBAMA, Estados Afetados -11 Municípios Afetados - 124. **2020**.
- [2] Soares, M. de O.; Teixeira, C. E. P.; Bezerra, L. E. A.; Paiva, S. V.; Tavares, T. C. L.; Garcia, T. M.; de Araújo, J. T.; Campos, C. C.; Ferreira, S. M. C.; Matthews-Cascon, H.; et al., Oil Spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and Governmental Disaster. *Mar Policy* **2020**, *115* (November 2019), p 103879.
- [3] Magris, R. A.; Giarrizzo, T., Mysterious Oil Spill in the Atlantic Ocean Threatens Marine Biodiversity and Local People in Brazil. *Mar Pollut Bull* **2020**, *153* (December 2019), p 110961.
- [4] MS, Vigilância Em Saúde: Monitoramento Das Manchas de Óleo No Litoral Do Nordeste. **2019**, *50*.
- [5] Stout, S. A.; Wang, Z., *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification: Second Edition*; 2016.
- [6] Peters, K. E.; Moldowan, J. M., *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediment*; Prentice Hall: New York, 1993.
- [7] Killops, S. D.; Killops, V. J., *Introduction to Organic Chemistry*; 2014.
- [8] Shirneshan, G.; Riyahi, A.; Memariani, M., Identification of Sources of Tar Balls Deposited along the Southwest Caspian Coast, Iran Using Fingerprinting Techniques. *Science of the Total Environment* **2016**, *568*, p 979–989.
- [9] Suneel, V.; Saha, M.; Rathore, C.; Sequeira, J.; Mohan, P. M. N.; Ray, D.; Veerasingam, S.; Rao, V. T.; Vethamony, P.; Port, M., Assessing the Source of Oil Deposited in the Surface Sediment of Mormugao Port, Goa - A Case Study of MV Qing Incident. *Mar Pollut Bull* **2019**, *145* (November 2018), p 88–95.
- [10] Mulabagal, V.; Yin, F.; John, G. F.; Hayworth, J. S.; Clement, T. P., Chemical Fingerprinting of Petroleum Biomarkers in Deepwater Horizon Oil Spill Samples Collected from Alabama Shoreline. *Mar Pollut Bull* **2013**, *70* (1–2), p 147–154.
- [11] Borisov, R. S.; Kulikova, L. N.; Zaikin, V. G., Mass Spectrometry in Petroleum Chemistry (Petroleomics) (Review). *Petroleum Chemistry* **2019**, *59* (10), p 1055–1076.
- [12] Wang, Z.; Stout, S. A.; Fingas, M., Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification. *Environ Forensics* **2006**, *7* (2), p 105–146.

- [13] Han, Y.; Yin, F.; John, G. F.; Clement, T. P., Understanding the Relative Performance of SCAN, SIM, PMRM and MRM Methods for Quantifying Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Crude Oil Samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2020**, 34 (11).
- [14] Qian, Y.; Wang, Z.; Tuo, J.; Zhang, M.; Wu, C.; Zhang, T., Multiple Reaction Monitoring of GC/MS/MS Analysis of Terpanes and Its Application to Petroleum Exploration. *Pet Sci Technol* **2017**, 35 (2), p 134–140.
- [15] Lourenço, R. A.; Combi, T.; Alexandre, M. da R.; Sasaki, S. T.; Zanardi-Lamardo, E.; Yogui, G. T., Mysterious Oil Spill along Brazil's Northeast and Southeast Seaboard (2019–2020): Trying to Find Answers and Filling Data Gaps. *Mar Pollut Bull* **2020**, 156 (April), p 111219.
- [16] Zacharias, D. C.; Gama, C. M.; Fornaro, A., Mysterious Oil Spill on Brazilian Coast: Analysis and Estimates. *Mar Pollut Bull* **2021**, 165 (January), p 112125.
- [17] de Oliveira, O. M. C.; Antônio, A. F.; Cerqueira, J. R.; Soares, S. A. R.; Garcia, K. S.; Filho, A. P.; de L. da S. Rosa, M.; Suzart, C. M.; de L. Pinheiro, L.; Moreira, Í. T. A., Environmental Disaster in the Northeast Coast of Brazil: Forensic Geochemistry in the Identification of the Source of the Oily Material. *Mar Pollut Bull* **2020**, 160 (July), p 111597.
- [18] Hinkle, A.; Shin, E.; Liberatore, M. W.; Herring, A. M.; Batzle, M., Correlating the Chemical and Physical Properties of a Set of Heavy Oils from around the World. **2008**, 87, p 3065–3070.
- [19] López, L.; Mónaco, S. Lo, Organic Geochemistry Vanadium, Nickel and Sulfur in Crude Oils and Source Rocks and Their Relationship with Biomarkers: Implications for the Origin of Crude Oils in Venezuelan Basins. **2017**, 104, p 53–68.
- [20] OLIVEIRA, W. K. ; ROHLFS, D. B. ; MACÁRIO, E. ; CRODA, J. H. R. ; PEREIRA, G. ; BRITO, S. ;, Vigilância Em Saúde: Monitoramento Das Manchas de Óleo No Litoral Do Nordeste. *Secretaria de Vigilância em saúde / Ministério da Saúde* **2019**, 50, p 3–9.
- [21] Speight, J. G., *Handbook of Petroleum Product Analysis Global Properties*, 4th ed.; Wiley- Interscience: Hoboken, New Jersey, 2002.
- [22] Killops, S.; Killops, V., *Introduction to Organic Geochemistry*; 2005.
- [23] Höök, M.; Bardi, U.; Feng, L.; Pang, X., Development of Oil Formation Theories and Their Importance for Peak Oil. *Mar Pet Geol* **2010**, 27 (9), p 1995–2004.
- [24] Kutcherov, V. G.; Krayushkin, V. A., Deep-Seated Abiogenic Origin of Petroleum: From Geological Assessment to Physical Theory. *Reviews of Geophysics* **2010**, 48 (1), p 1–30.

- [25] Gold, T.; Soter, S., Abiogenic Methane and the Origin of Petroleum. *Energy Exploration & Exploitation* **1982**, 1 (2), p 89–104.
- [26] Glasby, G. P., Abiogenic Origin of Hydrocarbons: An Historical Overview. *Resource Geology* **2006**, 56 (1), p 83–96.
- [27] Walters, C. C., Springer Handbook of Petroleum Technology. **2017**, p 359–379.
- [28] Chilingar, G. V; Buryakovsky, L.; Eremenko, N. A.; Gorfunkel, M. V, Geology and Geochemistry of Oil and Gas. *Developments in Petroleum Science* **2005**, 52, p 391.
- [29] Speight, J. G., *Handbook of Petroleum Product Analysis (2nd Edition)*; 2015, Vol. 53.
- [30] Tissot, B. P.; Welte, D. H., *Petroleum Formation and Occurrence, Second Revised and Enlarged Edition*; 1984.
- [31] Peters, K. E.; Walters, C. C.; Moldowan, J. M., *The Biomarker Guide II. Biomarkers and Isotopes in Petroleum Systems*, Second edi.; Cambrigde University Press, 2005.
- [32] Speight, J. G., *The Chemistry and Technology of Petroleum: Third Edition, Revised and Expanded*; 1999.
- [33] Azizian, S.; Khosravi, M., Advanced Oil Spill Decontamination Techniques. In *Interface Science and Technology*; Elsevier B.V., 2019, Vol. 30, pp 283–332.
- [34] Speight, J., The Chemistry and Technology of Petroleum, Fourth Edition. **2006**, 20064186.
- [35] Sarathy, S. M.; Farooq, A.; Kalghatgi, G. T., Recent Progress in Gasoline Surrogate Fuels. *Prog Energy Combust Sci* **2018**, 65, p 67–108.
- [36] Mol, J. C., Industrial Applications of Olefin Metathesis. **2004**, 213, p 39–45.
- [37] Varjani, S. J., Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. *Bioresour Technol* **2016**, 223, p 277–286.
- [38] Santos, J. M.; Galaverna, R. de S.; Pudenzi, M. A.; Schmidt, E. M.; Sanders, N. L.; Kurulugama, R. T.; Mordehai, A.; Stafford, G. C.; Wisniewski, A.; Eberlin, M. N.; et al., Petroleomics by Ion Mobility Mass Spectrometry: Resolution and Characterization of Contaminants and Additives in Crude Oils and Petrofuels. *Anal. Methods* **2015**, 7 (11), p 4450–4463.
- [39] Waples, D. W.; Machihara, T., Biomarkers for Geologists: A Practical Guide to the Applications of Steranes and Triterpanes in Petroleum Geology. *Biomarkers for geologists: a practical guide to the applications of steranes and triterpanes in petroleum geology* **1991**, No. 9.

- [40] George, S. C.; Ruble, T. E.; Volk, H.; Lisk, M.; Brincat, M. P.; Dutkiewicz, A.; Ahmed, M., Comparing the Geochemical Composition of Fluid Inclusion and Crude Oils from Wells on the Laminaria High, Timor Sea. *In: Timor Sea Petroleum Geoscience, Proceedings Of The Timor Sea Symposium, Darwin, Northern Territory, 19-20 June 2003* (eds G. K. Ellis, P. W. Baillie and T. J. Munson), Northern Territory Geological Survey, Special Publication **2004**, 1, p 203–230.
- [41] Jafarabadi, A. R.; Dashtbozorg, M.; Bakhtiari, A. R.; Maisano, M.; Cappello, T., Geochemical Imprints of Occurrence, Vertical Distribution and Sources of Aliphatic Hydrocarbons, Aliphatic Ketones, Hopanes and Steranes in Sediment Cores from Ten Iranian Coral Islands, Persian Gulf. *Mar Pollut Bull* **2019**, 144 (December 2018), p 287–298.
- [42] Stout, S. A.; Wang, Z., Chemical Fingerprinting of Spilled or Discharged Petroleum - Methods and Factors Affecting Petroleum Fingerprints in the Environment. *Oil Spill Environmental Forensics* **2007**, p 1–53.
- [43] Pollo, B. J.; Alexandrino, G. L.; Augusto, F.; Hantao, L. W., The Impact of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography on Oil & Gas Analysis: Recent Advances and Applications in Petroleum Industry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2018**, 105, p 202–217.
- [44] Herrera-Herrera, A. V.; Leierer, L.; Jambrina-Enríquez, M.; Connolly, R.; Mallol, C., Evaluating Different Methods for Calculating the Carbon Preference Index (CPI): Implications for Palaeoecological and Archaeological Research. *Org Geochem* **2020**, 146.
- [45] Bao, J. P.; Zhu, C. S.; Yang, X., Extended Hopanes and 8,14-Secohopanes up to C40 in Unbiodegraded Marine Oils from the Tarim Basin, NW China. *Pet Sci* **2022**, 19 (2), p 498–508.
- [46] PRATA, P. S., CARACTERIZAÇÃO GEOQUÍMICA DE PETRÓLEO POR CROMATOGRÁFIA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE E ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS. Ph.D Thesis, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2016.
- [47] Killops, S.; Killops, V., *Introduction to Organic Geochemistry*; 2004.
- [48] Alea, C.; Ruiz, C. I.; Yap, J. B.; Molina, E. F.; Saballa, A. J.; Ñuneza, J. S.; Bacharo, K. B. B., An Investigation of Aquatic Oil Spills in the Philippines from 2000 to 2021. *Mar Pollut Bull* **2022**, 185.
- [49] Bejarano, A. C.; Adams, J. E.; McDowell, J.; Parkerton, T. F.; Hanson, M. L., Recommendations for Improving the Reporting and Communication of Aquatic Toxicity Studies for Oil Spill Planning, Response, and Environmental Assessment. *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V. February 1, 2023.
- [50] McKew, B. A.; Coulon, F.; Yakimov, M. M.; Denaro, R.; Genovese, M.; Smith, C. J.; Osborn, A. M.; Timmis, K. N.; McGenity, T. J., Efficacy of

Intervention Strategies for Bioremediation of Crude Oil in Marine Systems and Effects on Indigenous Hydrocarbonoclastic Bacteria. *Environ Microbiol* **2007**, 9 (6), p 1562–1571.

- [51] Suja, F.; Rahim, F.; Raihan, M.; Hambali, N.; Razali, M. R.; Khalid, A.; Hamzah, A., Effects of Local Microbial Bioaugmentation and Biostimulation on the Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) in Crude Oil Contaminated Soil Based on Laboratory and Field Observations. *Int Biodeterior Biodegradation* **2014**, 90, p 115–122.
- [52] Harold M. McNair; Miller, J. M., *Basic Gas Chromatography*; A Wiley-Interscience Publication, 1993.
- [53] Braithwaite, A.; Smith, F. J., *Chromatographic Methods*, 5th ed.; KluwerAcademic Publishers: Dordrecht - The Netherlands, 1996.
- [54] Rudyk, S., Relationships between SARA Fractions of Conventional Oil, Heavy Oil, Natural Bitumen and Residues. *Fuel* **2018**, 216 (December 2017), p 330–340.
- [55] Islam, A.; Cho, Y.; Yim, U. H.; Shim, W. J.; Kim, Y. H.; Kim, S., The Comparison of Naturally Weathered Oil and Artificially Photo-Degraded Oil at the Molecular Level by a Combination of SARA Fractionation and FT-ICR MS. *J Hazard Mater* **2013**, 263, p 404–411.
- [56] Klein, G. C.; Angström, A.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G., Use of Saturates/Aromatics/Resins/Asphaltenes (SARA) Fractionation to Determine Matrix Effects in Crude Oil Analysis by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy and Fuels* **2006**, 20 (2), p 668–672.
- [57] Eriksson, L., Modeling and Control of TC SI and DI Engines. *Oil & Gas Science and Technology* **2008**, 63 (1), p 9–19.
- [58] Santos, J. M.; Wisniewski, A.; Eberlin, M. N.; Schrader, W.; Vetere, A.; Wisniewski, A.; Eberlin, M. N.; Schrader, W., Comparing Crude Oils with Different API Gravities on a Molecular Level Using Mass Spectrometric Analysis. Part 1: Whole Crude Oil. *Energies (Basel)* **2018**, 11 (10), p 2767.
- [59] Castiblanco, J. E. B. J. E. B.; Carregosa, J. C. J. C.; Santos, J. M. J. M.; Wisniewski, A., Molecular Behavior Assessment on Initial Stages of Oil Spill in Terrestrial Environments. *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, 25, p 13595–13604.
- [60] Carregosa, J. de C., AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO MOLECULAR NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE PETRÓLEO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE CONTATO COM AMBIENTES AQUÁTICOS. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Sergipe, 2019.
- [61] Pudenzi, M. A.; Santos, J. M.; Wisniewski, A.; Eberlin, M. N., Comprehensive Characterization of Asphaltenes by Fourier Transform Ion

- Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Precipitated under Different N-Alkanes Solvents. *Energy and Fuels* **2018**, 32 (2), p 1038–1046.
- [62] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S., *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 7th ed.; Editora da UNICAMP: Campinas - SP, 1997.
- [63] White, H. K.; Conmy, R. N.; MacDonald, I. R.; Reddy, C. M., Methods of Oil Detection in Response to the Deepwater Horizon Oil Spill. *Oceanography* **2016**, 29 (3), p 76–87.
- [64] Lemkau, K. L.; McKenna, A. M.; Podgorski, D. C.; Rodgers, R. P.; Reddy, C. M., Cosco Busan Spill: Insights from Fourier Transform Ion Cyclotron. *Environ Sci Technol* **2014**.
- [65] Frysinger, G. S.; Gaines, R. B.; Xu, L.; Reddy, C. M., Resolving the Unresolved Complex Mixture in Petroleum-Contaminated Sediments. *Environ Sci Technol* **2003**, 37 (8), p 1653–1662.
- [66] Sørensen, L.; Meier, S.; Mjøs, S. A., Application of Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry to Determine a Wide Range of Petrogenic Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Biotic Samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, 30 (18), p 2052–2058.
- [67] John, G. F.; Yin, F.; Mulabagal, V.; Hayworth, J. S.; Clement, T. P., Development and Application of an Analytical Method Using Gas Chromatography/Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Characterizing Alkylated Chrysenes in Crude Oil Samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, 28 (8), p 948–956.
- [68] Adhikari, P. L.; Wong, R. L.; Overton, E. B., Application of Enhanced Gas Chromatography/Triple Quadrupole Mass Spectrometry for Monitoring Petroleum Weathering and Forensic Source Fingerprinting in Samples Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Chemosphere* **2017**, 184, p 939–950.
- [69] Xing, Y.; Wang, M.; Li, T.; Fu, Y. xu; Wang, X., Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples by Gas Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry Using Macroporous Resin Solid-Phase Extraction. *J Sep Sci* **2018**, 41 (11), p 2453–2460.
- [70] Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F., The State of the Art of Chromatography Associated with the Tandem Mass Spectrometry for Toxic Compound Analyses in Food. *Quim Nova* **2008**, 31 (3), p 623–636.
- [71] D.A., M., *Fundamentals of Mass Spectrometry*; Hiraoka, K., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2013.
- [72] Pereira, R. C. L.; Simas, R. C.; Corilo, Y. E.; Vaz, B. G.; Klitzke, C. F.; Schmidt, E. M.; Pudenzi, M. A.; Silva, R. M. C. F.; Moraes, E. T.; Bastos, W. L.; et al., Precision in Petroleomics via Ultrahigh Resolution

- Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy & Fuels* **2013**, 27 (12), p 7208–7216.
- [73] Zubarev, R. A.; Makarov, A., Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2013**, 85 (11), p 5288–5296.
- [74] Eliuk, S.; Makarov, A., Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2015**, 8 (1), p 61–80.
- [75] Huba, A. K.; Gardinali, P. R., Characterization of a Crude Oil Weathering Series by Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry Using Multiple Ionization Modes. *Science of the Total Environment* **2016**, 563–564, p 600–610.
- [76] Leshuk, T.; Peru, K. M.; de Oliveira Livera, D.; Tripp, A.; Bardo, P.; Headley, J. V.; Gu, F., Petroleomic Analysis of the Treatment of Naphthenic Organics in Oil Sands Process-Affected Water with Buoyant Photocatalysts. *Water Res* **2018**, 141, p 297–306.
- [77] Cho, Y.; Ahmed, A.; Islam, A.; Kim, S., Developments in FT-ICR MS Instrumentation, Ionization Techniques, and Data Interpretation Methods for Petroleomics. *Mass Spectrom Rev* **2015**, 34 (6), p 248–263.
- [78] Kim, D.; Jung, J.-H.; Ha, S. Y.; An, J. G.; Shankar, R.; Kwon, J.-H.; Yim, U. H.; Kim, S. H., Molecular Level Determination of Water Accommodated Fraction with Embryonic Developmental Toxicity Generated by Photooxidation of Spilled Oil. *Chemosphere* **2019**, 237, p 124346.
- [79] Qian, K.; Robbins, W. K.; Hughey, C. A.; Cooper, H. J.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G., Resolution and Identification of Elemental Compositions for More than 3000 Crude Acids in Heavy Petroleum by Negative-Ion Microelectrospray High-Field Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Energy and Fuels* **2001**, 15 (6), p 1505–1511.
- [80] De Laeter, J. R.; Böhlke, J. K.; De Bièvre, P.; Hidaka, H.; Peiser, H. S.; Rosman, K. J. R.; Taylor, P. D. P., *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY INORGANIC CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON ATOMIC WEIGHTS AND ISOTOPIC ABUNDANCES * ATOMIC WEIGHTS OF THE ELEMENTS: REVIEW 2000 (IUPAC Technical Report) Atomic Weights of the Elements: Review 2000 (IUPAC Technical Report)*; 2003, Vol. 75.
- [81] Rocha, Y. dos S.; Pereira, R. C. L.; Filho, J. G. M., Petroleômica: Fundamentos e Aplicações Na Caracterização Geoquímica de Petróleos e Rochas Geradoras. *Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ* **2019**, 42 (March), p 135–145.
- [82] Liliane Dailei Almeida Gruber, Flaviana Cardoso Damasceno, E. B. C. e R. A. J.; Geller, A. M.; Campos, M. C. V. de. ÁCIDOS NAFTÊNICOS NO PETRÓLEO. *Quim. Nova* **2012**, 35 (7), p 1423–1433.

- [83] Marshall, A. G.; Rodgers, R. P., Petroleomics: Chemistry of the Underworld. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (47), p 18090–18095.
- [84] Rodgers, R. P.; Schaub, T. M.; Marshall, A. G., Petroleomics: MS Returns to Its Roots. *Anal Chem* **2005**, *77* (1), p 20 A-27 A.
- [85] Prata, P. S.; Alexandrino, G. L.; Mogollón, N. G. S.; Augusto, F., Discriminating Brazilian Crude Oils Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Multiway Principal Component Analysis. *J Chromatogr A* **2016**, *1472*, p 99–106.
- [86] Hertzog, J.; Carré, V.; Aubriet, F., *Contribution of Fourier Transform Mass Spectrometry to Bio-Oil Study*; 2019.
- [87] Sim, A.; Cho, Y.; Kim, D.; Witt, M.; Birdwell, J. E.; Kim, B. J.; Kim, S., Molecular-Level Characterization of Crude Oil Compounds Combining Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with off-Line High-Resolution Mass Spectrometry. *Fuel* **2015**.
- [88] Headley, J. V.; Barrow, M. P.; Peru, K. M.; Fahlman, B.; Frank, R. A.; Bickerton, G.; McMaster, M. E.; Parrott, J.; Hewitt, L. M., Preliminary Fingerprinting of Athabasca Oil Sands Polar Organics in Environmental Samples Using Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25* (13), p 1899–1909.
- [89] Islam, A.; Cho, Y.; Ahmed, A.; Kim, S., Data Interpretation Methods for Petroleomics. *Mass Spectrometry Letters* **2012**, *3* (3), p 63–67.
- [90] Pereira, I.; de Aguiar, D. V. A.; Vasconcelos, G.; Vaz, B. G., Fourier Transform Mass Spectrometry Applied to Petroleomics. *Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry* **2019**, p 509–528.
- [91] Staš, M.; Chudoba, J.; Auersvald, M.; Kubička, D.; Conrad, S.; Schulzke, T.; Pospíšil, M., Application of Orbitrap Mass Spectrometry for Analysis of Model Bio-Oil Compounds and Fast Pyrolysis Bio-Oils from Different Biomass Sources. *J Anal Appl Pyrolysis* **2017**, *124*, p 230–238.
- [92] Klein, C. G. G., Effect of Residual Bitumen on Polymer-Assisted Flocculation of Fluid Fine Tailings. Master of Science Dissertation, University of Alberta, Canada. MSc., University of Alberta, 2014.
- [93] Organização de Lisiane dos Santos Freitas, *Energia Da Biomassa: Termoconversão e Seus Produtos*, 1st ed.; Brazil Publishing: Curitiba, 2020.
- [94] Richardson, L. T.; Neumann, E. K.; Caprioli, R. M.; Spraggins, J. M.; Solouki, T., Referenced Kendrick Mass Defect Annotation and Class-Based Filtering of Imaging MS Lipidomics Experiments. *Anal Chem* **2022**, *94* (14), p 5504–5513.

- [95] Staš, M.; Chudoba, J.; Kubička, D.; Blažek, J.; Pospíšil, M., Petroleomic Characterization of Pyrolysis Bio-Oils: A Review. *Energy and Fuels* **2017**, *31* (10), p 10283–10299.
- [96] Chevalier, M.; Ricart, E.; Hanozin, E.; Pupin, M.; Jacques, P.; Smargiasso, N.; De Pauw, E.; Lisacek, F.; Leclère, V.; Flahaut, C., Kendrick Mass Defect Approach Combined to NORINE Database for Molecular Formula Assignment of Nonribosomal Peptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **2019**, *30* (12), p 2608–2616.
- [97] Ponthus, J.; Riches, E., Evaluating the Multiple Benefits Offered by Ion Mobility-Mass Spectrometry in Oil and Petroleum Analysis. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* **2013**, *16* (2), p 95–103.
- [98] Groenzin, H.; Mullins, O. C., *Asphaltene Molecular Size and Weight by Time-Resolved Fluorescence Depolarization*; 2007.
- [99] Corilo, Y. E.; Podgorski, D. C.; McKenna, A. M.; Lemkau, K. L.; Reddy, C. M.; Marshall, A. G.; Rodgers, R. P., Oil Spill Source Identification by Principal Component Analysis of Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra. *Anal Chem* **2013**, *85* (19), p 9064–9069.
- [100] Ese, M. H.; Kilpatrick, P. K., Stabilization of Water-in-Oil Emulsions by Naphthenic Acids and Their Salts: Model Compounds, Role of PH, and Soap: Acid Ratio#. *J Dispers Sci Technol* **2004**, *25* (3), p 253–261.
- [101] Jarvis, J. M.; Robbins, W. K.; Corilo, Y. E.; Rodgers, R. P., Novel Method to Isolate Interfacial Material. *Energy and Fuels* **2015**, *29* (11), p 7058–7064.
- [102] Stankovikj, F.; McDonald, A. G.; Helms, G. L.; Garcia-Perez, M., Quantification of Bio-Oil Functional Groups and Evidences of the Presence of Pyrolytic Humins. *Energy and Fuels* **2016**, *30* (8), p 6505–6524.
- [103] Guigue, J.; Harir, M.; Mathieu, O.; Lucio, M.; Ranjard, L.; Lévêque, J.; Schmitt-Kopplin, P., Ultrahigh-Resolution FT-ICR Mass Spectrometry for Molecular Characterisation of Pressurised Hot Water-Extractable Organic Matter in Soils. *Biogeochemistry* **2016**, *128* (3), p 307–326.
- [104] Barrow, M. P.; Headley, J. V.; Peru, K. M.; Derrick, P. J., Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Principal Components in Oilsands Naphthenic Acids. *J Chromatogr A* **2004**, *1058* (1–2), p 51–59.
- [105] Christensen, J. H.; Tomasi, G., *A Multivariate Approach to Oil Hydrocarbon Fingerprinting and Spill Source Identification*, Second Edi.; Elsevier Inc., 2016.
- [106] Kienhuis, P. G. M.; Hansen, A. B.; Faksness, L. G.; Stout, S. A.; Dahlmann, G., CEN Methodology for Oil Spill Identification. In *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification: Second Edition*; Elsevier Inc., 2016, pp 685–728.

- [107] Wang, C.; Chen, B.; Zhang, B.; He, S.; Zhao, M., Fingerprint and Weathering Characteristics of Crude Oils after Dalian Oil Spill, China. *Mar Pollut Bull* **2013**, 71 (1–2), p 64–68.
- [108] Bayona, J. M.; Domínguez, C.; Albaigés, J., Analytical Developments for Oil Spill Fingerprinting. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **2015**, 5, p 26–34.
- [109] Faksness, L. G.; Daling, P. S.; Hansen, A. B.; Kienhuis, P.; Duus, R., New Guidelines for Oil Spill Identification of Waterborne Petroleum and Petroleum Products. *Environment Canada Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar (AMOP) Proceedings* **2005**, 1 (January 2016), p 183–202.
- [110] Hair, Jr. J. F.; Black, W. C.; Sant’Anna, A. Schlup., *Análise Multivariada de Dados (6a. Ed.)*; Grupo A - Bookman, 2000.
- [111] Filchev, L.; Pashova, L.; Kolev, V.; Frye, S., Surveys, Catalogues, Databases/Archives, and State-of-the-Art Methods for Geoscience Data Processing. In *Knowledge Discovery in Big Data from Astronomy and Earth Observation: Astrogeoinformatics*; Elsevier, 2020, pp 103–136.
- [112] Xue, J.; Lee, C.; Wakeham, S., Using Principal Components Analysis (PCA) with Cluster Analysis to Study the Organic Geochemistry of Sinking Particles in the Ocean. *Organic Geochemistry journal* **2011**, 42 (May), p 356–367.
- [113] Stanimirova, I.; Walczak, B.; Massart, D. L.; Simeonov, V., A Comparison between Two Robust PCA Algorithms. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2004**, 71 (1), p 83–95.
- [114] Jolliffe, I. T.; Cadima, J., Principal Component Analysis: A Review and Recent Developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2016**, 374 (2065).
- [115] Itopf, ITOPF - Technical Information Paper 13: Sampling and Monitoring of Oil Spills. **2014**, p 1–12.
- [116] Da Silva, S. S. V., Avaliação Da Metodologia de Classificação SARA de Óleos Brutos e Estudo Da Redução de Escala. *Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. Depto de Engenharia Química. São Cristóvão. SE. Brasil* **2016**, p 113.
- [117] Mei, M.; Bissada, K. K. (Adry); Malloy, T. B.; Darnell, L. M.; Szymczyk, E. B., Improved Method for Simultaneous Determination of Saturated and Aromatic Biomarkers, Organosulfur Compounds and Diamondoids in Crude Oils by GC–MS/MS. *Org Geochem* **2018**, 116, p 35–50.
- [118] ASTM D4294-21, Standard Test Method for Sulfur in Petroleum and Petroleum Products by Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry 1. **2021**.

- [119] Brodskii, E. S.; Butkova, O. L.; Shelepchikov, A. A.; Feshin, D. B., Identification of Sources of Oil Spills in Soils and Sediments by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* **2010**, 65 (14), p 1524–1531.
- [120] El Nady, M. M.; Harb, F. M.; Mohamed, N. S., Biomarker Characteristics of Crude Oils from Ashrafi and GH Oilfields in the Gulf of Suez, Egypt: An Implication to Source Input and Paleoenvironmental Assessments. *Egyptian Journal of Petroleum* **2014**, 23 (4), p 455–459.
- [121] Fabiańska, M. J.; Bzowska, G.; Matuszewska, A.; Racka, M.; Skret, U., Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Geochemical Investigation of Organic Matter of the Grodziec Beds (Upper Carboniferous), Upper Silesian Coal Basin, Poland. *Chemie der Erde* **2003**, 63 (1), p 63–91.
- [122] Peters, K. E.; Walters, C. C.; Moldowan, J. M., *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*, 2nd ed.; Cambridge University Press: New Jersey, 2005.
- [123] Bennett, B.; Fustic, M.; Farrimond, P.; Huang, H.; Larter, S. R., 25-Norhopanes: Formation during Biodegradation of Petroleum in the Subsurface. *Org Geochem* **2006**, 37 (7), p 787–797.
- [124] Lima, B. D.; Martins, L. L.; de Souza, E. S.; Pudenzi, M. A.; da Cruz, G. F., Monitoring Chemical Compositional Changes of Simulated Spilled Brazilian Oils under Tropical Climate Conditions by Multiple Analytical Techniques. *Mar Pollut Bull* **2021**, 164 (January), p 111985.
- [125] Li, M.; Wang, T.-G.; Xiao, Z.; Fang, R.; Ni, Z.; Deng, W.; Tang, Y.; Zhang, C.; Yang, L., Practical Application of Reservoir Geochemistry in Petroleum Exploration: Case Study from a Paleozoic Carbonate Reservoir in the Tarim Basin (Northwestern China). *Energy & Fuels* **2018**, 32 (2), p 1230–1241.
- [126] Joshua Lukaye; Godfrey Etano; Geoffrey Abbott, Molecular Organic Geochemistry of Crude Oils from the Albertine Graben, Uganda: Possible Implications on the Expulsion of the Oils from the Source Rocks. *Journal of Earth Science and Engineering* **2017**, 7 (4).
- [127] Yang, C.; Wang, Z. D.; Hollebone, B.; Brown, C. E.; Landriault, M.; Fieldhouse, B.; Yang, Z. Y., Application of Light Petroleum Biomarkers for Forensic Characterization and Source Identification of Spilled Light Refined Oils. *Environ Forensics* **2012**, 13 (4), p 298–311.
- [128] Yang, C. F. S. of C. O. and P. P. S. in C. and O. S. C.; Wang, Z. D. Z.; Hollebone, B. P.; Brown, C. E.; Landriault, M.; Fieldhouse, B.; Yang, Z. Y.; Goodpaster, J. V.; Howerton, S. B.; McGuffin, V. L.; et al., Environmental Forensics Study of Crude Oil and Petroleum Product Spills in Coastal and Oilfield Settings: Combined Insights From Conventional GC-MS, Thermodesorption-GC-MS, and Pyrolysis-GC-MS. *Environ Forensics* **2018**, 33 (2), p 131–155.

- [129] McKenna, A. M.; Nelson, R. K.; Reddy, C. M.; Savory, J. J.; Kaiser, N. K.; Fitzsimmons, J. E.; Marshall, A. G.; Rodgers, R. P., Expansion of the Analytical Window for Oil Spill Characterization by Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry: Beyond Gas Chromatography. *Environ Sci Technol* **2013**, 47 (13), p 7530–7539.
- [130] Bakr, M. M. Y., Molecular Organic Geochemistry of Crude Oil from Shushan and Abu Gharadig Basins, Western Desert, Egypt. *Journal of King Abdulaziz University, Earth Sciences* **2009**, 20 (2), p 97–125.
- [131] He, S.; Yu, H.; Luo, Y.; Wang, C.; Li, X.; Li, Z., Oil Mixing Behavior after an Oil Spill: Identification Conflicts of Different Fingerprints. *Environmental Science and Pollution Research* **2018**, 25 (10), p 9539–9546.
- [132] Peters, K. E.; Walters, C. C.; Moldowan, J. M., The Biomarker Guide. *Cambridge University Press* **1993**, 2nd ed. (5), p 617.
- [133] Reddy, C. M.; Nelson, R. K.; Hanke, U. M.; Cui, X.; Summons, R. E.; Valentine, D. L.; Rodgers, R. P.; Chacón-Patiño, M. L.; Niles, S. F.; Teixeira, C. E. P.; et al., Synergy of Analytical Approaches Enables a Robust Assessment of the Brazil Mystery Oil Spill. *Energy and Fuels* **2022**.
- [134] Philp, P.; Symcox, C.; Wood, M.; Nguyen, T.; Wang, H.; Kim, D., Possible Explanations for the Predominance of Tricyclic Terpanes over Pentacyclic Terpanes in Oils and Rock Extracts. *Org Geochem* **2021**, 155, p 104220.
- [135] Rabbani, A. R.; Kamali, M. R., SOURCE ROCK EVALUATION AND PETROLEUM GEOCHEMISTRY, OFFSHORE SW IRAN. *Journal of Petroleum Geology* **2005**, 28 (4), p 413–428.
- [136] Beiras, R., Pollution Control. In *Marine Pollution*; Elsevier, 2018, pp 329–354.
- [137] Moldowan, J. M.; Dahl, J.; Huizinga, B. J.; Fago, F. J.; Hickey, L. J.; Peakman, T. M.; Taylor, D. W., The Molecular Fossil Record of Oleanane and Its Relation to Angiosperms. *Science (1979)* **1994**, 265 (5173), p 768–771.
- [138] BOEHM, P. D.; DOUGLAS, G. S.; BURNS, W. A.; MANKIEWICZ, P. J.; PAGE, D. S.; BENICE, and A. E., Application of Petroleum Hydrocarbon Chemical Fingerprinting and Allocation Techniques after the Exxon Valdez Oil Spill. *Mar Pollut Bull* **1997**, 34 (8), p 599–613.
- [139] Quintero, K.; Lo Mónaco, G.; López, L.; Lo Mónaco, S.; Escobar, G.; Peralba, M. C. R.; Franco, N.; Kalkreuth, W., Potential Petroleum Source Rocks in a Tertiary Sequence of the Eastern Venezuelan Basin. *J South Am Earth Sci* **2012**, 37, p 256–265.
- [140] B. Hansen, A.; S. Daling, P.; Faksness, L.-G.; R. Sørheim, K.; Kienhuis, P.; Duus, R., Emerging CEN Methodology for Oil Spill Identification. In *Oil Spill Environmental Forensics*; Elsevier, 2007, pp 229–256.

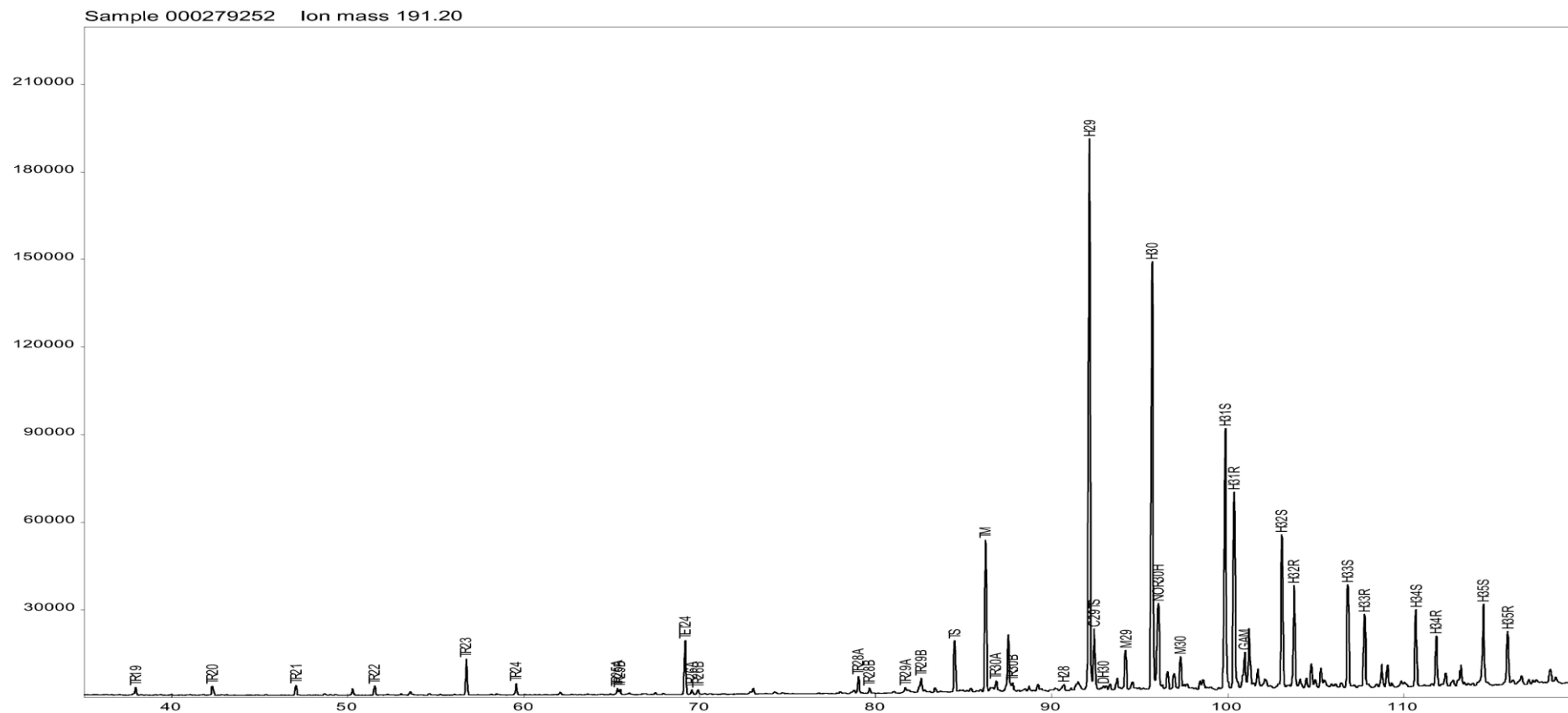
- [141] Eiserbeck, C.; Nelson, R. K.; Grice, K.; Curiale, J.; Reddy, C. M., Comparison of GC–MS, GC–MRM-MS, and GC × GC to Characterise Higher Plant Biomarkers in Tertiary Oils and Rock Extracts. *Geochim Cosmochim Acta* **2012**, 87 (2), p 299–322.
- [142] Peters, K. E.; Walters, C. C.; Moldowan, J. M., *The Biomarker Guide*; 2005.
- [143] Bhattacharya, S. K.; Mahmoodi, S. M. I.; Abdulla, F. H. A., Presence of Oleanane in Oil Also as Evidence of Contamination. *Icipeg 2014* **2015**, 41458, p 395–401.
- [144] Adegoke, A. K.; Sarki Yandoka, B. M.; Abdullah, W. H.; Akaegbobi, I. M., Molecular Geochemical Evaluation of Late Cretaceous Sediments from Chad (Bornu) Basin, NE Nigeria: Implications for Paleodepositional Conditions, Source Input and Thermal Maturation. *Arabian Journal of Geosciences* **2015**, 8 (3), p 1591–1609.
- [145] López, L.; Lo Mónaco, S., Vanadium, Nickel and Sulfur in Crude Oils and Source Rocks and Their Relationship with Biomarkers: Implications for the Origin of Crude Oils in Venezuelan Basins. *Org Geochem* **2017**, 104 (August 1996), p 53–68.
- [146] Bost, F. D.; Frontera-Suau, R.; McDonald, T. J.; Peters, K. E.; Morris, P. J., Aerobic Biodegradation of Hopanes and Norhopanes in Venezuelan Crude Oils. *Org Geochem* **2001**, 32 (1), p 105–114.
- [147] Lima, B.; Martins, L.; Santos, L.; de Souza, E.; Pudenzi, M.; Nascimento, H.; Eberlin, M.; da Cruz, G., Geochemical Investigation of Tar Balls Collected in a Brazilian Beach Using Biomarkers, Ni/V, $\Delta^{13}\text{C}$ Ratios and Ultra-High-Resolution FT-ICR Mass Spectrometry. *J Braz Chem Soc* **2020**, 31 (4), p 673–682.
- [148] Guo, R.; Zhao, Y.; Wang, W.; Hu, X.; Zhou, X.; Hao, L.; Ma, X.; Ma, D.; Li, S., Application of Rare-Earth Elements and Comparison to Molecular Markers in Oil–source Correlation of Tight Oil: A Case Study of Chang 7 of the Upper Triassic Yanchang Formation in Longdong Area, Ordos Basin, China. *ACS Omega* **2020**, 5 (35), p 22140–22156.
- [149] Lavilla, I.; Vilas, P.; Millos, J.; Bendicho, C., Development of an Ultrasound-Assisted Extraction Method for Biomonitoring of Vanadium and Nickel in the Coastal Environment under the Influence of the Prestige Fuel Spill (North East Atlantic Ocean). *Anal Chim Acta* **2006**, 577 (1), p 119–125.
- [150] Angolini, C. F. F.; Pudenzi, M. A.; Batezelli, A.; Eberlin, M. N., Comprehensive Petroleomics: Multiple Mass Spectrometry Strategies for Crude Oil Characterization. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* **2017**, p 1–16.
- [151] Chiaberge, S.; Fiorani, T.; Savoini, A.; Bionda, A.; Ramello, S.; Pastori, M.; Cesti, P., Classification of Crude Oil Samples through Statistical Analysis

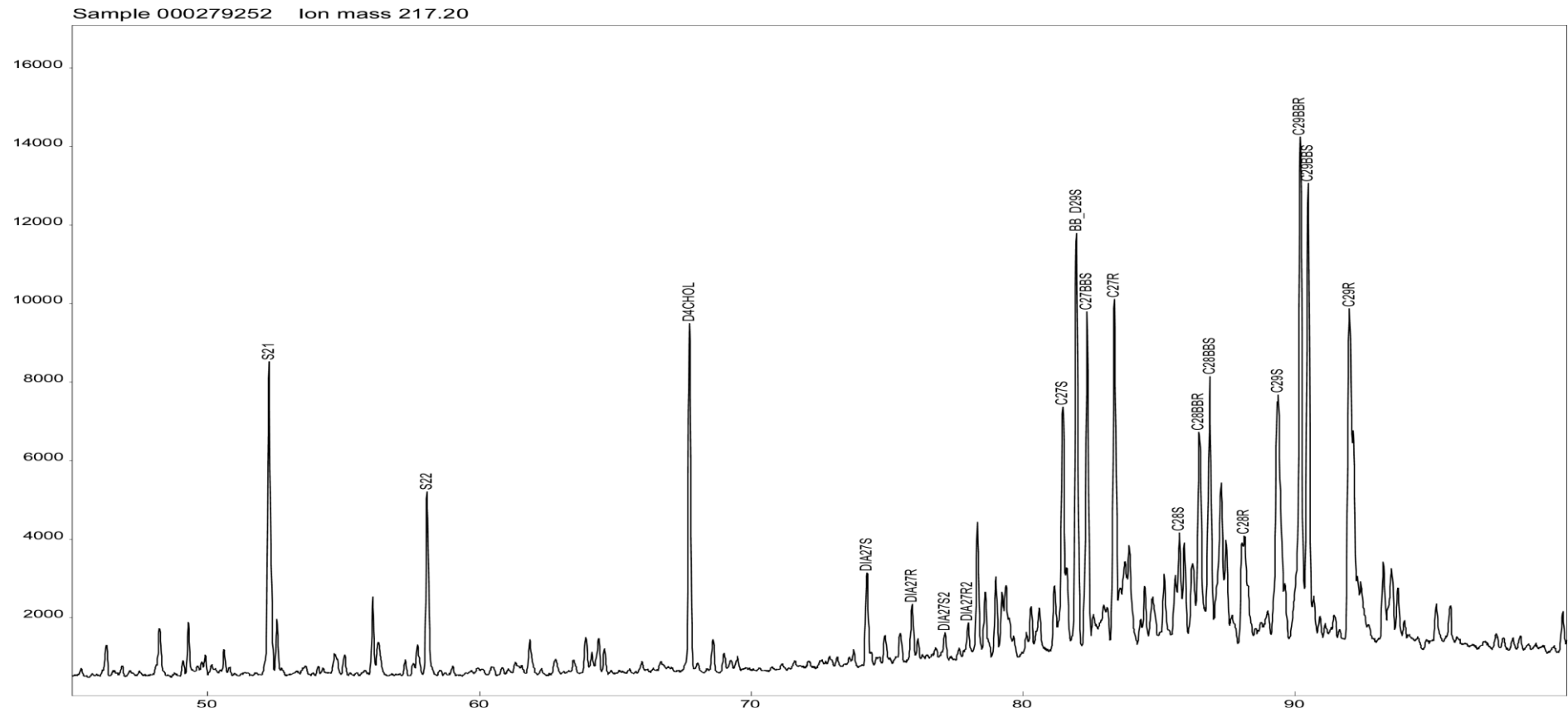
of APPI FTICR Mass Spectra. *Fuel Processing Technology* **2013**, 106, p 181–185.

ANEXOS

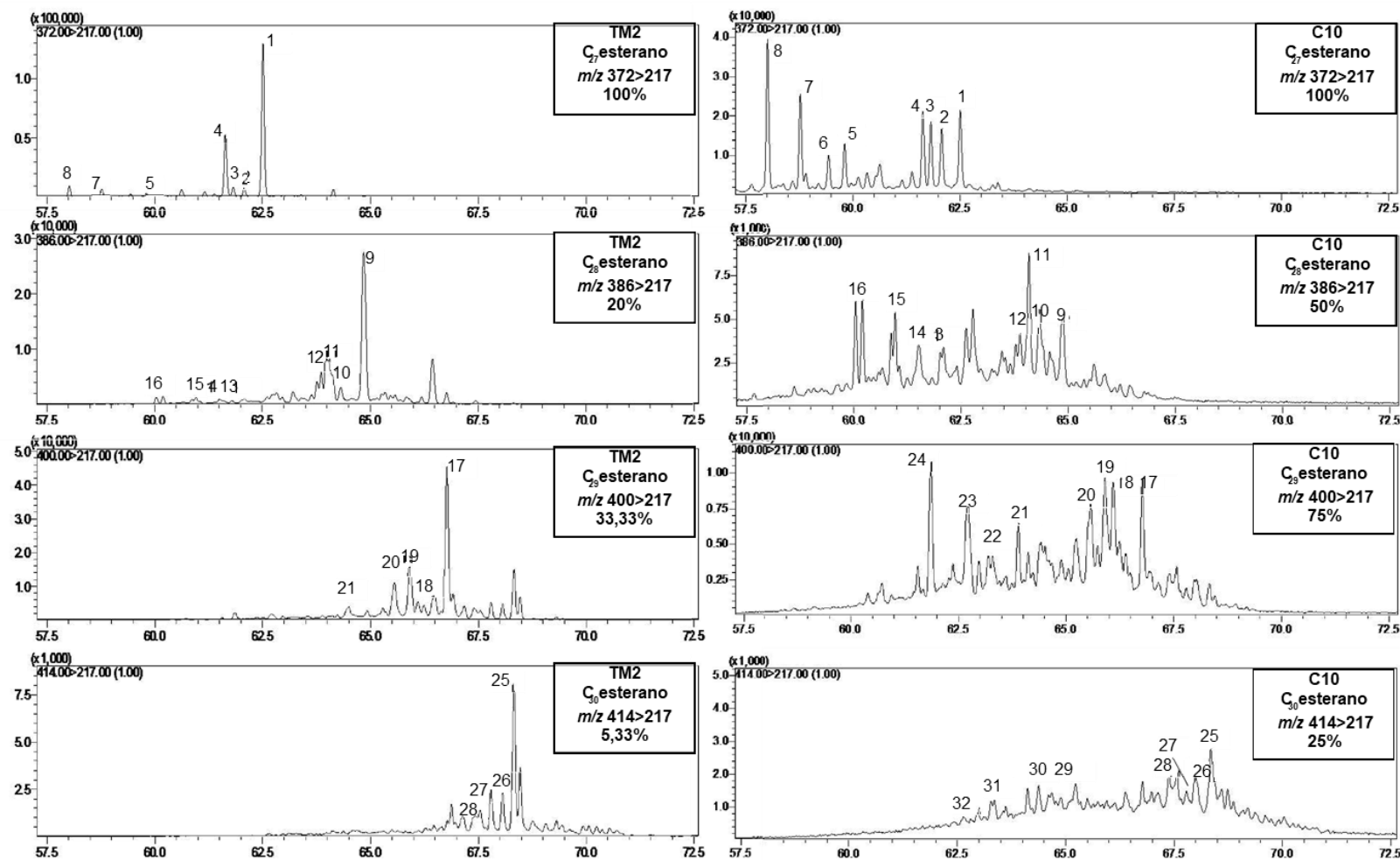
ANEXO 1. Tambor encontrado no litoral sergipano em setembro de 2019.



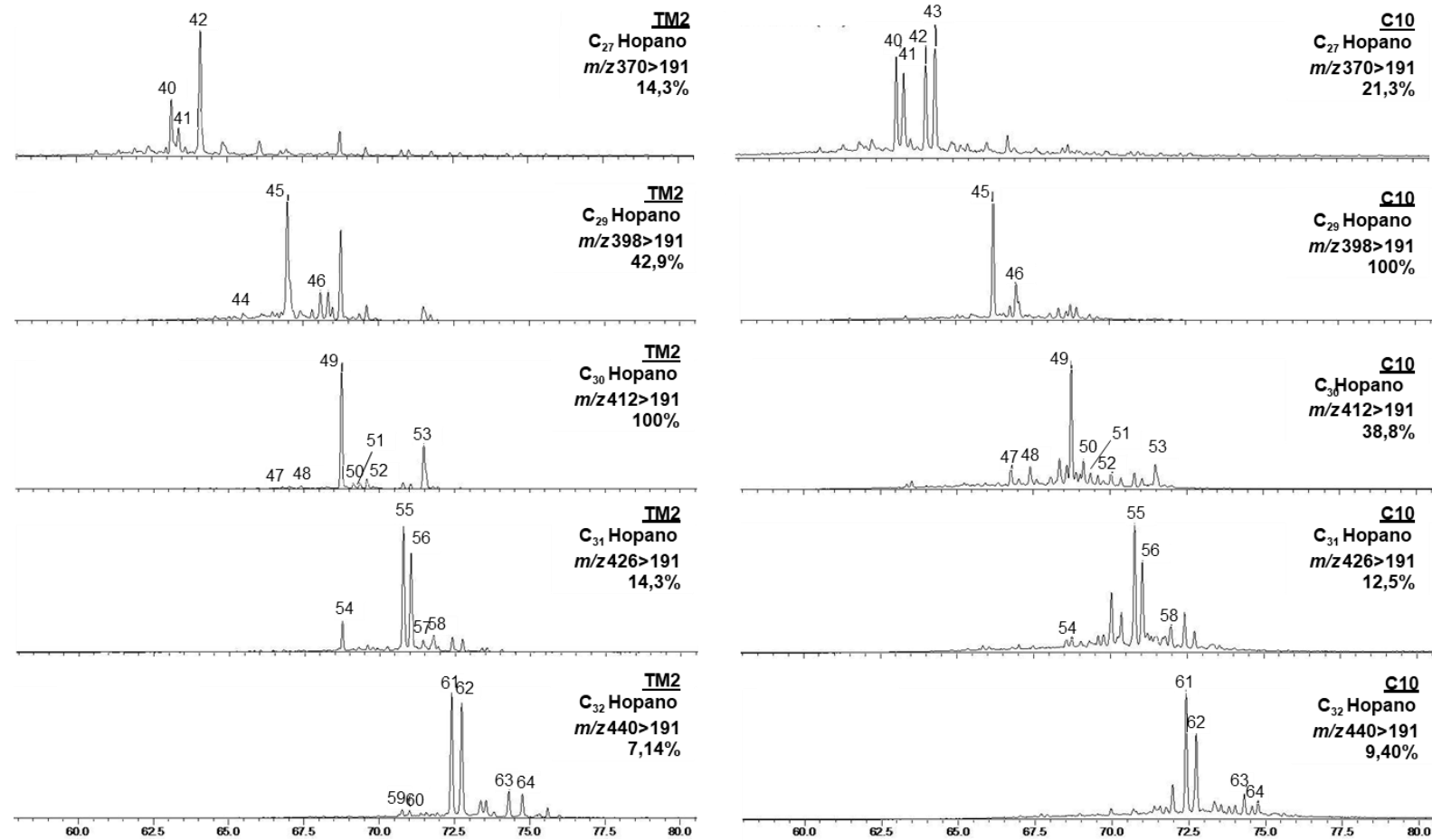
ANEXO 2. Cromatograma do íon m/z 191 descrito por Stout (2006) [12].

ANEXO 3. Cromatograma dos íons m/z 217 e 218 descrito por Stout (2006) [12].

ANEXO 4. Cromatogramas expandidos das amostras de petróleo no modo MRM com sua identificação por números (ver Tabela 5 em **ANEXO**) para as transições correspondente à família de esteranos. **Fonte:** Prata (2016) [46].

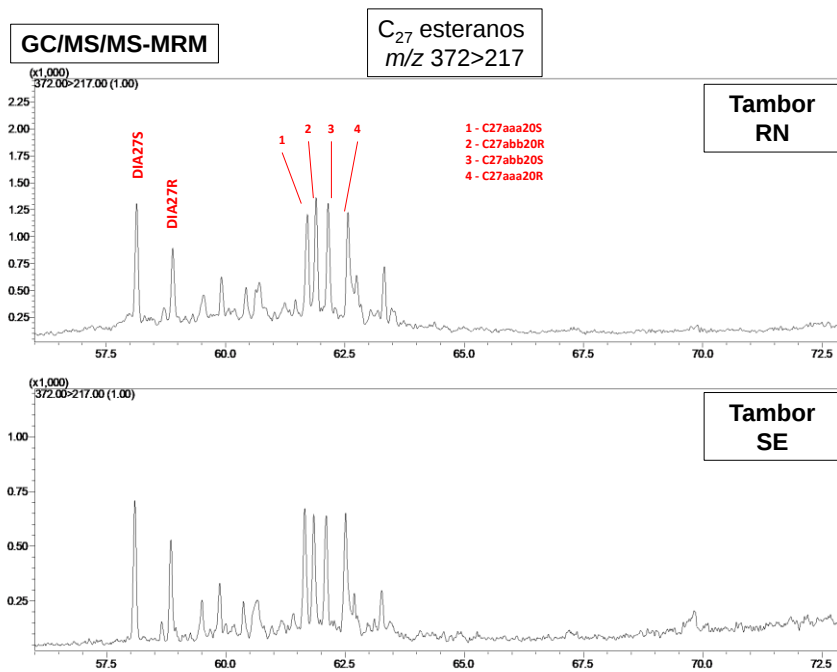


ANEXO 5. Cromatogramas expandidos correspondentes aos terpanos pentacíclicos (Hopanos) representativos para as amostras da bacia de Sergipe/Alagoas (TM2) característico de amostras marinhas e C10 representando amostras da bacia de Campos, Miranga e Potiguar. **Fonte:** Prata (2016) [46].

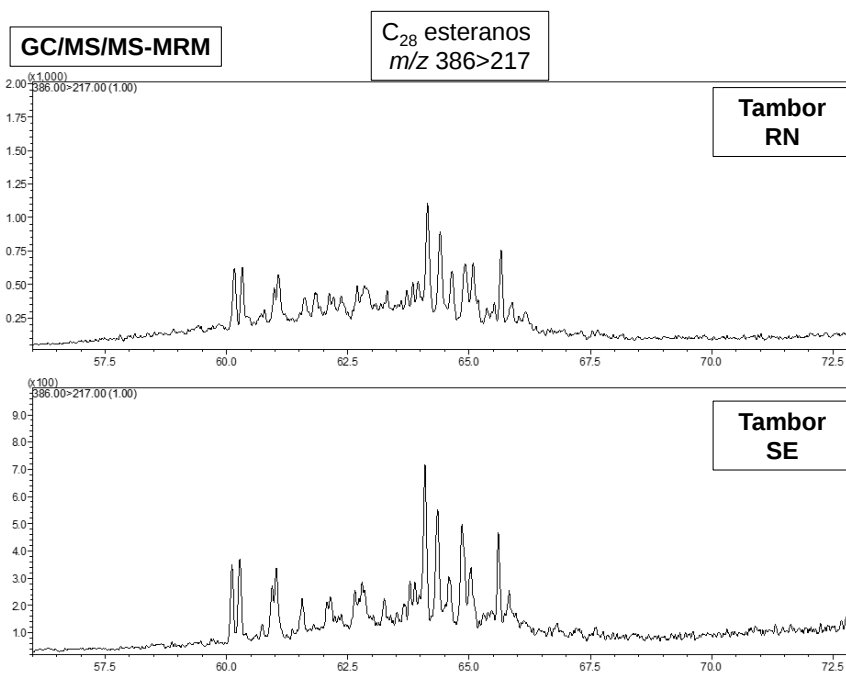


APÊNDICES

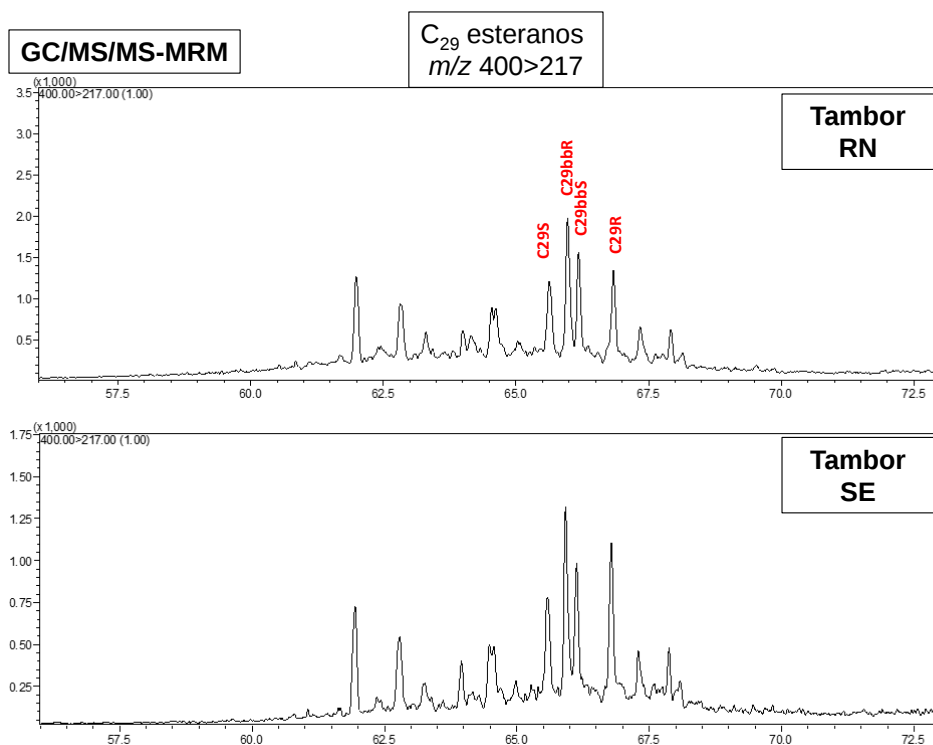
APÊNDICE 1. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C₂₇.



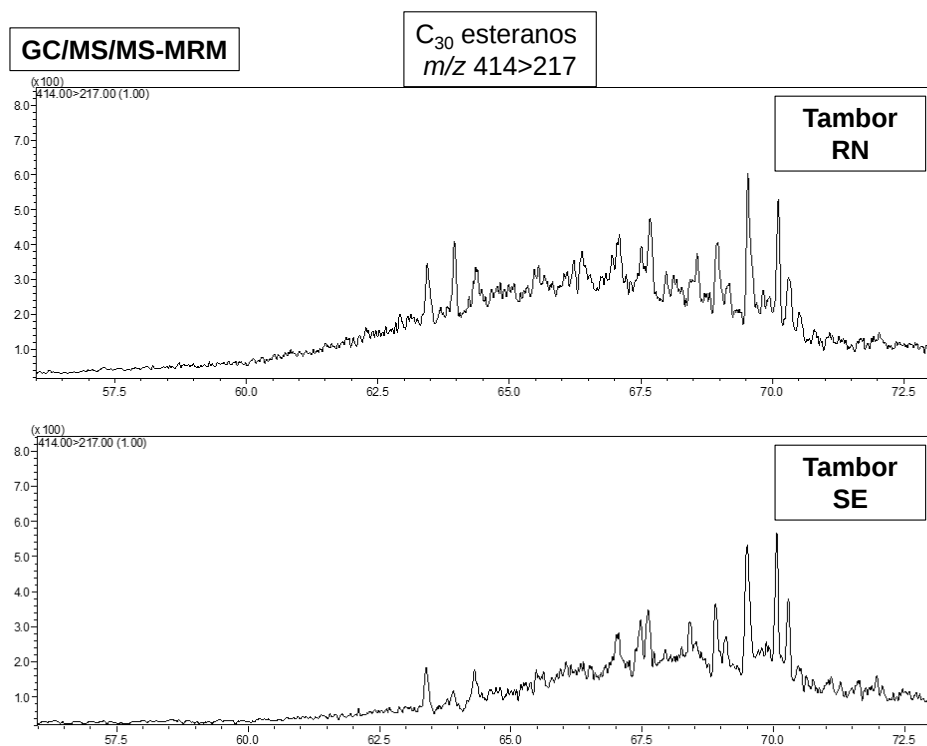
APÊNDICE 2. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C₂₈.



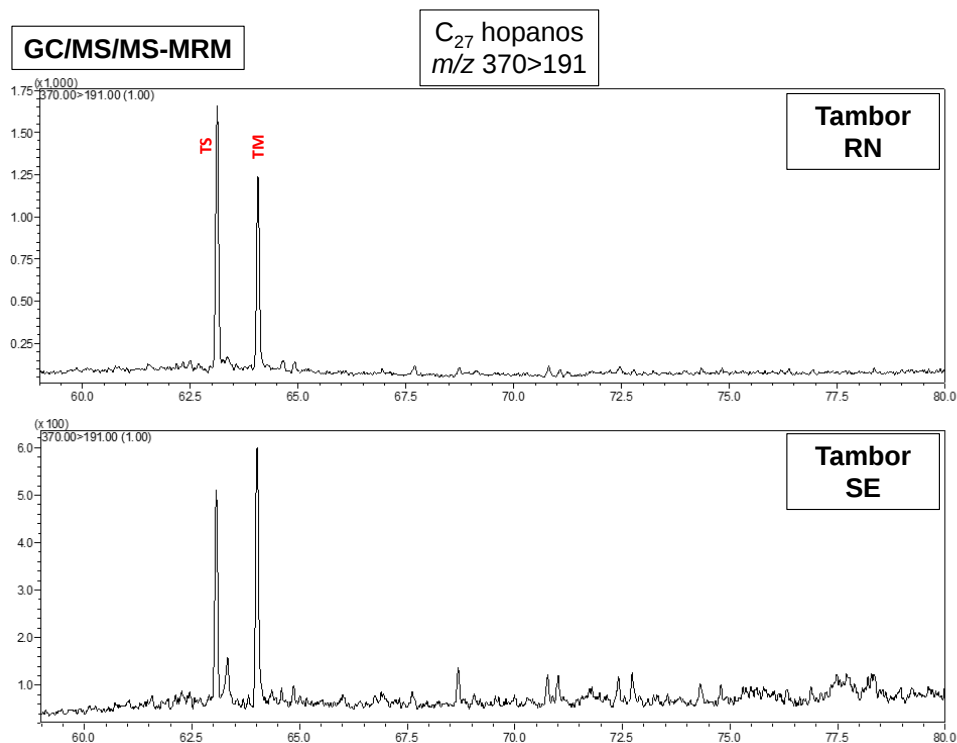
APÊNDICE 3. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{29} .



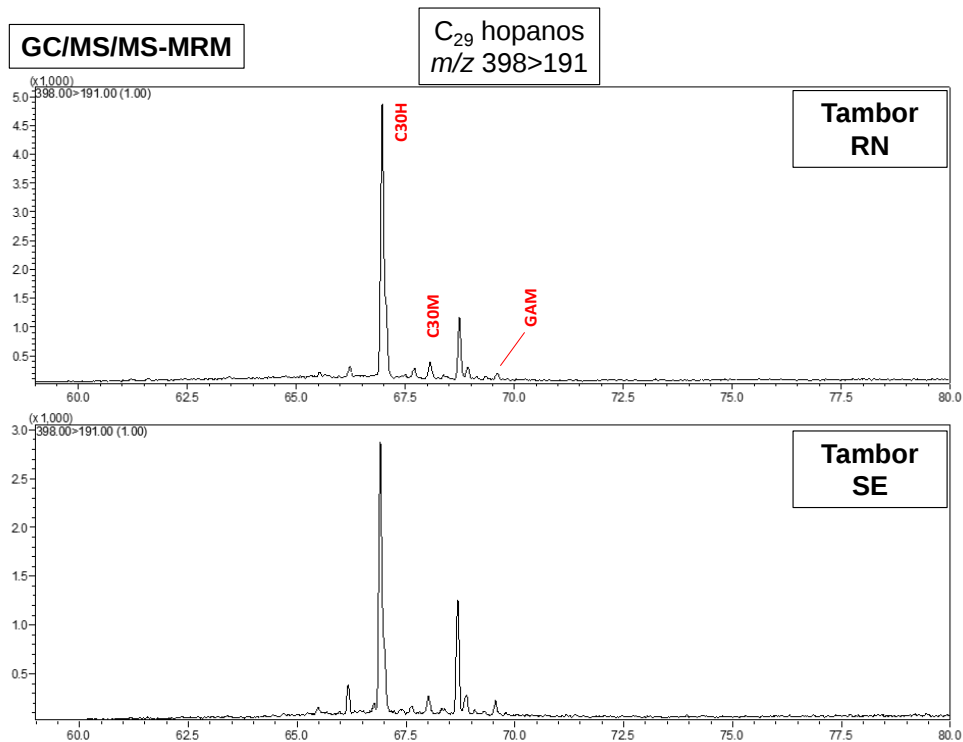
APÊNDICE 4. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{30} .



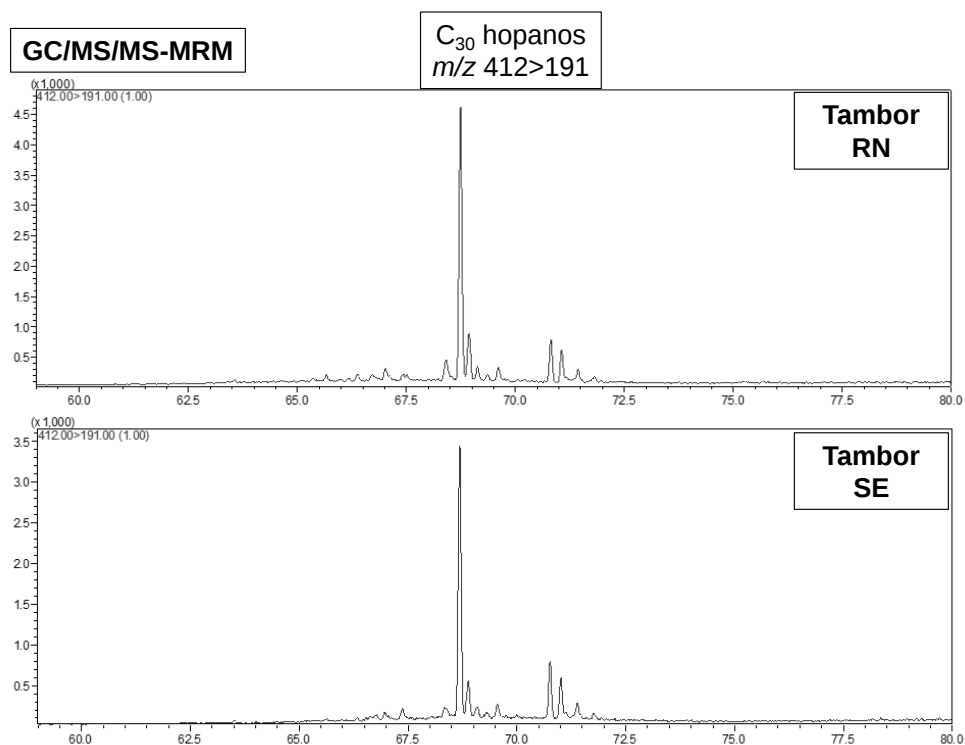
APÊNDICE 5. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C_{27} .



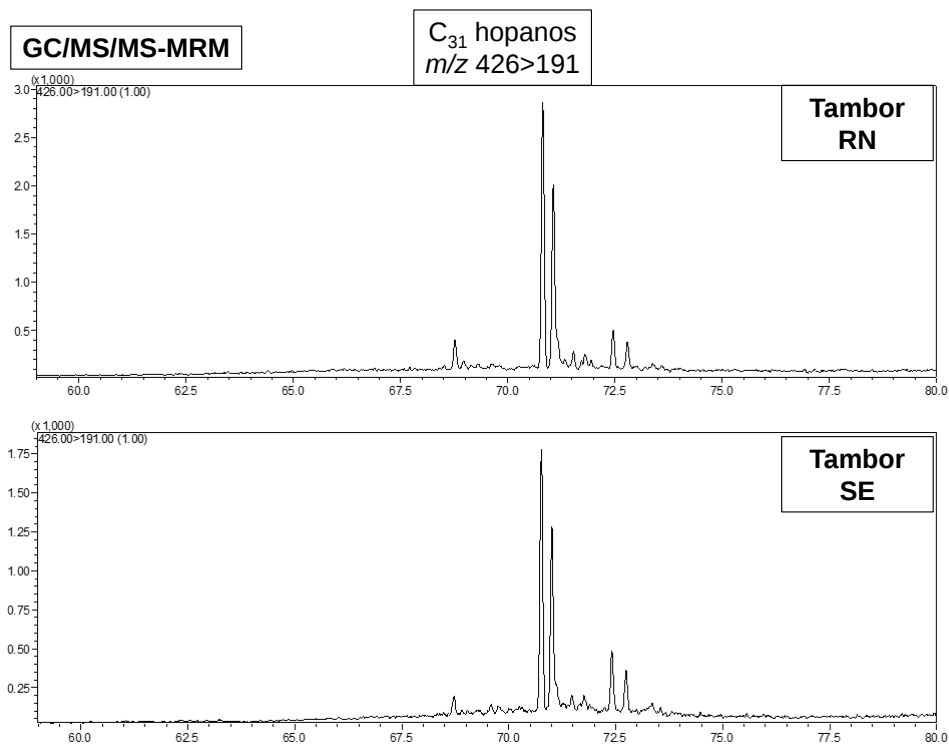
APÊNDICE 6. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C_{29} .



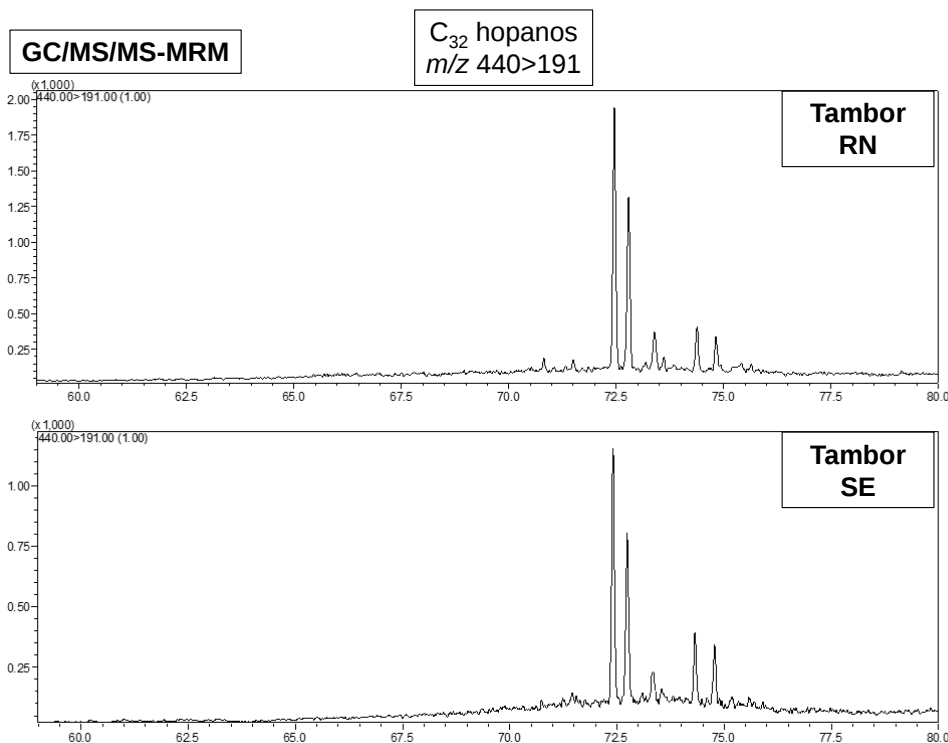
APÊNDICE 7. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C₃₀.



APÊNDICE 8. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C₃₁.



APÊNDICE 9. Comparação dos cromatogramas obtidos para as amostras dos tambores via por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos hopanos C₂₇.



APÊNDICE 10. Comparativo das razões de biomarcadores obtidas para os óleos dos tambores por C/MS/MS-MRM.

Razão de biomarcadores	Tonel SE	Tonel RN	RSD (%)	RSD < 10%
Ts/Tm	0.876295	0.75804	10	SIM
Ts/(Ts+Tm)	0.467035	0.431185	6	SIM
H29/H30	0.638189	0.701858	7	SIM
MOR30/H30	0.051705	0.050042	2	SIM
GAM/H30	0.051897	0.051098	1	SIM
H31S/H31R	1.774397	1.681458	4	SIM
H32S/H32R	1.412943	1.454746	2	SIM
C30Diahop/H30	0.032069	0.02027	32	NÃO
H31R/H30	0.282882	0.26647	4	SIM
Esteranos/Hopanos	0.822079	0.621086	20	NÃO
C ₂₉ ααS/(C ₂₉ ααS+C ₂₉ ααR)	0.474231	0.476362	0	SIM
C ₂₇ ββ(R+S)/C ₂₉ ββ(R+S)	0.551707	0.375429	27	NÃO
C ₂₇ ααS/C ₂₇ ααR	1.003784	0.987097	1	SIM
C ₂₈ ααS/C ₂₈ ααR	0.995569	1.102908	7	SIM
C ₂₉ ααS/C ₂₉ ααS	0.901975	0.909715	1	SIM
DIA ₂₇ αβ/DIA ₂₇ βα+Dia ₂₇ αβ	1.145105	0.832792	22	NÃO
ISO30S/ISO30S+ISO30R	0.634286	0.686667	6	SIM
C ₂₇ ααS/C ₂₇ ααR	1.637187	1.597468	2	SIM

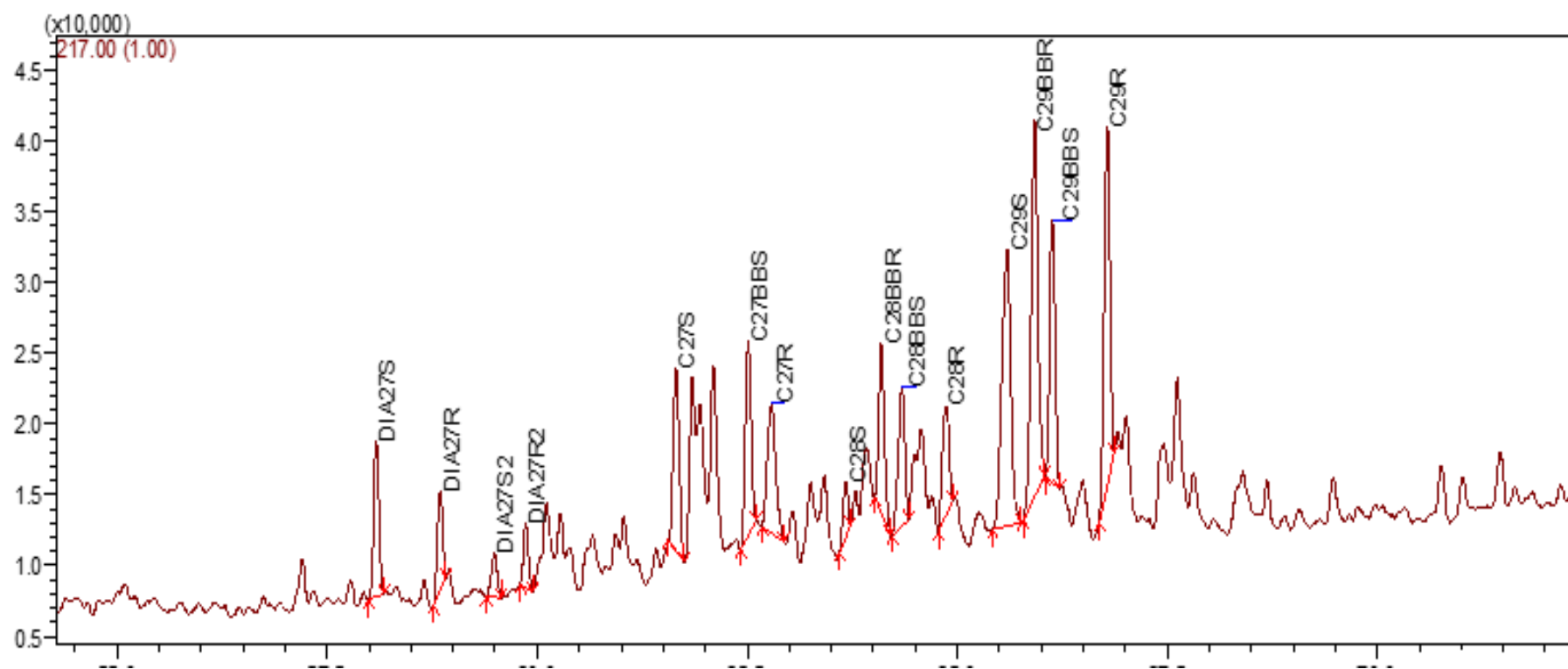
Continuação do **APÊNDICE 10.**

$C_{27}\beta\beta S/C_{27}\beta\beta R$	0.703273	0.626374	8	SIM
$C_{27}\alpha\alpha(S+R)/C_{27}\alpha\alpha(S+R)+C_{27}\beta\beta(S+R)$	0.243502	0.223903	6	SIM
$DIA_{28}\alpha\beta/DIA_{28}\beta\alpha+Dia_{28}\alpha\beta$	0.271007	0.302285	8	SIM
$C_{28}\alpha\alpha S/C_{28}\alpha\alpha R$	0.995569	1.102908	7	SIM
$C_{28}\beta\beta S/C_{28}\beta\beta R$	0.13517	0.23748	39	NÃO
$C_{28}\alpha\alpha(S+R)/C_{28}\alpha\alpha(S+R)+C_{28}\beta\beta(S+R)$	0.536466	0.550996	2	SIM
$C_{29}\alpha\alpha S/C_{29}\alpha\alpha R$	1.134456	1.081009	3	SIM
$C_{29}\beta\beta(S+R)/(C_{29}\beta\beta(S+R)+C_{29}\alpha\alpha(S+R))$	0.187659	0.194758	3	SIM
$C_{29}\beta\beta S/C_{29}\beta\beta R$	0.604478	0.621906	2	SIM
$H32S/(H32R+H32S)$	0.585568	0.592626	1	SIM
$C_{29}\beta\beta(S+R)/(C_{29}\beta\beta(S+R)+C_{29}\alpha\alpha(S+R))$	0.555342	0.5739	2	SIM
$\%GI = GAM/(GAM+H30)$	0.049336	0.011506	88	NÃO
$\%OI = OL/(OL+H30)$	0.083073	0.078255	4	SIM
$\%C_{27}$	0.335343	0.29722	9	SIM
$\%C_{28}$	0.214784	0.214286	0	SIM
$\%C_{29}$	0.449873	0.488495	6	SIM

APÊNDICE 11. Relação de compostos esteranos identificados pelo GC/MS-SIM.

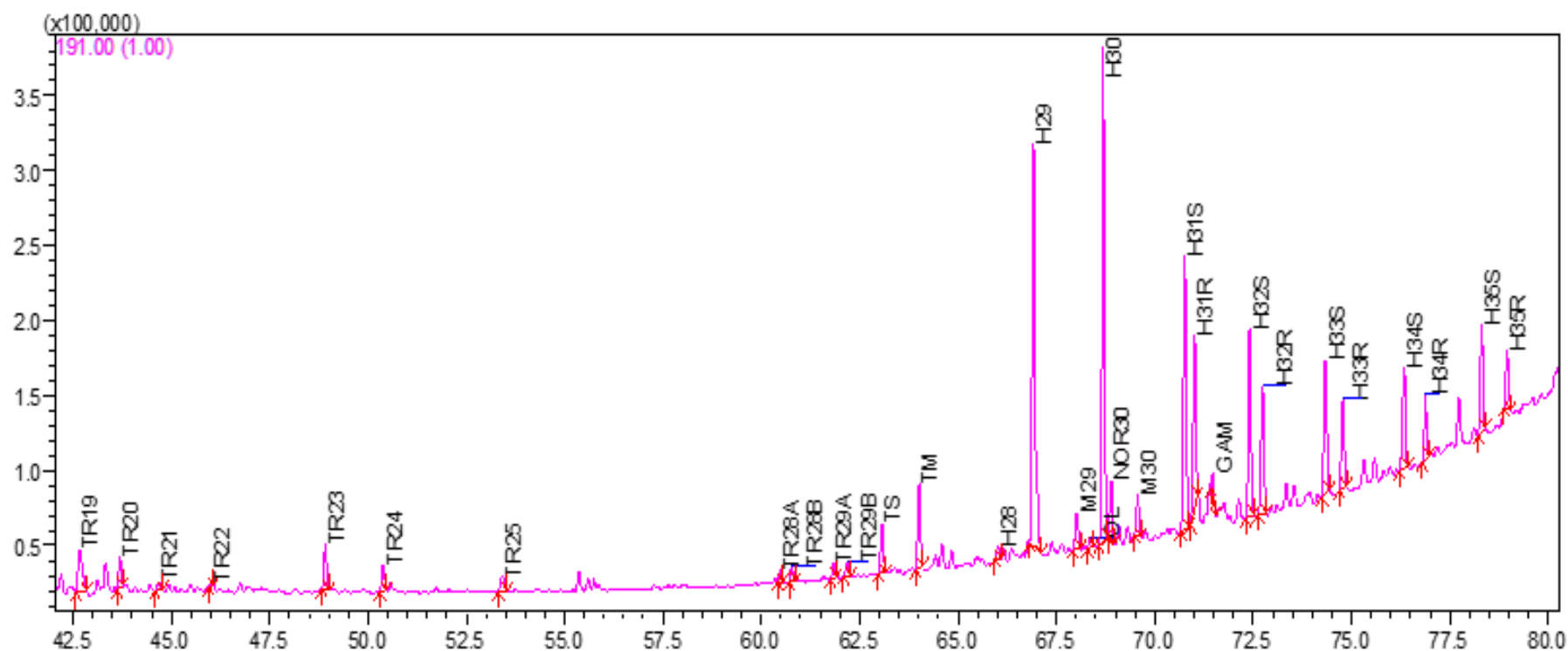
T_R (min)	Código	Nome do composto
58.080	$DIA_{27}\beta\alpha S$	$C_{27} 20S- 13\beta(H), 17\alpha(H)$ -diaesterano
58.837	$DIA_{27}\beta\alpha R$	$C_{27} 20R- 13\beta(H), 17\alpha(H)$ -diaesterano
59.493	$DIA_{27}\alpha\beta S$	$C_{27} 20S- 13\alpha(H), 17\beta(H)$ -diaesterano
59.858	$DIA_{27}\alpha\beta R$	$C_{27} 20R- 13\alpha(H), 17\beta(H)$ -diaesterano
61.649	$C_{27}S$	$C_{27} 20S- 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$ -colesterano
62.503	$C_{27}\beta\beta S$	$C_{27} 20S- 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$ -colesterano
62.790	$C_{27}R$	$C_{27} 20R- 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$ -colesterano
63.669	$C_{28}S$	$C_{28} 20S- 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$ -ergosterano
64.088	$C_{28}\beta\beta R$	$C_{28} 20R- 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$ -ergosterano
64.331	$C_{28}\beta\beta S$	$C_{28} 20S- 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$ -ergosterano
64.858	$C_{28}R$	$C_{28} 20R- 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$ -ergosterano
65.592	$C_{29}S$	$C_{29} 20S- 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$ -estigmasterano
65.913	$C_{29}\beta\beta R$	$C_{29} 20R- 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$ -estigmasterano
66.126	$C_{29}\beta\beta S$	$C_{29} 20S- 5\alpha(H), 14\beta(H), 17\beta(H)$ -estigmasterano
66.779	$C_{29}R$	$C_{29} 20R- 5\alpha(H), 14\alpha(H), 17\alpha(H)$ -estigmasterano

APÊNDICE 12. Cromatograma obtido por GC/MS monitorando o íon de m/z 217.



APÊNDICE 13. Relação de compostos terpanos identificados pelo GC/MS-SIM.

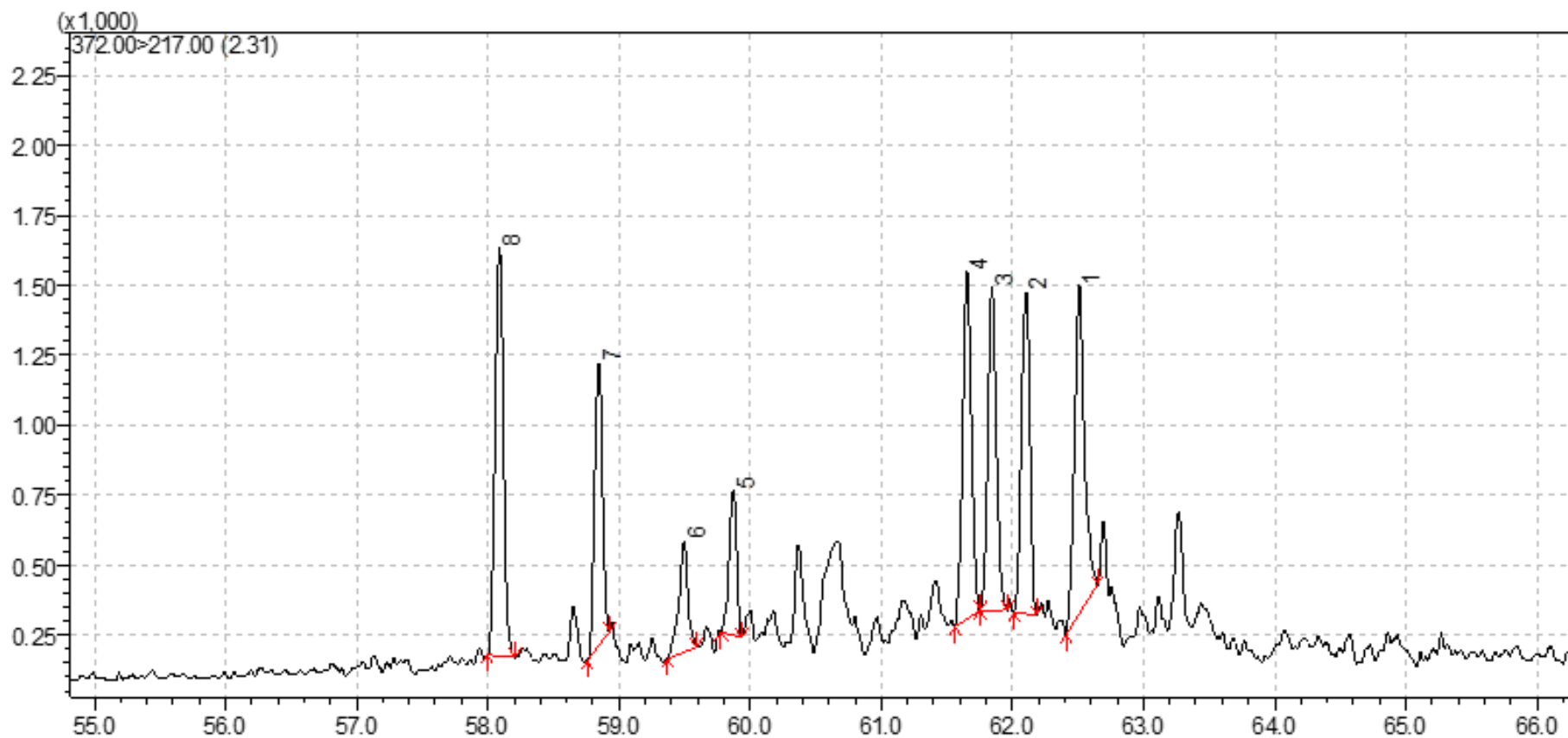
T_R (min)	Código	Nome do composto
42.673	TR19	C19 terpano tricíclico
43.694	TR20	C20 terpano tricíclico
44.696	TR21	C21 terpano tricíclico
46.012	TR22	C22 terpano tricíclico
48.914	TR23	C23 terpano tricíclico
50.385	TR24	C24 terpano tricíclico
53.397	TR25	C25 terpano tricíclico
60.473	TR28A	C28 terpano tricíclico (a)
60.768	TR28B	C28 terpano tricíclico (b)
61.835	TR29A	C29 terpano tricíclico (a)
62.188	TR29B	C29 terpano tricíclico (b)
63.064	Ts	18 α (H),21 β (H)-22,29,30-trisnorhopano
64.009	Tm	17 α (H),21 β (H)-22,29,30-trisnorhopano
66.013	H28	17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-bisnorhopano
66.908	H29	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano
68.015	M29	17 α (H),21 β (H)-30-norhopano (norMoretano)
68.349	OL	18 α (H) and 18 β (H)-Oleanano
68.687	H30	17 α (H),21 β (H)-hopano
68.884	NOR30	17 α (H)-30-nor-29-homohopano
69.563	M30	17 β (H),21 α (H)-hopano (Moretano)
70.760	H31S	22S-17 α (H),21 β (H)-30-homohopano
71.011	H31R	22R-17 α (H),21 β (H)-30-homohopano
71.389	GAM	Gmacerano
72.410	H32S	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31-bishomohopano
72.738	H32R	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31-bishomohopano
74.325	H33S	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32-trishomohopano
74.777	H33R	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32-trishomohopano
76.332	H34R	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33-tetrakishomohopano
76.879	H34S	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33-tetrakishomohopano
78.302	H35S	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33,34-pentakishomohopano

APÊNDICE 14. Cromatograma obtido por GC/MS monitorando o íon de m/z 191.

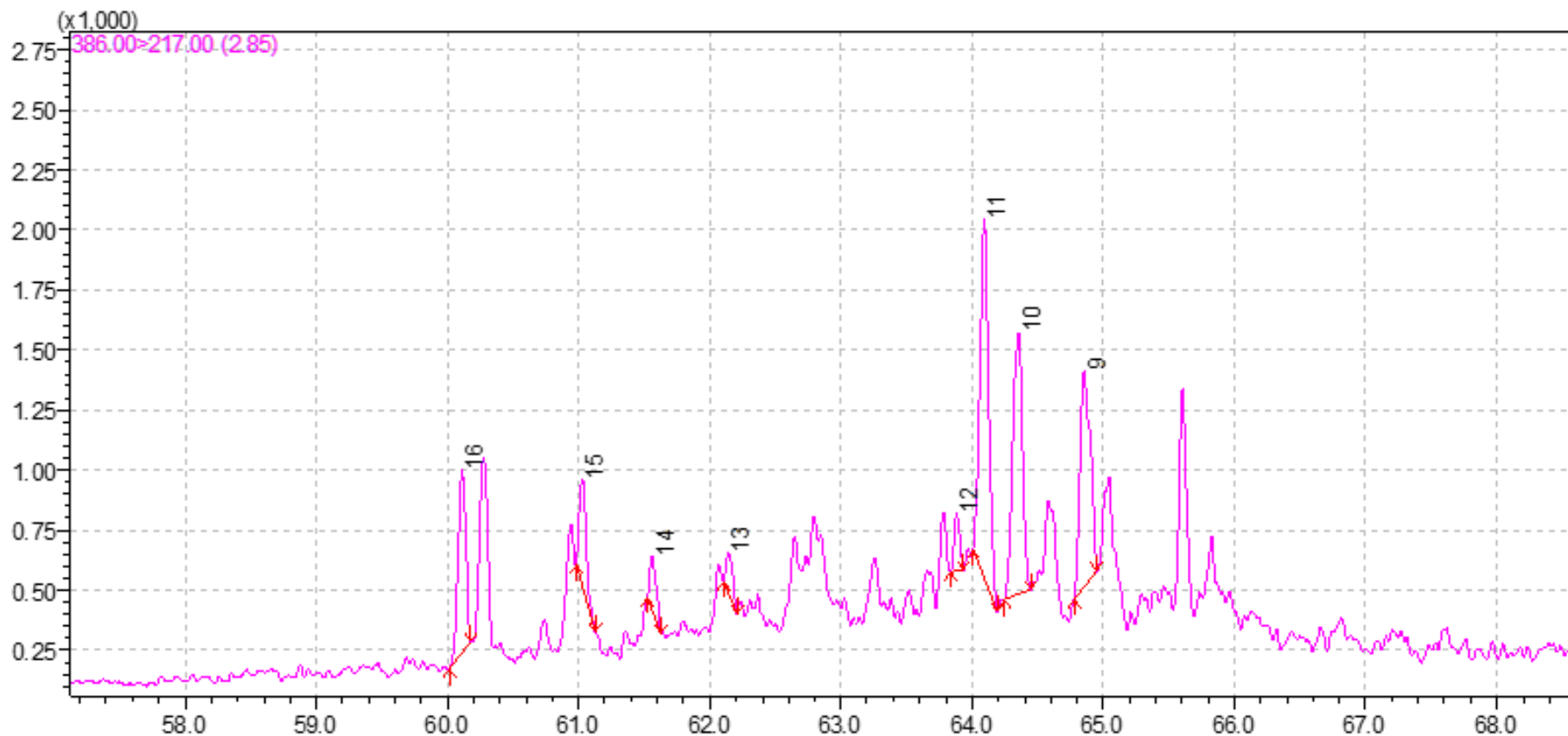
APÊNDICE 15. Relação de compostos biomarcadores esteranos e hopanos identificados pelo GC/MS/MS-MRM.

T_R (min)	Número	Código	Nome do composto
62.501	1	C ₂₇ ααR	5α(H),14α(H), 17α(H)-colestano (20R)
62.092	2	C ₂₇ ββS	5α(H),14 β (H), 17 β (H)-colestano (20S)
61.836	3	C ₂₇ ββR	5α(H),14 β (H), 17 β (H)-colestano (20R)
61.65	4	C ₂₇ ααS	5α(H),14α(H), 17α(H)-colestano (20S)
59.859	5	DIA ₂₇ αβR	13α(H),17β(H)-diacolestano (20R)
59.484	6	DIA ₂₇ αβS	13α(H),17β(H)-diacolestano (20S)
58.838	7	DIA ₂₇ βαR	13β(H),17α(H)-diacolestano (20R)
58.083	8	DIA ₂₇ βαS	13β(H),17α(H)-diacolestano (20S)
64.852	9	C ₂₈ ααR	5α(H),14α(H), 17α(H)-ergostano (20R)
64.344	10	C ₂₈ ααS	5α(H),14 β (H), 17β(H)-ergostano (20S)
64.09	11	C ₂₈ ββR	5α(H),14 β (H), 17β(H)-ergostano (20R)
63.879	12	C ₂₈ ββS	5α(H),14α(H), 17α(H)-ergostano(20S)
62.149	13	DIA ₂₈ αβR	13α(H),17β(H)-diaergostano (20R)
61.553	14	DIA ₂₈ αβS	13α(H),17β(H)-diaergostano (20S)
61.006	15	DIA ₂₈ βαR	13β(H),17α(H)-diaergostano (20R)
60.101	16	DIA ₂₈ βαS	13β(H),17α(H)-diaergostano (20S)
66.778	17	C ₂₉ ααR	5α(H),14α(H), 17α(H)-estigmastano (20R)
66.115	18	C ₂₉ ββS	5α(H),14 β (H), 17 β (H)-estigmastano (20S)
65.919	19	C ₂₉ ββR	5α(H),14β(H), 17β(H)-estigmastano (20R)
65.578	20	C ₂₉ ααS	5α(H),14α(H), 17α(H)-estigmastano (20S)
62.776	23	DIA ₂₉ βαR	13β(H),17α(H)-diaestimagtano (20R)
61.932	24	DIA ₂₉ βαS	13β(H),17α(H)-diaestimagtano (20S)
68.496	25	ISO30R	5α(H),14α(H), 17α(H)-24-isopropilcolestano (20R)
67.434	28	ISO30S	5α(H),14α(H), 17α(H)-24-isopropilcolestano (20S)
63.056	40	Ts	18α(H)-22,29,30-trisnorhopano (Ts)
64.002	42	Tm	17α(H)-22,29,30-trisnorhopano (Tm)
66.901	45	H29	17α(H),21 β (H)-30-norhopano (C29Hop)
67.347	48	C30Diahop	C3017α(H)-diahopano
68.68	49	H30	17α(H),21 β (H)-hopano (C30Hop)
69.547	52	MOR30	17β(H),21α(H)-hopano (C30baHop)
71.377	53	GAM	Gamacerano
70.754	55	H31S	17α(H),21 β (H),-homohopano (22S)
71.004	56	H31R	17α(H),21β(H),-homohopano (22R)
72.398	61	H32S	17α(H),21β(H)-bishomohopano (22S)
72.727	62	H32R	17α(H),21β(H)-bishomohopano (22R)
68.344	65	OL	18α(H)-oleanane + 18β(H)-oleanane

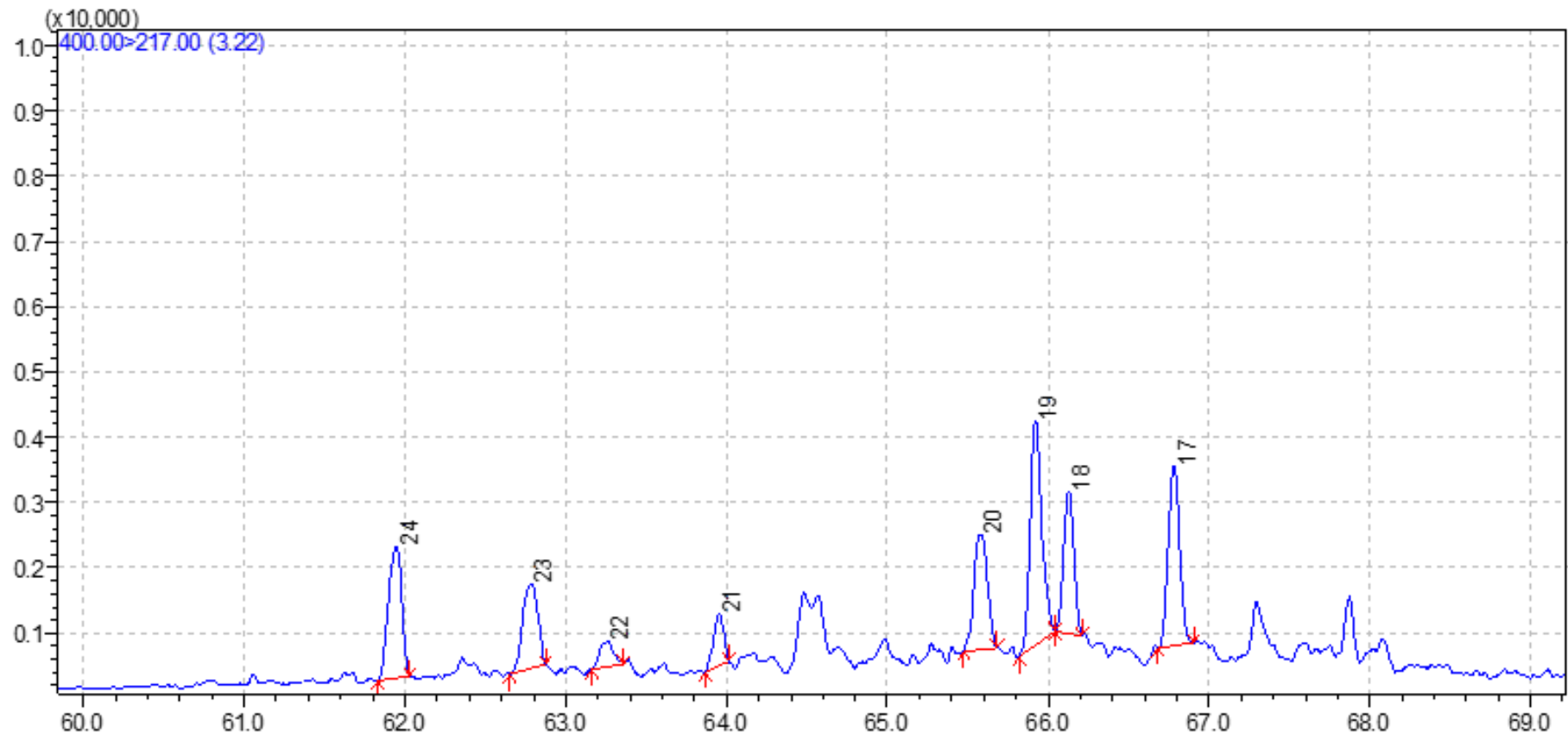
APÊNDICE 16. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{27} (m/z 372 > m/z 217).



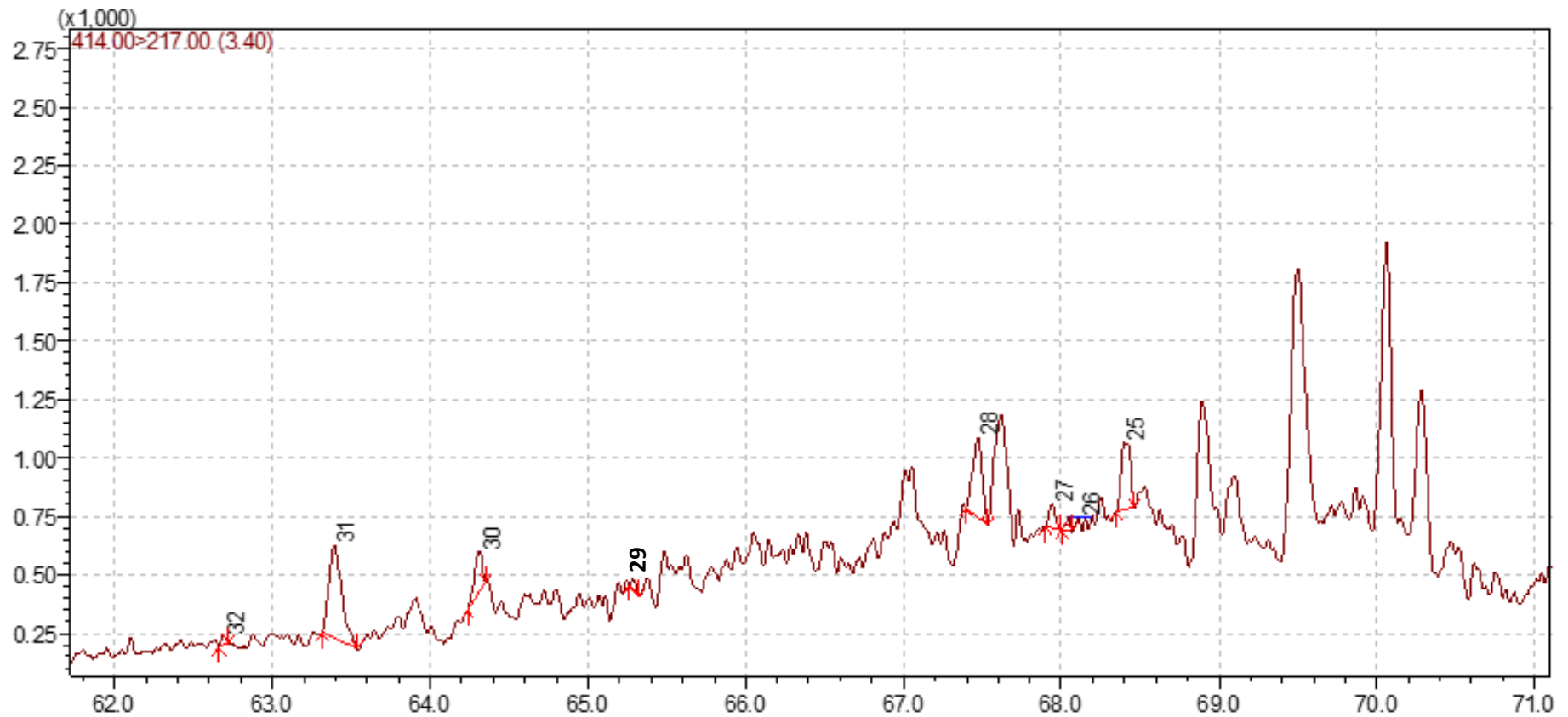
APÊNDICE 17. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{28} (m/z 386 > m/z 217).



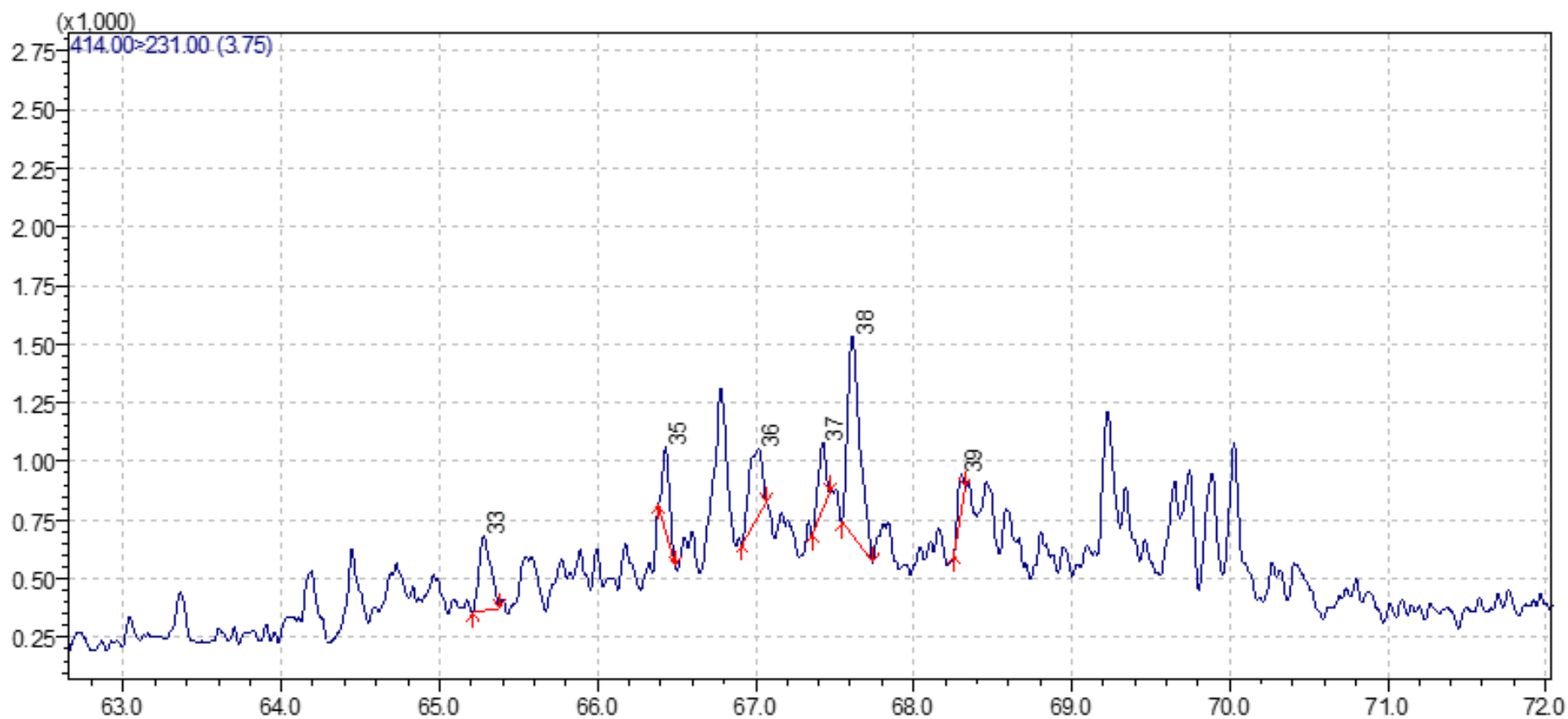
APÊNDICE 18. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{29} (m/z 400 > m/z 217).



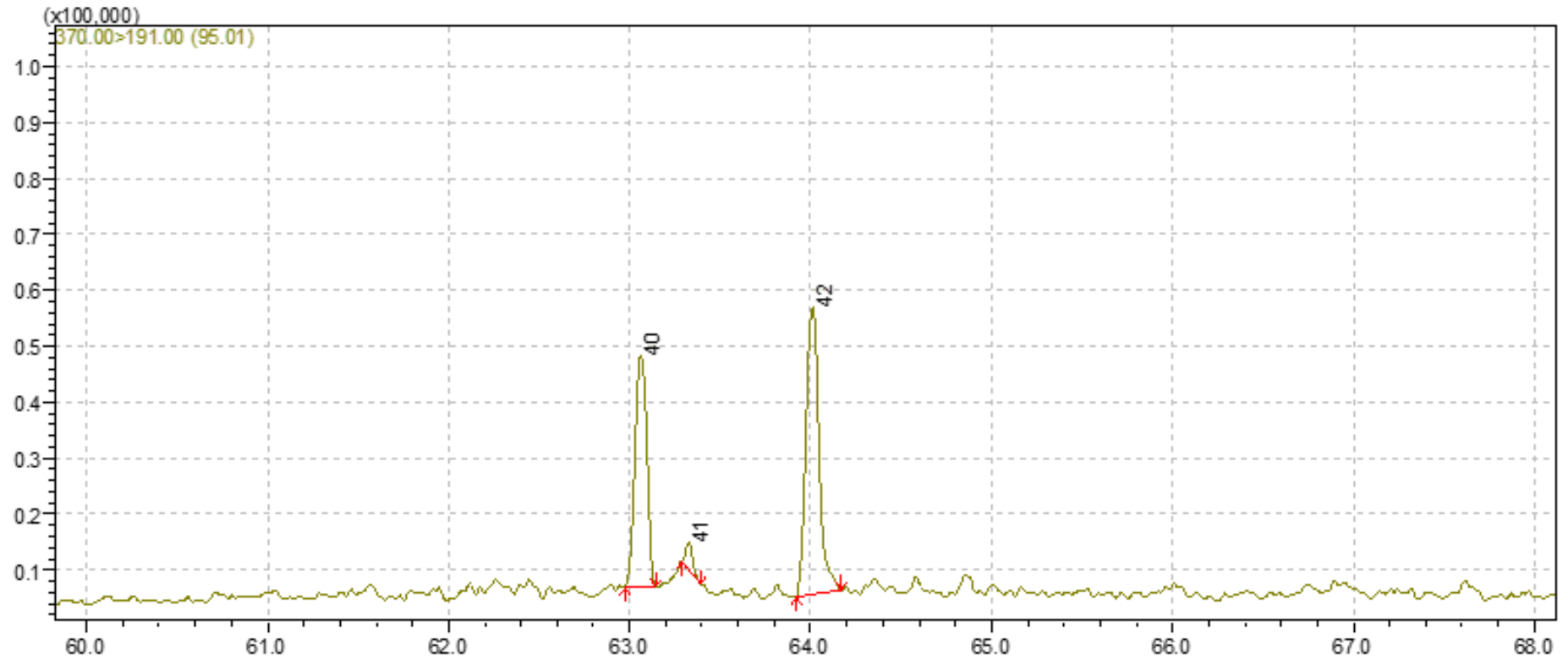
APÊNDICE 19. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos esteranos C_{30} (m/z 414 > m/z 217).



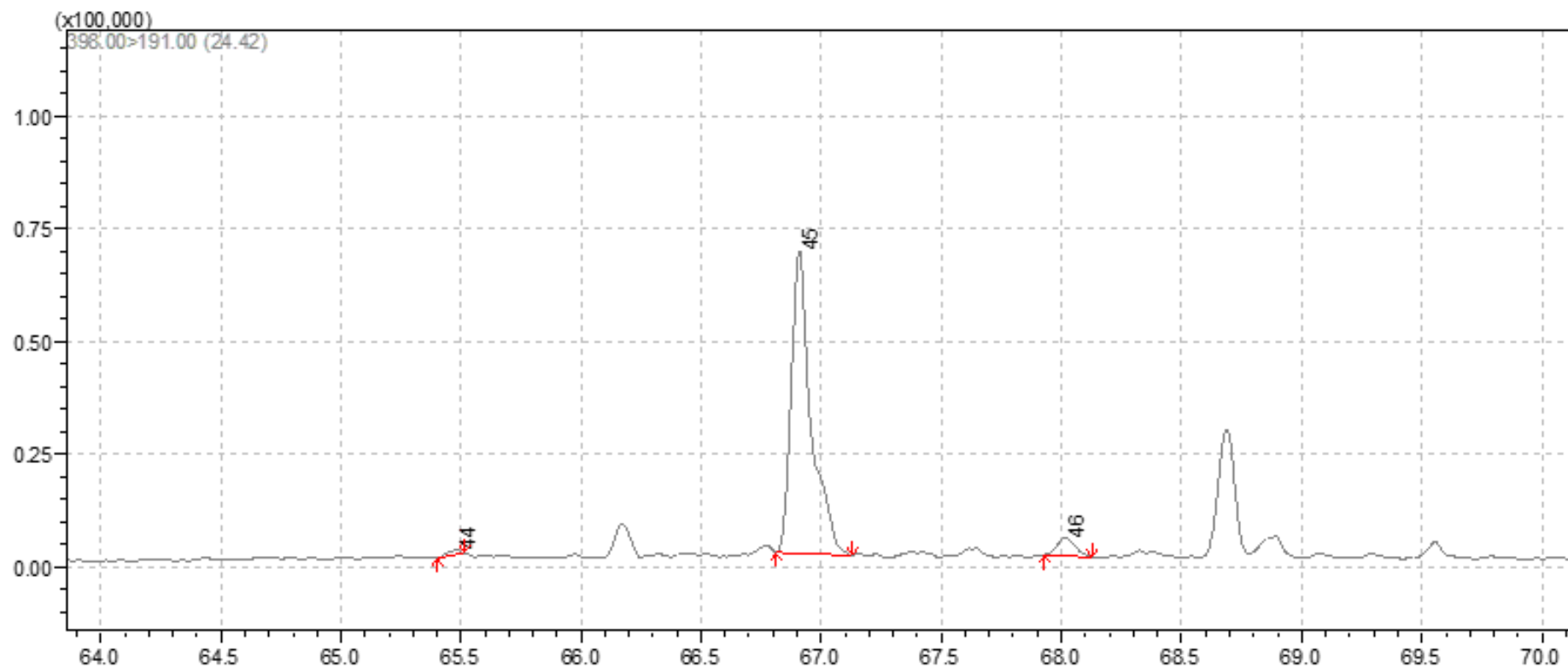
APÊNDICE 20. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos metilesteranos C_{27} (m/z 414 > m/z 231).



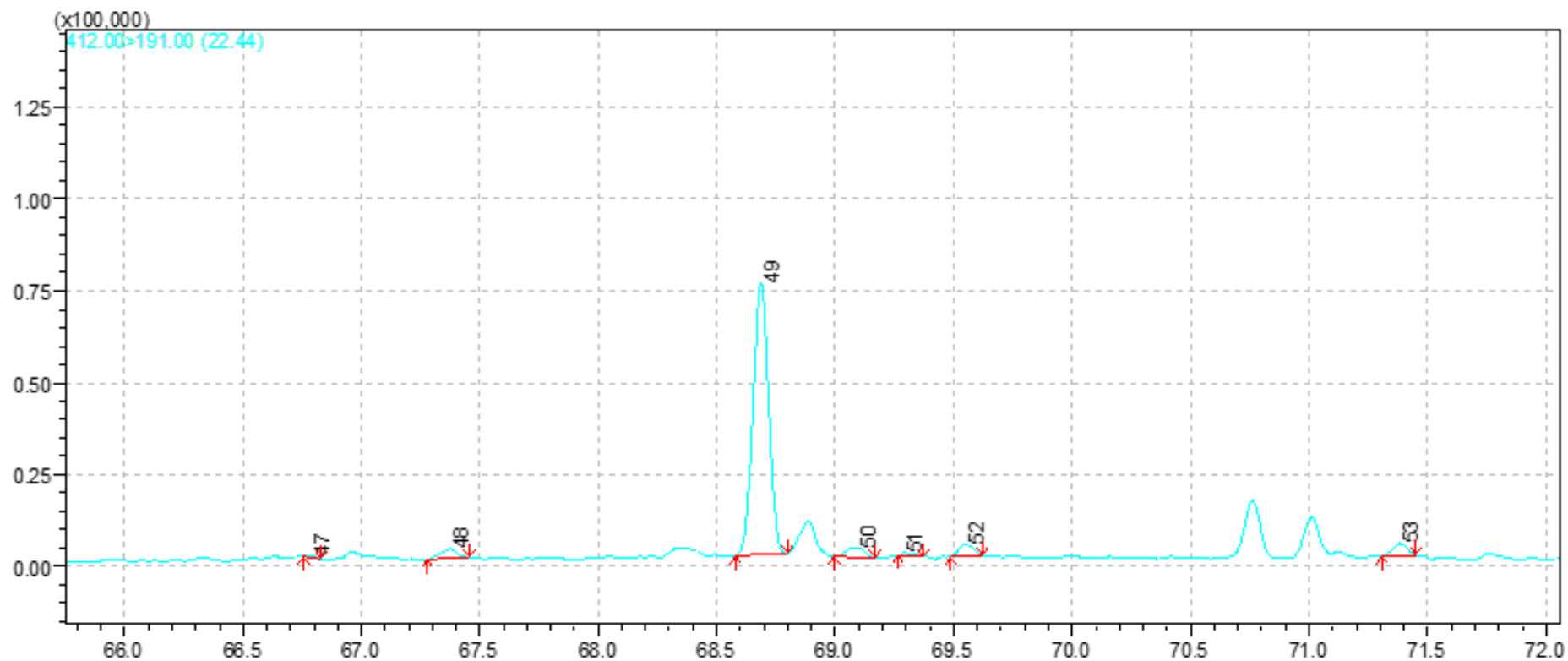
APÊNDICE 21. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C₂₇ (m/z 370 > m/z 191).



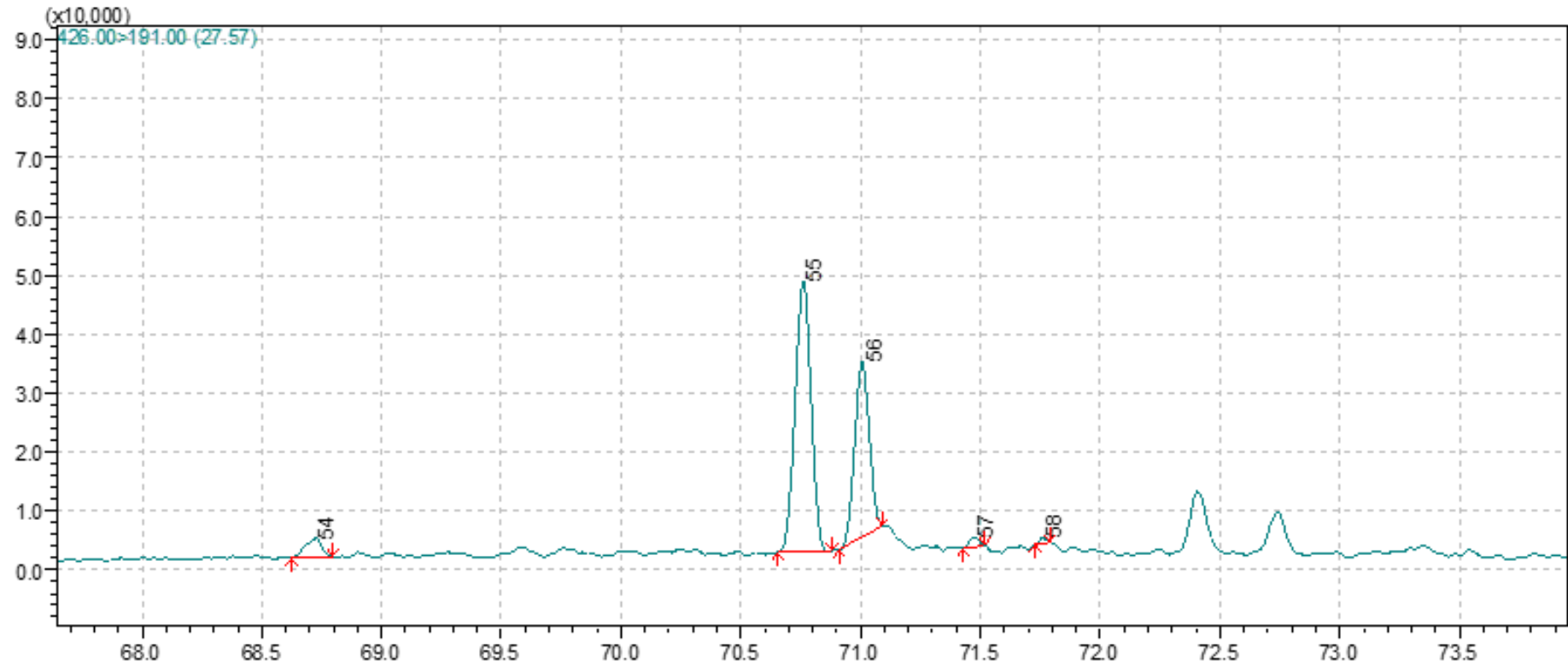
APÊNDICE 22. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C_{29} (m/z 398 > m/z 191).



APÊNDICE 23. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C₃₀ (m/z 412 > m/z 191).



APÊNDICE 24. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C₃₁ (m/z 426 > m/z 191).



APÊNDICE 25. Cromatograma obtido por GC/MS/MS-MRM monitorando a transição dos Hopanos C₃₂ (m/z 440 > m/z 191)

