

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Laísa Piccardo Shiroiwa

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR HS-SPME-GC-MS
PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE METABÓLITOS RESULTANTES DA
DECOMPOSIÇÃO MICROBIANA DA ÁGUA DE LASTRO DE BODIESEL**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

Laísa Piccardo Shirowa

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR HS-SPME-GC-MS
PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE METABÓLITOS RESULTANTES DA
DECOMPOSIÇÃO MICROBIANA DA ÁGUA DE LASTRO DE BIODIESEL**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Orientadora

Profa. Dra. Fátima Menezes Bento

Co-orientadora

Porto Alegre

2019

Dedico este trabalho a todos aqueles que o tornaram possível de alguma forma, ao meu amor – por toda a paciência e por não desistir de nós nesse período – aos meus amigos e a todos aqueles que persistem na área da Pesquisa, mesmo em tempos de crise e ataques aos investimentos em Educação e Pesquisa, como esse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento, pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos os educadores que possibilitaram que eu chegasse até aqui, desde o ensino fundamental até a última cadeira da graduação. Sem vocês eu não teria chegado tão longe!

Agradeço especialmente minha orientadora, Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato, que me acolheu no laboratório e nos seus projetos de maneira ímpar e que soube compreender meu humor (e suas oscilações) sem que isso prejudicasse a maneira como sou vista por ela.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, por todo o suporte e ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço ao meu amor, por ter sido meu porto seguro durante todo esse trajeto tortuoso que foi chegar ao fim da graduação sem nunca se abalar.

Agradeço aos meus amigos, que não me permitiram desistir, mesmo quando isso era tudo o que eu queria fazer. Àqueles que acompanharam todo o processo de desenvolvimento desse trabalho.

Àqueles que me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente, não me deixando acreditar que eu era incapaz. Àqueles que não puderam estar tão próximos quando gostariam, mas que prestaram apoio incondicional.

Agradeço também a minha família por todo o suporte, em especial a minha avó Yedda Piccardo Shiroiwa, que, apesar de não ter formação superior, sempre me incentivou e apoiou durante todos os momentos da Graduação.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os membros da comunidade acadêmica por, mesmo em tempos de crise, manterem o alto nível de pesquisa, fazendo das Universidades Públicas responsáveis por 90% da tecnologia produzida no país. Mesmo com os investimentos congelados e sem reajuste nas Bolsas Auxílio desde 2013.

“Lembre-se, não vale a pena viver sonhando e esquecer de viver.”

*Dumbledore, A. P. W. B. – Harry Potter e
a Pedra Filosofal, p. 185 (J. K. Rowling)*

RESUMO

O biodiesel é um combustível menos poluente que os de origem fóssil (petróleo e derivados), produzido a partir de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais. Quimicamente são ésteres metílico ou etílico de óleos e gorduras obtido por meio da reação de transesterificação de triglicerídeos com álcool metanol ou etanol. Apesar das inúmeras vantagens do biodiesel, o contato com o ar e com a água durante a estocagem pode afetar a sua qualidade; por ser altamente higroscópico. Dependendo das condições de transporte e armazenamento, há proliferação de micro-organismos envolvidos na degradação do combustível, na água de lastro. A água de lastro possui em sua composição uma série de compostos derivados do óleo do qual foi originada. Com intuito de sanar ou reduzir esse problema, determinados fungos são utilizados para conter esta proliferação. Um dos fungos amplamente utilizados é o *Pseudallescheria boydii*. A avaliação da composição da água de lastro em termos de compostos resultantes dos processos de degradação envolvendo fungos e micro-organismos é fundamental para a caracterização do sistema e eficiência dos fungos. Para a identificação de compostos residuais resultantes da degradação microbiana da água de lastro na presença e ausência de fungos, foi desenvolvida uma metodologia analítica baseada em Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas que permitisse identificação por tentativa destes compostos. A análise por tentativa é utilizada quando não há padrões disponíveis para os compostos de interesse e consiste em comparar o perfil de fragmentação do espectro de massa gerado com a biblioteca NIST. Uma das técnicas de preparo de amostra mais empregadas para esse tipo de matriz é a SPME (*Solid Phase Microextraction*). A partir desta problemática, o objetivo do trabalho foi desenvolver metodologia analítica por SPME para análise por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) para compostos resultantes da decomposição microbiana de água de lastro de biodiesel. As melhores condições para a SPME foram estabelecidas possibilitando a comparação entre o perfil de compostos das amostras na ausência e presença do fungo. Na comparação do perfil cromatográfico das amostras controle, os ésteres de cadeia longa são detectados já na primeira semana. Na presença de fungos a ocorrência de ésteres de cadeia longa pode ser detectada somente a partir da quarta semana.

Palavras-chave: biodiesel, degradação, fungos, SPME.

ABSTRACT

Biodiesel is a less polluting fuel than fossil fuels (petroleum and derivatives), produced from renewable sources such as vegetable oils and animal fats. Chemically they are methyl or ethyl esters of oils and fats obtained by a transesterification reaction of triglycerides with methanol or ethanol. Despite the many advantages of biodiesel, contact with air and water during storage can affect its quality; being highly hygroscopic. Depending on the conditions of transport and storage, proliferation of microorganisms involved in fuel degradation in free water, may occur. Free water has a series of oil-derived compounds in its composition, springing from its original source. In order to remedy or reduce this problem, certain fungi are used. A widely used fungus is *Pseudallescheria boydii*. The evaluation of free water composition, in terms of compounds resulting from degradation processes involving fungi and microorganisms is essential for the characterization of the system and ascertainment of the efficiency of the fungi. – For identification of residual compounds, resulting from microbial degradation of free water in presence and absence of fungi, an analytical methodology based on Gas-Chromatography coupled to Mass Spectrometry that allows tentative identification of these compounds was developed. Tentative identification is applied when no standards are available for the interest compounds and consists in comparing the fragmentation profile of the generated mass spectrum with the NIST library. One of the most commonly used sample preparation techniques for this type of matrix is *SPME (Solid Phase Microextraction)*. From this problematic, the objective of this work was to develop *SPME* analytical methodology for analysis by Gas-Chromatography coupled to Mass Spectrometry (*GC-MS*) for compounds resulting from microbial decomposition of biodiesel free water. The best conditions for *SPME* were established allowing the comparison between the compound profile of the samples in the absence and presence of the fungus. Comparing the chromatographic profile of control samples, long chain esters are detected as early as the first week. In the presence of fungi, the occurrence of long chain esters can be detected only from the fourth week.

Keywords: biodiesel, degradation, fungi, *SPME*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da micro extração em fase sólida.	15
Figura 2. Estrutura do PDMS.	20
Figura 3. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, no início do ensaio (B100 P T0).	21
Figura 4. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, após sete dias do início do ensaio (B100 P T7).	22
Figura 5. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, após vinte e um dias do início do ensaio (B100 P T21).	23
Figura 6. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, após vinte e oito dias do início do ensaio (B100 P T28).	24
Figura 7. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, no início do ensaio (B100 CT T0).	25
Figura 8. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, sete dias após o início do ensaio (B100 CT T7).	26
Figura 9. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, vinte e um dias após o início do ensaio (B100 CT T21).	27
Figura 10. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, vinte e oito dias após o início do ensaio (B100 CT T28).	28
Figura 11. Ampliação dos cromatogramas referentes às demais amostras, conforme descrito.	29
Figura 12. Ampliação do cromatograma para melhor visualização do pico selecionado.	30
Figura 13. Espectro de massas médio para os tempos de retenção pertencentes ao pico do composto de interesse.	31
Figura 14. Comparação entre o espectro de massas (a) da amostra e o (b) da biblioteca NIST para o composto 1.	31
Figura 15. Ampliação de um dos cromatogramas para melhor visualização dos picos referentes ao Composto 1 no mesmo tempo de retenção. Cada cor representa uma das replicatas.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições instrumentais utilizadas para análise por Cromatografia a Gás acoplada a espectrometria de Massas (GC-MS).	19
Tabela 2. Condições de extração para as amostras de biodiesel.	20
Tabela 3. Nomenclatura dos compostos identificados nos cromatogramas.	30
Tabela 4. Compostos encontrados nas diferentes amostras de biodiesel com e sem inóculo em diferentes tempos de amostragem, apresentados por ordem de eluição.	33

ABREVIATURAS

GC-MS	Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas
HS	<i>Head Space</i>
m/z	Razão massa-carga
PDMS	Polidimetilsiloxano
SPME	Micro Extração em Fase Sólida

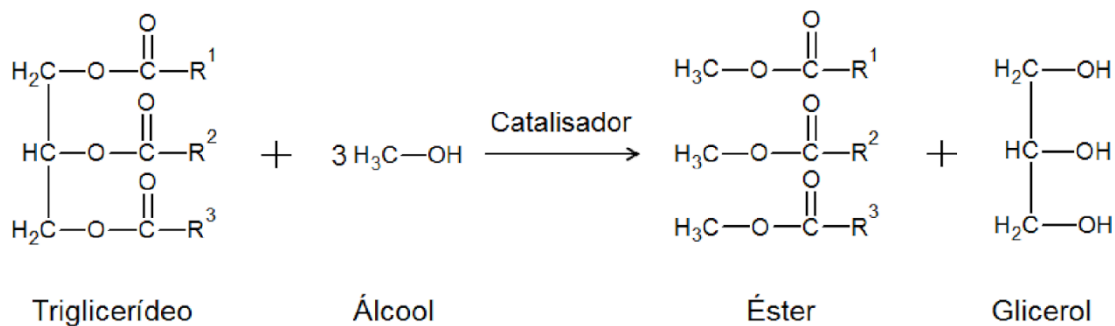
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.1.1. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	15
3.2. SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE UMA AMOSTRA COMPLEXA E IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	16
3.3. ÁGUA DE LASTRO	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. RECEBIMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	18
4.2. ANÁLISE POR SPME.....	18
4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	19
4.4. IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR SPME.....	20
5.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	20
5.3. IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA	30
6. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO I.....	36
ANEXO II	37
ANEXO III	49
ANEXO IV.....	50

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é um óleo renovável que surge como alternativa ao diesel, cuja matéria-prima é proveniente de origem fóssil. A vantagem de utilizar biodiesel está na sua versatilidade e suas características semelhantes ao diesel comum. Matérias primas para extração desse óleo renovável podem ser o amendoim, soja, oliva, gordura animal, dentre outros.

O processo de fabricação comumente utilizado para produção de biodiesel é a reação de transesterificação, onde um triglicerídeo reage com um álcool produzindo o biodiesel e um glicerol como subproduto, um exemplo de reação pode ser observado no Esquema 1.



Esquema 1. Reação genérica de transesterificação de um triglicerídeo.

Dentre as características do biodiesel, destacam-se a degradabilidade e a higroscopicidade, onde o caráter higroscópico faz com que parte da água residual da reação seja incorporada ao produto. Quando o biodiesel é armazenado em tanques para uso posterior, a água residual que não é eliminada pode favorecer a ação de micro-organismos que degradam o óleo ou ainda reduzem suas propriedades de queima, fazendo com que tenha menor desempenho como combustível.

O biodiesel atualmente possui ampla importância e utilização em uma série de países, devido a isso surge o diesel do tipo B, que visa diminuir os impactos causados pelo diesel de origem fóssil. Como exemplo de diesel do tipo B, cita-se o B5, que consiste em acrescentar 5% de biodiesel ao diesel.

A água residual produzida na reação de transesterificação, também chamada de água de lastro, possui em sua composição uma série de compostos derivados do óleo do qual foi originada. Assim, faz-se necessário um tratamento adequado dessa água, e análise de sua composição a fim de verificar se a reação de produção do biodiesel está ocorrendo de forma eficiente e sem perdas significativas.

Os fungos agem de maneira a diminuir ou até inibir a ação de micro-organismos presentes no biodiesel, sendo possível por vezes isolar os micro-organismos do diesel visando verificar como eles atuam durante o processo de biodegradação. Através de uma série de pesquisas, foi possível verificar características dos micro-organismos e entender melhor como eles agem nos tanques de armazenamento. Dentre os compostos testados para agir sobre o biodiesel, o fungo *Pseudallescheria boydii* apresentou resultados favoráveis quanto a degradação de micro-organismos nos tanques que armazenam diesel.

Para analisar os compostos formados nessa reação e os efeitos dos fungos, é necessário utilizar uma metodologia capaz de detectar que tipo de compostos são produzidos e misturados a água de lastro. Com esse objetivo, a técnica de micro extração em fase sólida (SPME) é uma alternativa, pois dependendo dos parâmetros utilizados, pode aumentar o fator de concentração dos compostos extraídos, possibilitando detectar concentrações mais baixas sem a utilização de grandes volumes de amostra ou solvente. Para análise dos compostos extraídos, a técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) pode ser empregada.

Tendo isso em vista, este trabalho visa avaliar, por meio da técnica de SPME-GC-MS, os produtos de resultantes da degradação da água de lastro do biodiesel, utilizando identificação tentativa pela comparação do perfil de fragmentação com a biblioteca NIST e dos tempos de retenção dos compostos extraídos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Desenvolver metodologia analítica por micro extração em fase sólida (SPME) e análise por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) para identificação tentativa de compostos resultantes da decomposição microbiana da água de lastro de biodiesel.

2.2. Objetivos específicos:

- a) Estabelecer as condições de análise por microextração em fase sólida (tempo de equilíbrio, tempo de exposição, temperatura, recobrimento da fibra);
- b) Estabelecer os critérios para a identificação tentativa (tempo de retenção, íon molecular e fragmentação compatíveis);
- c) Identificação tentativa dos compostos presentes nas diferentes amostras de acordo com os critérios estabelecidos;
- d) Comparação do perfil cromatográfico das amostras;
- e) Comparar os compostos presentes nas amostras analisadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextração em fase sólida apresenta-se como uma técnica miniaturizada de preparo de amostras que se baseia na sorção dos analitos em uma fase extratora, que consiste de um filme polimérico líquido, sólido ou misto, suportado sobre uma fibra de sílica fundida (similar à fibra ótica). (ZHANG; PAWLISZYN, 1993) Esta técnica é relativamente simples do ponto de vista instrumental, pois se ancora basicamente no princípio físico-químico de sorção/dessorção, e se baseia na cinética de transferência de massa e nos princípios termodinâmicos que descrevem o equilíbrio de partição do analito entre as fases.

Esse processo ocorre em duas etapas. Primeiramente, dá-se a partição dos analitos entre o recobrimento (do filme) e a amostra (matriz) por imersão ou exposição da fibra no *head space* (HS). Em seguida, tem-se a dessorção térmica do extrato concentrado no instrumento analítico (sistema cromatográfico a gás). (ZHANG; PAWLISZYN, 1993)

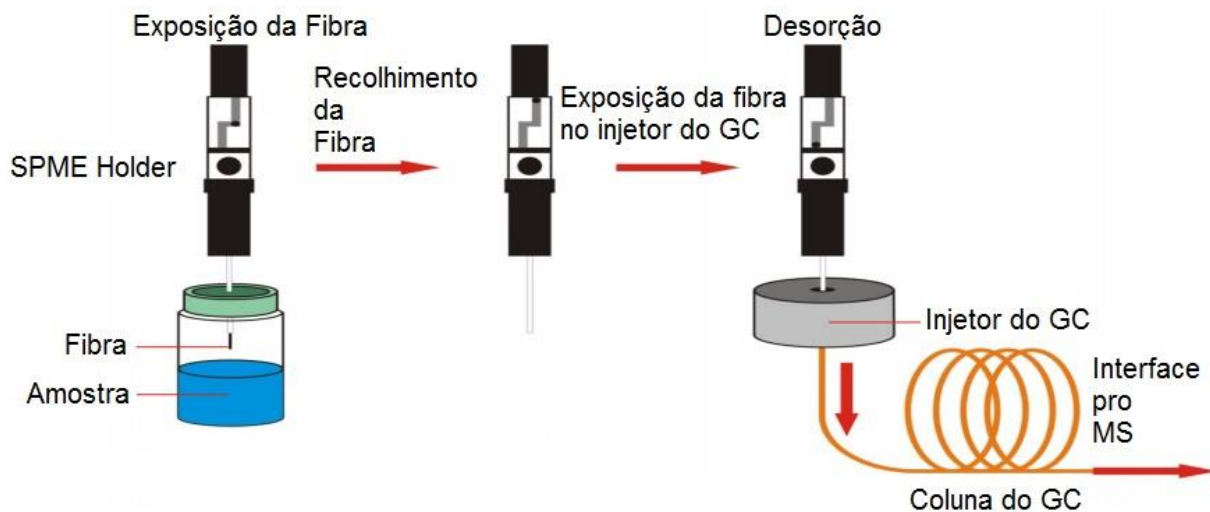


Figura 1. Etapas da micro extração em fase sólida. Adaptado de (SCHMIDT; PODMORE, 2015)

Uma das vantagens da SPME é apresentar um processo analítico mais rápido quando comparada a métodos de extração convencionais, tais como a extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Além disso, não utiliza solventes para eluição, tem baixos custos e é de fácil automatização, sendo muito empregada para a extração de compostos orgânicos a partir de distintas matrizes em diversos níveis de concentração. Da mesma forma, essa técnica permite a redução do número de etapas de análise, integrando os primeiros passos do processo analítico: amostragem,

extração e concentração, além de propiciar a introdução direta da amostra no instrumento analítico. Logo, torna-se especialmente adequada quando hifenada a métodos analíticos tais como a cromatografia gasosa, visto que permite a introdução dos analitos diretamente no injetor cromatográfico. (VAS; VÉKEY, 2004)

Para cada tipo de amostra, as condições de extração podem ser otimizadas de maneira a garantir melhores resultados. Vários parâmetros podem ser modificados para que haja a otimização do processo. O controle da temperatura da amostra, por exemplo, auxilia na passagem dos analitos da fase líquida para a fase gasosa (HS), aumentando a concentração de analitos no *head space*, de maneira que o equilíbrio seja deslocado para a fase sólida, a fibra de SPME. Outro parâmetro ajustável é o tempo de exposição da fibra no *head space*, de maneira que haja o tempo necessário para que o sistema entre em equilíbrio. Mais um parâmetro que pode ser otimizado é a utilização de sal – efeito *salting-out* – para que a água possa solvatar os íons dissociados do sal e os analitos volatilizem com maior facilidade.

3.2. SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE UMA AMOSTRA COMPLEXA E IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSA

Quando se trata da análise (separação e identificação) de compostos orgânicos, termicamente estáveis, presentes em uma amostra complexa, a melhor técnica analítica é a Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS). A cromatografia separa os componentes da amostra, enquanto que o Espectrômetro de Massa gera espectros de massa de cada composto registrado. A partir de espectro de massa obtido, a identificação dos compostos pode ser realizada mesmo sem os respectivos padrões. Para isso, os equipamentos de GC-MS, vêm com uma biblioteca (uma das mais utilizadas é a biblioteca NIST) de Espectros de Massa (MS), que possui mais de 15 mil MS. A identificação de compostos, comparando o espectro de massa (MS) gerado com o da biblioteca NIST, é denominada de **identificação tentativa**. (CHEN et al., 2019)

Desta forma, a identificação tentativa pode ser utilizada quando se trata compostos onde não há possibilidade de uso de padrões. A identificação é qualitativa a partir dos íons presentes nos respectivos espectros de massa.

Para a identificação tentativa, realiza-se inicialmente, levantamento dos principais fragmentos do MS e sua intensidade (conforme a razão m/z).

Para identificação de compostos por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas existem diversas abordagens. Neste trabalho foram utilizados alguns dos critérios da guia SANTE/11813/2017. (EUROPEAN COMMISSION, 2017)

3.3. ÁGUA DE LASTRO

O biodiesel é um combustível renovável que surge como alternativa para o petróleo e outros combustíveis fósseis. Esse combustível pode ser feito a partir de reação de transesterificação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol. Dentre os subprodutos dessa reação estão a água livre (também chamada de água de lastro) e a glicerina, os quais podem estar em maior ou menor quantidade de acordo com a metodologia adotada para realizar a reação.

Devido ao caráter higroscópico do biodiesel e a maneira como é produzido e armazenado, parte da água e da glicerina formadas ao longo do processo podem se misturar a ele e interferir em suas propriedades intrínsecas. O maior problema do acúmulo de água em indústrias de refinamento de petróleo é a contaminação dos tanques por micro-organismos, que pode levar à perda de qualidade do produto, assim como à formação de lodo e deterioração de encanamentos e tanques. (BENTO, F. M.; GAYLARDE, 1996)

Diversos trabalhos visam entender como agem os micro-organismos no biodiesel, (BENTO; GAYLARDE, 2001; PRINCE et al., 2008) enquanto outros buscam estudar como tratar as águas residuais e eventualmente remover ou inibir os micro-organismos. (BENTO, F. M.; GAYLARDE, 1996; BENTO et al., 2004, 2005) Uma das formas mais eficientes para remoção de micro-organismos se dá por meio da ação de fungos, onde pesquisas nessa área se mostraram promissoras para lidar com o problema. (BENTO et al., 2005; BÜCKER et al., 2011) Dentre os fungos capazes de agir sobre a água de lastro do biodiesel, o *Pseudallescheria boydii* se mostrou eficiente na degradação e no controle do crescimento de micro-organismos em tanques de biodiesel. (CAZAROLLI et al., 2014)

4. METODOLOGIA

4.1. RECEBIMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram recebidas e identificadas de acordo com o percentual de biodiesel presente, tempo de amostragem e presença ou ausência de micro-organismo responsável pela degradação dos componentes da água de lastro. As amostras foram mantidas sob refrigeração a -18 °C até o momento da análise. No Anexo I estão descritos os experimentos realizados em um dos laboratórios do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, coordenado pela Profa. Dra. Fátima Menezes Bento, que forneceu as amostras para o desenvolvimento deste trabalho.

4.2. ANÁLISE POR SPME

Avaliação dos parâmetros tempo de exposição da fibra e temperatura da amostra foram otimizadas. As condições definidas como ótimas são descritas a seguir: Cerca de 2 mL de amostra foi transferida para o vial de SPME e, após 15 minutos de termostatização a 60° C, a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) foi exposta no *head space* do vial por 15 minutos para sorção dos analitos e, então, posterior dessorção diretamente no equipamento de análise (GC-MS). O parâmetro utilizado para avaliar as melhores condições foi a área do pico cromatográfico de cada composto.

4.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As condições de análise por GC-MS foram estabelecidas em trabalho anterior e estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições instrumentais utilizadas para análise por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS).

Condições da análise cromatográfica	
Coluna	RTX-5MS (30 m x 0,25 µm x 0,25 mm)
Volume de injeção	1 µL
Modo de injeção	Splitless
Temperatura do injetor	250 °C
Gás de arraste	He 5.0
Fluxo do gás de arraste	1 ml min ⁻¹
Condições do espectrômetro de massas	
Programa de Temperatura	70 °C (2 min), aquecimento de 10 °C min ⁻¹ até 200 °C (5 min), aquecimento de 10 °C min ⁻¹ até 270 °C (8 min)
Temperatura da interface	280 °C
Temperatura da fonte de íons	230 °C
IE	30 eV
Modo de detecção	Scan
Faixa de m/z	De 45 a 500 Da

4.4. IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA

A identificação tentativa consiste em adotar uma série de critérios para a identificar os compostos quando não há possibilidade de uso de padrões

Para considerar os compostos tentativamente identificados, foram utilizados os seguintes critérios:

- Definição do íon molecular de cada analito;
- Definição e presença dos principais íons, de acordo com o perfil de fragmentação da molécula para ionização por impacto de elétrons;
- Para comparação entre as amostras, avaliou-se também o tempo de retenção (em minutos) para compostos iguais.

Neste trabalho, estes critérios foram utilizados para a identificação tentativa dos compostos presentes nas amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CONDIÇÕES DE ANÁLISES POR SPME

Os parâmetros da análise por SPME que apresentaram os melhores resultados para a área dos picos, foram determinados em trabalho prévio e são os descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de extração para as amostras de biodiesel.

Fibra SPME	Polidimetilsiloxano (PDMS)
Espessura do recobrimento	100 μm
Temperatura da extração	60 $^{\circ}\text{C}$
Tempo de equilíbrio	15 min
Tempo de exposição da fibra	15 min

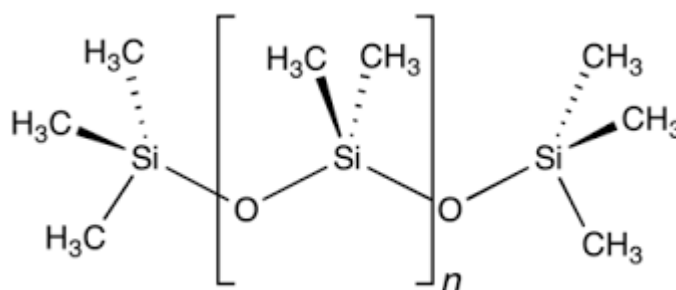


Figura 2. Estrutura do PDMS.

5.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Siloxanos são compostos recorrentes quando se utilizam fibras de SPME com recobrimento de PDMS ou colunas com essa fase estacionária, como é o caso do presente trabalho que utilizou uma coluna RTX-5MS, composta por 95% grupos metila e 5% de grupos fenila. De maneira que os picos de siloxano, apesar de presentes nos cromatogramas, não fazem parte, mas são intrínsecos a análise instrumental que foi utilizada. As figuras a seguir apresentam as ampliações dos cromatogramas das análises realizadas por HS-SPME-GC-MS das amostras e têm seus picos identificados com o número correspondente ao composto ao qual pertence. Para melhor visualização dos picos, os cromatogramas foram divididos em três regiões por barras vermelhas que compreendem (a) de 12,00 a 14,00 minutos, (b) de 14,00 a 18,00 minutos e (c) de 18,00 a 22,00 minutos.

Os cromatogramas sem ampliação podem ser vistos no Anexo II.

Cada figura é formada pela sobreposição dos cromatogramas das triplicatas de cada ensaio, indicados pelas diferentes cores das linhas (rosa, azul e preto).

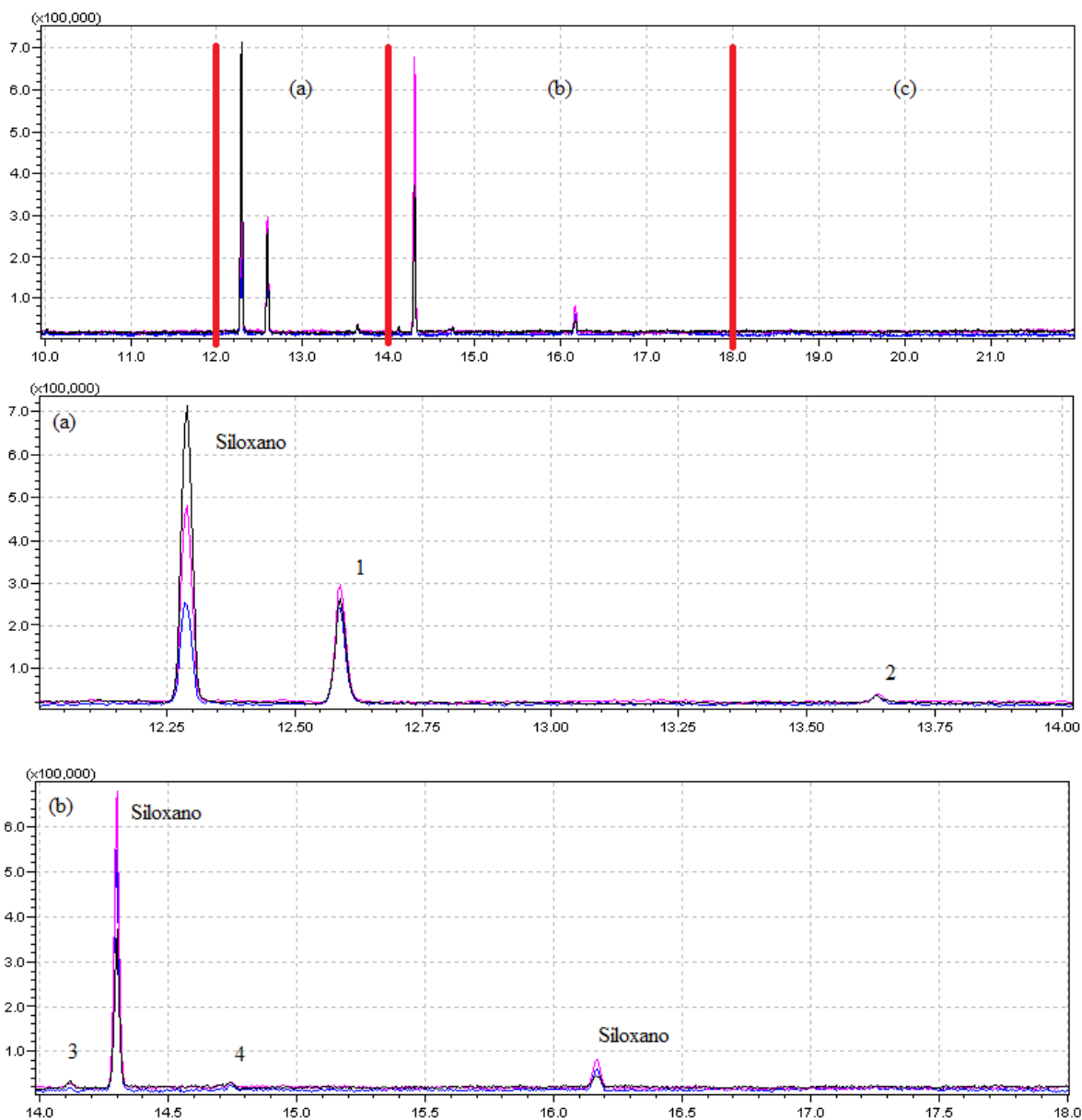


Figura 3. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, no início do ensaio (B100 P T0).

Para esta amostra, os picos de 1 a 4 foram relacionados com possíveis metabólitos do processo a que a amostra foi submetida.

Para todos os demais cromatogramas, o mesmo critério foi utilizado.

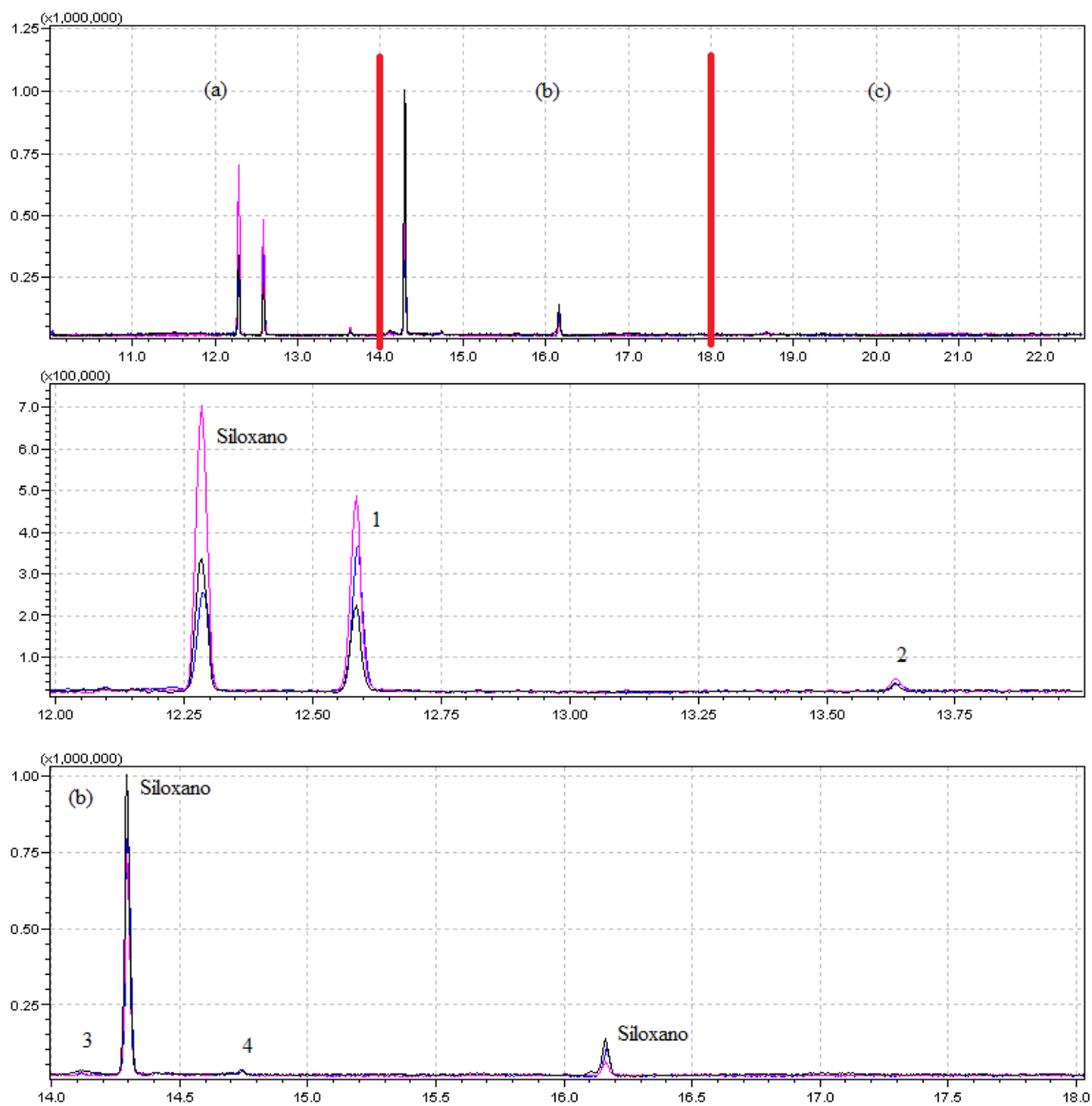


Figura 4. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, após sete dias do início do ensaio (B100 P T7).

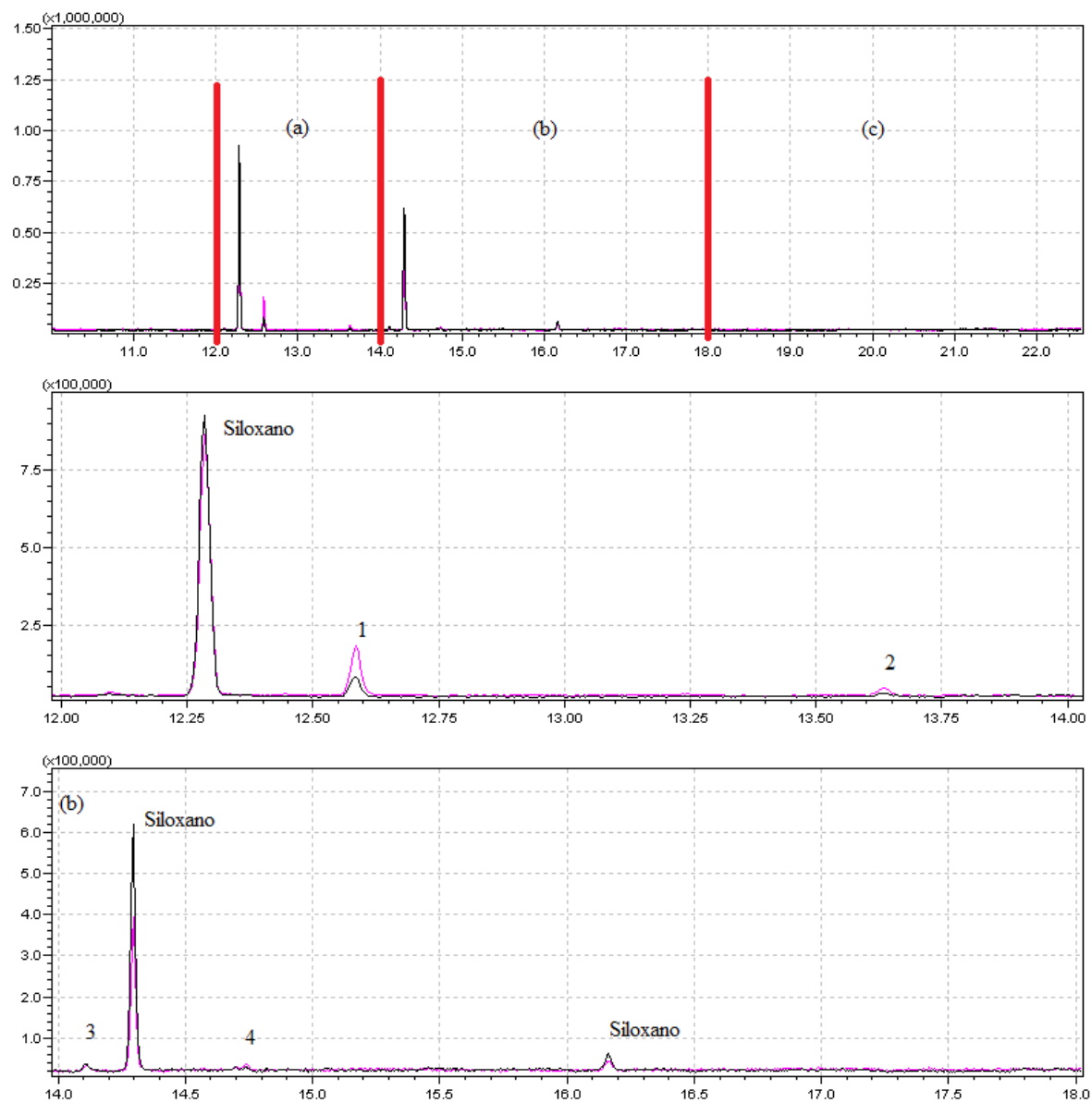


Figura 5. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, após vinte e um dias do início do ensaio (B100 P T21).

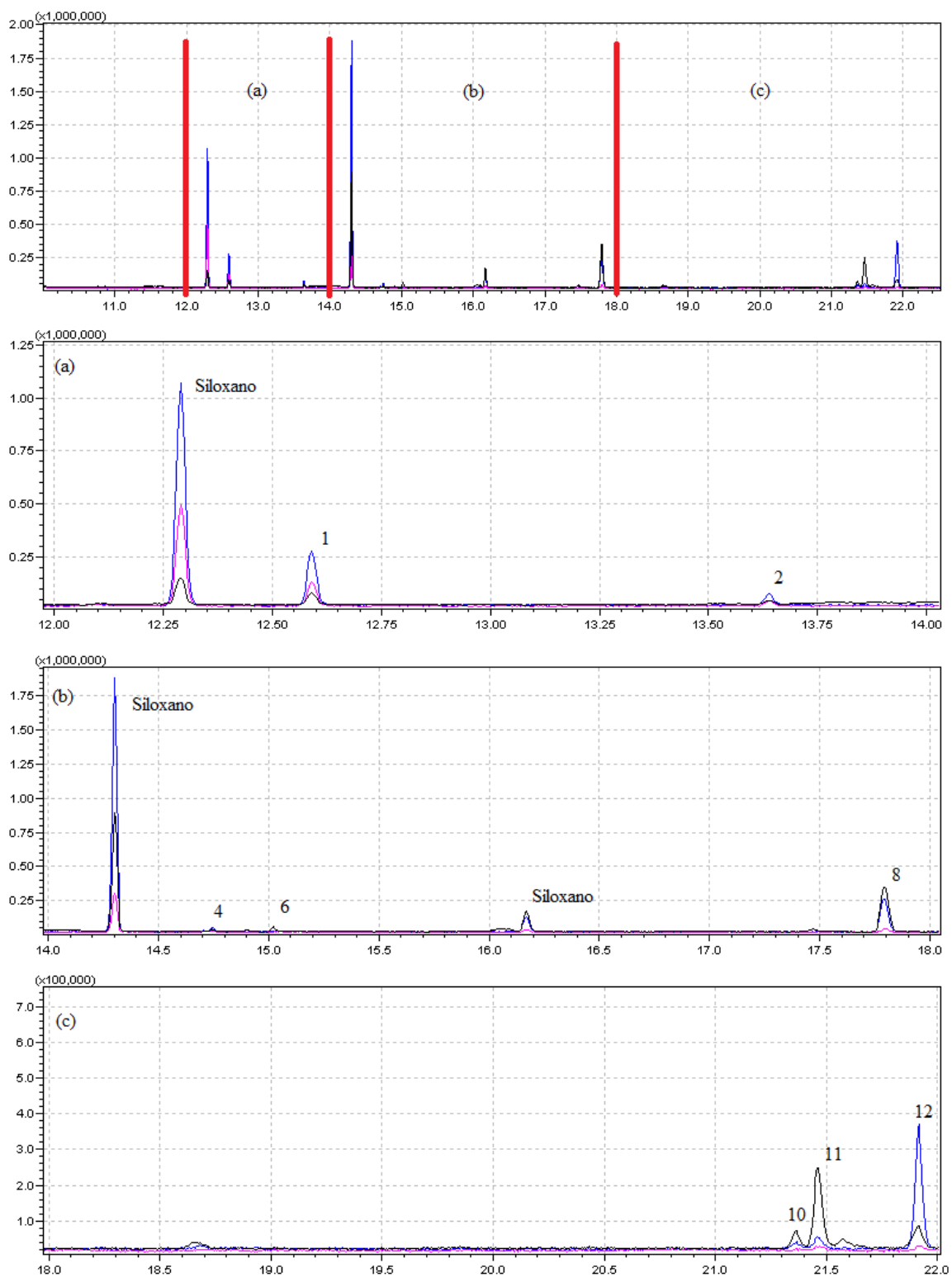


Figura 6. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, com fungo, após vinte e oito dias do início do ensaio (B100 P T28).

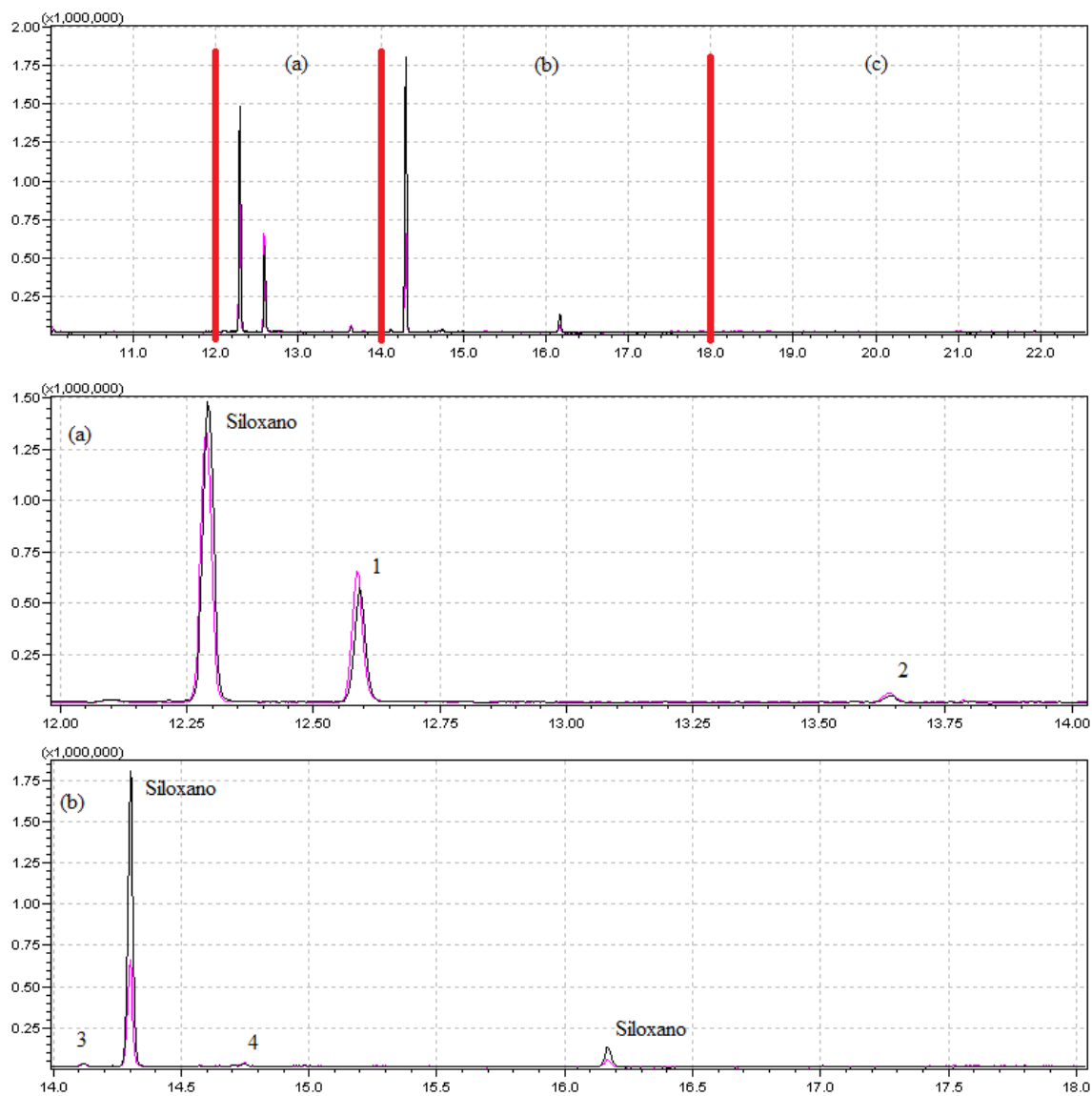


Figura 7. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, no início do ensaio (B100 CT T0).

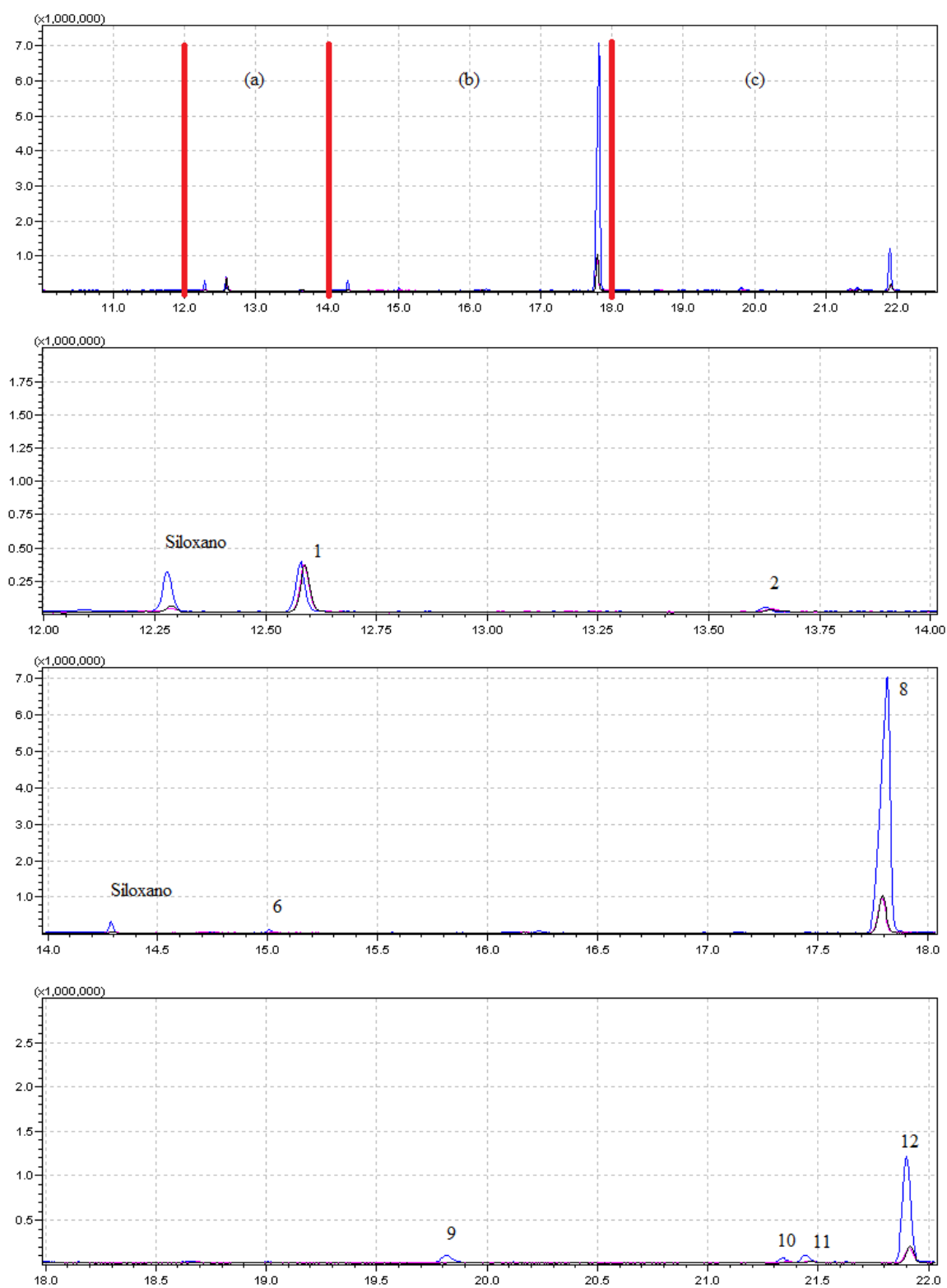


Figura 8. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, sete dias após o início do ensaio (B100 CT T7).

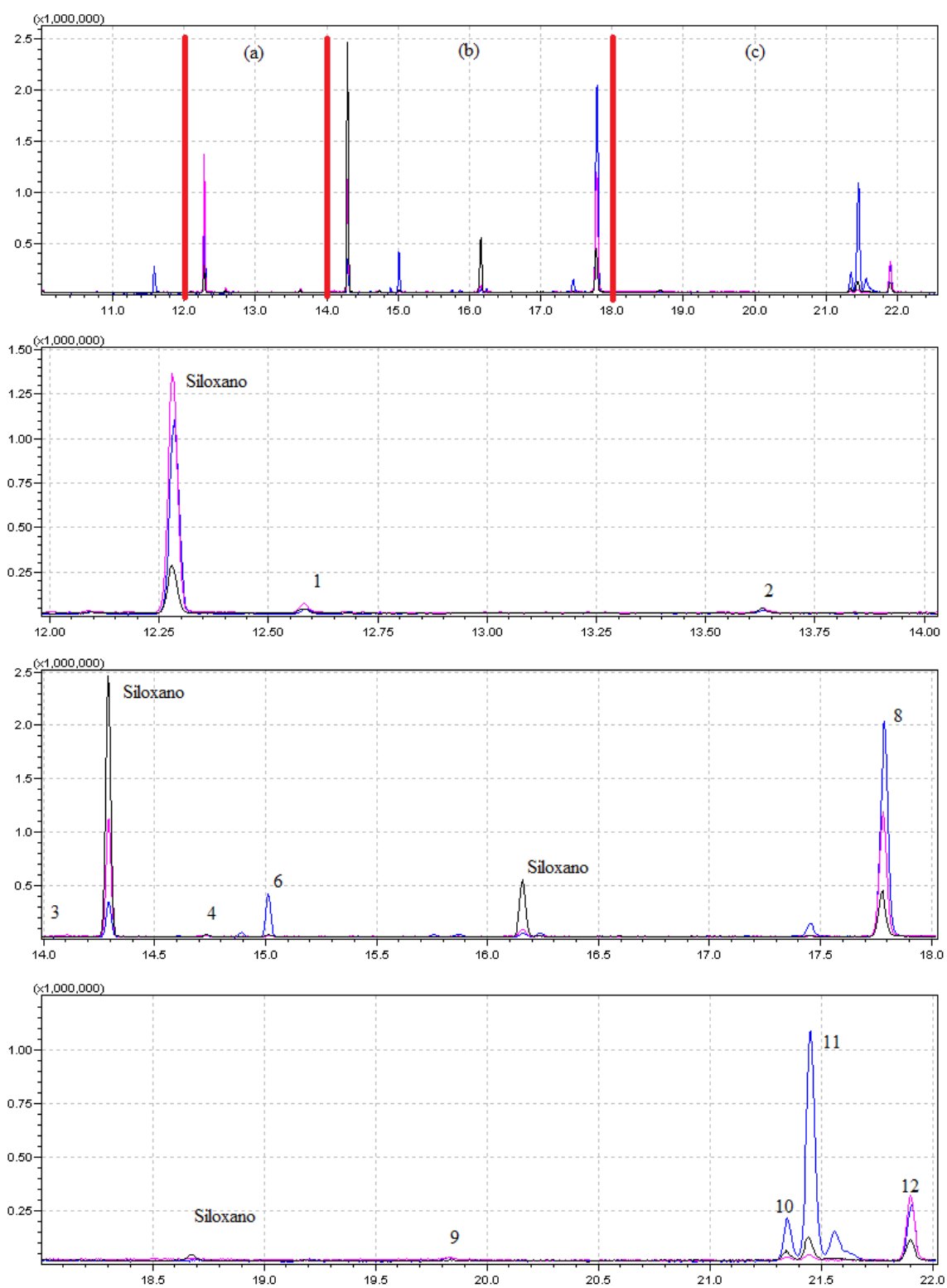


Figura 9. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, vinte e um dias após o início do ensaio (B100 CT T21).

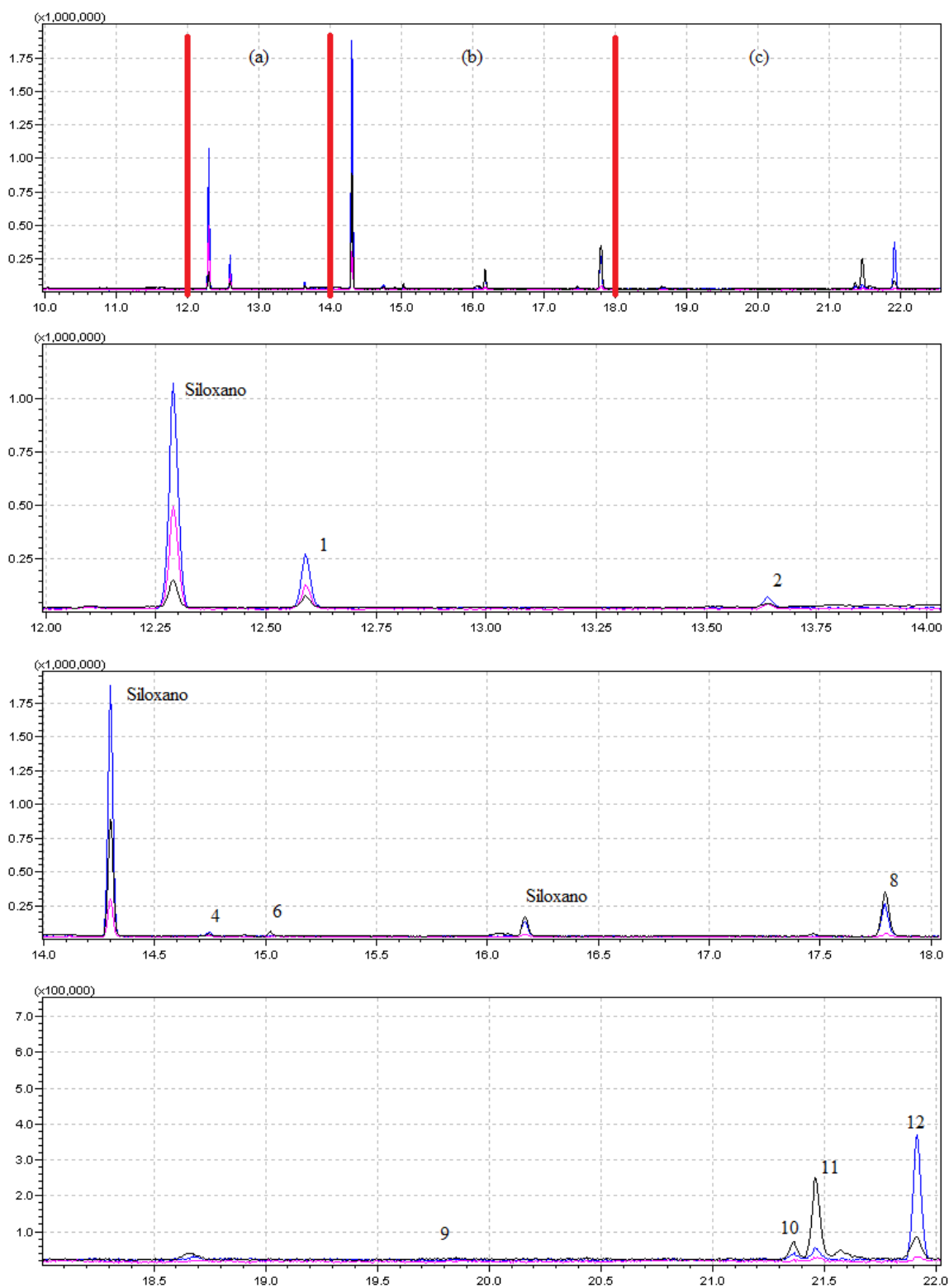


Figura 10. Ampliação dos cromatogramas referentes às amostras com 100% biodiesel, sem fungo, vinte e oito dias após o início do ensaio (B100 CT T28).

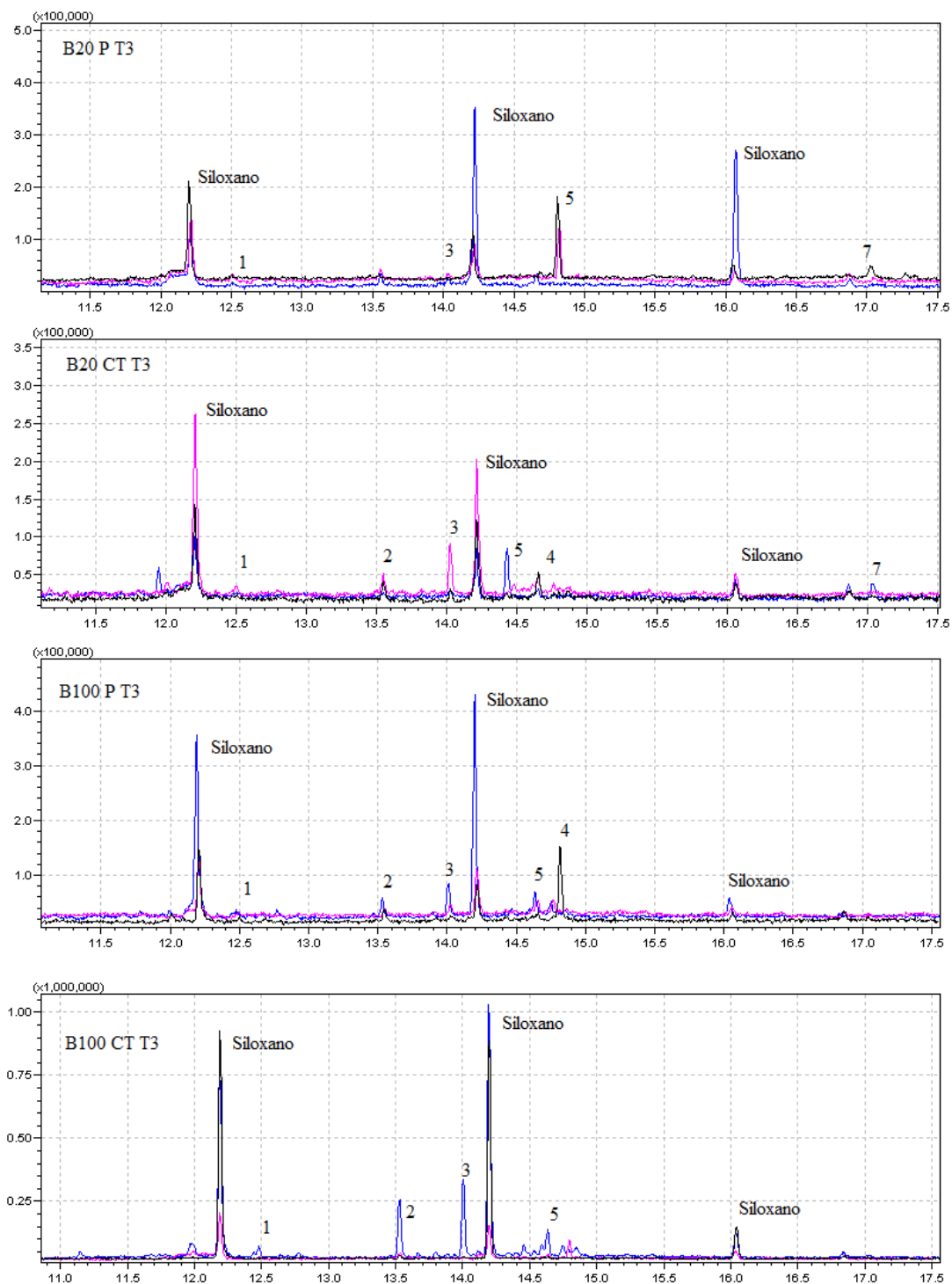


Figura 11. Ampliação dos cromatogramas referentes às demais amostras conforme descrito.

5.3. IDENTIFICAÇÃO TENTATIVA

A partir dos critérios descritos anteriormente, foi feita a identificação tentativa de cada um dos compostos apresentados na Tabela 3. As respectivas estruturas de cada um dos compostos podem ser vistas no Anexo III.

Tabela 3. Nomenclatura dos compostos identificados nos cromatogramas.

COMPOSTO	NOMENCLATURA
1	2,4-di-tert-butyl-phenol
2	2 methyl, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester propanoic acid
3	2,6-di-tert-butyl-4-sec-butylphenol
4	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)phenol
5	1-ethyl-4-methyl-cyclohexane
6	Methyl tetradecanoate
7	Dipentylamine
8	Methyl hexadecanoate
9	Methyl heptadecanoate
10	Methyl octadeca-9,12-dienoate
11	Methyl 11-octadecenoate
12	Methyl octadecanoate

Foi isolado o pico correspondente a um composto de interesse, como mostrado na Figura 12.

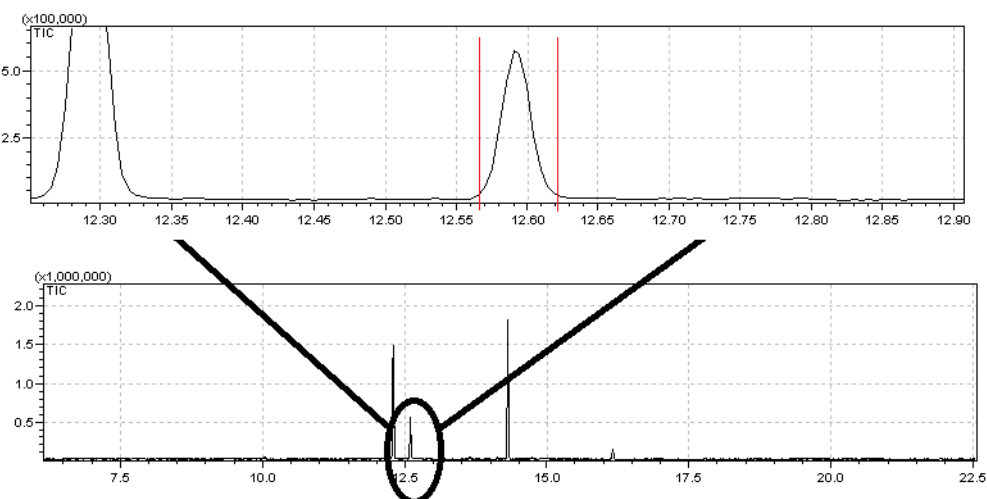


Figura 12. Ampliação do cromatograma para melhor visualização do pico selecionado.

Com o pico selecionado, é feito pelo software a média dos espectros de massa em cada um dos tempos de retenção pertencentes ao pico, resultando no espectro apresentado na Figura 13.

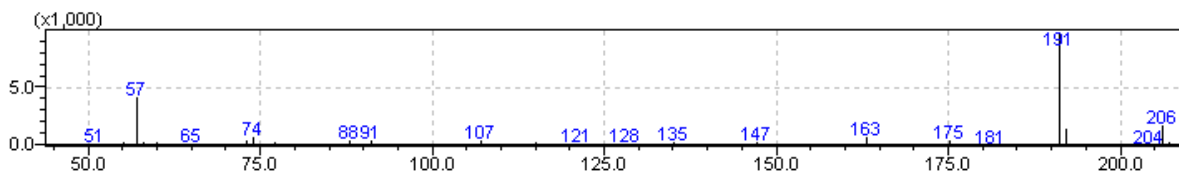


Figura 13. Espectro de massas médio para os tempos de retenção pertencentes ao pico do composto de interesse.

Com o espectro de massas médio, foi feita então a comparação com a biblioteca NIST, para avaliação do perfil de fragmentação do composto a ser tentativamente identificado. A biblioteca fornece os 25 compostos mais similares ao espectro de massas apresentado.

A comparação foi feita conforme mostra a Figura 14.

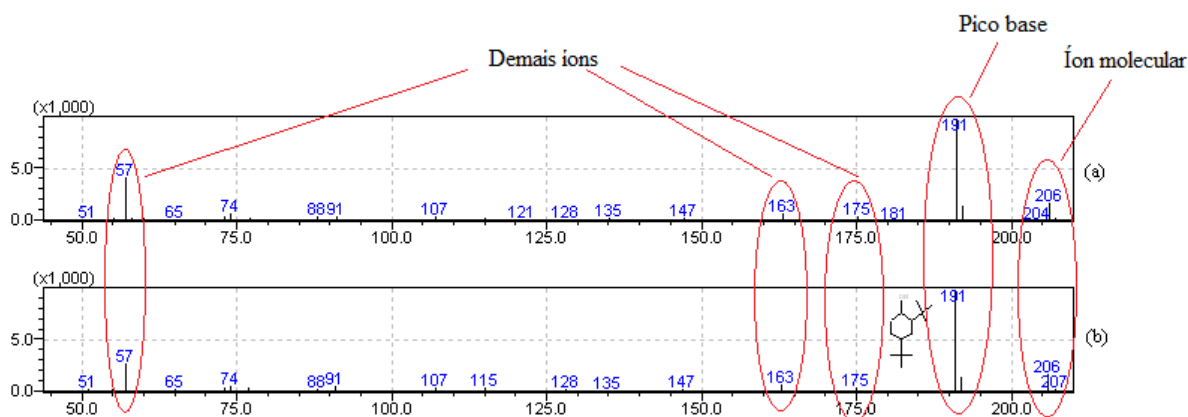


Figura 14. Comparação entre o espectro de massas (a) da amostra e o (b) da biblioteca NIST para o composto 1.

Com as intensidades e as fragmentações similares, considera-se o composto 1 tentativamente identificado. De maneira análoga, foram feitas as avaliações dos mesmos critérios para as demais amostras e compostos, que se encontram detalhadas nas Tabelas de 1 a 12 do Anexo IV.

Nas amostras analisadas, foram identificados 12 compostos, entre eles: fenóis, hidrocarbonetos e, principalmente, ésteres provenientes da fase oleosa.

Alguns destes compostos já foram citados na literatura como sendo produtos de degradação de amostras de biodiesel. (BENTO et al., 2005)

Após identificados, os compostos – por meio do seu tempo de retenção – foram comparados entre as diferentes amostras, a fim de verificar se esses seriam coerentes, representando o mesmo composto em todas amostras. Como mostrado na Figura 15 para uma triplicata de amostras.

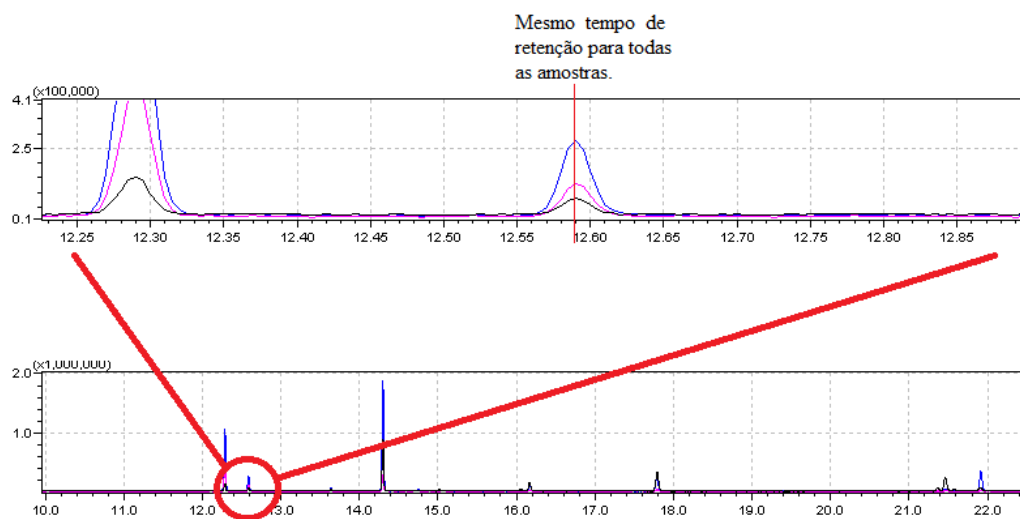


Figura 15. Ampliação de um dos cromatogramas para melhor visualização dos picos referentes ao Composto 1 no mesmo tempo de retenção. Cada cor representa uma das replicatas.

Os compostos tentativamente identificados nas amostras estão representados na Tabela 4, apresentados por ordem de eluição. As amostras estão identificadas de acordo com a porcentagem de biodiesel presente em cada uma delas, precedidas pela letra B – B100 significando 100% biodiesel, B20 20% biodiesel e 80% diesel. Em seguida, a presença ou não do inóculo, amostras P e CT, respectivamente. E o tempo de amostragem, em dias. Os compostos marcados com “X” são aqueles que foram encontrados na respectiva amostra.

Tabela 4. Compostos encontrados nas diferentes amostras de biodiesel com e sem inóculo em diferentes tempos de amostragem, apresentados por ordem de eluição.

<i>Amostra</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>
<i>B100 P T0</i>	X	X	X	X								
<i>B100 P T7</i>	X	X	X	X								
<i>B100 P T21</i>	X	X	X	X								
<i>B100 P T28</i>	X	X		X		X		X		X	X	X
<i>B100 CT T0</i>	X	X	X	X								
<i>B100 CT T7</i>	X	X				X		X	X	X	X	X
<i>B100 CT T21</i>	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
<i>B100 CT T28</i>	X	X		X		X		X	X	X	X	X
<i>B20 P T3</i>	X		X		X		X					
<i>B20 CT T3</i>	X	X	X	X	X		X					
<i>B100 P T3</i>	X	X	X	X	X							
<i>B100 CT T3</i>	X	X	X		X							

Comparando as diferentes amostras, os compostos que representam ésteres de cadeia longa são encontrados tanto nas amostras com o fungo quanto as amostras controle. Porém, nas amostras controle, esses compostos começam a ser detectados já ao final da primeira semana, enquanto nas amostras com o fungo, só são detectados ao final da quarta semana.

Todas as amostras apresentaram perfil semelhante quanto aos demais compostos.

6. CONCLUSÕES

A metodologia analítica utilizando a HS-SPME para extração dos compostos produzidos no sistema estudado foi considerada adequada, pois os compostos tentativamente identificados corroboram com outros estudos presentes na literatura.

A abordagem escolhida para identificação, mesmo sem a utilização de padrões, a partir da abordagem de identificação tentativa por espectrometria de massas se mostrou adequada para diferenciar os perfis dos produtos de degradação a partir dos compostos referenciados na literatura, podendo ser monitorados nesse tipo de estudo.

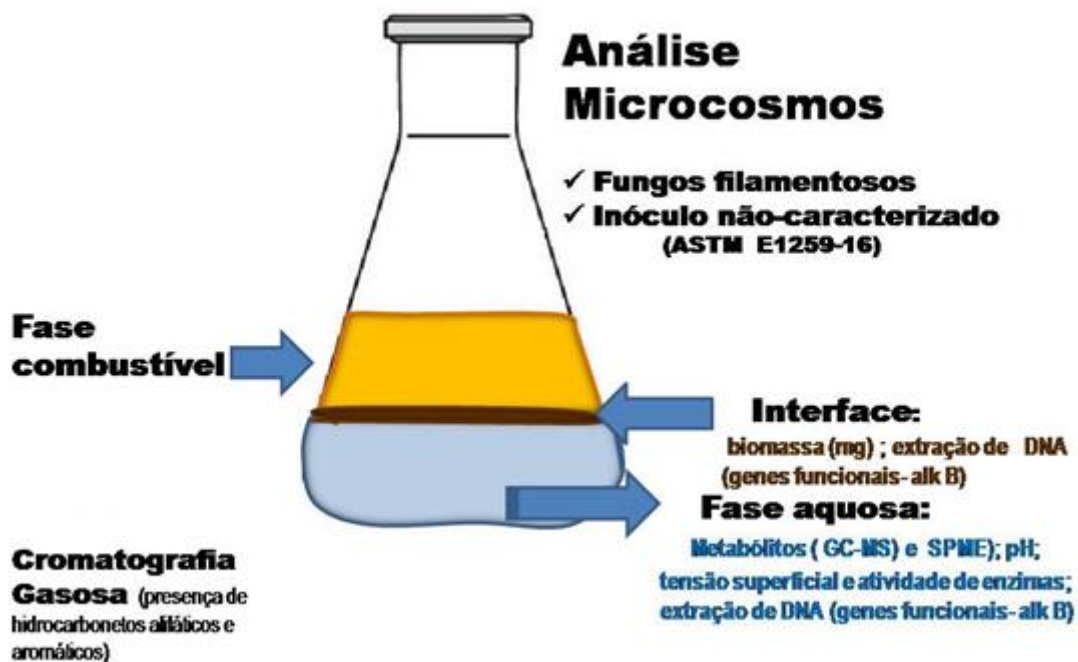
Dos compostos identificados, a maior parte pertence à classe dos ésteres, possivelmente provenientes da fase oleosa e que não sofreram degradação.

REFERÊNCIAS

- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Microbial contamination of stored diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 71–75, 1996.
- BENTO, F. M. et al. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. **Materials and Corrosion**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 577–585, 2004.
- BENTO, F. M. et al. Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 135–142, 2005.
- BENTO, F. M.; GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: Studies in Brazil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 107–112, 2001.
- BÜCKER, F. et al. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 172–178, 2011.
- CAZAROLLI, J. C. et al. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 95, n. PB, p. 364–372, 2014.
- CHEN, J. et al. Pyridine Alkaloids in the Venom of Imported Fire Ants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 41, p. 11388–11395, 2019.
- EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017**. 2017. Disponível em:
<https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf%0Ahttps://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere**, [s. l.], v. 71, n. 8, p. 1446–1451, 2008.
- SCHMIDT, K.; PODMORE, I. Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, [s. l.], v. 06, n. 06, 2015.
- VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 233–254, 2004.
- ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 14, p. 1843–1852, 1993.

ANEXO I

Condições experimentais utilizadas no prepare das amostras analisadas.



ANEXO II

Cromatogramas das triplicatas das amostras sem ampliação.

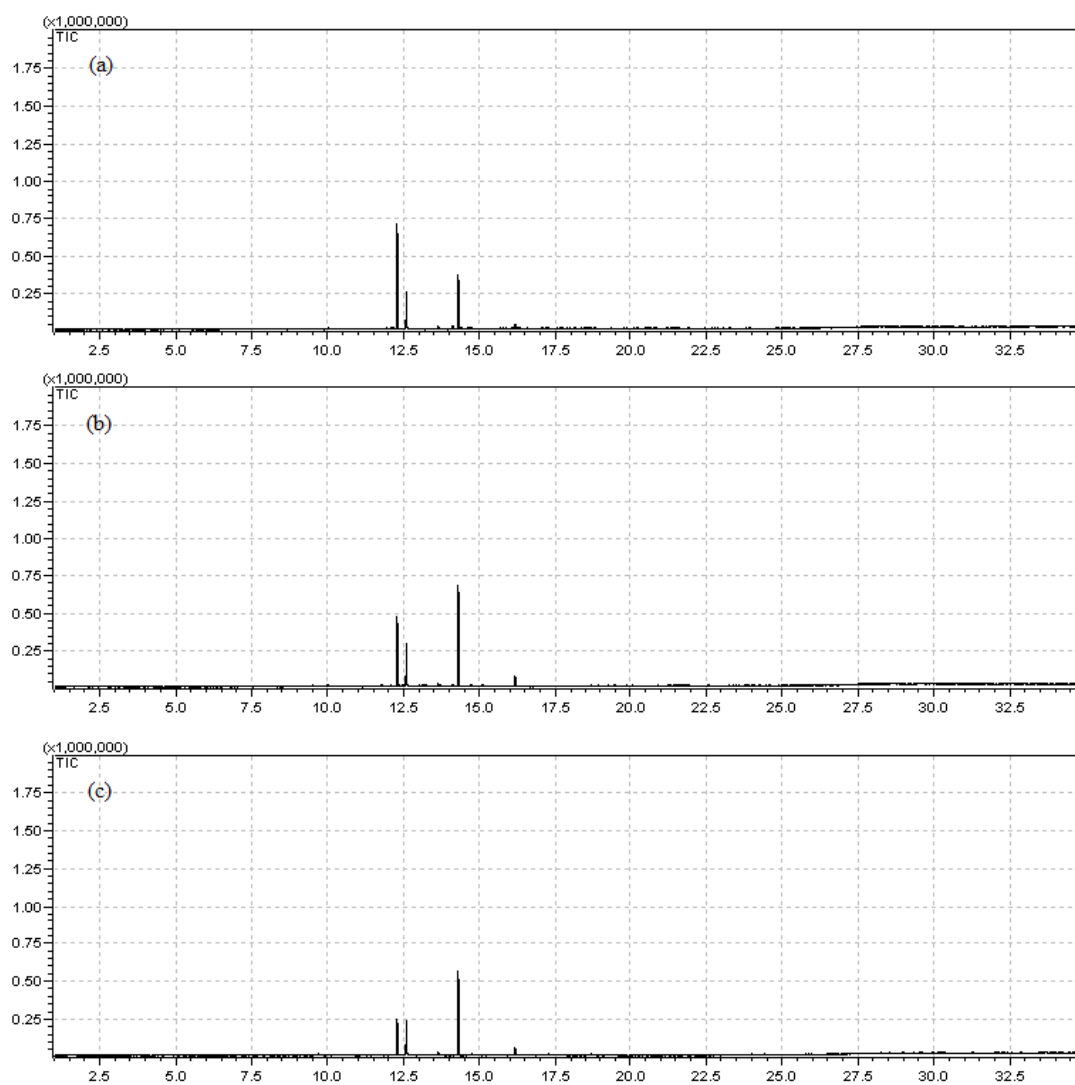


Figura 1. B100 P T0

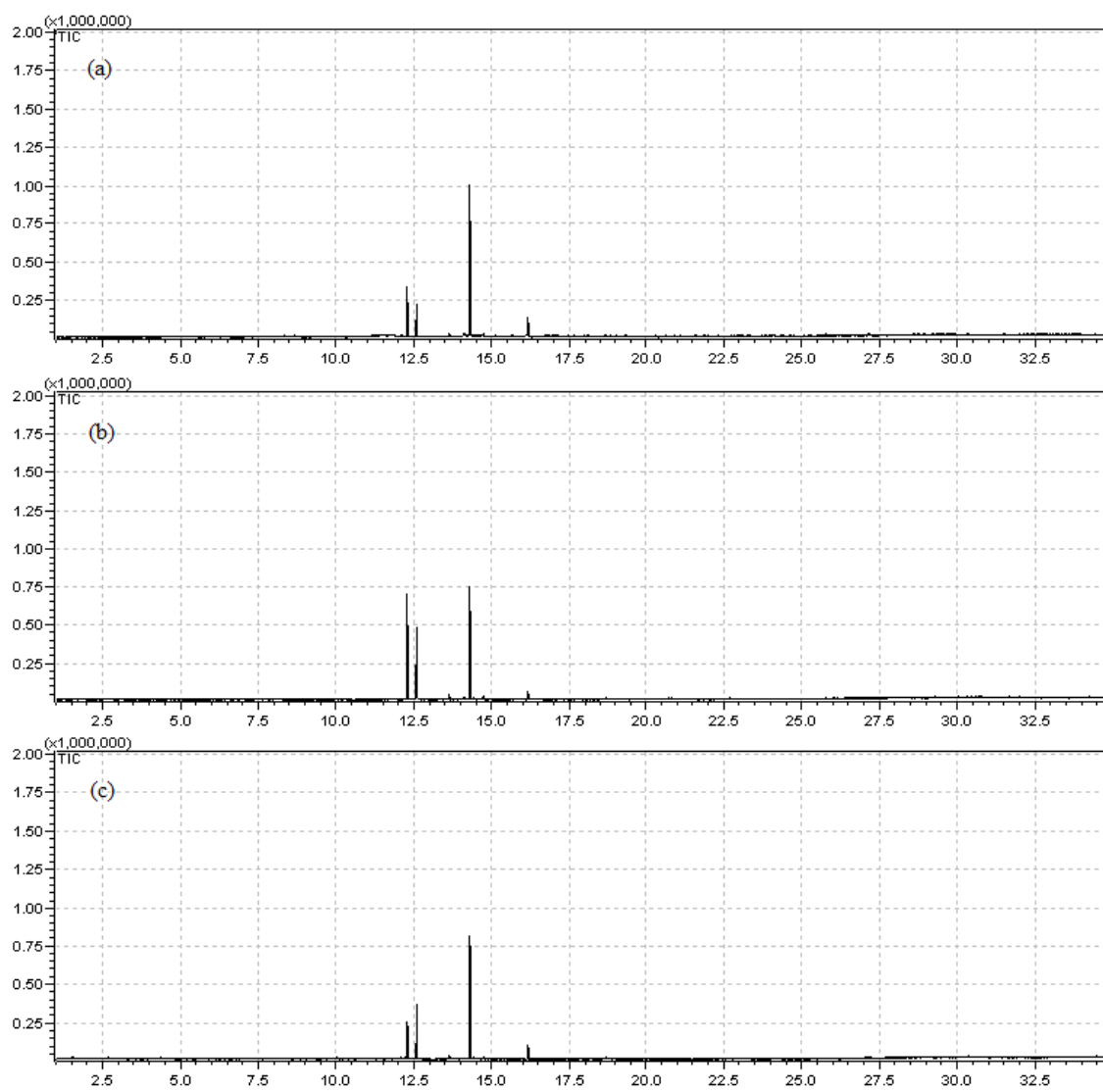


Figura 2. B100 P T7

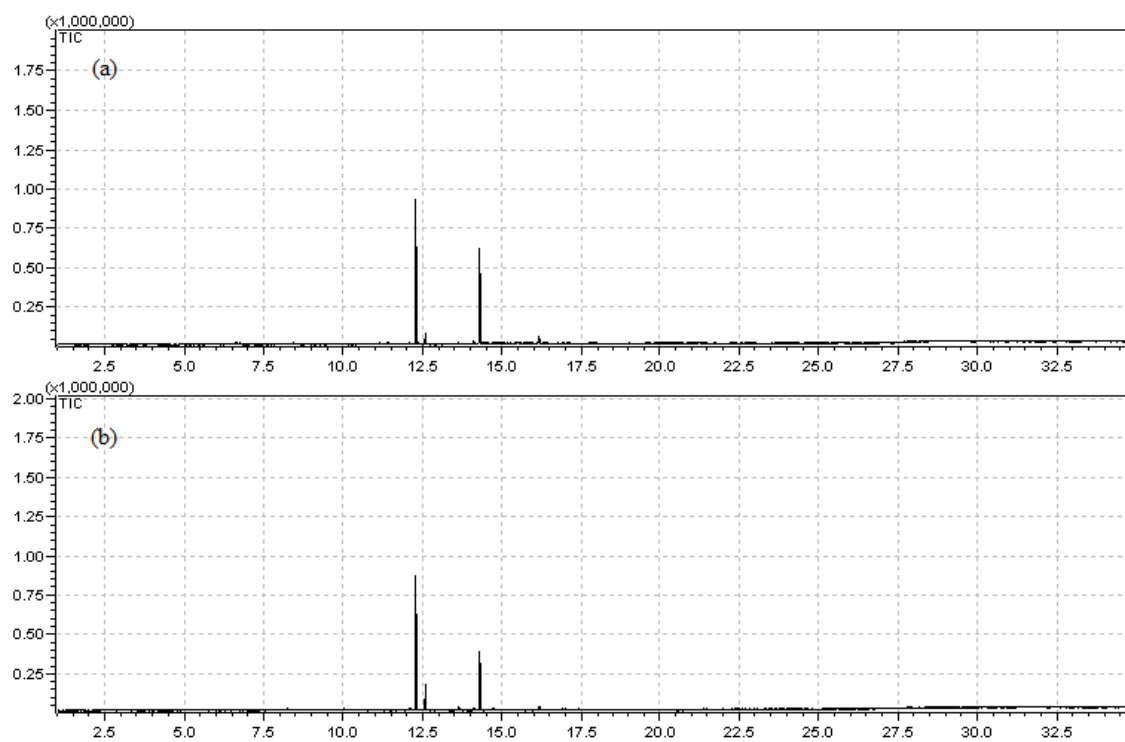


Figure 3. B100 P T21

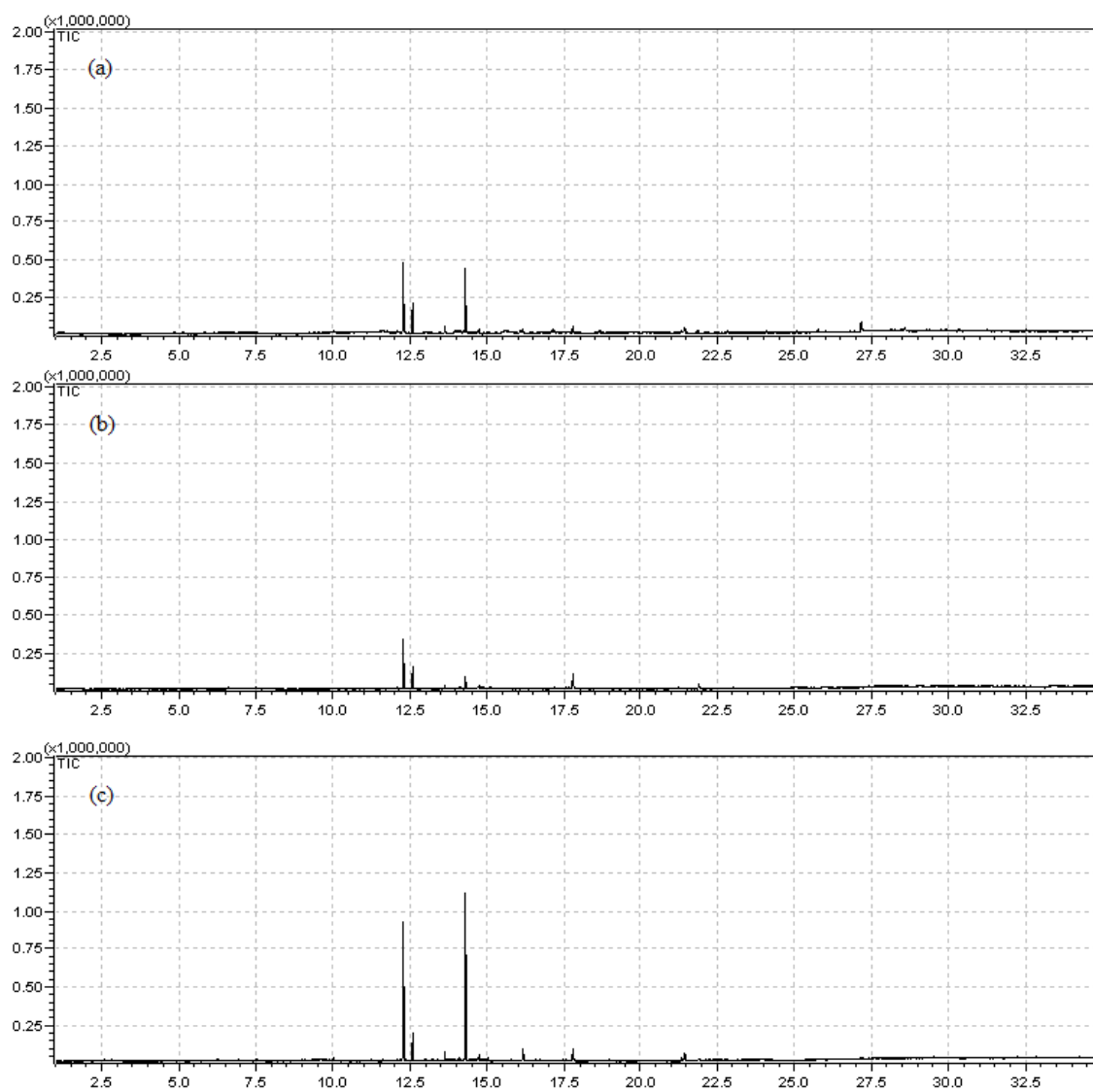


Figura 4. B100 P T28

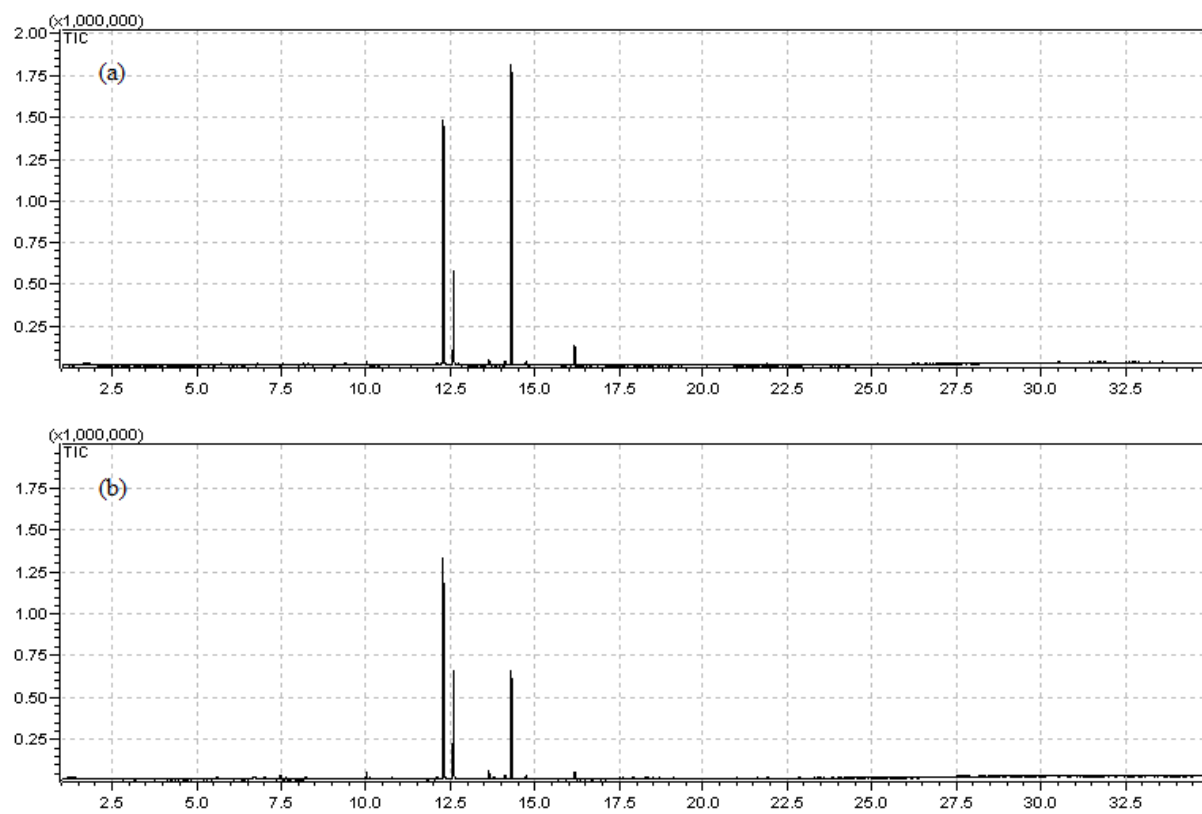


Figura 5. B100 CT T0

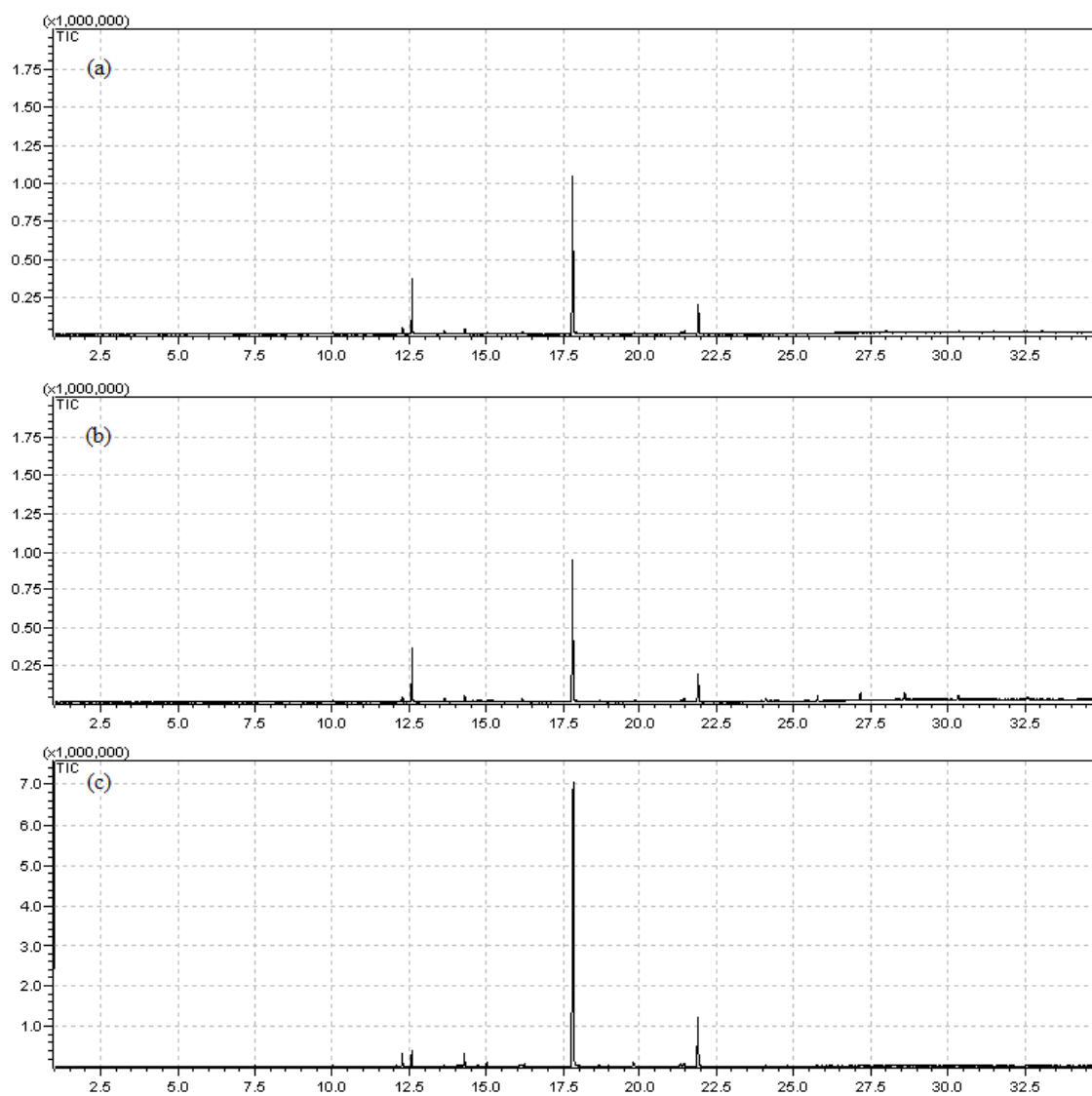


Figura 6. B100 CT T7

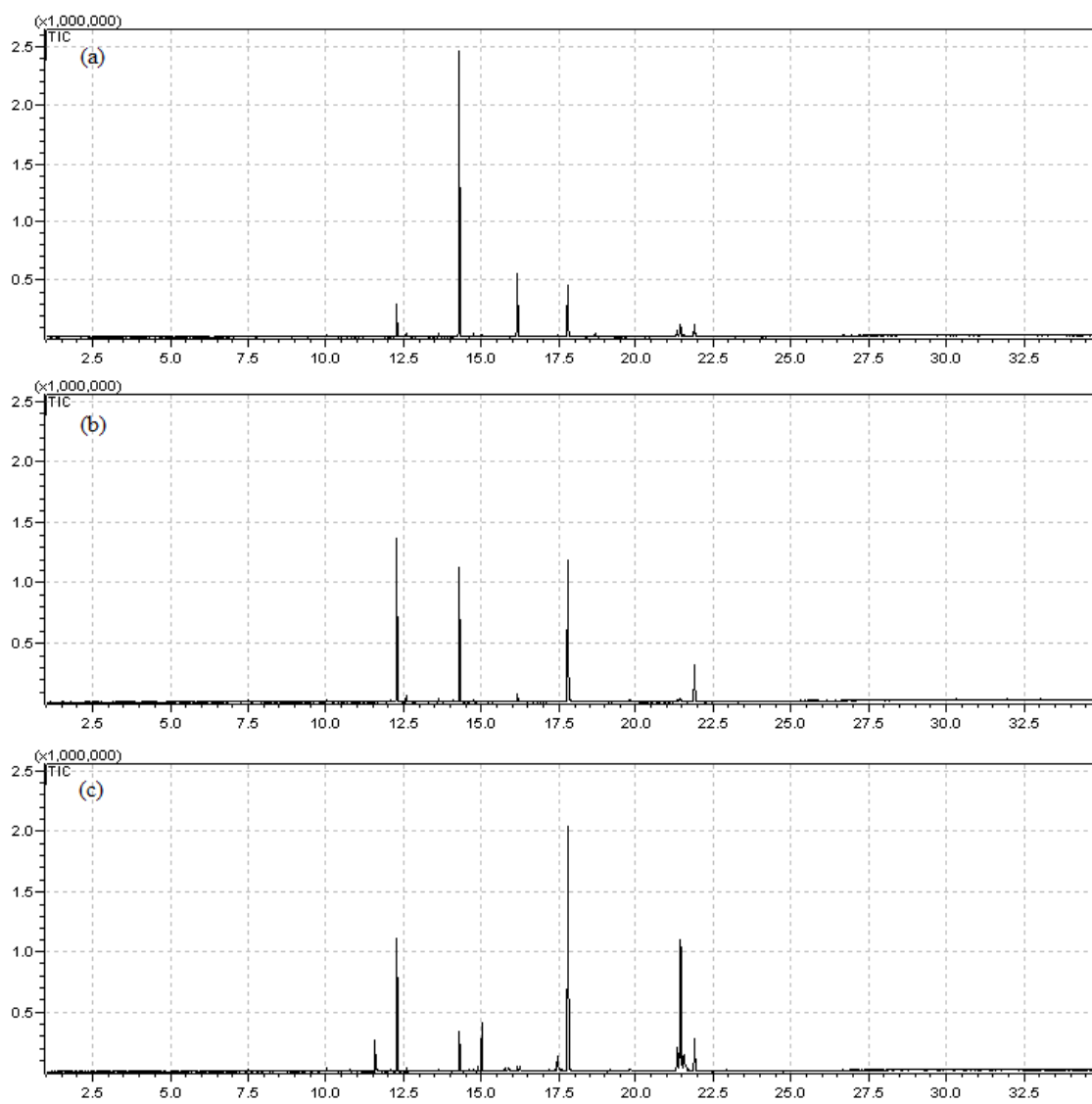


Figure 7. B100 CT T21

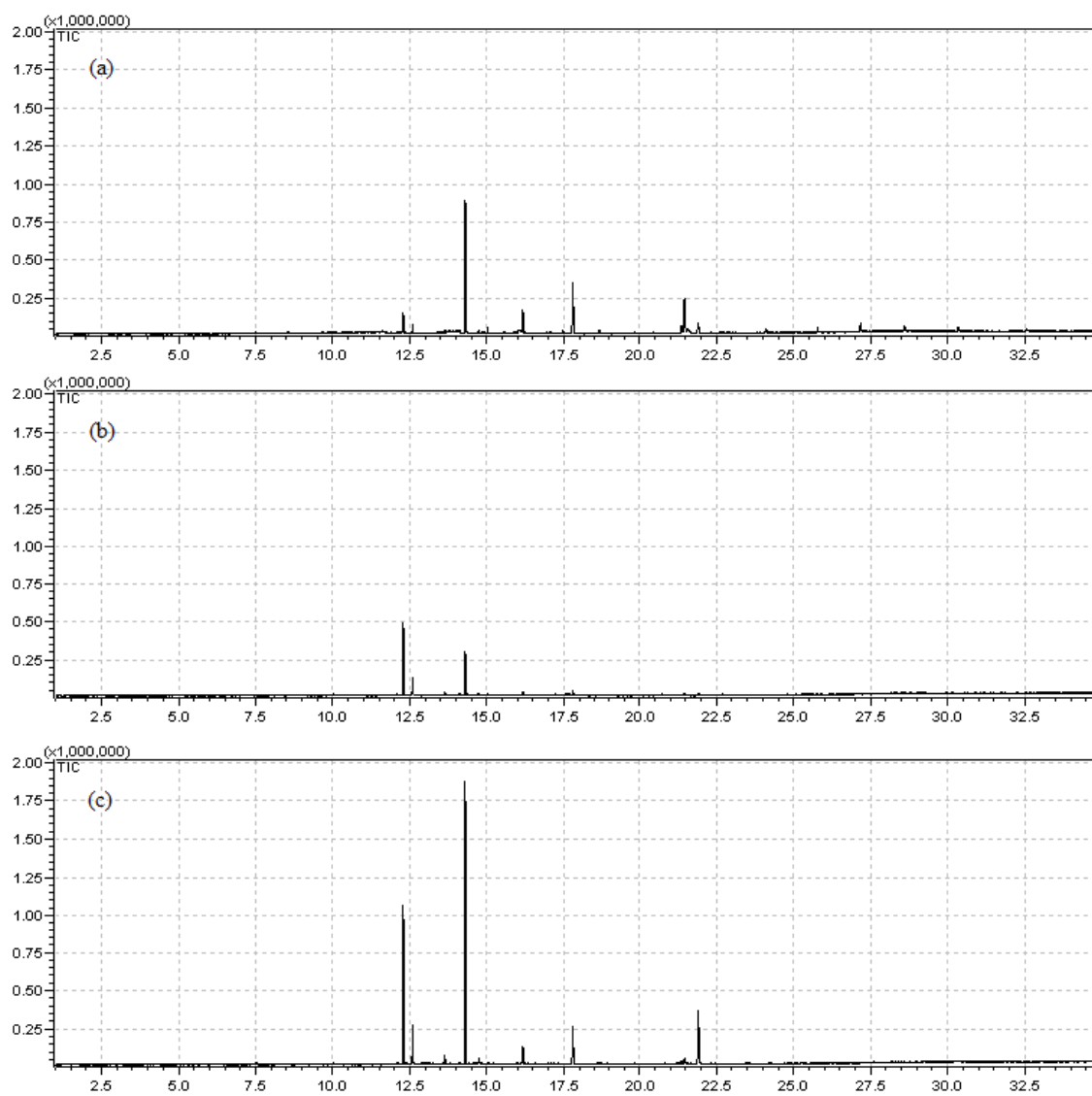


Figura 8. B100 CT T28

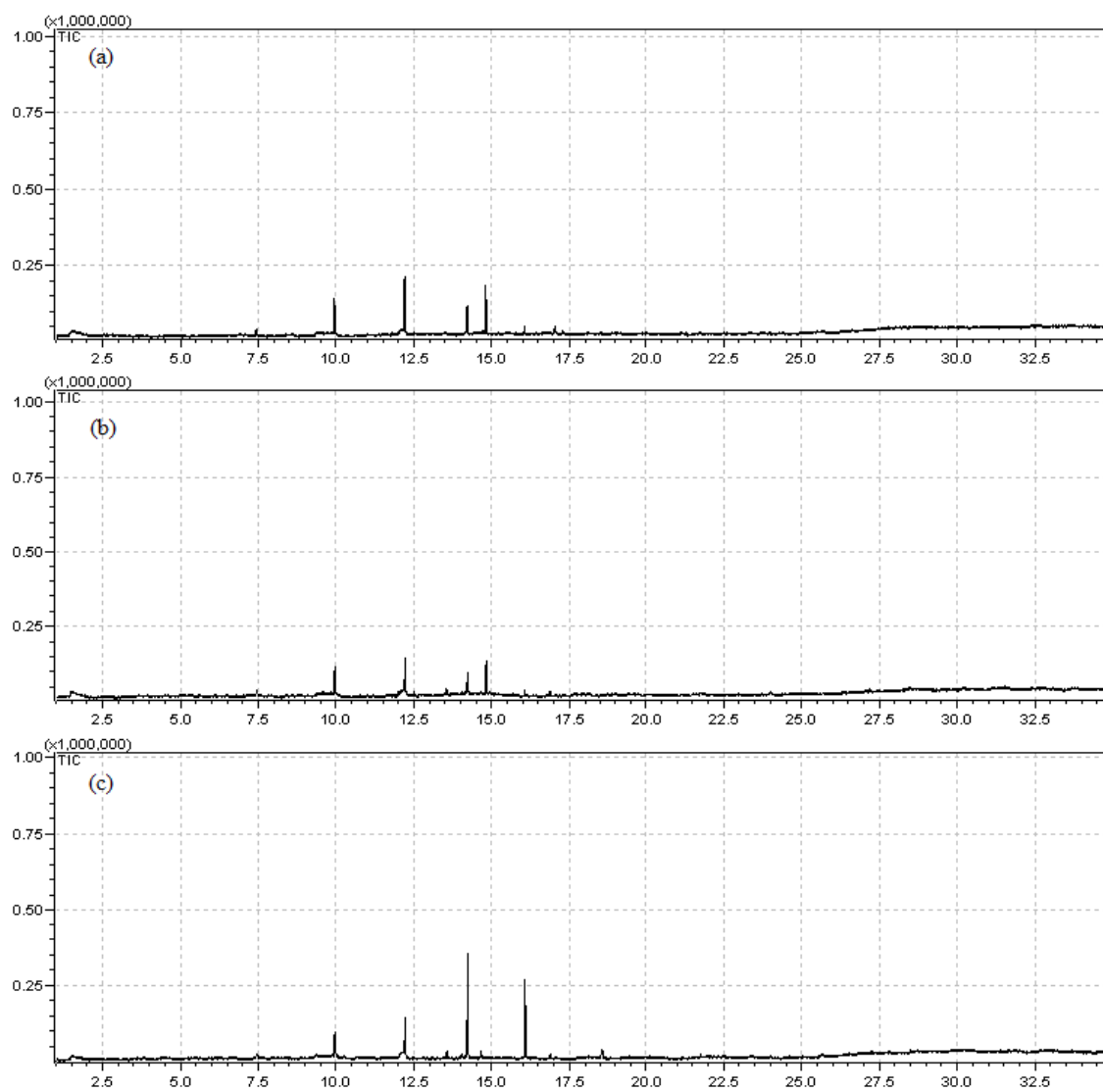


Figura 9. B20 P T3

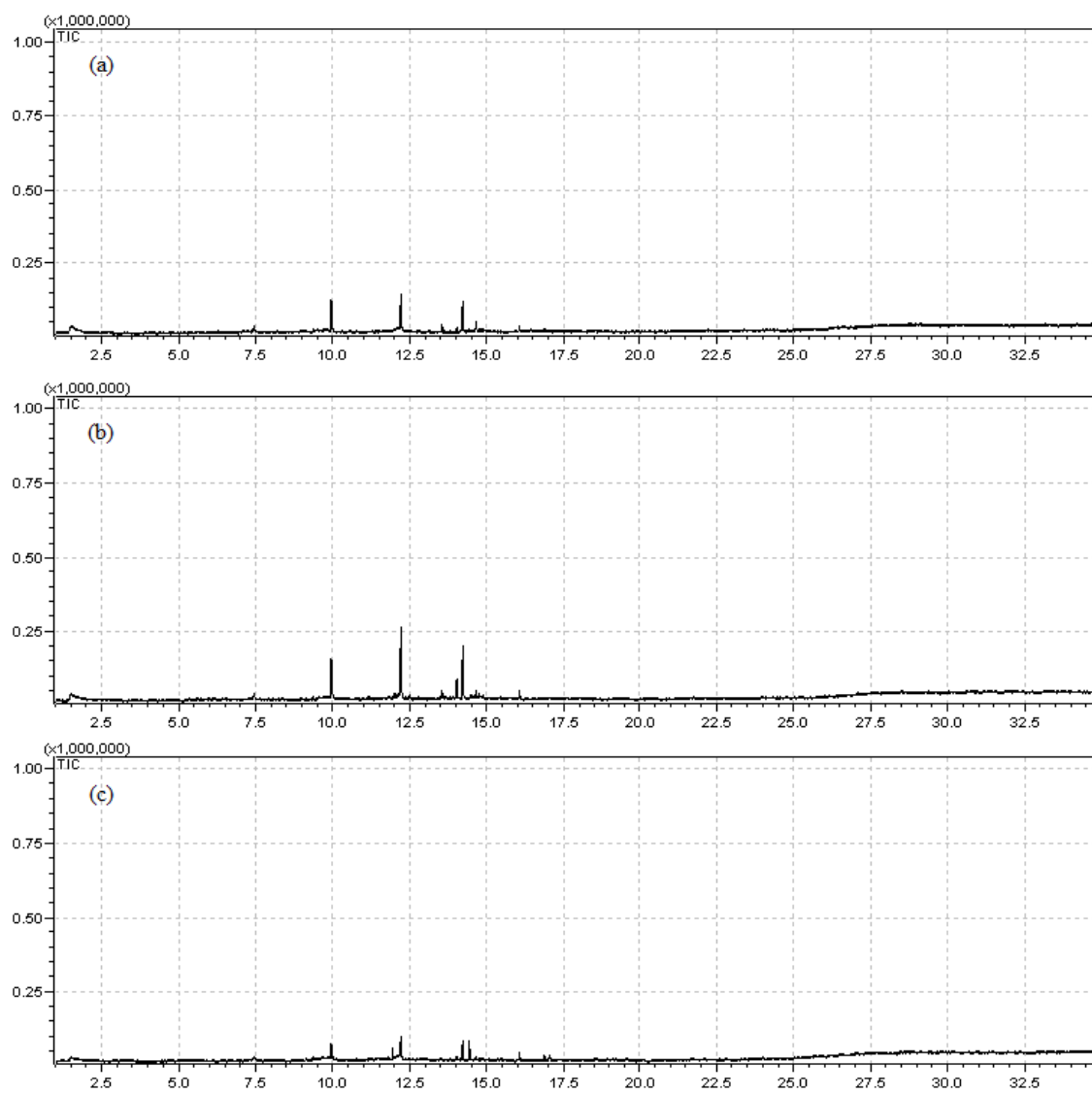


Figura 10. B20 CT T3

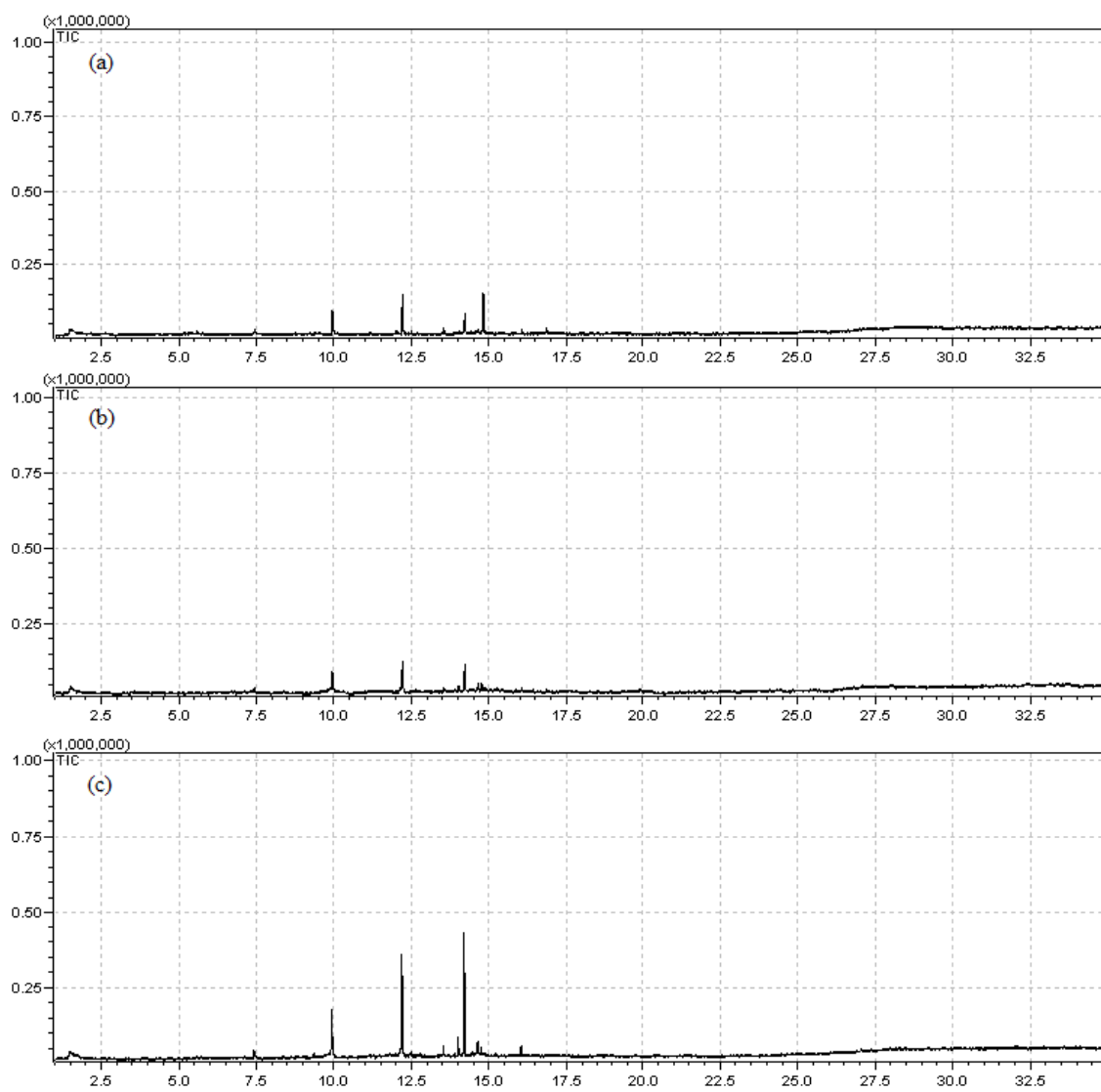


Figura 11. B100 P T3

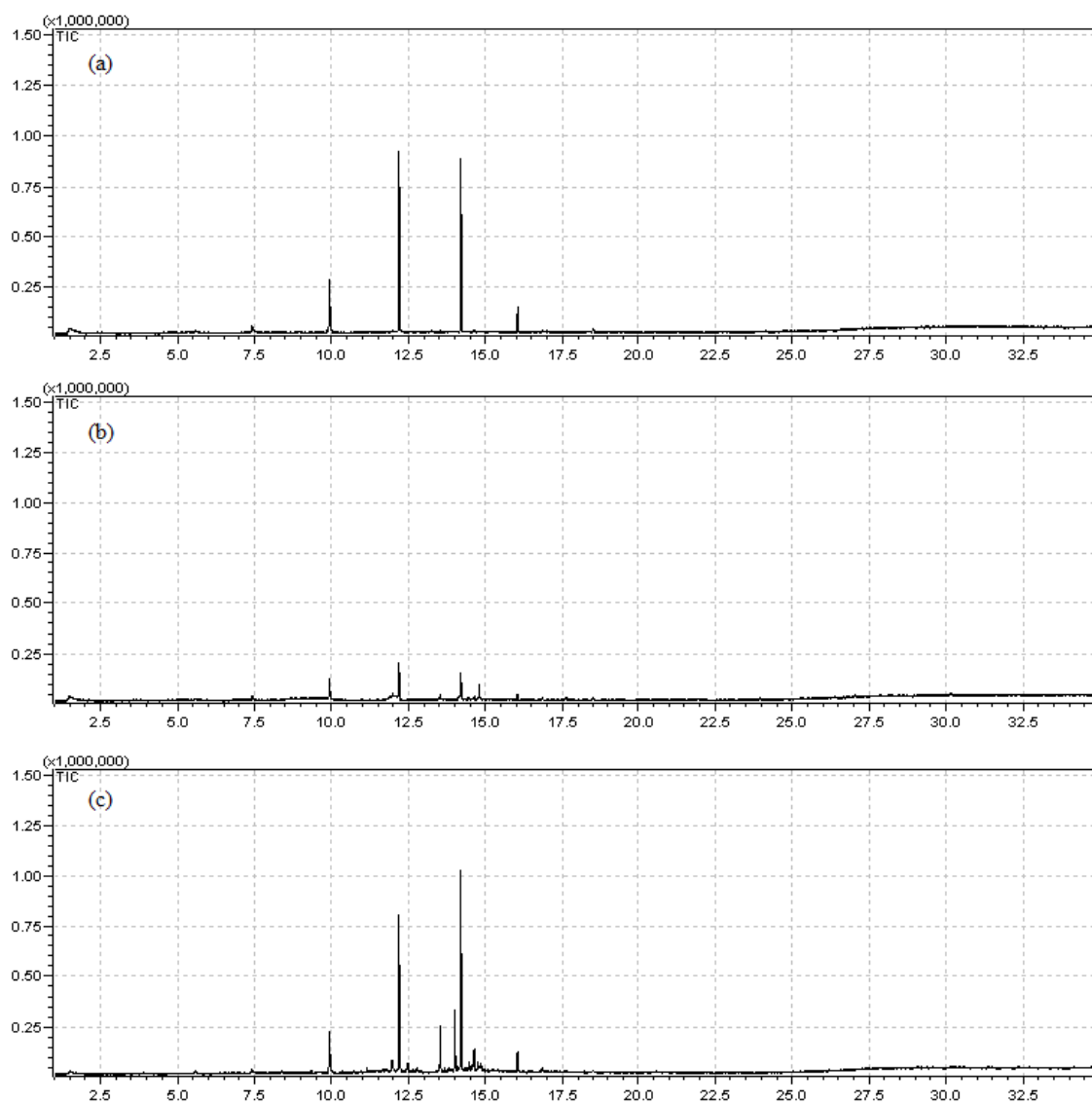
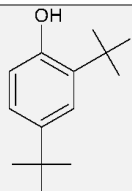
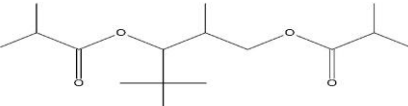
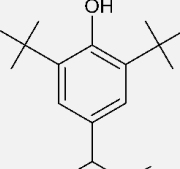
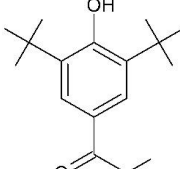
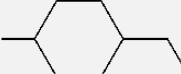
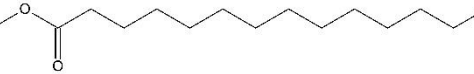
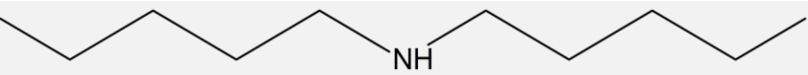
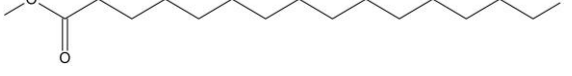
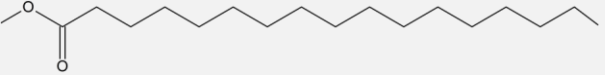
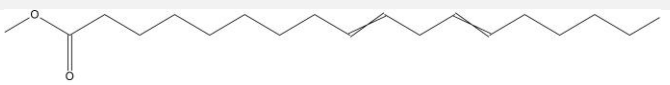
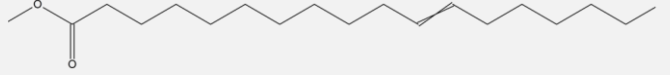
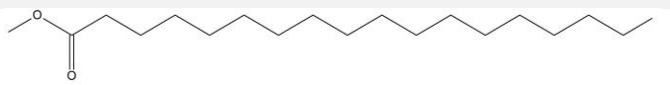


Figura 12. B100 CT T3

ANEXO III

Compostos tentativamente identificados por comparação com a Biblioteca de Espectros de Massa NIST.

	NOME	ESTRUTURA
1	2,4-di-tert-butyl-phenol	
2	2 methyl, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester propanoic acid	
3	2,6-di-tert-butyl-4-sec-butylphenol	
4	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)phenol	
5	1-ethyl-4-methyl-cyclohexane	
6	Methyl tetradecanoate	
7	Dipentylamine	
8	Methyl hexadecanoate	
9	Methyl heptadecanoate	
10	Methyl octadeca-9,12-dienoate	
11	Methyl 11-octadecenoate	
12	Methyl octadecanoate	

ANEXO IV

Avaliação da presença de compostos tentativamente identificados, nas diferentes amostras analisadas, utilizando os critérios estabelecidos no item 5.3.

Tabela 1. 2,4-di-tert-butyl-phenol (Composto 1)

Amostras	Critérios	t _R (min)	M ⁺ = 206 (16%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)				
				191 (100%)	57 (26%)	192 (15%)	163 (6%)	175 (4%)
B100 P T0 1		12,590	X	X	X	X	X	X
B100 P T0 2		12,590	X	X	X	X	X	X
B100 P T0 3		12,584	X	X	X	X	X	X
B100 P T7 1		12,585	X	X	X	X	X	X
B100 P T7 2		12,586	X	X	X	X	X	X
B100 P T7 3		12,589	X	X	X	X	X	X
B100 P T21 1		12,585	X	X	X	X	X	X
B100 P T21 2		12,585	X	X	X	X	X	X
B100 P T28 1		12,579	X	X	X	X	X	X
B100 P T28 2		12,580	X	X	X	X	X	X
B100 P T28 3		12,580	X	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1		12,591	X	X	X	X	X	X
B100 CT T0 2		12,584	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 1		12,590	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2		12,584	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3		12,579	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1		12,578	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2		12,580	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3		12,587	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1		12,590	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2		12,591	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3		12,588	X	X	X	X	X	X
B20 P T3 1		12,507	X	X	X	X	X	X
B20 P T3 2		12,505	X	X	X	X	X	X
B20 P T3 3		12,506	X	X	X	X	X	X
B20 CT T3 1		12,504	X	X	X	X	X	X
B20 CT T3 2		12,496	X	X	X	X	X	X
B20 CT T3 3		12,511	X	X	X	X	X	X
B100 P T3 1		12,499	X	X	X	X	X	X
B100 P T3 2		12,492	X	X	X	X	X	X
B100 P T3 3		12,482	X	X	X	X	X	X
B100 CT T3 1		N/D						
B100 CT T3 2		12,474	X	X	X	X	X	X
B100 CT T3 3		12,478	X	X	X	X	X	X

Tabela 2. 2 methyl, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester propanoic acid (Composto 2)

Amostras	Crítérios t _R (min)	M ⁺ = 286 (0%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)				
			71 (100%)	56 (6%)	111 (5,6%)	159 (3%)	243 (2%)
B100 P T0 1	13,639	-	X	X	X	X	X
B100 P T0 2	13,639	-	X	X	X	X	X
B100 P T0 3	13,635	-	X	X	X	X	X
B100 P T7 1	13,636	-	X	X	X	X	X
B100 P T7 2	13,636	-	X	X	X	X	X
B100 P T7 3	13,635	-	X	X	X	X	X
B100 P T21 1	13,630	-	X	X	X	X	X
B100 P T21 2	13,636	-	X	X	X	X	X
B100 P T28 1	13,627	-	X	X	X	X	X
B100 P T28 2	13,631	-	X	X	X	X	X
B100 P T28 3	13,631	-	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1	13,639	-	X	X	X	X	X
B100 CT T0 2	13,640	-	X	X	X	X	X
B100 CT T7 1	13,640	-	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2	13,640	-	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3	13,625	-	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1	13,631	-	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2	13,626	-	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3	13,632	-	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1	13,642	-	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2	13,640	-	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3	13,645	-	X	X	X	X	X
B20 P T3 1	N/D						
B20 P T3 2	N/D						
B20 P T3 3	N/D						
B20 CT T3 1	N/D						
B20 CT T3 2	N/D						
B20 CT T3 3	N/D						
B100 P T3 1	N/D						
B100 P T3 2	N/D						
B100 P T3 3	N/D						
B100 CT T3 1	N/D						
B100 CT T3 2	N/D						
B100 CT T3 3	N/D						

Tabela 3. 2,6-di-tert-butyl-4-sec-butylphenol (Composto 3)

Amostras	Crítérios t _R (min)	M ⁺ = 262 (12%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)			
			233 (100%)	57 (60%)	247 (20%)	91 (10%)
B100 P T0 1	14,118	X	X	X	X	X
B100 P T0 2	14,116	X	X	X	X	X
B100 P T0 3	14,115	X	X	X	X	X
B100 P T7 1	14,119	X	X	X	X	X
B100 P T7 2	14,115	X	X	X	X	X
B100 P T7 3	14,115	X	X	X	X	X
B100 P T21 1	14,110	X	X	X	X	X
B100 P T21 2	14,109	X	X	X	X	X
B100 P T28 1	14,106	X	X	X	X	X
B100 P T28 2	14,111	X	X	X	X	X
B100 P T28 3	14,116	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1	14,116	X	X	X	X	X
B100 CT T0 2	14,117	X	X	X	X	X
B100 CT T7 1	N/D					
B100 CT T7 2	N/D					
B100 CT T7 3	N/D					
B100 CT T21 1	14,110	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2	14,107	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3	N/D					
B100 CT T28 1	N/D					
B100 CT T28 2	14,115	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3	14,115	X	X	X	X	X
B20 P T3 1	N/D					
B20 P T3 2	N/D					
B20 P T3 3	14,031	X	X	X	X	X
B20 CT T3 1	14,029	X	X	X	X	X
B20 CT T3 2	14,025	X	X	X	X	X
B20 CT T3 3	14,022	X	X	X	X	X
B100 P T3 1	14,022	X	X	X	X	X
B100 P T3 2	14,022	X	X	X	X	X
B100 P T3 3	14,011	X	X	X	X	X
B100 CT T3 1	14,004	X	X	X	X	X
B100 CT T3 2	14,015	X	X	X	X	X
B100 CT T3 3	14,005	X	X	X	X	X

Tabela 4. 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)phenol (Composto 4)

Critérios Amostras	t _R (min)	M ⁺ = 262 (11%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)			
			233 (100%)	57 (57%)	247 (17%)	91 (10%)
B100 P T0 1	14,740	X	X	X	X	X
B100 P T0 2	14,739	X	X	X	X	X
B100 P T0 3	14,739	X	X	X	X	X
B100 P T7 1	14,739	X	X	X	X	X
B100 P T7 2	14,736	X	X	X	X	X
B100 P T7 3	14,743	X	X	X	X	X
B100 P T21 1	14,736	X	X	X	X	X
B100 P T21 2	14,740	X	X	X	X	X
B100 P T28 1	14,735	X	X	X	X	X
B100 P T28 2	14,742	X	X	X	X	X
B100 P T28 3	14,733	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1	14,746	X	X	X	X	X
B100 CT T0 2	14,745	X	X	X	X	X
B100 CT T7 1	N/D					
B100 CT T7 2	N/D					
B100 CT T7 3	14,735	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1	14,736	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2	14,735	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3	14,740	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1	14,745	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2	14,746	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3	14,753	X	X	X	X	X
B20 P T3 1	N/D					
B20 P T3 2	N/D					
B20 P T3 3	N/D					
B20 CT T3 1	N/D					
B20 CT T3 2	N/D					
B20 CT T3 3	N/D					
B100 P T3 1	N/D					
B100 P T3 2	N/D					
B100 P T3 3	N/D					
B100 CT T3 1	N/D					
B100 CT T3 2	N/D					
B100 CT T3 3	N/D					

Tabela 5. 1-ethyl-4-methyl-cyclohexane (Compostp 5)

Amostras	Critérios	t_R (min)	$M^+ = 126$ (20%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)		
				97 (100%)	55 (89%)	69 (20%)
B100 P T0 1		N/D				
B100 P T0 2		N/D				
B100 P T0 3		N/D				
B100 P T7 1		N/D				
B100 P T7 2		N/D				
B100 P T7 3		N/D				
B100 P T21 1		N/D				
B100 P T21 2		N/D				
B100 P T28 1		N/D				
B100 P T28 2		N/D				
B100 P T28 3		N/D				
B100 CT T0 1		N/D				
B100 CT T0 2		N/D				
B100 CT T7 1		N/D				
B100 CT T7 2		N/D				
B100 CT T7 3		N/D				
B100 CT T21 1		N/D				
B100 CT T21 2		N/D				
B100 CT T21 3		N/D				
B100 CT T28 1		N/D				
B100 CT T28 2		N/D				
B100 CT T28 3		N/D				
B20 P T3 1		14,810		X	X	X
B20 P T3 2		14,811	X		X	X
B20 P T3 3		14,660	X		X	X
B20 CT T3 1		14,657			X	X
B20 CT T3 2		14,661	X		X	X
B20 CT T3 3		14,657	X		X	X
B100 P T3 1		14,816	X	X	X	X
B100 P T3 2		N/D				
B100 P T3 3		N/D				
B100 CT T3 1		N/D				
B100 CT T3 2		14,794	X	X	X	X
B100 CT T3 3		N/D				

Tabela 6. Methyl tetradecanoate (Composto 6)

Amostras	Critérios	t _R (min)	M ⁺ = 242 (5%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)			
				74 (100%)	87 (68%)	143 (20%)	199 (10%)
B100 P T0 1		N/D					
B100 P T0 2		N/D					
B100 P T0 3		N/D					
B100 P T7 1		N/D					
B100 P T7 2		N/D					
B100 P T7 3		N/D					
B100 P T21 1		N/D					
B100 P T21 2		N/D					
B100 P T28 1		15,011	X	X	X	X	X
B100 P T28 2		15,019	X	X	X	X	X
B100 P T28 3		15,011	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1		N/D					
B100 CT T0 2		N/D					
B100 CT T7 1		15,025	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2		15,025	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3		15,005	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1		15,009	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2		15,013	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3		15,010	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1		15,020	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2		N/D					
B100 CT T28 3		15,034	X	X	X	X	X
B20 P T3 1		N/D					
B20 P T3 2		N/D					
B20 P T3 3		N/D					
B20 CT T3 1		N/D					
B20 CT T3 2		N/D					
B20 CT T3 3		N/D					
B100 P T3 1		N/D					
B100 P T3 2		N/D					
B100 P T3 3		N/D					
B100 CT T3 1		N/D					
B100 CT T3 2		N/D					
B100 CT T3 3		N/D					

Tabela 7. Dipentylamine (Composto 7)

Amostras	Critérios t_R (min)	$M^+ = 157$ (7%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)		
			100 (100%)	101 (7%)	56 (6%)
B100 P T0 1	N/D				
B100 P T0 2	N/D				
B100 P T0 3	N/D				
B100 P T7 1	N/D				
B100 P T7 2	N/D				
B100 P T7 3	N/D				
B100 P T21 1	N/D				
B100 P T21 2	N/D				
B100 P T28 1	N/D				
B100 P T28 2	N/D				
B100 P T28 3	N/D				
B100 CT T0 1	N/D				
B100 CT T0 2	N/D				
B100 CT T7 1	N/D				
B100 CT T7 2	N/D				
B100 CT T7 3	N/D				
B100 CT T21 1	N/D				
B100 CT T21 2	N/D				
B100 CT T21 3	N/D				
B100 CT T28 1	N/D				
B100 CT T28 2	N/D				
B100 CT T28 3	N/D				
B20 P T3 1	17,025	X	X	X	X
B20 P T3 2	17,030	X	X	X	X
B20 P T3 3	17,039	X	X	X	X
B20 CT T3 1	N/D				
B20 CT T3 2	N/D				
B20 CT T3 3	17,039	X	X	X	X
B100 P T3 1	N/D				
B100 P T3 2	N/D				
B100 P T3 3	N/D				
B100 CT T3 1	17,018	X	X	X	X
B100 CT T3 2	17,031	X	X	X	X
B100 CT T3 3	17,030	X	X	X	X

Tabela 8. Methyl hexadecanoate (Composto 8)

Amostras	Critérios	t_R (min)	$M^+ = 270$ (7%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)			
				74 (100%)	87 (70%)	143 (6%)	227 (1%)
B100 P T0 1		N/D					
B100 P T0 2		N/D					
B100 P T0 3		N/D					
B100 P T7 1		N/D					
B100 P T7 2		N/D					
B100 P T7 3		N/D					
B100 P T21 1		N/D					
B100 P T21 2		N/D					
B100 P T28 1		17,781	X	X	X	X	X
B100 P T28 2		17,781	X	X	X	X	X
B100 P T28 3		17,779	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1		N/D					
B100 CT T0 2		N/D					
B100 CT T7 1		17,794	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2		17,791	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3		17,819	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1		17,780	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2		17,779	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3		17,790	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1		17,790	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2		17,799	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3		17,785	X	X	X	X	X
B20 P T3 1		N/D					
B20 P T3 2		N/D					
B20 P T3 3		N/D					
B20 CT T3 1		N/D					
B20 CT T3 2		N/D					
B20 CT T3 3		N/D					
B100 P T3 1		N/D					
B100 P T3 2		N/D					
B100 P T3 3		N/D					
B100 CT T3 1		N/D					
B100 CT T3 2		N/D					
B100 CT T3 3		N/D					

Tabela 9. Methyl heptadecanoate (Composto 9)

Amostras	Critérios t _R (min)	M ⁺ = 284 (1%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)			
			74 (100%)	87 (70%)	143 (16%)	241 (6%)
B100 P T0 1	N/D					
B100 P T0 2	N/D					
B100 P T0 3	N/D					
B100 P T7 1	N/D					
B100 P T7 2	N/D					
B100 P T7 3	N/D					
B100 P T21 1	N/D					
B100 P T21 2	N/D					
B100 P T28 1	N/D					
B100 P T28 2	N/D					
B100 P T28 3	N/D					
B100 CT T0 1	N/D					
B100 CT T0 2	N/D					
B100 CT T7 1	19,865	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2	19,840	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3	19,815	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1	N/D					
B100 CT T21 2	19,833	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3	19,822	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1	19,849	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2	N/D					
B100 CT T28 3	19,844	X	X	X	X	X
B20 P T3 1	N/D					
B20 P T3 2	N/D					
B20 P T3 3	N/D					
B20 CT T3 1	N/D					
B20 CT T3 2	N/D					
B20 CT T3 3	N/D					
B100 P T3 1	N/D					
B100 P T3 2	N/D					
B100 P T3 3	N/D					
B100 CT T3 1	N/D					
B100 CT T3 2	N/D					
B100 CT T3 3	N/D					

Tabela 10. Methyl octadeca-9,12-dienoate (Composto 10)

Amostras	Critérios	t _R (min)	M ⁺ = 294 (5%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)				
				67 (100%)	81 (80%)	135 (12%)	150 (10%)	263 (3%)
B100 P T0 1		N/D						
B100 P T0 2		N/D						
B100 P T0 3		N/D						
B100 P T7 1		N/D						
B100 P T7 2		N/D						
B100 P T7 3		N/D						
B100 P T21 1		N/D						
B100 P T21 2		N/D						
B100 P T28 1		21,349	X	X	X	X	X	X
B100 P T28 2		N/D						
B100 P T28 3		21,349	X	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1		N/D						
B100 CT T0 2		N/D						
B100 CT T7 1		21,370	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2		21,359	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3		21,335	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1		21,345	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2		21,344	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3		21,350	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1		21,363	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2		N/D						
B100 CT T28 3		21,359	X	X	X	X	X	X
B20 P T3 1		N/D						
B20 P T3 2		N/D						
B20 P T3 3		N/D						
B20 CT T3 1		N/D						
B20 CT T3 2		N/D						
B20 CT T3 3		N/D						
B100 P T3 1		N/D						
B100 P T3 2		N/D						
B100 P T3 3		N/D						
B100 CT T3 1		N/D						
B100 CT T3 2		N/D						
B100 CT T3 3		N/D						

Tabela 11. Methyl 11-octadecenoate (Composto 11)

Amostras	Critérios	t _R (min)	M ⁺ = 296 (0,5%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)				
				57 (100%)	264 (20%)	222 (13%)	180 (12%)	137 (10%)
B100 P T0 1		N/D						
B100 P T0 2		N/D						
B100 P T0 3		N/D						
B100 P T7 1		N/D						
B100 P T7 2		N/D						
B100 P T7 3		N/D						
B100 P T21 1		N/D						
B100 P T21 2		N/D						
B100 P T28 1		21,450	X	X	X	X	X	X
B100 P T28 2		N/D						
B100 P T28 3		21,450	X	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1		N/D						
B100 CT T0 2		N/D						
B100 CT T7 1		21,470	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2		21,455	X	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3		21,438	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1		21,444	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2		21,445	X	X	X	X	X	X
B100 CT T21 3		21,455	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1		21,461	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2		21,470	X	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3		21,461	X	X	X	X	X	X
B20 P T3 1		N/D						
B20 P T3 2		N/D						
B20 P T3 3		N/D						
B20 CT T3 1		N/D						
B20 CT T3 2		N/D						
B20 CT T3 3		N/D						
B100 P T3 1		N/D						
B100 P T3 2		N/D						
B100 P T3 3		N/D						
B100 CT T3 1		N/D						
B100 CT T3 2		N/D						
B100 CT T3 3		N/D						

Tabela 12. Methyl octadecanoate (Composto 12)

Amostras	Critérios	t _R (min)	M ⁺ = 298 (1%)	Fragmentos (Intensidade Relativa)			
				74 (100%)	87 (62%)	143 (20%)	255 (6%)
B100 P T0 1		N/D					
B100 P T0 2		N/D					
B100 P T0 3		N/D					
B100 P T7 1		N/D					
B100 P T7 2		N/D					
B100 P T7 3		N/D					
B100 P T21 1		N/D					
B100 P T21 2		N/D					
B100 P T28 1		21,891	X	X	X	X	X
B100 P T28 2		21,903	X	X	X	X	X
B100 P T28 3		21,889	X	X	X	X	X
B100 CT T0 1		21,919	X	X	X	X	X
B100 CT T0 2		N/D					
B100 CT T7 1		21,916	X	X	X	X	X
B100 CT T7 2		21,910	X	X	X	X	X
B100 CT T7 3		21,901	X	X	X	X	X
B100 CT T21 1		21,900	X	X	X	X	X
B100 CT T21 2		21,900	X	X	X	X	X
B100 CT T28 1		21,905	X	X	X	X	X
B100 CT T28 2		21,915	X	X	X	X	X
B100 CT T28 3		21,915	X	X	X	X	X
B20 P T3 1		21,912	X	X	X	X	X
B20 P T3 2		N/D					
B20 P T3 3		N/D					
B20 CT T3 1		N/D					
B20 CT T3 2		N/D					
B20 CT T3 3		N/D					
B100 P T3 1		N/D					
B100 P T3 2		N/D					
B100 P T3 3		N/D					
B100 CT T3 1		N/D					
B100 CT T3 2		N/D					
B100 CT T3 3		N/D					