



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Letícia Pereira

**Desenvolvimento e avaliação de métodos para fracionamento e análise de
especação química de mercúrio em amostras de resíduos oleosos de petróleo**

Florianópolis - SC
2019

Letícia Pereira

**Desenvolvimento e avaliação de métodos para fracionamento e análise de
especação química de mercúrio em amostras de resíduos oleosos de petróleo**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química.
Orientador: Prof. Daniel Lázaro Gallindo Borges, Dr.

Florianópolis - SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Leticia

Desenvolvimento e avaliação de métodos para
fracionamento e análise de especiação química de mercúrio em
amostras de resíduos oleosos de petróleo / Leticia Pereira ;
orientador, Daniel Lázaro Gallindo Borges, 2019.
175 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. Resíduos oleosos de petróleo. 3. Extração de
mercúrio. 4. Fracionamento químico de mercúrio. 5. Análise
de especiação química de mercúrio. I. Borges, Daniel Lázaro
Gallindo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Letícia Pereira

**Desenvolvimento e avaliação de métodos para fracionamento e análise de
especação química de mercúrio em amostras de resíduos oleosos de petróleo**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Cassiana Seimi Nomura, Dra.
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Ricardo Jorgensen Cassella, Dr.
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof. Gustavo Amadeu Micke, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Adolfo Horn Júnior, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química.

Prof. Marcus Mandolesi Sá, Dr.
Coordenador do Programa

Prof. Daniel Lázaro Gallindo Borges, Dr.
Orientador

Florianópolis, 04 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo acolhimento e possibilidade de execução deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Daniel Lázaro Gallindo Borges, pelo exemplo profissional, pela oportunidade de trabalho no grupo de pesquisa, pela paciência e compreensão, pela orientação e apoio durante toda a execução deste trabalho.

Aos professores Tatiane Maranhão, Vera Frescura e Eduardo Chaves, pelo exemplo profissional, pelo carinho, pelas sugestões e pela valorosa contribuição a este trabalho. Lembrarei com saudosismo e orgulho dos excelentes professores do Laboratório de Espectrometria de Massa e Atômica (LEMA).

Ao técnico Jairo Fontana, por sempre auxiliar na resolução dos problemas instrumentais, pelos momentos de confraternização, pela amizade e carinho à que dedica aos alunos do LEMA.

Aos professores Cassiana Nomura, Ricardo Cassella, Gustavo Micke e Adolfo Horn Júnior, pela participação como banca avaliadora deste trabalho de tese e pelas grandes contribuições para a finalização deste trabalho.

À Jesse pelos ensinamentos e por me auxiliar na iniciação aos projetos. Aos demais colegas do LEMA, Richard, Letícia, Bárbara, Thebny, Klaiani, Héryca, Geovanna, Gilberto, Bernardo, Marcos, Diogo, Amauri, Graziela, Tarcísio, Juliano, Beatriz, Ghislaine, Patrícia, Mariana, Renata, Eduardo, Massai e demais colegas com quem eu convivi durante os quatro anos de doutorado. Vou lembrar sempre com carinho dos momentos de descontração e o aprendizado que tive com esse grupo de pesquisa que me causa tanto orgulho.

À minha família, Senita, Luciara e Lucas pelo apoio e incentivo em todos os momentos e, para mim, exemplo de persistência e dedicação.

À minha mãe, Senita, a quem tanto amo, que sempre foi meu exemplo de luta e conquista de uma vida melhor. Meu exemplo de amor, força, persistência, simplicidade e respeito.

Agradeço à Deus por todas as conquistas, por ter me dado forças para concluir esta etapa tão importante da minha vida, e por ter colocado no meu caminho pessoas que me ajudaram e que agregaram ao meu desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

Este trabalho descreve a otimização de métodos de extração em amostras de resíduos oleosos de petróleo para posterior fracionamento e análise de especiação de mercúrio (Hg). Nesse sentido, aquecimento convectivo e soluções de HNO₃ ou HCl foram avaliadas quanto ao desempenho frente à extração de espécies de Hg e posterior fracionamento (frações inorgânicas e orgânicas) em amostras de borra oleosa utilizando espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS). Os fatores massa de amostra, volume de extrator, temperatura, tipo e concentração da solução extratora (HNO₃ ou HCl) e tempo de extração foram avaliados. Matrizes Doehlert e Box-Behnken foram empregadas para a projeção das superfícies de resposta. Após tratamento estatístico e inspeção das superfícies de resposta, as condições de 100 mg de amostra, 90 °C, 10 mL de HNO₃ 8,0 mol L⁻¹ e 10 min de extração foram selecionadas. Para a otimização das condições experimentais de extração com solução de HNO₃ foi utilizada a função desejabilidade, combinando a máxima extração de espécies, a taxa de conversão CH₃Hg⁺ e a máxima recuperação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺, para maximização da resposta. Nas três amostras de borra oleosa analisadas, 45-66% do Hg total foi correspondente à fração inorgânica (Hg²⁺), com conversão desprezível de CH₃Hg⁺ e recuperações de 49-102% para Hg²⁺ e 89-106% para CH₃Hg⁺. Os resultados analíticos foram comparados com aqueles obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS) e nenhuma diferença estatística foi observada em nível de confiança de 95%. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) alcançados para CV-AFS foram de 0,07 e 0,2 ng g⁻¹, respectivamente, enquanto o LOD e LOQ obtidos usando HPLC-ICP-MS foram de 0,01 e 0,03 mg kg⁻¹, respectivamente. A concentração de espécies orgânicas de Hg em amostras de borra oleosa foi inferior ao LOD em ambos os métodos. No que concerne a análise de especiação química de Hg nas amostras de resíduos oleosos, as seguintes condições de extração das espécies foram otimizadas utilizando planejamento multivariado Doehlert e Box-Behnken: 100 mg de amostra, 1,2 mL de xileno para a solubilização da amostra, 13,8 mL de L-cisteína 1,3% m/v, submetidos ao aquecimento em banho (60 °C) e ultrassom na frequência de 60 Hz por 30 min. Os extratos foram analisados por HPLC-ICP-MS utilizando as seguintes condições otimizadas: composição da fase móvel de 96% da mistura de L-cisteína 0,26% m/v + acetato de amônio 0,03 mol L⁻¹ e 4% de metanol a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ em uma eluição isocrática, 1,0 L min⁻¹ de vazão do gás nebulizador e 1000 W de potência de radiofrequência. Após a análise de diferentes amostras de borra oleosa com diferentes composições de água, óleo e sólidos, extrações de Hg²⁺ entre 30 e 77% em relação ao Hg total foram obtidas. Testes de adição e recuperação para Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ apresentaram valores entre 70 e 101%. O LOD e o LOQ obtidos para Hg²⁺ foram de 0,05 e 0,16 mg kg⁻¹, respectivamente, e para CH₃Hg⁺, 0,06 e 0,19 mg kg⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Resíduos oleosos de petróleo. Extração de mercúrio. Fracionamento químico. Análise de especiação química. Otimização multivariada.

ABSTRACT

This work describes the optimization of extraction methods in oily sludge samples for subsequent mercury fractionation and speciation analysis. In this sense, convective heating and solutions of HNO₃ or HCl were evaluated for performance against Hg species extraction and subsequent fractionation (inorganic and organic fractions) in oily sludge samples using cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CV-AFS). The factors sample mass, extractor volume, temperature, type and concentration of the extractive solution (HNO₃ or HCl) and extraction time were evaluated. Doehlert and Box-Behnken matrices were used for the projection of response surfaces. After statistical treatment and inspection of the response surfaces, conditions of 100 mg of sample, 90 °C, 10 mL of 8.0 mol L⁻¹ HNO₃ and 10 min of extraction were selected. For the optimization of the experimental conditions in extraction with HNO₃ solution, the desirability function was used, combining the maximum extraction of species, the CH₃Hg⁺ conversion rate and maximum Hg²⁺ and CH₃Hg⁺ recoveries. In the three oily sludge samples analyzed, 45-66% of the total Hg corresponded to inorganic fraction (Hg²⁺), with negligible CH₃Hg⁺ conversion and recoveries of 49-102% for Hg²⁺ and 89-106% for CH₃Hg⁺. The analytical results were compared with those obtained by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) and no statistical difference was observed at the 95% confidence level. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) achieved for Hg²⁺ by CV-AFS were 0.07 and 0.2 ng g⁻¹, respectively, while the LOD and LOQ obtained using HPLC-ICP-MS were 0.01 and 0.03 mg kg⁻¹, respectively. The concentration of organic Hg species in oily sludge samples was lower than LOD in both methods. As regards the chemical speciation analysis of Hg in oily sludge samples, the following extraction conditions were optimized using Doehlert and Box-Behnken multivariate planning: 100 mg of sample, 1.2 mL of xylene for the solubilization of the sample, 13.8 mL of 1.3% (m/v) L-cysteine, submitted to heating bath (60 °C) and ultrasound at 60 Hz frequency for 30 min. The extracts were analyzed by HPLC-ICP-MS using the following optimized conditions: mobile phase composition of 96% of the mixture of 0.26% (m/v) L-cysteine + 0.03 mol L⁻¹ ammonium acetate and 4% methanol at flow rate of 0.8 mL min⁻¹ in isocratic elution, 1.0 L min⁻¹ nebulizer gas flow and 1000 W radiofrequency power. After analysis of different oily sludge samples with different compositions of water, oil and solids, Hg²⁺ extractions between 30 and 77% in relation to total Hg were obtained. Addition and recovery tests for Hg²⁺ and CH₃Hg⁺ presented values between 70 and 101%. The LOD and LOQ obtained for Hg²⁺ were 0.05 and 0.16 mg kg⁻¹, respectively, and for CH₃Hg⁺, 0.06 and 0.19 mg kg⁻¹, respectively.

Keywords: Oily sludge. Mercury extraction. Chemical fractionation. Chemical speciation analysis. Multivariate optimization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Intensidade de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ em diferentes potências de micro-ondas (110 a 700 W) por 10 min, sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), utilizando HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ 54
- Figura 2.** Intensidade de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} em diferentes potências de micro-ondas (110 a 700 W) por 10 min, sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), utilizando HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ 56
- Figura 3.** Intensidades de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), em a) diferentes concentrações de HCl ($1,0 - 6,0 \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas na potência de 200 W por 10 min, e b) em diferentes potências de micro-ondas (100 a 500 W) por 10 min na solução de HCl 1 mol L^{-1} (escolhida a partir de “a”)57
- Figura 4.** Intensidade de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} em diferentes potências de micro-ondas (100 a 500 W) por 10 min, sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), utilizando HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ 59
- Figura 5:** Esquema de procedimentos usados para fracionamento de Hg determinado por CV-AFS73
- Figura 6.** Superfície de resposta para a) concentração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) $n=2$) e b) desvio padrão ($n=4$), obtidos a partir da matriz Doehlert para a otimização da massa de amostra e volume de solução (HNO_3), obtidos nas condições experimentais: aquecimento convectivo a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e 10 mL de HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ 77
- Figura 7.** Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na solução padrão durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$ 79

Figura 8. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na amostra de borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$..81

Figura 9. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para a extração de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$ 82

Figura 10. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para a extração de Hg orgânico (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$83

Figura 11. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$ 84

Figura 12. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de CH_3Hg^+ (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$85

Figura 13. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na solução padrão nos experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$ 88

Figura 14. Superfície de resposta obtida a partir de matriz de design Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na amostra durante os experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$ 89

Figura 15. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para extração de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$ 90

- Figura 16.** Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para extração de Hg orgânico (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e [HNO₃]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HNO₃]91
- Figura 17.** Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de Hg²⁺ (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e [HNO₃]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HNO₃]92
- Figura 18.** Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de CH₃Hg⁺ (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e [HNO₃]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HNO₃]93
- Figura 19.** Superfícies de resposta da desejabilidade global para conversão de CH₃Hg⁺, extração de Hg²⁺ e Hg orgânico e recuperação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ durante a otimização dos fatores (a) [HNO₃] e temperatura (b) tempo e temperatura (c) tempo e [HNO₃] na extração das espécies de Hg da borra oleosa com aquecimento convectivo para posterior fracionamento.....96
- Figura 20.** Superfície de resposta obtida de uma matriz Doehlert na otimização dos componentes da fase móvel (L-cisteína e acetato de amônio) sobre as contagens para a solução padrão de 50 µg L⁻¹ de Hg²⁺ 115
- Figura 21.** Superfície de resposta para as contagens referentes a solução padrão de 50 µg L⁻¹ de Hg²⁺ após aplicação de planejamento Doehlert para otimização da vazão da fase móvel e proporção de metanol 117
- Figura 22.** Perfil dos sinais cromatográficos das espécies Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ em solução padrão, obtidos nas diferentes condições experimentais para otimização da separação, avaliando-se a proporção de metanol (%) e a vazão da fase móvel (mL min⁻¹) 119
- Figura 23.** Superfícies de resposta para a) resolução e b) coeficiente de seletividade relacionados a separação das espécies de Hg em solução padrão, nas diferentes

condições experimentais de otimização de vazão da fase móvel e proporção de metanol..... 120

Figura 24. Superfície de resposta para a otimização da vazão do gás nebulizador e da potência de RF obtidas por matriz de planejamento Doehlert. Resposta expressa como contagens de Hg^{2+} 122

Figura 25. Efeito de diferentes soluções sobre a extração de Hg^{2+} ($mg\ kg^{-1}$) da amostra de borra oleosa, empregando-se extração assistida por ultrassom ou por aquecimento..... 124

Figura 26. Comparação do aspecto visual das soluções L-cisteína, KOH e da mistura a) após extração com aquecimento e ultrassom, simultaneamente, centrifugação e b) após filtração com filtro $0,22\ \mu m$ e diluição num fator de 10 127

Figura 27. Superfície de resposta gerada a partir da matriz Doehlert referente a otimização do volume (mL) e massa de amostra (g). Resposta expressa como extração de Hg^{2+} ($mg\ kg^{-1}$) 128

Figura 28. Aspecto visual das soluções contendo diferentes solventes orgânicos para a solubilização da fração oleosa da amostra. Em **a)** estão mostrados a amostra na ausência de solvente orgânico (à esquerda) e a amostra na presença de 0,5 mL xileno (à direita), e em **b)** a amostra na presença de 0,5 mL dos solventes xileno, etanol ou clorofórmio para a solubilização da amostra. A solução extratora é composta por L-cisteína 0,6% m/v 130

Figura 29. Concentrações de Hg^{2+} obtidas após a solubilização da fase oleosa da amostra de borra oleosa com diferentes solventes orgânicos. ($n=2$) 131

Figura 30. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ para verificação de significância dos fatores considerando a extração de Hg^{2+} ($mg\ kg^{-1}$)..... 133

- Figura 31.** Intensidades do Hg^{2+} em diferentes soluções utilizadas nos processos de extração e determinação, analisadas em intervalos de 5 min utilizando ICP-MS .. 135
- Figura 32.** Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS após a injeção de solução contendo Hg^{2+} $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em meio de a) solução de metanol 4% v/v b) solução de L-cisteína 0,26% m/v + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ e c) solução de L-cisteína 0,1 % m/v + 0,06% v/v de 2-mercaptoetanol..... 136
- Figura 33.** Avaliação de diferentes volumes de xileno sobre a extração de espécies de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa 138
- Figura 34.** Avaliação de diferentes concentrações de L-cisteína sobre a extração de espécies de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa 139
- Figura 35.** Superfícies de resposta para a extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Temperatura e volume de xileno; c) Concentração de L-cisteína e volume de xileno..... 142
- Figura 36.** Superfícies de resposta para a conversão de CH_3Hg^+ na amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Concentração de L-cisteína e volume de xileno; c) Temperatura e volume de xileno 143
- Figura 37.** Superfícies de resposta para a recuperação de CH_3Hg^+ da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Temperatura e volume de xileno; c) Concentração de L-cisteína e volume de xileno..... 144
- Figura 38.** Superfícies de resposta para recuperação de Hg^{2+} na amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Temperatura e volume de xileno; c) Concentração de L-cisteína e volume de xileno 145

Figura 39. Perfil dos sinais cromatográficos para **a)** Hg^{2+} e CH_3Hg^+ nas soluções de calibração (10 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$). **b)** Hg^{2+} em uma amostra de borra oleosa diluída num fator de 10 147

Figura 40. Amostras de borra oleosa submetidas à extração e análise de especiação de Hg por HPLC-ICP-MS 148

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Métodos aplicados para o fracionamento de Hg em amostras diversas ...35
- Tabela 2.** Aplicação de métodos para a análise de especiação química de mercúrio em diferentes matrizes41
- Tabela 3.** Valores obtidos para o fracionamento de Hg nos CRMs DOLT-4 e TORT-2, após digestão e extração em HNO_3 4,0 mol L^{-1} na potência de 400 W ou HCl 1,0 mol L^{-1} na potência de 300 W, utilizando KMnO_4 0,05% (m/v) + $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v). (n=2).....60
- Tabela 4.** Concentrações de Hg obtidas por CV-AFS após extração (utilizando HCl 1,0 mol L^{-1}) e digestão do extrato e do resíduo da amostra certificada (TORT-2). (n=3)61
- Tabela 5.** Concentrações de Hg obtidas por CV-AFS após digestão (Hg total) e extração com HNO_3 4,0 mol L^{-1} (Hg inorgânico) em amostras de resíduos oleosos. (n=3).....63
- Tabela 6.** Parâmetros e condições usadas para análise de especiação química de Hg por HPLC-ICP-MS.....68
- Tabela 7.** Matriz Doehlert aplicada para otimizar o volume de extrator (mL) e a massa de amostra (mg), valores experimentais reais e valores codificados, entre parênteses, e respostas expressas como concentração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) e desvio padrão (n=4)75
- Tabela 8.** Matriz Box Behnken utilizada para avaliar a conversão de CH_3Hg^+ na solução padrão durante a otimização da temperatura, [HCl] e tempo de extração, com os valores reais e valores codificados (-1, 0, +1). Respostas expressas como percentual de conversão de CH_3Hg^+ 79

Tabela 9. Matriz Box-Behnken e respostas da extração de Hg^{2+} , extração de Hg orgânico, conversão de CH_3Hg^+ e recuperações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , referentes a otimização da temperatura, $[HCl]$ e tempo de extração	86
Tabela 10. Matriz Box Behnken utilizada para avaliar a conversão de CH_3Hg^+ na solução padrão durante a otimização da temperatura, $[HNO_3]$ e tempo de extração, em diferentes condições. Respostas expressas como percentual de conversão de CH_3Hg^+	87
Tabela 11. ANOVA para a desejabilidade global de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} , extração de Hg^{2+} e Hg orgânico e reuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ para a otimização da extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa com solução de HNO_3 . $R^2 = 0,84593$	97
Tabela 12. Matriz Box-Behnken, respostas e desejabilidades individuais e global calculadas para extração de Hg^{2+} (%), extração de Hg orgânico (%), conversão de CH_3Hg^+ (%), recuperações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (%) para otimização do método de extração de espécies de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo.....	98
Tabela 13. Amostras analisadas por CV-AFS para fracionamento de Hg após extração com aquecimento convectivo na condição: 90 °C por 10 min com HNO_3 8,0 mol L ⁻¹	101
Tabela 14. Comparação das concentrações de Hg^{2+} nas amostras de borra oleosa determinadas por CV-AFS e HPLC-ICP-MS após extração com aquecimento convectivo	102
Tabela 15. Fatores e níveis (-1, 0, +1) avaliados aplicando-se planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ na triagem dos fatores significativos envolvidos no método de extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa.....	110
Tabela 16. Fatores e níveis (-1, 0, +1) avaliados aplicando-se matriz Box-Behnken na otimização do método de extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa	110

Table 17. Parâmetros e condições usadas para análise de especiação química de Hg por HPLC-ICP-MS.....	112
Tabela 18. Matriz Doehlert, condições experimentais e respostas das contagens de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ obtidas nas otimizações das soluções de L-cisteína e acetato de amônio na composição da fase móvel	114
Tabela 19. Matriz Doehlert aplicada para otimização da vazão da fase móvel e proporção de metanol na fase móvel, respostas para as contagens referentes a solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , resolução e seletividade	117
Tabela 20. Matriz Doehlert e condições experimentais empregadas na otimização da vazão de gás nebulizador e da potência de radiofrequência e respostas de contagens referentes a solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+	121
Tabela 21. Avaliação das soluções de L-cisteína e KOH, individualmente e misturadas, sobre a extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) da amostra, submetidas ao aquecimento em banho e ao ultrassom, individualmente ou simultaneamente.....	126
Tabela 22. Matriz Doehlert para otimização do volume de solução extratora e da massa de amostra e resposta referente à extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) da amostra de borra oleosa	128
Tabela 23. Valores reais dos fatores (xileno, L-cisteína, 2-mercaptoetanol, temperatura e tempo de ultrassom) avaliados no planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ e respostas expressas como concentração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}).....	132
Tabela 24. Matriz Box-Behnken utilizada para a otimização dos fatores volume de xileno, concentração de L-cisteína e temperatura, condições experimentais avaliadas e respostas para a extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}), porcentagem de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} e recuperação das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+	140

Tabela 25. ANOVA para a extração de Hg ²⁺ (%) da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken avaliando-se volume de xileno (mL), concentração de L-cisteína (% m/v) e temperatura (°C). R ² = 0,9628	141
Tabela 26. Parâmetros das curvas de calibração das espécies Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺ após medição por HPLC-ICP-MS (n=4).....	148
Tabela 27. Concentração de Hg total obtida por CV-AFS e extração de Hg ²⁺ e recuperação das espécies Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺ após extração com aquecimento e ultrassom e análise por HPLC-ICP-MS (n=2).....	149
Tabela 28. Testes de adição e recuperação da espécie Hg ²⁺ nas amostras de borra oleosa nos níveis de 50, 100 e 300 mg kg ⁻¹ (n=2).....	152
Tabela 29. Concentrações de Hg ²⁺ (mg kg ⁻¹) obtidas após extração com o método otimizado neste trabalho e com o método de extração EPA 3200 (n=2).....	153

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de variância
CE	Eletroforese capilar (do inglês <i>capillary electrophoresis</i>)
CONAMA	Conselho Nacional do Meio ambiente
CRM	Material de referência certificado (do inglês <i>certified reference material</i>)
CV AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (do inglês <i>cold vapor atomic absorption spectrometry</i>)
CV AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (do inglês <i>cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i>)
CV ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e geração de vapor frio (do inglês <i>cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ESI-MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura (do inglês Food and Agriculture Organization)
FI-CV-AFS	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio e injeção em fluxo (do inglês <i>flow injection cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i>)
GC	Cromatografia a gás (do inglês <i>gas chromatography</i>)
GC-CV AFS	Cromatografia a gás com geração de vapor frio acoplada à espectrometria de fluorescência atômica (do inglês <i>gas chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPLC-CV AFS	Cromatografia a líquido de alta eficiência com geração de vapor frio acoplada à espectrometria de fluorescência atômica (do inglês <i>high performance liquid chromatography cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i>)
HPLC-ICP-MS	Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do

	inglês <i>high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
LC	Cromatografia a líquido (do inglês <i>liquid chromatography</i>)
LC-CV-ICP-MS	Cromatografia a líquido com geração de vapor frio acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>liquid chromatography cold vapor inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantification</i>)
MAE	Extração assistida por micro-ondas (do inglês <i>microwave assisted extraction</i>)
MW	Micro-ondas (do inglês <i>microwave</i>)
PHAs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (do inglês <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
PHCs	Hidrocarbonetos de petróleo (do inglês <i>petroleum hydrocarbons</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i>)
RSM	Metodologia de superfície de resposta (do inglês <i>response surface methodology</i>)
SIDMS	Espectrometria de massa com diluição de isótopos especiados (do inglês <i>speciated isotope dilution mass spectrometry</i>)
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio (do inglês <i>tetramethylammonium hydroxide</i>)
US EPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>United States environmental protection agency</i>)
WHO	Organização mundial da saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
XAS	Espectroscopia de absorção de raios X (do inglês <i>X-ray absorption spectroscopy</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO	26
2.2	ESPÉCIES DE MERCÚRIO.....	29
2.2.1	Toxicidade das espécies de Hg.....	30
2.2.2	Espécies de mercúrio em petróleo e derivados	31
2.3	FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO	32
2.4	ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA.....	36
2.4.1	Análise de especiação química de mercúrio	39
2.5	USO DE PLANEJAMENTO MULTIVARIADO PARA A OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	44
3	OBJETIVO GERAL.....	47
4	CAPÍTULO 1 - FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO UTILIZANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	48
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.2.1	Instrumentação.....	50
4.2.2	Amostras e reagentes	50
4.2.3	Procedimento experimental.....	51
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.3.1	Avaliação da conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} utilizando soluções de HNO_3 e HCl como extratoras	53
4.3.2	Avaliação da adequação dos meios extratores	60
4.3.3	Investigação da extração das espécies de Hg utilizando HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$	61

4.3.4	Avaliação da extração de Hg²⁺ nas amostras de resíduos oleosos empregando solução de HNO₃ 4,0 mol L⁻¹	62
4.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	64
5	CAPÍTULO 2 - FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO UTILIZANDO EXTRAÇÃO COM AQUECIMENTO CONVECTIVO	65
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
5.2.1	Instrumentação.....	67
5.2.2	Amostras e reagentes	68
5.2.3	Procedimento experimental.....	69
5.2.3.1	<i>Avaliação do método de extração com aquecimento convectivo para fracionamento de mercúrio em amostras de resíduos oleosos de petróleo empregando otimização multivariada</i>	<i>69</i>
5.2.3.1.1	Otimização dos fatores massa de amostra e volume de solução extratora aplicando planejamento Doehlert	70
5.2.3.1.2	Otimização dos fatores temperatura, [HNO ₃] ou [HCl] e tempo de extração aplicando planejamento Box-Behnken	70
5.2.3.2	<i>Digestão da amostra de resíduo de petróleo para a determinação de Hg total.....</i>	<i>71</i>
5.2.3.3	<i>Extração das espécies de Hg das amostras de resíduos oleosos de petróleo com aquecimento convectivo para posterior fracionamento.....</i>	<i>72</i>
5.2.3.4	<i>Determinação de Hg por CV-AFS</i>	<i>73</i>
5.2.3.5	<i>Determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS</i>	<i>74</i>
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	75
5.3.1	Otimização da massa de amostra e volume de solução sobre a extração das espécies de Hg da amostra de resíduo oleoso de petróleo utilizando matriz Doehlert.....	75

5.3.2	Avaliação da solução extratora utilizando matriz Box-Behnken para posterior fracionamento de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo	77
5.3.2.1	<i>Otimização da extração de espécies de mercúrio da amostra de borra oleosa com solução de HCl utilizando planejamento de experimentos com matriz Box-Behnken</i>	<i>78</i>
5.3.2.1.1	Estudo de conversão de CH ₃ Hg ⁺ em solução padrão nas otimizações com solução de HCl	78
5.3.2.1.2	Estudo de conversão de CH ₃ Hg ⁺ em Hg ²⁺ na amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HCl	80
5.3.2.1.3	Avaliação da extração de Hg ²⁺ e de Hg orgânico da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HCl.....	81
5.3.2.1.4	Avaliação da recuperação das espécies Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺ da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HCl.....	83
5.3.2.2	<i>Otimização da extração de espécies de mercúrio da amostra de borra oleosa com solução de HNO₃ utilizando planejamento de experimentos Box-Behnken.....</i>	<i>86</i>
5.3.2.2.1	Estudo de conversão de CH ₃ Hg ⁺ em solução padrão nas otimizações com solução de HNO ₃	87
5.3.2.2.2	Estudo de conversão de CH ₃ Hg ⁺ na amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HNO ₃	88
5.3.2.2.3.	Avaliação da extração de Hg ²⁺ e de Hg orgânico da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HNO ₃	89
5.3.2.2.4	Avaliação da recuperação das espécies Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺ da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HNO ₃	91
5.3.2.2.5	Aplicação da função desejabilidade para otimização do método de extração das espécies Hg ²⁺ e CH ₃ Hg ⁺ de borra oleosa utilizando a solução de HNO ₃	94
5.3.3	Fracionamento de Hg em amostras de borra oleosa	99
5.3.4	Determinação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ por HPLC-ICP-MS	101

5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	102
6	CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE MERCÚRIO EM RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO POR HPLC-ICP-MS	103
6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	104
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
6.2.1	Instrumentação.....	105
6.2.2	Amostras e reagentes	105
6.2.3	Procedimento experimental.....	106
6.2.3.1	<i>Otimização das condições instrumentais para a determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS</i>	<i>107</i>
6.2.3.1.1	Otimização da fase móvel do instrumento de HPLC.....	107
6.2.3.1.2	Otimização da vazão de gás nebulizador e da potência de radiofrequência do ICP-MS	107
6.2.3.2	<i>Otimização da extração assistida por ultrassom e por aquecimento sobre a extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa.....</i>	<i>108</i>
6.2.3.2.1	Avaliação de diferentes soluções sobre a extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa.....	108
6.2.3.2.2	Otimização da massa de amostra e volume de solução para a extração das espécies de Hg	108
6.2.3.2.3	Avaliação do uso de solvente orgânico para o aumento do contato da amostra com a solução extratora sobre a extração das espécies de Hg	109
6.2.3.2.4	Aplicação de um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ para triagem dos fatores significativos na extração das espécies de Hg	109
6.2.3.2.5	Otimização dos fatores envolvidos com o método de extração.....	110
6.2.3.3	<i>Análise de especiação química de Hg em amostras de borra oleosa</i>	<i>111</i>
6.2.3.4	<i>Avaliação da exatidão do método de extração das espécies de Hg.....</i>	<i>112</i>
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	114
6.3.1	Otimização das condições instrumentais para a determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS	114

6.3.1.1	<i>Otimização da composição da fase móvel para a separação das espécies de Hg</i>	114
6.3.1.2	<i>Otimização da proporção de metanol e da vazão da fase móvel sobre as contagens e separação das espécies de Hg</i>	116
6.3.1.3	<i>Otimização da vazão de gás nebulizador e da potência de radiofrequência do instrumento de ICP-MS</i>	121
6.3.2	Otimização do processo de extração de espécies de Hg da amostra de borra oleosa	123
6.3.2.1	<i>Avaliação de diferentes soluções sobre a extração das espécies de Hg</i>	123
6.3.2.2	<i>Avaliação da massa de amostra e volume de solução extratora para extração das espécies de Hg</i>	127
6.3.2.3	<i>Avaliação do uso de solvente orgânico para o aumento do contato da amostra com a solução extratora sobre a extração das espécies de Hg</i>	129
6.3.2.4	<i>Aplicação de um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ para triagem dos fatores significativos na extração</i>	131
6.3.2.5	<i>Avaliação do efeito da solução de 2-mercaptoetanol na presença de L-cisteína sobre a extração e determinação de Hg^{2+}</i>	134
6.3.2.6	<i>Otimização dos fatores associados à extração aplicando planejamento Box-Behnken</i>	137
6.3.3	Análise de especiação química de Hg em amostras de borra oleosa	146
6.3.4	Avaliação da exatidão do método de extração das espécies de Hg	151
6.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	154
7	CONCLUSÕES FINAIS	155
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
	APÊNDICES	165

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos oleosos de petróleo, tais como lodos e borras oleosas, são provenientes da exploração e do processamento químico de petróleo. Esses resíduos são produzidos em grandes quantidades e são classificados como perigosos (LING; ISA, 2006). Normalmente, são gerados pela sedimentação de óleo, água e sólidos na parte inferior dos tanques de armazenamento. Devido à sua natureza, são considerados resíduos de grande preocupação ambiental e custos significativos estão associados ao descarte apropriado dos mesmos (AL-FUTAISI *et al.* 2007; KHALIL; ALGAMAL; SALEEM, 2018; WANG *et al.* 2017).

O mercúrio (Hg) é conhecidamente presente no petróleo em concentrações que variam de acordo com a origem geológica da produção de petróleo (MOJAMMAL *et al.* 2019). A toxicidade deste elemento depende, em grande parte, de sua forma química. Dentre as espécies, o metilmercúrio (CH_3Hg^+) é substancialmente mais tóxico que a espécie inorgânica (Hg^{2+}) (UBILLÚS *et al.* 2000). Sugere-se que a maior parte do Hg do petróleo e derivados está na forma particulada, seguido por Hg^{2+} dissolvido e Hg elementar. As espécies orgânicas (CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), quando presentes, estão em baixas concentrações nesses produtos (BLOOM, 2000; LIANG; HORVAT; DANILCHIK, 1996; RITGER; CURTIS; CHEN, 2018; WILHELM; BLOOM, 2000).

Para investigação das espécies de Hg, métodos de análise de especiação química e fracionamento são amplamente discutidos. Nesse aspecto, existem diversas técnicas de preparo de amostras e de análise instrumental aplicadas à determinação das espécies de Hg. Os processos mais usuais para fracionamento e análise de especiação de Hg baseiam-se na extração assistida por micro-ondas e ultrassom, em função da rapidez e redução no consumo de reagentes. Alternativamente, a extração com aquecimento convectivo, utilizando bloco digestor, é uma abordagem simples e de baixo custo, que também fornece condições satisfatórias para a determinação de Hg (FERREIRA *et al.* 2015).

Em relação aos métodos de determinação mais empregados na análise de especiação química, destaca-se o acoplamento da cromatografia à líquido com diferentes técnicas de detecção como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ou com a espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS), os quais garantem baixos limites de detecção para as

espécies determinadas (GAJDOSECHOVA *et al.* 2016; GAULIER *et al.* 2015; YUN *et al.* 2013).

No que concerne o fracionamento de Hg, a CV-AFS e espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV-AAS) têm sido utilizadas para a quantificação de espécies orgânicas e inorgânicas com redução seletiva de Hg^{2+} em Hg^0 usando um agente redutor. Esses métodos fornecem alta sensibilidade com relativo baixo custo de manutenção (CHEN; LAI; MAO, 2019).

Existem discussões significativas em relação à especiação de Hg em amostras de petróleo, principalmente no que se refere às espécies presentes na fração oleosa dessas amostras. Entretanto, no que concerne a especiação química e fracionamento destas espécies em sedimentos do petróleo provindos de tanques de armazenamento, poucas investigações têm sido realizadas (AVELLAN *et al.* 2018). A partir disso, mostra-se imprescindível a análise de especiação de Hg nestes resíduos para se ter um conhecimento das espécies presentes nas fases aquosa, oleosa e sólida, a fim de estabelecer estratégias adequadas para o tratamento e disposição final destes resíduos.

Convenientemente, ferramentas quimiométricas têm sido utilizadas para enriquecer os processos de otimização de experimentos e garantir uma melhor relação das variáveis durante estes processos. Nesse sentido, a metodologia de superfície de resposta (RSM) permite avaliar as condições experimentais por inspeção visual de superfícies gráficas geradas pela aplicação de planejamentos experimentais. Esse recurso fornece informações relevantes sobre a significância dos fatores sobre o processo de otimização, assim como exibe as condições ideais de trabalho de forma visualmente clara.

Em vista da demanda de desenvolvimento de métodos voltados para a análise de especiação de Hg em sedimentos oleosos de petróleo, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e avaliação de métodos de extração utilizando aquecimento convectivo e ultrassom para o fracionamento e análise de especiação química de Hg nessas matrizes. A otimização das condições experimentais foi efetuada aplicando-se a metodologia de superfície de resposta com matrizes Doehlert e Box-Behnken.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO

O petróleo bruto é submetido a diversos processos na indústria petrolífera e durante as etapas de extração, transporte, armazenamento e refino, são produzidos os resíduos oleosos de petróleo (XU *et al.* 2009). Estes resíduos podem ser provenientes da sedimentação do petróleo nos equipamentos utilizados na separação, transporte e tratamento, em tanques de armazenamento do óleo bruto e derivados e na separação água-óleo nas estações de tratamento de efluentes. A quantidade gerada depende da densidade e viscosidade do óleo, do método de armazenamento e da capacidade de refino. Estima-se que uma tonelada de resíduo oleoso seja gerada para cada 500 toneladas de petróleo bruto processado (BHATTACHARYYA; SHEKDAR, 2003; HU; LI; ZENG, 2013; KHALIL; ALGAMAL; SALEEM, 2018; KRIIPSALU; MARQUES; MAASTIK, 2008; WANG *et al.* 2017). Os resíduos de petróleo podem apresentar diferentes características de acordo com o conteúdo de água (30-50%), óleo (30-80%) e sólidos (halita, calcita, caolinita e quartzo) (10-20%) por massa (AL-FUTAISI *et al.* 2007; WANG *et al.* 2017; XU *et al.* 2009). Quanto à composição, essa mistura complexa contém componentes tóxicos como hidrocarbonetos saturados (40-60%), hidrocarbonetos aromáticos (25-40%), resinas (10-15%), asfaltenos (10-15%), metais e recalcitrantes, o que a torna um resíduo tóxico para a saúde e o meio ambiente, caso seu tratamento seja inadequado (BOJES; POPE, 2007; DA SILVA; ALVES; DE FRANCA, 2012; HEJAZI; HUSAIN; KHAN, 2003; HUANG *et al.* 2014; KHALIL; ALGAMAL; SALEEM, 2018; SHIE *et al.* 2004).

Particularmente, os hidrocarbonetos de petróleo (PHCs) e os metais são potenciais contaminantes presentes nos resíduos oleosos. A maioria dos metais tem efeito cumulativo no organismo e pode bioacumular na cadeia trófica (HU; LI; ZENG, 2013). Sugere-se que os metais estejam presentes em resíduos de petróleo na forma de compostos organometálicos e metaloporfirinas solúveis em óleo (ALI; ABBAS, 2006). Além disso, apesar da concentração variável dos metais de um resíduo para outro, os metais Pb, Zn, Ni, Cr e Cu podem estar em alta concentração nestes resíduos (MARIN *et al.* 2006).

O mercúrio está presente naturalmente em petróleo e derivados e, conseqüentemente, nos resíduos oleosos, onde são acumulados devido à sua deposição na superfície dos equipamentos de refino (WILHELM; BLOOM, 2000). A concentração de mercúrio nestes resíduos pode variar de acordo com a localização geológica de 0,1 ppb a 10 ppm (em massa). Essa quantidade de Hg é suficiente para colocar os resíduos oleosos de petróleo como um dos mais perigosos, tornando imprescindível a adoção de regras rígidas de disposição do mesmo (KRIIPSAU; MARQUES; MAASTIK, 2008; LIANG; HORVAT; DANILCHIK, 1996; MOJAMMAL *et al.* 2019; WILHELM; BLOOM, 2000). Devido à natureza recalcitrante dos resíduos oleosos, atribuída a presença de compostos complexos de alta massa molar tais como os asfaltenos, estima-se um alto custo no tratamento destes resíduos. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) apresentam efeito citotóxico, mutagênico e carcinogênico de preocupação não apenas ambiental como também de saúde pública (CERQUEIRA *et al.* 2014; UBANI; ATAGANA; THANTSHA, 2013). Estes compostos aliados a metais como Cd e Hg prejudicam tratamentos como biodegradação destes resíduos por processos enzimáticos, restringindo as alternativas de tratamento e disposição (BALDRIAN, 2004).

O acúmulo destes resíduos tem sido de grande preocupação para a indústria petrolífera, como consequência da significativa quantidade gerada anualmente e da redução da capacidade de armazenamento destes resíduos (AL-FUTAISI *et al.* 2007; JOHNSON; MADZLAN; KAMARUDDIN, 2015; LING; ISA, 2006). Nesse cenário, as indústrias têm o compromisso de promover a classificação e correta disposição dos resíduos, suportados pelas agências reguladoras (USEPA e CONAMA).

No Brasil, existem normas técnicas que são aplicadas para avaliar a composição dos resíduos oleosos e classificá-los de acordo com a periculosidade em relação ao meio ambiente. De acordo com a NBR ISO 10004 (ABNT, 2004), os resíduos oleosos de petróleo são classificados como perigosos (classe I) na presença de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), fenóis e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), os quais são os principais responsáveis por tornar este resíduo perigoso. A norma prevê um limite máximo de 0,5; 0,07; 100; e 2,0 mg L⁻¹ de benzeno, benzopireno, clorobenzeno e nitrobenzeno, respectivamente, nos extratos obtidos por ensaios de lixiviação. Esta norma também prevê a caracterização dos resíduos oleosos de petróleo através da medição de parâmetros que incluem pH; matéria sólida seca; fósforo total; nitrogênio total; carbono total; enxofre; metais e

semimetals (As, Pb, Cd, Co, Cu, Cr, Ni, Zn, V, Hg), preconizados por esta norma. Os limites máximos para As, Cd, Pb, Cr e Hg nos extratos obtidos por lixiviação são de 1,0; 0,5; 1,0; 5,0 e 0,1 mg L⁻¹ (ABNT, 2004).

Existem legislações específicas para o gerenciamento de resíduos no Brasil. Dentre estas, pode-se destacar a lei 12.305/2010 (BRASIL, 2010a), que estabelece a Política Nacional de Resíduos Sólidos que institui que os responsáveis por gerar o resíduo sólido devem desenvolver ações para o descarte apropriado dos mesmos. Além deste, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através da Resolução 313/2002 (CONAMA, 2002), institui que o setor industrial deva fornecer informações sobre a geração, características, armazenamento, transporte e disposição final dos resíduos sólidos, visando o controle dos resíduos gerados pelas indústrias.

A legislação brasileira prevê o limite máximo de 0,1 mg L⁻¹ de Hg em extratos lixiviados através da ABNT NBR 10005:2004, enquanto a legislação americana (US EPA) prevê um limite máximo de 0,2 mg L⁻¹ para este elemento. Entretanto, não há valores estabelecidos nas legislações em relação às diferentes espécies químicas deste elemento. Sob este ponto de vista, torna-se de extrema importância desenvolver estudos relacionados à análise de especiação química de Hg em resíduos sólidos oleosos, visto que espécies deste elemento podem contribuir para a toxicidade destes resíduos.

Diversos métodos de tratamento e disposição final destes resíduos foram desenvolvidos a fim de minimizar o impacto ambiental e viabilizar a reutilização deste resíduo para a produção de combustíveis. Apesar disso, ainda é difícil encontrar uma condição de compromisso entre cumprir a regulamentação ambiental rigorosa e a aplicação de tratamentos com custo acessível (MAZLOVA; MESHCHERYAKOV, 1999). Porém, alguns métodos de tratamento podem ter efeito de remoção de PHCs e apresentarem pouco efeito na remoção de metais (HU; LI; ZENG, 2013). Portanto, o tratamento de resíduos oleosos de petróleo é um desafio, e torna-se imprescindível o desenvolvimento de métodos para a análise, a fim de determinar a composição e planejar estratégias para o gerenciamento apropriado (DA SILVA; ALVES; DE FRANCA, 2012; HU; LI; ZENG, 2013; WANG *et al.* 2017).

2.2 ESPÉCIES DE MERCÚRIO

As espécies de Hg mais comumente presentes no ambiente e no ciclo biogeoquímico são o mercúrio elementar (Hg^0), o mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) e as espécies orgânicas metilmercúrio (CH_3Hg^+), dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Hg}^+$) e fenilmercúrio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$) (POPP; HANNA; KOELLENSPERGER, 2010). Estas espécies podem ser classificadas como voláteis (Hg^0 e $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), reativas (Hg^{2+} , CH_3Hg^+ e outros compostos organomercuriais) ou espécies não-reativas, representadas por $\text{Hg}(\text{CN})_2$ e HgS . Dentre estes grupos, as espécies reativas correspondem às formas químicas mais tóxicas. (ISSARO; ABI-GHANEM; BERMOND, 2009). No que diz respeito às espécies de Hg presentes no ambiente, diferentes espécies determinam a toxicidade, biodisponibilidade, metabolismo, transporte, persistência e ciclo bio-geoquímico (LEOPOLD; FOULKES; WORSFOLD, 2010). O mercúrio elementar (Hg^0) está presente no ar devido à sua alta volatilidade, enquanto Hg^{2+} está presente na crosta terrestre e nos oceanos, além de estar adsorvido em partículas em suspensão, sendo acumulado em sedimentos e solos. Dessa forma, as espécies de Hg de interesse em sedimentos e solos são tipicamente Hg^{2+} e CH_3Hg^+ . O Hg^{2+} é alvo de estudos para avaliar a mobilidade, já que tem a afinidade por diferentes ligantes (OH^- , Cl^- , S^{2-}) e CH_3Hg^+ para avaliação da toxicidade (COULIBALY *et al.* 2016; RAVICHANDRAN, 2004). No ambiente, o CH_3Hg^+ pode ser formado a partir de biometilação de Hg^{2+} por micro-organismos presentes em solos e sedimentos (TUTSCHKU; SCHANTZ; WISE, 2002).

Os sedimentos e solos têm a capacidade de captar mais metais e, por isso, são objetos de pesquisas sobre especiação de Hg, pois podem sofrer reações de metilação ou demetilação de Hg de acordo com a quantidade de matéria orgânica, concentração de Hg e pH. O Hg^{2+} é a espécie predominante em solos e sedimentos, enquanto a concentração de metilmercúrio em sedimentos pode ser relativamente baixa, dependendo das condições ambientais. Isto pode ocorrer devido à formação de complexos Hg-S, pela interação de Hg com grupos sulfeto em alta concentração, que passam a controlar a biodisponibilidade do Hg, inibindo a metilação devido à dificuldade de assimilação deste complexo pelas bactérias (COULIBALY *et al.* 2016). Quimicamente, segundo a classificação de Pearson, o Hg é um ácido macio com grande afinidade por bases moles, ligando-se facilmente a compostos contendo enxofre, por exemplo (MOUSAVI, 2015). No ambiente, solos e sedimentos, há uma

grande quantidade de matéria orgânica contendo S, formando espécies como HgS, que são altamente estáveis (SYSALOVÁ *et al.* 2017).

Assim, dependendo da fonte e das condições ambientais, o Hg pode ser transformado em diferentes formas com diferentes toxicidades. Nesse contexto, a determinação do Hg total é insuficiente para fornecer informações sobre a mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade deste elemento (ISSARO, ABI-GHANEM; BERMOND, 2009).

2.2.1 Toxicidade das espécies de Hg

O mercúrio é encontrado no ambiente devido a fontes naturais, assim como fontes antropogênicas, sendo considerado altamente tóxico, dependendo da sua forma química. Este elemento pode estar presente em rochas e minerais e liberado no ambiente para o meio aquático, ar e solo, além de estar presente naturalmente em combustíveis fósseis e carvão. Atividades antropogênicas como a queima de carvão, refino de óleo, atividades de mineração e indústrias de álcalis clorados contribuem para a emissão de mercúrio no ambiente. As principais formas de exposição ao mercúrio são oriundas do consumo de peixes com alta concentração de Hg e da exposição ocupacional (LINDQVIST *et al.* 1991).

Conhecido como precursor da doença de Minamata, o metilmercúrio é uma das espécies de mercúrio mais tóxicas devido à alta afinidade pelo tecido adiposo e a facilidade com que atravessa membranas biológicas (RAVICHANDRAN, 2004). Além disso, sugere-se que o CH_3Hg^+ é substancialmente mais tóxico que o Hg^{2+} (UBILLÚS, 2000). Este íon acumula-se em concentrações prejudiciais em organismos, biomagnificando-se na cadeia alimentar aquática para concentrações de relevância toxicológica (RAVICHANDRAN, 2004). O metilmercúrio se liga fortemente a grupos sulfidrila (-SH) em proteínas, justificando seu potencial toxicológico e bioacumulativo em organismos aquáticos altamente proteicos (MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000). A organização mundial da saúde classifica o metilmercúrio como um dos dez compostos mais nocivos à saúde pública (WHO, 2017). Em vista disso, para proteger a população da alta exposição a Hg através do consumo de peixes, a organização das nações unidas para a alimentação e a agricultura (FAO), em julho de 2018, criou novos limites para a quantidade de metilmercúrio em diferentes tipos de peixe, variando entre 1,2 a 1,7 mg kg⁻¹ (FAO, 2018).

Além do risco de contaminação humana por Hg através do consumo de peixes contaminados, a contaminação por Hg de populações em áreas próximas de campos de exploração de óleo tem sido investigada. Nesse contexto, foi observado um aumento na concentração de Hg na urina de mulheres que utilizavam água de superfície para afazeres domésticos e homens envolvidos com processo de limpeza e remediação de derramamento de óleo (WEBB, 2016). No organismo humano, baixas doses de Hg podem causar efeitos deletérios ao sistema nervoso, acarretando em perda de memória, déficit de atenção, distúrbio sensorial, distúrbio da função motora fina, redução da força muscular e prejuízo aos sistemas renal, cardiovascular e imunológico (ZAHIR *et al.* 2005).

2.2.2 Espécies de mercúrio em petróleo e derivados

Em hidrocarbonetos de petróleo, as espécies de Hg estão presentes tanto na fase orgânica quanto na fase sólida. Discute-se que do total de Hg presente, a maior quantidade seja de Hg associado a partículas sólidas em suspensão (Hg particulado), seguido pelo Hg^{2+} dissolvido, Hg^0 e espécies orgânicas (mono e dialquílicas) em concentrações sub-ppb. Neste caso, o Hg particulado está presente em óleo cru possivelmente na forma de HgS (BLOOM, 2000; FINSTER *et al.* 2015; GAJDOSECHOVA *et al.* 2016; LIANG; HORVAT; DANILCHIK, 1996; WILHELM; BLOOM, 2000). Além disso, a espécie Hg^{2+} também pode se ligar a tióis formando espécies $\text{Hg}(\text{SR})_x$ na fase oleosa (AVELLAN *et al.* 2018; CAI *et al.* 2018). Particularmente, o Hg^0 é pouco solúvel em óleo e hidrocarbonetos líquidos, sendo adsorvido em componentes metálicos de armazenamento do petróleo. Compostos de Hg orgânico dissolvidos são altamente solúveis em óleo e gás condensado, enquanto o Hg^{2+} iônico é solúvel em óleo e na fase aquosa, podendo ser adsorvido em partículas suspensas (WILHELM, 1999).

Assume-se que a maior parte do Hg total se concentre na fase mais pesada do óleo cru, na parte de sedimento de petróleo, que pode apresentar HgS e HgSe , insolúveis na fase aquosa e oleosa, em concentrações significativas. Além disso, essas espécies têm caráter inerte frente à aplicação de métodos de lixiviação com soluções levemente ácidas (WILHELM; LIANG; KIRCHGESSNER, 2006). No que diz respeito ao sedimento de petróleo, a especiação de Hg a nível de sólido mostrou que

a maior parte do Hg está presente na forma “*metacinnabar*” (β -HgS), mais especificamente (AVELLAN *et al.* 2018).

A determinação de espécies de Hg em solos contaminados por derramamento de Hg elementar e de petróleo mostrou que o Hg permanece detectável mesmo após décadas, predominantemente associado à matéria orgânica do solo (85%) e em menor extensão à fração mineral do solo (RENNEBERG; DUDAS, 2001). A partir disso, a análise de especiação de Hg é uma ferramenta crucial para propor soluções de remediação para Hg, tanto em casos de contaminação ambiental (RENNEBERG; DUDAS, 2001), como em casos de disposição final dos resíduos da indústria petrolífera (GAULIER *et al.* 2015).

Apesar de existirem estudos relacionados à análise de especiação de Hg em amostra de petróleo, em se tratando de borra oleosa e resíduos da indústria petrolífera, são necessários estudos investigativos mais aprofundados, que elucidem a distribuição dessas espécies na amostra. Assim, a análise de especiação de Hg é uma ferramenta crucial para propor soluções para a remoção de Hg de hidrocarbonetos (GAULIER *et al.* 2015).

2.3 FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO

Fracionamento é o processo de classificação de um analito ou um grupo de analitos de uma amostra de acordo com as propriedades físicas (tamanho, solubilidade) ou propriedades químicas (ligação, reatividade) (IUPAC). Sob esta ótica, o fracionamento das espécies de mercúrio pode considerar massa molar das espécies ou polaridade para avaliar a distribuição, gerando informações sobre a forma química de Hg na amostra (FINSTER, 2015; MARYUTINA; TIMERBAEV, 2017; RAHMAN *et al.* 2010). Nesse sentido, o fracionamento pode ser utilizado como uma aproximação da análise de especiação química, quando a instrumentação ou soluções padrões de todas as espécies forem indisponíveis (ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018).

Este direcionamento pode resultar na diferenciação de Hg inorgânico e Hg orgânico por três formas: (i) utilizando redutores seletivos para Hg inorgânico e Hg total para a determinação sequencial por geração de vapor frio e cálculo da concentração de Hg orgânico por diferença (SEGADE; TYSON, 2003; ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018); (ii) empregando métodos de extração específicos para cada espécie (SEGADE; BENDICHO, 1999); ou (iii) por determinação de Hg inorgânico e Hg total

antes e após o processo de digestão da amostra, respectivamente. Nesse aspecto, a digestão usualmente é feita com o uso de agentes oxidantes capazes de decompor as espécies orgânicas de Hg e pode ser assistida por micro-ondas ou ultrassom (ALMEIDA *et al.* 2016; ALONSO *et al.* 2008; ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018).

A vantagem do fracionamento consiste no emprego de métodos robustos, com menor custo operacional, que proporcionam alta sensibilidade e limites de detecção na faixa de ng g^{-1} (CARRASCO; DÍEZ; BAYONA, 2009). Na literatura estão relatados métodos de preparo de amostras e de análise para o fracionamento de mercúrio em amostras biológicas, sedimentos e solos, dentre outros tipos de matrizes, a fim de investigar a mobilidade e toxicidade das espécies nesses sistemas. As técnicas de determinação de AAS e AFS operadas com sistemas de geração de CV são as técnicas mais sensíveis e de fácil operação empregadas para a determinação de Hg total e Hg^{2+} . Aliado a isso, os efeitos de matriz são reduzidos devido ao alto fator de diluição da amostra nessas análises (CARRASCO; DÍEZ; BAYONA, 2009; GAO; LIU, 2011; LIANG; HORVAT; DANILCHIK, 1996; WILHELM; BLOOM, 2000).

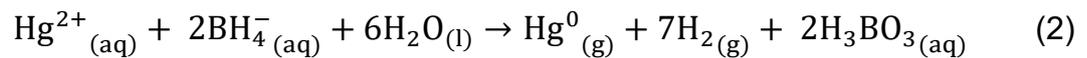
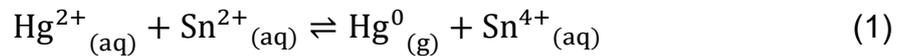
Em contrapartida, estes métodos podem fornecer apenas uma estimativa da quantidade de espécies orgânicas de Hg na amostra, visto que, em alguns casos, são medidas indiretamente, por diferença, sem emprego de uma solução padrão da espécie (ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018).

A análise por AAS ou AFS requer que o Hg contido na amostra após processo de extração ou digestão esteja na forma de Hg^{2+} . Isto é feito, normalmente, com o auxílio de um oxidante como $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (NIXON; MUSSMANN; MOYER, 1996; ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018), H_2O_2 (SHADE; HUDSON, 2005), KMnO_4 (ALMEIDA *et al.* 2016); (ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (PALMISANO; ZAMBONIN; CARDELLICCHIO, 1993) ou BrCl (CANÁRIO *et al.* 2017; SHI *et al.* 2005). Dessa forma, após a liberação da espécie Hg^{2+} ocorre a redução a Hg^0 com auxílio de um agente redutor (SnCl_2 ou NaBH_4) para que o Hg seja quantificado (CHEN; LAI; MAO, 2019).

O uso de SnCl_2 possibilita a redução eficaz de espécies Hg^{2+} a Hg^0 , durante a determinação de Hg^{2+} . Por outro lado, o agente redutor NaBH_4 tem potencial para reduzir tanto Hg^{2+} quanto CH_3Hg^+ em seu respectivo hidreto, para a determinação dessa espécie. Entretanto, em relação a determinação de CH_3Hg^+ , frequentemente, é necessária a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} para posterior geração do vapor e

determinação desta espécie (ALMEIDA *et al.* 2016; CAPELLO; LAVILLA; BENDICHO, 2000).

Os processos de redução empregando SnCl₂ e NaBH₄ estão mostrados nas Equações 1 e 2, respectivamente.



Existem diversos métodos de preparo de amostras para a determinação de espécies de Hg, considerando as especificidades deste elemento, tais como a volatilidade. Métodos baseados em extração assistida por micro-ondas (NEVADO *et al.* 2008; VAZQUEZ *et al.* 1997) e ultrassom (DENMARK *et al.* 2018; PARK *et al.* 2011) são os mais citados quanto à rapidez e eficiência. O uso de aquecimento convectivo em blocos digestores é uma alternativa simples e de baixo custo que, quando operado em sistema fechado, também fornece condições satisfatórias para preparo de amostras e posterior determinação de mercúrio (FERREIRA *et al.* 2015). É importante assegurar nesta etapa a estabilidade das espécies de modo a evitar a conversão entre as espécies durante o preparo da amostra. Normalmente, durante a otimização desses métodos, diferentes parâmetros envolvidos com a extração são investigados, por exemplo, a concentração da solução a ser utilizada como extrator, massa de amostra, temperatura e tempo de extração (JAGTAP *et al.* 2011; RAHMAN; KINGSTON, 2005).

A solução extratora deve ser cuidadosamente escolhida para contato efetivo entre o analito e a matriz da amostra de modo a favorecer a extração sem a conversão das espécies (MELLO *et al.* 2012). Soluções ácidas ou alcalinas como HCl, HNO₃, KOH e TMAH são as mais empregadas para a extração de espécies de Hg (DENMARK *et al.* 2018; ISSARO; ABI-GHANEM; BERMOND, 2009; JAGTAP; MAHER, 2015; JIMÉNEZ-MORENO *et al.* 2018; MARGETINOVA; HOUSEROVA-PELCOVA; KUBAN, 2008).

Na Tabela 1 estão mostrados alguns métodos de extração e de análise utilizados para o fracionamento de Hg.

Tabela 1. Métodos aplicados para o fracionamento de Hg em amostras diversas.

Espécies de Hg	Amostra	Soluções e preparo de amostra	Método analítico	LOD	Referência
Hg total Hg-inorg. Hg-org. (por diferença)	Água lacustre	Digestão online (HCl 4 mol L ⁻¹ , 50 mmol L ⁻¹ de Na ₂ S e KMnO ₄ 1%) Hg total (KMnO ₄ 1%) Hg ²⁺	FIA-CV-AFS	3,0 ng L ⁻¹	(ZHANG, 2018)
Hg total CH ₃ Hg ⁺	Água do mar	Não especificado	CV-AFS (BrCl e SnCl ₂) Hg total GC-CV-AFS (CH ₃ Hg ⁺)	0,10 ng L ⁻¹ (Hg total) e 0,02 ng L ⁻¹ (CH ₃ Hg ⁺)	CANÁRIO, 2017
Hg total, Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ (por diferença)	Solo, sedimento	Hg total (digestão com KMnO ₄) Extração em banho a 60°C por 30 min Com solução Universol® (Hg ²⁺)	CV-AAS NaBH ₄	0,07 mg kg ⁻¹ (Hg total) e 0,08 mg kg ⁻¹ (Hg ²⁺)	(ALMEIDA, 2016)
Hg total, Hg-H ₂ O, Hg-ácido, Hg-org., Hg ₀ , Hg-S	Sedimento, solo e água	Extração sequencial: água, CH ₃ COOH 0,1 mol L ⁻¹ + HCl 0,01 mol L ⁻¹ , KOH 1 mol L ⁻¹ , HNO ₃ 12 mol L ⁻¹ , água régia	CV-AFS (BrCl) Hg total e frações de Hg)	Não informado	(SHI, 2005)
Hg total, Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ (por diferença)	Frutos do mar	Digestão assistida por micro-ondas (Hg total) Extração assistida por micro-ondas com HNO ₃ 4 mol L ⁻¹ (45°C por 28 min) e sonicação por 5 min (Hg ²⁺)	FI-CV-AAS e FI-CV-ETAAS (NaBH ₄)	10 ng L ⁻¹ (CV-AAS) e 6 ng L ⁻¹ (CV-ETAAS)	(ALONSO, 2008)
Hg total, Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ (por diferença)	Amostras biológicas e sedimentos	Extração assistida por micro-ondas (60 W por 3 min) com TMAH 25% m/v ou 6 mol L ⁻¹ de HCl	FI-CV-AAS (NaBH ₄)	3,9 ng L ⁻¹ (Hg ²⁺) 24 ng L ⁻¹ (Hg total)	(SEGADE, 2003)

Tabela 1. Continuação.

Espécies de Hg	Amostra	Soluções e preparo de amostra	Método analítico	LOD	Referência
Hg total, Hg ²⁺ , CH ₃ Hg ⁺ (por diferença)	CRM de amostra Biológica	Digestão assistida por micro-ondas (Hg total), TMAH 25% m/v (Hg ²⁺)	CV-AAS (NaBH ₄)	0,02 µg g ⁻¹ (Hg ²⁺) e 0,04 µg g ⁻¹ (Hg total)	(TORRES, 2009)

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Como evidenciado (Tabela 1), as técnicas analíticas CV-AAS e CV-AFS permitem avaliar a presença de espécies inorgânicas ou orgânicas de Hg. Nesse contexto, parece favorável o uso destas para avaliar o fracionamento de Hg em amostra de petróleo e resíduos dessa natureza. Inerente a isso, o grande desafio do fracionamento e análise de especiação nessas matrizes é devido à complexa mistura de hidrocarbonetos e compostos orgânicos, caracterizada por matriz heterogênea com alta viscosidade e difícil de ser digerida, incompatível com muitos métodos analíticos (FINSTER *et al.* 2015; RAHMAN *et al.* 2010). Em vista da falta de trabalhos na literatura sobre fracionamento de Hg em resíduos oleosos de petróleo utilizando as técnicas mencionadas (CV-AAS e CV-AFS), é de grande valia o desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes para a extração de espécies e fracionamento do Hg nestes resíduos.

2.4 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA

A especiação química é definida como a distribuição de um elemento entre espécies químicas definidas em um sistema. Especificamente, a análise de especiação química é a atividade analítica utilizada para a identificação e/ou medição das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra (IUPAC).

A análise de especiação química de um elemento tornou-se uma questão importante em diversas áreas de pesquisa, incluindo química verde, ecotoxicologia, toxicologia clínica, ciências médicas e nutricionais, indústrias de alimentos e petroquímica, pois a toxicidade e a reatividade dos elementos dependem fortemente da sua forma química (LEERMAKERS *et al.* 2005).

As principais etapas da análise de especiação química envolvem a coleta da amostra, o pré-tratamento da amostra e a preservação, a extração das espécies de interesse a partir da matriz da amostra, a purificação e pré-concentração (derivatização), quando necessárias, a separação das espécies de interesse e a detecção e quantificação das espécies. A etapa de extração é um dos passos mais críticos na análise de especiação, pois pode-se obter baixa eficiência de extração da espécie de interesse, além de ocorrer interconversão de espécies durante essa etapa, caso o método de extração não seja apropriado (LEERMAKERS *et al.* 2005). A etapa de extração de espécies pode ser feita utilizando uma extração seletiva ou única (uma etapa de extração para espécies específicas do elemento) ou uma extração sequencial (consecutivas etapas de extração para um grupo de espécies com características semelhantes) utilizando diversos solventes (ISSARO ABI-GHANEM, C.; BERMOND, 2009; MICHALKE, 2003). Os métodos de extração usados para o preparo da amostra em análise de especiação química de Hg baseiam-se nos mesmos métodos utilizados para o fracionamento de Hg, reportados na seção 2.3. Além disso, alguns métodos permitem pré-concentrar as espécies aplicando-se microextração em fase sólida e extração com solvente para melhorar os limites de detecção (LOD) (TSENG *et al.* 1997).

Com o aumento da demanda pela identificação de espécies químicas de um elemento a fim de avaliar a biodisponibilidade e toxicidade em diferentes matrizes, algumas técnicas foram acopladas para aprimorar a identificação e quantificação dessas espécies.

Os principais métodos mencionados na literatura para a análise de especiação química baseiam-se em técnicas cromatográficas e não-cromatográficas acopladas a detectores de alta sensibilidade. As técnicas cromatográficas continuam sendo as mais empregadas e abrangem o acoplamento de cromatografia a líquido a detectores como AFS, ICP-OES e ICP-MS, assim como a cromatografia a gás que é utilizada para espécies voláteis (WU; SUN, 2016).

Uma das características da cromatografia a líquido é a versatilidade associada ao uso de diferentes fases móveis (eluente) e fases estacionárias para a separação das espécies de interesse. Ambas devem atender aos requisitos de assegurar a estabilidade das espécies e proporcionar a separação eficiente durante a análise (MICHALKE, 2003). O mecanismo de separação mais utilizado na cromatografia a líquido para a análise de especiação química de Hg é a cromatografia em fase reversa

(colunas C₈ e C₁₈). Nessa técnica são aplicados, normalmente, dois eluentes diferentes, com pelo menos um deles contendo um solvente orgânico atentando-se para o controle do pH da fase móvel a fim de evitar hidrólise da fase estacionária. As desvantagens do uso de solventes orgânicos no acoplamento com detectores de alta sensibilidade como ICP-MS são a redução da energia do plasma, o surgimento de interferências poliatômicas causadas pelo excesso de carbono interagindo com os íons do plasma e a deposição de carbono nos cones (MICHALKE, 2003; SUTTON; SUTTON; CARUSO, 1997).

Utilizada para a separação de espécies voláteis, a cromatografia a gás (GC) tem a vantagem de transferir o analito na fase gás diretamente para o ICP-MS sem a necessidade de um sistema de nebulização para a introdução da amostra, melhorando os limites de detecção. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados como a temperatura da linha de transferência que deve estar numa temperatura compatível com a estabilidade do analito a fim de evitar perda dos analitos voláteis por condensação. Outro fator é a morosidade do processo de derivatização para tornar o analito mais volátil, o qual pode ser pouco seletivo (QUEVAUVILLER; MAIER; GRIEPNK, 1996).

No que concerne às técnicas não-cromatográficas, a eletroforese capilar (CE), a geração de hidretos (HG) e a geração de vapor frio (CV) acopladas a detectores como ICP OES, AFS e ICP-MS podem ser utilizadas para a análise de especiação química (WU; SUN, 2016).

A utilização de ICP-MS em análise de especiação química é vantajosa por ser uma técnica de grande versatilidade. É possível obter baixos limites de detecção, atua em uma ampla faixa dinâmica e permite acoplamento com outras técnicas como a cromatografia a líquido (MICHALKE, 2003).

A aplicação de ICP-MS, individualmente, permite a determinação da concentração total de um elemento, sem fornecer informações sobre o estado de oxidação e ligação do elemento com moléculas orgânicas. Por outro lado, o acoplamento de ICP-MS com a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) permite que espécies individuais de um elemento sejam identificadas através da determinação do tempo de retenção das espécies e o uso de padrões das espécies químicas do analito. Nestas circunstâncias, o método de extração deve garantir a estabilidade das espécies, impedindo que as espécies sofram interconversão (KROUKAMP; WONDIMU; FORBES, 2016; MICHALKE, 2003).

Com a vantagem de fornecer maiores informações sobre as espécies moleculares de um elemento presentes na amostra, a análise de especiação química pode ser feita em um sistema *online*, pelo emprego simultâneo da cromatografia a líquido com os sistemas de detecção por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) e com ICP-MS. Este sistema fornece a informação molecular necessária para identificar espécies que geram picos desconhecidos encontrados na análise por HPLC-ICP-MS. Esse arranjo instrumental permite a detecção de espécies conhecidas por HPLC-ICP-MS através do uso de padrões das espécies, enquanto a ESI-MS é utilizada para fornecer informações necessárias para identificar compostos desconhecidos do elemento sem a necessidade de utilização de padrões. Dessa forma, os picos desconhecidos obtidos por HPLC-ICP-MS podem ser identificados por ESI-MS (FELDMANN, 2005).

A verificação da exatidão inerente a métodos de análise de especiação química é dificultada pela baixa disponibilidade de materiais de referência certificados que contenham todas as espécies de interesse e que apresentem matriz similar à amostra em análise. Sabendo desta dificuldade, o material de referência de matriz similar pode ser fortificado com a espécie de interesse antes da extração para verificar a exatidão do método. Quando nenhuma outra ferramenta está disponível, testes de adição e recuperação nas amostras costumam ser uma alternativa (IBÁÑEZ-PALOMINO; LOPEZ-SANCHEZ; SAHUQUILLO, 2012).

2.4.1 Análise de especiação química de mercúrio

A análise de especiação química de Hg utilizando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa tem sido amplamente utilizada para as mais diversas amostras. Apesar de ser um método oneroso, garante uma excelente identificação e quantificação das espécies de Hg presentes na amostra, utilizando soluções padrões. Para isso, é preciso que o tratamento da amostra também seja adequado para a quantificação das espécies. Portanto, costuma-se otimizar o método de extração que garanta eficaz extração das espécies em estudo, sem perda ou conversão.

Normalmente, além das soluções ácidas e básicas mencionadas no item 2.3, para a extração das espécies de Hg na análise de especiação química, solventes orgânicos (metanol, tolueno) e solventes contendo grupos sulfidríla, dentre os quais

se destacam o 2-mercaptoetanol e L-cisteína (KRUG; ROCHA, 2016, p 521; TSENG *et al.* 1997) são amplamente utilizados. No que concerne as principais fases móveis utilizadas em LC para a separação das espécies de Hg, soluções compostas por 2-mercaptoetanol (YAO *et al.* 2017), L-cisteína (RAI; MAHER; KIRKOWA, 2002) e acetato de amônio (CATTANI *et al.* 2008; LIU *et al.* 2018) são as mais utilizadas com colunas de separação em fase reversa C₈ e C₁₈ (JAGTAP; MAHER, 2015). Além de prevenir o efeito de memória, estes compostos impedem a adsorção das espécies de Hg através da formação de complexos neutros que são eluídos mais facilmente da coluna cromatográfica (JAGTAP; MAHER, 2015; RAI; MAHER; KIRKOWA, 2002). Ambas colunas cromatográficas garantem uma boa separação das espécies, entretanto, as colunas C₈ garantem uma análise mais rápida do que as colunas C₁₈, devido à menor interação das espécies de Hg com a fase estacionária (JAGTAP; MAHER, 2015). Complementarmente à composição da fase móvel, uma certa proporção de metanol (até 8%) é normalmente empregada para melhorar a sensibilidade e a separação das espécies nas análises por HPLC-ICP-MS (LIN; CHANG; JIANG, 2008).

Os agentes complexantes L-cisteína e 2-mercaptoetanol são os mais utilizados em métodos de especiação cromatográficos e na extração de espécies de Hg, por garantirem um pH adequado e possuírem uma alta afinidade pelas espécies. Nesse quesito, esses compostos possuem algumas particularidades que influenciam na separação utilizando colunas C₈ e C₁₈. Quando a concentração de 2-mercaptoetanol é elevada na composição da fase móvel, o tempo de retenção das espécies de Hg na coluna de separação aumenta (CHIOU; JIANG; DANADURAI, 2001). Quando se aumenta a concentração de L-cisteína na fase móvel, ocorre redução do tempo de retenção das espécies de Hg na coluna, diminuindo o tempo de análise (SOUZA *et al.* 2010). No que concerne aos efeitos de retenção, os complexos de 2-mercaptoetanol com as espécies de Hg são neutros e interagem fortemente com a coluna de fase reversa; já os complexos de L-cisteína têm uma carga líquida positiva que possui menor afinidade com a fase reversa. A partir das características específicas destes complexantes, testes de otimização são normalmente efetuados para garantir adequada separação das espécies com satisfatória sensibilidade e seletividade e um apropriado tempo de análise (JAGTAP *et al.* 2011).

Esses reagentes têm sido usados amplamente para extração das espécies de Hg aplicando-se diferentes métodos, como extração assistida por micro-ondas e

ultrassom, e para a separação das espécies por HPLC. Na Tabela 2 são mostrados alguns dos solventes e métodos baseados em cromatografia a líquido, utilizados na análise de especificação de Hg em amostras diversas.

Tabela 2. Aplicação de métodos para a análise de especificação química de mercúrio em diferentes matrizes.

Espécies de Hg	Amostra	Métodos e solventes extratores	Métodos de determinação	LOD	Ref.
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₃ H ⁺	Frutos do mar	Extração ultrassom (15 min) HCl 0,10% v/v + L-cisteína 0,05% m/v + 2-mercaptoetanol 0,10% v/v	LC-ICP-MS Coluna C ₈ FM: 0,05% v/v 2-mercaptoetanol 0,4% m/v L-cisteína 0,06 mol L ⁻¹ acetato de amônio Vazão: 1,0 ml min ⁻¹	0,1 a 0,25 ng g ⁻¹	(BATISTA, 2011)
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺	Tecido muscular de peixe e sedimento	Extração micro-ondas (120°C por 15 min) 2-mercaptoetanol 0,5%	HPLC-ICP-MS Coluna C ₈ FM: 0,5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 5% (v/v) metanol Vazão: 1,5 mL min ⁻¹	0,01 µg g ⁻¹ (LOQ)	(JAGTAP, 2011)
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₃ H ⁺ C ₆ H ₅ H ⁺	Sedimento	Extração micro-ondas (500W, 45°C por 10 min) HCl 3,0 mol L ⁻¹ + ácido cítrico 0,2 mol L ⁻¹ + metanol 50% (v/v)	HPLC-CV AFS Coluna C ₁₈ FM: metanol 65%/35% H ₂ O Vazão: 0,8 mL min ⁻¹	0,8 a 4,3 µg L ⁻¹	(MARGETI NOVA, 2008)
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺	Solo	Extração ultrassom (45 min) HCl 7,6% (m/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v)	HPLC-ICP-MS Coluna C ₁₈ FM: NH ₄ CH ₃ CO ₂ 0,06mol L ⁻¹ , 0,1% 2-mercaptoetanol, 3% (v/v) metanol Vazão: 0,35 mL min ⁻¹	LOD < 15 ng L ⁻¹	(CATTANI, 2008)

Tabela 2. Continuação.

Espécies de Hg	Amostra	Métodos e solventes extratores	Métodos de determinação	LOD	Ref.
CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₃ Hg ⁺	Sedimento o marinho	Extração ultrassom (70 °C, 30 min) TMAH 25% (m/v)	HPLC-CV-AFS Coluna C ₁₈ FM: 60 mmol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ CO ₂ , 0,1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 5% (v/v) metanol Vazão: 0,4 ml min ⁻¹	125 a 250 ng kg ⁻¹	(GAO, 2011)
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₃ Hg ⁺	Pepino do mar	Extração ultrassom (30 min) 0,10% HCl (v/v), 0,12% L-cisteína (m/v) e 0,10% 2- mercaptoetanol (v/v)	HPLC-ICP-MS FM: 92% (0,12% L- cisteína (m/v) + 0,01 mol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ CO ₂ 8% metanol Vazão: 0.8 mL min ⁻¹	1,6 a 4,0 ng g ⁻¹	(LIU, 2018)
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₃ Hg ⁺	Plasma sanguíneo	Extração ultrassom (15 min) HCl 0,10% (m/v) + L- cisteína 0,05% (m/v) + 2-mercaptoetanol 0,10% (v/v)	LC-CV-ICP-MS Coluna C ₈ FM: 97% (0,5% v/v 2- mercaptoetanol + 0,05% v/v ácido fórmico) 3% v/v metanol Vazão: 1,2 mL min ⁻¹	4 a 12 ng L ⁻¹	(SOUZA, 2013)
Hg ⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₅ Hg ⁺ Hg ²⁺	Água	Pré-concentração com 3-mercapto-1- propanossulfonato de sódio, 2- mercaptoetanol 3% (v/v).	HPLC-ICP-MS Coluna C ₁₈ FM: 0,5% (v/v) 2- mercaptoetanol Vazão: 1,5 mL min ⁻¹	0,009 a 0,016 ng L ⁻¹	(CHENG, 2014)
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₅ Hg ⁺	Óleo de peixe	Extração micro- ondas (60°C por 5 min) 0,6% v/v de 2- mercaptoetanol, 3% v/v metanol, 1% m/v lipase, 2% v/v triton X-100 e 1% v/v HNO ₃	HPLC-ICP-MS Coluna C ₈ FM: 0,6% v/v de 2- mercaptoetanol, 3% v/v metanol Vazão: 1,5 mL min ⁻¹	0,5–1 ng g ⁻¹	(YAO, 2017)

Tabela 2. Continuação.

Espécies de Hg	Amostra	Métodos e solventes extratores	Métodos de determinação	LOD	Ref.
Hg ²⁺ CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₅ Hg ⁺	Petróleo	Método EPA 3200 Extração micro-ondas (100°C por 10 min) HNO ₃ 4,0 mol L ⁻¹	Método EPA 6800 (SIDMS) HPLC-ICP-MS Coluna C ₁₈ FM: 50 mmol L ⁻¹ piridina, 0,5% (m/v) L-cisteína, 5% (v/v) metanol Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	Não informado	(RAHMAN, 2010)
CH ₃ Hg ⁺ C ₂ H ₅ Hg ⁺	Petróleo	Extração assistida por micro-ondas (60W por 5 min) TMAH 25% (m/v)	HPLC-CV-AFS Coluna C ₁₈ FM: 1g L ⁻¹ de L-cisteína e 0,06 mol L ⁻¹ de NH ₄ CH ₃ CO ₂ Vazão: 1 mL min ⁻¹	0,515 ng g ⁻¹	(YUN, 2013)

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Existem discussões sobre a tipificação das espécies de Hg presentes em petróleo e derivados. Essas discussões focaram no emprego de técnicas cromatográficas e espectrométricas para identificação e quantificação de espécies iônicas como Hg²⁺, CH₃Hg⁺ e CH₃CH₂Hg⁺, utilizando padrões. As mais variadas concentrações dessas espécies têm sido obtidas, em vista das diferentes origens (etapas do processo ou mesmo localização geográfica) (BLOOM, 2000; GAJDOSECHOVA *et al.* 2016; PONTES *et al.* 2014; RAHMAN *et al.* 2010; WILHELM; BLOOM, 2000; YUN *et al.* 2013).

A investigação de espécies não extraídas da fração sólida das amostras tem evoluído para uso de técnicas de espectroscopia de raios X e microscopia eletrônica (AVELLAN *et al.* 2018; GAULIER *et al.* 2015). Essas técnicas fornecem informações relevantes sobre a natureza das espécies de Hg a nível de partícula. As discussões acerca destas pesquisas mostram que grande parte do Hg total presente nas amostras de petróleo e sedimentos oleosos está na forma de HgS particulado em dimensões menores que 10 µm (AVELLAN *et al.* 2018; GAJDOSECHOVA *et al.* 2016; GAULIER *et al.* 2015).

Embora existam discussões significativas na literatura sobre a quantificação de espécies de Hg em petróleo e derivados, não há discussões bem definidas sobre métodos para a especiação de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo como borras e lodos, apesar de uma certa paridade entre a composição destas matrizes.

Inicialmente, Avellan *et al.* (2018) investigaram a especiação de Hg em amostras de sedimentos de petróleo em tanques de armazenamento e subprodutos da cadeia de processamento nas refinarias, utilizando técnicas de espectroscopia de absorção de raios X e microscopia eletrônica. Especificamente, essa investigação foi feita a nível de fração sólida dos sedimentos. Os autores observaram que a espécie predominante nos sólidos analisados *metacinnabar* (β -HgS), com diâmetros de partícula menores que 100 nm.

A partir disso, torna-se imprescindível uma investigação das espécies presentes tanto na fase oleosa como no sólido dos resíduos de petróleo provindos de tanque de armazenamento, para desenvolver estratégias de gerenciamentos destes resíduos na cadeia de processos da indústria do petróleo.

2.5 USO DE PLANEJAMENTO MULTIVARIADO PARA A OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

O uso de ferramentas quimiométricas para a otimização multivariada de experimentos tem sido frequentemente reportado (FAKHRI, 2008; SILVA *et al.* 2019; UZUN; ŞAHAN, 2017). Nesse sentido, essas ferramentas permitem avaliar diferentes fatores ou variáveis independentes, em diferentes níveis, simultaneamente, fornecendo respostas acerca das interações entre todas as variáveis independentes (BEZERRA *et al.* 2008).

Os planejamentos fatoriais, os quais são estudados em dois níveis, são normalmente aplicados no processo de triagem, para avaliar a significância dos fatores sob investigação. Esse tipo de planejamento de experimentos é representado por uma função de primeira ordem. Por outro lado, quando o objetivo é proceder a otimização dos experimentos utilizando superfície de resposta, modelos de segunda ordem são requeridos (FERREIRA *et al.* 2007).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica multivariada aplicada com muita eficiência para otimização de experimentos. Esta técnica compreende a aplicação de planejamentos experimentais com diferentes matrizes,

escolhidas de acordo com a necessidade e o número de fatores a serem avaliados. A matriz de experimentos está associada a um modelo matemático empírico, caracterizado por uma curvatura que abrange o domínio experimental, representado por uma função matemática com coeficientes pré-definidos. Nesse caso, para descrever o comportamento dos dados experimentais e avaliar se o modelo é válido para as condições experimentais aplicadas, procede-se o ajuste da função matemática aos valores experimentais obtidos para estimar os coeficientes ajustados que modelam a superfície de resposta obtida. É relevante que, para a aplicação eficiente da técnica RSM, sejam aplicadas matrizes de experimentos que garantam o ajuste de uma função de segunda ordem. Portanto, os fatores devem ser estudados em no mínimo três níveis para que os dados experimentais se ajustem ao modelo quadrático e descrevam corretamente o comportamento dos dados experimentais. Para isso, normalmente se empregam os planejamentos Box-Behnken, Doehlert e composto central. Dentre estes, os planejamentos de experimentos Box-Behnken e Doehlert são os mais usados, permitindo a avaliação de dois ou mais fatores em no mínimo três níveis, favorecendo a modelagem com curvatura (BEZERRA *et al.* 2008).

Fundamentalmente, os modelos empíricos são representados pela função de segunda ordem, mostrada na Equação 3, na qual \hat{y} é a resposta, x_i são os fatores, k é o número de fatores, β_0 é o termo constante, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes do parâmetro linear, quadrático e de interação, respectivamente e ε é o resíduo.

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Para descrever o comportamento dos dados experimentais obtidos, ajustados com a função matemática, utiliza-se a análise de variância (ANOVA). Empregando esta ferramenta estatística, avalia-se a significância dos fatores, a relação entre os fatores e as respostas e o ajuste do modelo.

No que concerne à investigação de múltiplas respostas e a otimização de uma condição de compromisso que satisfaça a todas, a função desejabilidade, pode ser utilizada para maximização dos resultados. Essa função permite calcular as desejabilidades individuais das respostas de cada experimento, conferindo pesos de 0 para as respostas indesejáveis e 1 para as respostas desejáveis. A partir disso,

calcula-se a desejabilidade global, definindo-se uma condição adequada às respostas avaliadas (PEREIRA FILHO, 2017, p 75).

3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver e avaliar criticamente estratégias de extração das espécies de mercúrio em resíduos oleosos de petróleo para posterior fracionamento e análise de especiação química, utilizando as técnicas de espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CV-AFS) e cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (HPLC-ICP-MS), respectivamente.

4 FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO UTILIZANDO EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Neste capítulo, foram abordados os estudos preliminares relacionados à extração de espécies inorgânicas e orgânicas de Hg das amostras de resíduos oleosos utilizando aquecimento por micro-ondas para o fracionamento de mercúrio. Primeiramente, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} foi avaliada com as soluções de HNO_3 e HCl , em diferentes concentrações e potências de micro-ondas. Simultaneamente, o efeito de permanganato de potássio e cloridrato de hidroxilamina foram avaliados em relação à determinação de Hg^{2+} por espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS). Posteriormente, a adequação do método foi verificada pela análise de materiais certificados sob as condições de mínima conversão de espécies CH_3Hg^+ em Hg^{2+} . Os resultados apresentados neste capítulo serviram como base para os estudos de fracionamento de mercúrio apresentados no Capítulo 2.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} em processo de extração assistida por micro-ondas utilizando soluções de HNO_3 e HCl .
- Avaliar o efeito de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ na determinação de Hg^{2+} por CV-AFS.
- Verificar a adequação dos métodos de extração assistida por micro-ondas com as soluções de HNO_3 e HCl , utilizando amostras certificadas TORT-2 e DOLT-4 com valores certificados para Hg total e CH_3Hg^+ .
- Avaliar a extração das espécies inorgânicas e orgânicas de Hg nas amostras de resíduos oleosos de petróleo utilizando extração assistida por micro-ondas.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Instrumentação

As amostras foram pesadas em balança analítica M 254Ai (Bel Engineering, Milão, Itália). Para a digestão e a extração das espécies de Hg foi utilizado forno de micro-ondas MLS 1200 (Mega, Milestone, Bergamo, Itália) com controle de potência e tempo, com seis posições para frascos de PTFE ou PFA. Uma centrífuga (Quimis, São Paulo) foi utilizada para a centrifugação dos extratos.

Para a determinação de Hg total e Hg^{2+} por CV-AFS, um espectrômetro de fluorescência atômica com vapor frio Mercur Duo Plus (Analytik Jena, Jena, Alemanha), utilizando uma lâmpada de baixa pressão de Hg, operado no comprimento de onda de 253,7 nm e com detecção no ângulo de 90°C com o feixe incidente, foi utilizado.

4.2.2 Amostras e reagentes

Os materiais de referência certificados (CRM) TORT-2 hepatopâncreas de lagosta (National Research Council (NRC), Ottawa, Canadá) e DOLT-4 fígado de peixe (NRC) com valores certificados para Hg total e CH_3Hg^+ foram utilizados para avaliar a adequação do método de extração com aquecimento por micro-ondas. As amostras de resíduos oleosos de petróleo foram obtidas em parceria com a indústria de petróleo. Os reagentes utilizados para a digestão e a extração foram H_2O_2 30% (Vetec, Rio de Janeiro), HNO_3 65% e HCl 37% (Merck, São Paulo). Os ácidos foram bidestilados abaixo do ponto de ebulição utilizando um sistema de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) e a água foi deionizada e purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), para resistividade final de 18,2 $\text{M}\Omega$ cm para o preparo das soluções.

Para a geração do vapor atômico de mercúrio, a solução do agente redutor SnCl_2 3% (m/v), preparada a partir de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), em meio de HCl 0,36 mol L^{-1} e a solução de HCl 0,36 mol L^{-1} foram utilizadas. As soluções da amostra e dos reagentes (SnCl_2 e HCl), foram aspiradas descontinuamente em um sistema em fluxo a uma vazão de 8,0 mL min^{-1} e 2,0 mL min^{-1} , respectivamente, e argônio com 99,997% de pureza (White Martins, São Paulo)

foi utilizado como gás carreador na vazão de 10 L h⁻¹. Para a medição da concentração de Hg²⁺ nas amostras adicionou-se às soluções de calibração e da amostra diluída as soluções 0,05% (m/v) de KMnO₄ (Merck, Rio de Janeiro) e 0,025% (m/v) de NH₂OH.HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) antes das medições. A solução padrão de Hg²⁺ foi preparada a partir de uma solução padrão de Hg (Specsol, São Paulo), a qual foi utilizada para o preparo da curva de calibração na faixa de 0,05 a 1 µg L⁻¹, e a solução de CH₃Hg⁺ a partir do cloreto de metilmercúrio 95% (Alfa Aesar, Massachusetts, EUA), preparado com cuidado rigoroso. Cabe destacar que o metilmercúrio é altamente tóxico e seu preparo foi feito utilizando luvas e máscara especiais para materiais tóxicos, sendo manipulado em capela de exaustão. O descarte dos resíduos foi feito em recipientes especiais para mercúrio e os resíduos foram coletados pelo Departamento de Gestão de Resíduos Sólidos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para tratamento apropriado.

4.2.3 Procedimento experimental

Para a investigação das variáveis envolvidas na extração das espécies de Hg utilizando extração assistida por micro-ondas a concentração da solução e a potência de micro-ondas foram avaliadas. Inicialmente, para investigar o efeito indesejável de conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺, as soluções de HNO₃ 4,0 mol L⁻¹ (RAHMAN; KINGSTON, 2005) ou HCl (em diferentes concentrações) foram avaliadas aplicando-se diferentes potências de micro-ondas (100 a 700 W). Durante os experimentos, as soluções padrão de CH₃Hg⁺ na concentração de 100 µg L⁻¹ foram submetidas à irradiação com micro-ondas nas diferentes potências pelo período de 10 min, utilizando-se 10 mL da solução de ácido. Este estudo foi feito para avaliar a maior potência de irradiação que poderia ser utilizada na extração sem que ocorresse conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺. Após o programa de extração, as soluções foram diluídas para 1,0 µg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ e analisadas por CV-AFS para a determinação da intensidade de fluorescência integrada da espécie Hg²⁺. Cabe destacar que por esta técnica não é possível determinar a espécie CH₃Hg⁺ diretamente; por isso, foi monitorada a intensidade de Hg²⁺ gerada pela conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺. Adicionalmente, as soluções padrão foram analisadas com e sem a adição de KMnO₄ e NH₂OH.HCl. Para isso, durante a diluição da solução a ser analisada, após adicionar-se a alíquota do extrato no frasco de polipropileno, adicionou-se KMnO₄

0,05% (m/v) para estabilizar o Hg em solução na forma Hg^{2+} . Em seguida, para eliminar o excesso de KMnO_4 , adicionou-se $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0,025% (m/v), para posteriormente promover a geração do vapor atômico a partir de Hg^{2+} durante a determinação por CV-AFS. Cabe destacar que a solução a ser analisada deve estar em meio ácido (em torno de 1%) para que a reação com KMnO_4 seja eficaz.

Após a otimização das condições de extração, aproximadamente 0,1 g de amostra foi adicionado nos frascos de PTFE do micro-ondas juntamente com 10 mL de solução HNO_3 4,0 mol L^{-1} e submetida à extração com 400 W de potência ou solução de HCl 1,0 mol L^{-1} e 300 W de potência, durante 10 min. Após atingir temperatura ambiente, as soluções foram filtradas com filtros membrana de 0,45 μm (Merck Millipore, Carrigtohill, Ireland) e diluídas, adicionando-se KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ antes da análise por CV-AFS.

Para proceder o balanço de massa de Hg na amostra certificada TORT-2, após a filtração, os extratos das amostras foram digeridos por aquecimento com micro-ondas adicionando-se 5,0 mL do extrato, 3,0 mL de HNO_3 e 1,0 mL de H_2O_2 , e submetidos ao aquecimento em 250 W por 6 min, 400 W por 6 min, 600 W por 6 min e 250 W por 6 min para avaliar, por diferença, a concentração de espécies orgânicas no extrato. O resíduo de amostra do filtro também foi digerido por aquecimento com micro-ondas utilizando 4,0 mL de HNO_3 , 1,0 mL de HCl e 1,0 mL de H_2O_2 , utilizando o mesmo programa de digestão, para determinar a quantidade de Hg não extraído. O CRM TORT-2 foi utilizado para verificar a adequação do método de extração.

O fracionamento de mercúrio foi feito a partir da medição da quantidade total de mercúrio nas amostras após digestão assistida por micro-ondas e a aplicação do método de extração assistida por micro-ondas às mesmas amostras para a determinação de mercúrio inorgânico (Hg^{2+}). A fração orgânica de Hg foi determinada por diferença entre a concentração de Hg^{2+} no extrato digerido e o Hg^{2+} no extrato não-digerido.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

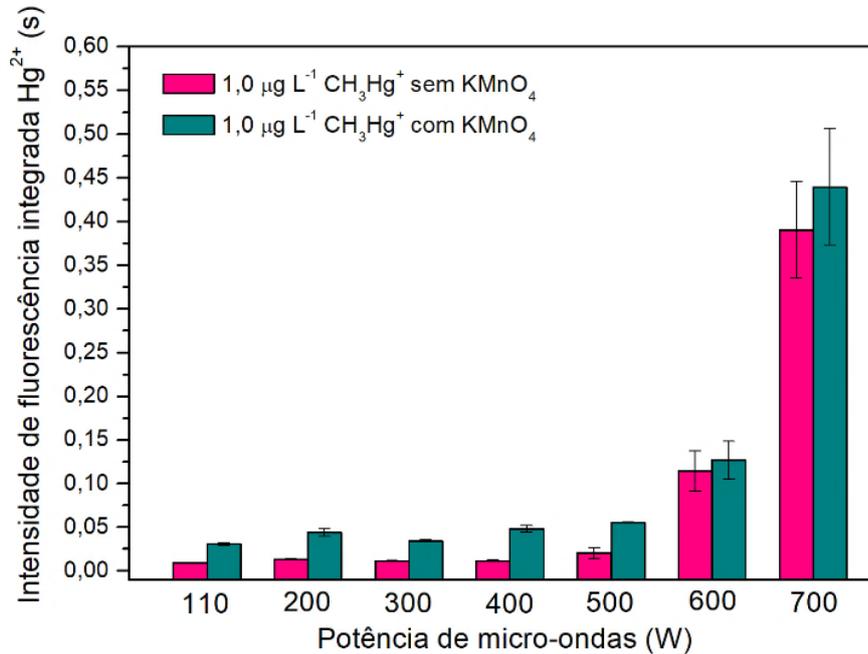
4.3.1 Avaliação da conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} utilizando soluções de HNO_3 e HCl como extratoras

Soluções de HNO_3 4,0 mol L^{-1} e HCl em diferentes concentrações foram estudadas como meios extratores nas extrações assistidas por micro-ondas. Para isso, avaliou-se o efeito de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} utilizando estas soluções. Inicialmente, soluções padrão de CH_3Hg^+ foram submetidas à irradiação com micro-ondas em diferentes potências pelo período de 10 min, utilizando-se 10 mL da solução extratora. Este estudo foi feito para avaliar a maior potência de irradiação que poderia ser utilizada na extração sem que ocorresse conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} .

Após a extração, as soluções foram analisadas por CV-AFS para a determinação das intensidades de fluorescência integradas relacionadas a Hg^{2+} . É importante ressaltar que por esta técnica não é possível determinar a espécie CH_3Hg^+ diretamente, por isso, foi monitorada a intensidade de Hg^{2+} gerada pela conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} . Adicionalmente, as amostras foram analisadas com e sem a adição de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ para avaliar o efeito destes reagentes sobre a intensidade de fluorescência nas medições de Hg^{2+} por CV-AFS.

Para o estudo com a solução de HNO_3 , partiu-se de um valor referência da literatura (RAHMAN; KINGSTON, 2005) fixando-se a concentração em 4,0 mol L^{-1} para o andamento dos experimentos. Segundo os autores, essa condição forneceu melhor extração e recuperação das espécies de Hg das amostras de solos e sedimentos, garantindo a estabilidade das espécies. A partir disso, variou-se apenas a variável potência de micro-ondas na faixa entre 110 e 700 W. As intensidades de fluorescência integrada para Hg^{2+} medidas nas soluções de CH_3Hg^+ (1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) sob influência das potências aplicadas estão mostradas na Figura 1.

Figura 1. Intensidade de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ em diferentes potências de micro-ondas (110 a 700 W) por 10 min, sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), utilizando HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$.



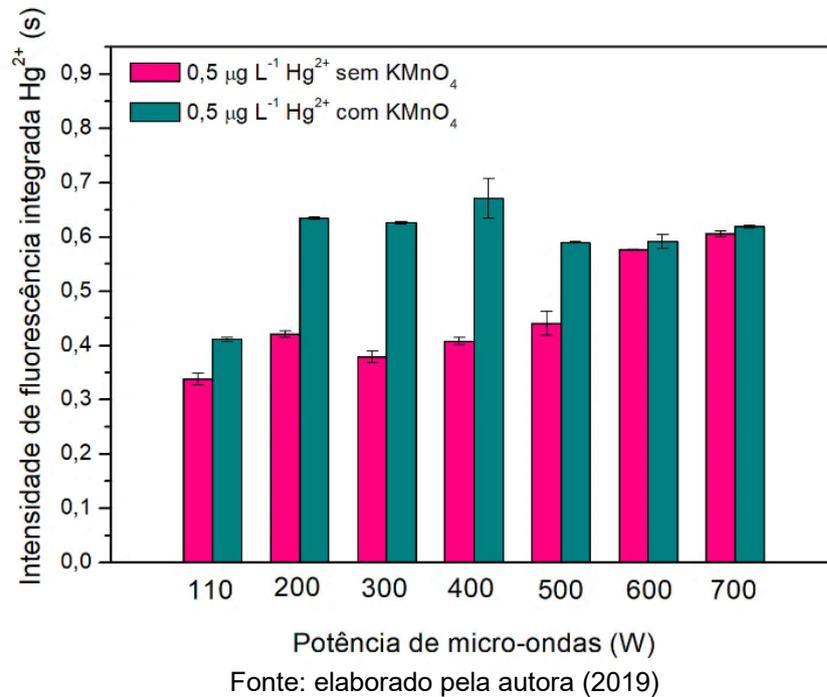
Fonte: elaborado pela autora (2019)

A partir da Figura 1 pode-se inferir que com o aumento da potência de micro-ondas ocorre um aumento das intensidades de Hg^{2+} na solução de CH_3Hg^+ tanto sem como com a adição de KMnO_4 . Este aumento foi mais acentuado em potências superiores a 500 W. Isso indica que o aumento de temperatura decorrente da irradiação com as micro-ondas está sendo suficiente para romper a ligação entre o grupo metílico e o Hg, convertendo CH_3Hg^+ em Hg^{2+} na solução de HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, outro aspecto a ser discutido é o efeito do uso do KMnO_4 nas medições de Hg^{2+} . Neste trabalho investigou-se o uso deste oxidante sobre a intensidade de Hg^{2+} ou conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} nas medições por CV-AFS (Figura 1). É relatado que mesmo após o processo de extração, o Hg inorgânico pode estar ligado a proteínas ou outras moléculas e não ser completamente reduzido a Hg^0 durante a análise por CV-AFS (TAO; WILLIE; STURGEON, 1999). Em vista disso, o uso de um oxidante em baixa concentração, pode auxiliar na estabilização do Hg^{2+} na solução. Conseqüentemente, uma maior quantidade de Hg^{2+} estará disponível em solução para a geração do vapor de Hg^0 . Entretanto, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} ocasionada pelo oxidante é indesejável. Portanto, como pode ser visto na Figura 1, os extratos foram analisados com e sem KMnO_4 a fim de avaliar o efeito deste sobre

a intensidade de Hg^{2+} e verificar possível conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} . Na Figura 1 é mostrado que nas soluções contendo KMnO_4 houve um aumento da intensidade de Hg^{2+} em todas as condições de potências de micro-ondas avaliadas com a solução de HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$, comparado à solução sem adição de KMnO_4 . Aplicando-se teste t para 95% de confiança, foi observada diferença significativa entre os valores de intensidade de fluorescência integrada de Hg^{2+} , com e sem o uso de KMnO_4 , nos estudos de potências entre 110 e 500 W. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os valores de intensidade de fluorescência de Hg^{2+} nos estudos de potência de 600 e 700 W. O aumento de intensidade de Hg^{2+} é evidente em todas as soluções contendo KMnO_4 (Figura 1) e pode ser decorrente da conversão parcial de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} . Além disso, a solução do branco analisado com KMnO_4 apresentou intensidade de fluorescência de Hg^{2+} superior (0,01) a intensidade para a solução do branco sem a adição de KMnO_4 (0,001). Isso sugere que além de o uso de KMnO_4 promover conversão parcial de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} , ocorre aumento dos valores de intensidade nas soluções do branco. Cabe destacar que os valores de intensidade das soluções do branco foram descontados das respectivas intensidades das soluções analisadas (Fig. 1). Apesar disso, a provável conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} é supostamente baixa em comparação à concentração de CH_3Hg^+ em solução ($1,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (Fig. 1).

A fim de verificar o efeito do uso de KMnO_4 e das potências de MW sobre a intensidade da espécie inorgânica (Hg^{2+}) (Figura 2), soluções de $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} foram adicionadas nos frascos de PTFE e submetidas às diferentes potências de micro-ondas com solução de HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, as soluções foram diluídas para $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e analisadas sem e com adição de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$.

Figura 2. Intensidade de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} em diferentes potências de micro-ondas (110 a 700 W) por 10 min, sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), utilizando HNO_3 4,0 mol L^{-1} .



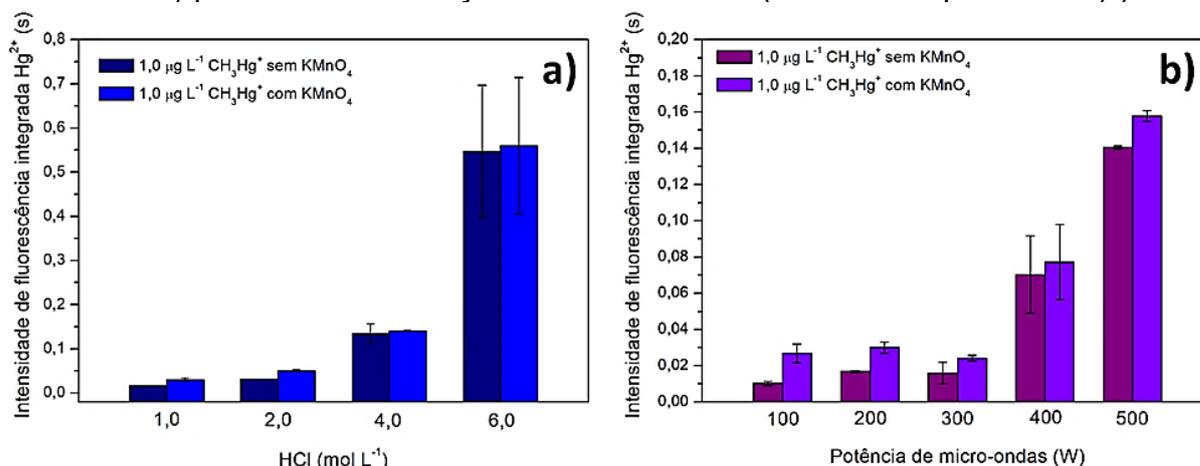
É esperado que, mesmo com a aplicação de diferentes potências de MW, não ocorra variação na intensidade de fluorescência de Hg^{2+} em vista da improvável conversão desta espécie em outra, no meio avaliado.

Em relação a estabilidade de Hg^{2+} nas medições por CV-AFS, as soluções sem o uso de KMnO_4 mostraram um aumento gradual com o aumento da potência de micro-ondas (Fig. 2). Em contrapartida, exceto para a solução submetida a potência de 110 W, as soluções contendo KMnO_4 submetidas às potências de 200 a 700 W alcançaram um patamar. Isso sugere que o uso de KMnO_4 favoreceu a estabilização do Hg^{2+} em solução e a geração quantitativa do vapor de Hg^0 a partir de Hg^{2+} aumentando a intensidade. A diferença estatística entre os valores de intensidade de fluorescência de Hg^{2+} sem e com o uso de KMnO_4 também foi avaliada aplicando teste *t* com 95% de confiança. Observou-se que, assim como para as intensidades de Hg^{2+} na solução de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , houve diferença significativa para as soluções submetidas entre as potências de 110 e 500 W. Porém, para as soluções submetidas às potências de 600 e 700 W não foi observada diferença significativa entre as intensidades de Hg^{2+} nas soluções sem e com KMnO_4 .

Sob estas circunstâncias, a potência de 400 W foi selecionada para a continuação dos estudos de extração das espécies de Hg por não resultar em conversão evidente de CH_3Hg^+ com o meio de HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, optou-se por utilizar KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v) nas análises por CV-AFS por auxiliar na estabilidade de Hg^{2+} em solução.

Para o estudo do método de extração assistida por micro-ondas utilizando HCl, avaliaram-se diferentes concentrações de HCl ($1,0$ a $6,0 \text{ mol L}^{-1}$) e potências de micro-ondas (100 a 500 W). Neste caso, o efeito do uso de KMnO_4 também foi avaliado, assim como a conversão da espécie CH_3Hg^+ em Hg^{2+} . As intensidades de fluorescência integrada para Hg^{2+} nas soluções de CH_3Hg^+ $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ estão mostradas na Figura 3.

Figura 3. Intensidades de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), em a) diferentes concentrações de HCl ($1,0 - 6,0 \text{ mol L}^{-1}$) irradiadas na potência de 200 W por 10 min , e b) em diferentes potências de micro-ondas (100 a 500 W) por 10 min na solução de HCl 1 mol L^{-1} (escolhida a partir de “a”).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

O efeito da concentração de HCl sobre a conversão de CH_3Hg^+ (Fig. 3a) foi avaliado aplicando-se potência de 200 W por 10 min sobre as soluções de CH_3Hg^+ $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Nota-se na Figura 3a, que o uso de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ durante as análises resultou em aumento sutil da intensidade de fluorescência nas diferentes concentrações. A diferença entre as intensidades sem e com KMnO_4 parece ser atenuada ainda mais em concentrações acima de $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Fig 3a).

No que concerne a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} , em concentrações de HCl superiores a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ este efeito já é observado (Fig 3a). Por isso, optou-se pelo uso da solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para a avaliar uma faixa mais ampla de potências

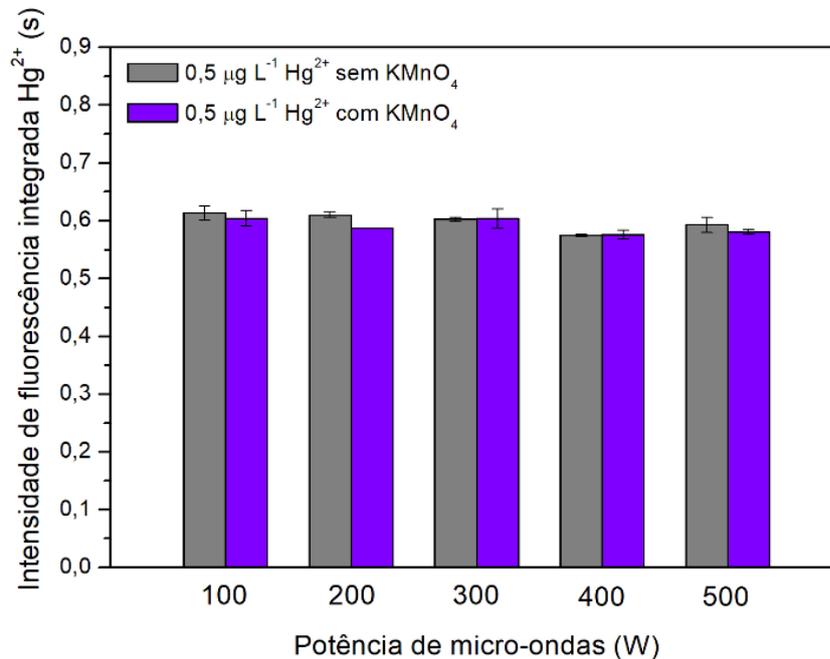
de micro-ondas, visto que estas variáveis influenciam fortemente a conversão de CH_3Hg^+ .

Para investigar a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} em diferentes potências de micro-ondas com a solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Fig. 3b), condições entre 100 e 500 W foram avaliadas. As intensidades de fluorescência de Hg^{2+} sem e com o uso de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ obtidas nas diferentes potências aplicadas estão mostradas na Figura 3b. Pode-se observar que em potências superiores a 300 W (Fig. 3b), CH_3Hg^+ é convertido em Hg^{2+} devido ao aumento da temperatura do sistema causado pelas micro-ondas, promovendo o rompimento das ligações do CH_3Hg^+ . A partir deste estudo, a condição de 300 W foi escolhida para a extração das espécies de Hg utilizando a solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Na Fig. 3b, novamente, as soluções analisadas na presença de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ apresentaram um aumento da intensidade de fluorescência integrada possivelmente devido à conversão de uma fração de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} . Apesar de existir diferença significativa entre os valores de intensidade de fluorescência de Hg^{2+} na solução de CH_3Hg^+ sem e com a presença de KMnO_4 (Fig. 3b), aplicando-se teste t para 95% de confiança, essa diferença de intensidade ainda é bastante reduzida, sugerindo baixa conversão de CH_3Hg^+ .

Para avaliar o efeito do uso de KMnO_4 sobre a sensibilidade de Hg^{2+} em solução de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se potências entre 100 e 500 W, soluções de $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} foram adicionadas nos frascos de PTFE e submetidas ao aquecimento por micro-ondas. Posteriormente, as soluções foram diluídas para $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e analisadas sem e com KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ (Figura 4).

Figura 4. Intensidade de fluorescência integrada para Hg^{2+} na solução contendo $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} em diferentes potências de micro-ondas (100 a 500 W) por 10 min, sem e com o uso de KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v), utilizando HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Observa-se, na Fig. 4, que as soluções de Hg^{2+} analisadas sem e com o uso de KMnO_4 não apresentaram diferença significativa entre os valores de intensidade de Hg^{2+} , ao contrário do que foi observado para a solução com HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ (Fig. 2). Isso sugere que a solução de HCl é suficiente para estabilizar o Hg^{2+} em solução, sem a necessidade do uso de KMnO_4 para auxiliar neste processo.

O tempo de extração utilizado neste trabalho (10 min), mostrou-se suficiente para a extração das espécies de Hg nas condições experimentais utilizadas por (RAHMAN; KINGSTON, 2005) para amostras de solo e sedimentos. Por esse motivo, o tempo de extração não foi avaliado mais especificamente neste trabalho.

A partir dos estudos preliminares supracitados sobre os efeitos de conversão de CH_3Hg^+ e do uso de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ nas análises, foram avaliadas duas estratégias para a extração das frações de Hg em resíduos oleosos de petróleo:

- 1) Extração assistida por micro-ondas utilizando 10 mL da solução HNO_3 $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ na potência de 400 W por 10 min, utilizando KMnO_4 0,05% (m/v) e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,025% (m/v) na análise por CV-AFS; e

- 2) Extração assistida por micro-ondas utilizando 10 mL da solução HCl 1,0 mol L⁻¹ na potência de 300 W por 10 min e KMnO₄ 0,05% (m/v) e NH₂OH.HCl 0,025% (m/v) durante a análise.

4.3.2 Avaliação da adequação dos meios extratores

Após a definição das condições de extração assistida por micro-ondas, fez-se a digestão (para determinação de Hg total) e as extrações (para determinação de Hg²⁺) dos CRMs fígado de peixe (DOLT-4) e hepatopâncreas de lagosta (TORT-2). Estes CRMs apresentam valores certificados para Hg total e para CH₃Hg⁺. É evidente que estas amostras não possuem semelhança com resíduos oleosos, mas esta estratégia foi empregada apenas para verificar se seria possível quantificar Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ de maneira coerente com os valores certificados sob as diferentes estratégias de extração. Nesse caso, para estimar a concentração de Hg inorgânico nas amostras certificadas, subtraiu-se o valor do Hg total pelo valor do CH₃Hg⁺.

Os valores de Hg total e inorgânico medidos após o preparo das amostras com os métodos de digestão e extração estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores obtidos para o fracionamento de Hg nos CRMs DOLT-4 e TORT-2, após digestão e extração em HNO₃ 4,0 mol L⁻¹ na potência de 400 W ou HCl 1,0 mol L⁻¹ na potência de 300 W, utilizando KMnO₄ 0,05% (m/v) + NH₂OH.HCl 0,025% (m/v). (n=2)

CRM	Hg total Certificado (mg kg ⁻¹)	Hg total Medido (mg kg ⁻¹)	Hg ²⁺ Certificado (mg kg ⁻¹) ^a	Extração HNO ₃ 4 mol L ⁻¹		Extração HCl 1 mol L ⁻¹	
				Hg ²⁺ medido (mg kg ⁻¹)	Concor. (%)	Hg ²⁺ medido (mg kg ⁻¹)	Concor. (%)
DOLT-4	2,58 ± 0,22	N.D.	1,25 ± 0,25	1,21 ± 0,01	97	N.D.	N.D.
TORT-2	0,27 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,118 ± 0,06	0,125 ± 0,062	106	0,015 ± 0,004	13

Fonte: elaborado pela autora (2019)

N.D. (não determinado)

Valores certificados TORT-2: CH₃Hg⁺: 0,152 ± 0,013 (mg kg⁻¹)

Valores certificados DOLT-4: CH₃Hg⁺: 1,33 ± 0,12 (mg kg⁻¹)

^aHg²⁺ (inorgânico) estimado por diferença entre Hg total e CH₃Hg⁺ (mg kg⁻¹)

Como pode ser observado na Tabela 3, as concentrações de Hg²⁺ obtidas na extração com HNO₃ 4,0 mol L⁻¹ com as duas amostras certificadas foram concordantes com os valores certificados. Entretanto, utilizando a solução extratora HCl 1,0 mol L⁻¹, obteve-se valor de concordância insatisfatório para a amostra TORT-

2. Estudos mais detalhados estão mostrados a seguir para avaliar este efeito, porém, acredita-se que a solução de HCl nesta concentração não tenha sido suficiente para extrair o Hg inorgânico da matriz da amostra. Adicionalmente, o processo de extração com HCl 1,0 mol L⁻¹ não foi aplicado à amostra DOLT-4 devido à quantidade insuficiente de amostra disponível no laboratório para esta investigação.

4.3.3 Investigação da extração das espécies de Hg utilizando HCl 1,0 mol L⁻¹

Com o intuito de investigar os motivos que levaram à aparente baixa extração de Hg²⁺ utilizando HCl 1,0 mol L⁻¹, a amostra certificada TORT-2 foi submetida à extração em potências de 100, 200 e 300 W. Os extratos foram filtrados e a fase líquida foi analisada por CV-AFS para a determinação de Hg²⁺ nas condições descritas anteriormente. Para verificar o balanço de massa para Hg, procedeu-se também a digestão do extrato filtrado para avaliar a presença de espécies extraídas concomitantemente ao Hg²⁺, não detectáveis por CV-AFS. A partir disso, foi possível determinar o Hg total no extrato. Subtraindo a concentração de Hg total do extrato digerido pela concentração de Hg²⁺ determinada no extrato não digerido, estimou-se a concentração de CH₃Hg⁺. O filtro contendo o resíduo também foi digerido para verificar a quantidade de Hg remanescente no resíduo sólido da amostra. As concentrações de Hg inorgânico (Hg²⁺) e a concentração estimada para Hg orgânico CH₃Hg⁺ estão mostradas na Tabela 4 (n=3).

Tabela 4. Concentrações de Hg obtidas por CV-AFS após extração (utilizando HCl 1,0 mol L⁻¹) e digestão do extrato e do resíduo da amostra certificada (TORT-2).

Potência (W)	Hg inorgânico extrato filtrado (mg kg ⁻¹)	Hg extrato filtrado digerido (mg kg ⁻¹)	Hg Sólido digerido (mg kg ⁻¹)	Hg total (extrato filtrado + sólido)	*Hg orgânico extrato filtrado (mg kg ⁻¹)
100	0,009 ± 0,003	0,141 ± 0,019	0,119 ± 0,006	0,260	0,132
200	0,009 ± 0,002	0,144 ± 0,008	0,113 ± 0,006	0,257	0,135
300	0,037 ± 0,003	0,184 ± 0,021	0,073 ± 0,001	0,257	0,147

Fonte: elaborado pela autora (2019)

*Valor estimado por diferença.
 Valores certificados TORT-2:
 Hg total: 0,27 ± 0,06 (mg kg⁻¹)
 CH₃Hg⁺: 0,152 ± 0,013 (mg kg⁻¹)
 Hg inorg.: 0,118 ± 0,060 (mg kg⁻¹)

Como pode ser observado na Tabela 4, a concentração de Hg^{2+} no extrato é consideravelmente reduzida, indicando que a extração para esta espécie com solução de HCl é ineficaz. Por outro lado, observa-se uma concentração superior de Hg no extrato digerido. Assume-se que esta concentração seja referente à fração orgânica de Hg (essencialmente CH_3Hg^+) extraída, estimada pela diferença entre o valor de Hg total do extrato digerido e o valor de Hg^{2+} do extrato não digerido. Com o aumento da potência, pode-se observar que a concentração de Hg orgânico estimada alcança valores muito próximos ao valor certificado para CH_3Hg^+ na amostra TORT-2, utilizando a potência de 300 W. Conclui-se, a partir desses dados, que a solução de HCl é relativamente mais eficaz para a extração de CH_3Hg^+ , mas relativamente ineficaz para a extração de Hg^{2+} . Sob essas condições, assume-se que a extração conduzida com solução de HCl é inadequada para o propósito de uma análise de fracionamento químico para Hg, algo potencialmente extensível a amostras de resíduos oleosos.

4.3.4 Avaliação da extração de Hg^{2+} nas amostras de resíduos oleosos empregando solução de HNO_3 4,0 mol L⁻¹

As amostras de resíduos oleosos de petróleo foram submetidas ao processo de digestão assistida por micro-ondas para a determinação de Hg total e posteriormente à extração com HNO_3 4,0 mol L⁻¹ para a determinação da fração inorgânica por CV-AFS. As concentrações correspondentes à fração “orgânica” ou à fração não-extraível foram estimadas por diferença entre a concentração de Hg total e a concentração de Hg inorgânico. As concentrações obtidas estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações de Hg obtidas por CV-AFS após digestão (Hg total) e extração com HNO_3 4,0 mol L⁻¹ (Hg inorgânico) em amostras de resíduos oleosos. (n=3)

Amostra	Total		Fração inorgânica		*Fração orgânica + não-extraível (mg kg ⁻¹)
	Digestão		Extração HNO_3 4,0 mol L ⁻¹		
	Hg total medido (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	Hg ²⁺ medido (mg kg ⁻¹)	RSD (%)	
1	649 ± 13	2,0	60,8 ± 1,3	2,1	588 ± 13
2	466 ± 10	2,2	52,9 ± 2,2	4,2	413 ± 10
3	671 ± 11	1,6	80,5 ± 6,0	7,4	590 ± 13
4	689 ± 9	1,3	203,1 ± 8,7	4,3	486 ± 13

Fonte: elaborado pela autora (2019)

*Valor estimado por diferença.

Como pode ser visto na Tabela 5, apenas de 9 a 29% do Hg total das amostras de resíduos oleosos de petróleo foi extraído e determinado como Hg²⁺ (inorgânico) utilizando a solução de HNO_3 4,0 mol L⁻¹. A fração “orgânica” e não-extraível, estimada por diferença, pode ser, não exatamente espécies orgânicas de Hg, mas sim, espécies que não são facilmente extraíveis em meio aquoso.

Cabe destacar que, apesar da extração ter permitido obter concentrações concordantes com as certificadas para amostras de tecido animal (Tabela 3), não há uma garantia de que este método seja eficaz para a extração de espécies inorgânicas nas amostras de resíduos oleosos. A ausência de CRMs para este tipo de amostra e de protocolos de fracionamento oficiais e específicos dificulta sobremaneira a avaliação da exatidão para este tipo de aplicação.

Os resultados relativos à aplicação do método de extração assistida por micro-ondas forneceram informações relevantes quanto ao comportamento das espécies com as soluções avaliadas. Entretanto, existem fatores relacionados à extração assistida por micro-ondas que não são passíveis de serem monitorados devido a uma limitação do instrumento utilizado. Nesse contexto, optou-se por utilizar outro método para otimizar a extração das espécies de Hg das amostras de resíduos oleosos de petróleo, o qual fornecesse a aferição da temperatura do sistema durante o processo de extração. Dessa forma, o método de extração com aquecimento convectivo foi

empregado para a a continuação dos estudos de fracionamento de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo, mostrados no Capítulo 2.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os estudos sobre fracionamento de Hg utilizando extração asistida por micro-ondas são ainda preliminares. As primeiras observações evidenciaram que HNO_3 tem maior eficácia para a extração de Hg^{2+} em amostra TORT-2, enquanto o uso de HCl parece ser mais eficaz para a extração de CH_3Hg^+ . No que concerne à determinação de Hg^{2+} por CV-AFS, o uso de KMnO_4 e $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ parece favorecer a estabilização das espécies de Hg^{2+} em solução, e, conseqüentemente, a quantitativa geração de vapor atômico. Os estudos possibilitaram uma primeira aproximação sobre a concentração de Hg^{2+} extraível nas amostras de resíduos oleosos de petróleo. Entretanto, é prudente afirmar que um aperfeiçoamento nestes estudos é necessário para avaliar outras variáveis envolvidas com a conversão e extração das espécies de Hg, como a temperatura. Para isso, o método de extração com aquecimento convectivo foi utilizado para a continuação dos estudos de fracionamento de Hg nas amostras de resíduos oleosos de petróleo.

5 FRACIONAMENTO DE MERCÚRIO EM RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO UTILIZANDO EXTRAÇÃO COM AQUECIMENTO CONVECTIVO

Neste capítulo, foram abordados os estudos relacionados à extração das frações inorgânicas e orgânicas de Hg das amostras de resíduos oleosos de petróleo utilizando aquecimento convectivo. A otimização das condições experimentais para a extração das espécies de Hg foi realizada por planejamento multivariado. Nesse contexto, os fatores massa de amostra, volume de solução, temperatura, tipo e concentração da solução e tempo de extração foram investigados aplicando matriz Doehlert e Box-Behnken. O fracionamento de Hg nas amostras foi realizado pela determinação seletiva de Hg²⁺ utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS). A técnica de HPLC-ICP-MS foi utilizado para a comparação dos resultados obtidos após a extração com aquecimento convectivo.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} em processo de extração com aquecimento convectivo.
- Avaliar o efeito da concentração de solução extratora (HNO_3 e HCl), temperatura e tempo de extração utilizando otimização multivariada.
- Avaliar, durante a otimização das condições de extração, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} , a extração de Hg^{2+} e Hg orgânico e as recuperações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , a fim de obter um método com baixa conversão de CH_3Hg^+ e máxima extração e recuperação.
- Determinar parâmetros de mérito e verificar a exatidão do método de extração com aquecimento convectivo por meio de testes de adição e recuperação nas amostras avaliadas e comparação dos resultados quantitativos obtidos por CV-AFS com os resultados obtidos por HPLC-ICP-MS.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Instrumentação

As amostras foram pesadas em balança analítica M 254Ai (Bel Engineering, Milão, Itália). Para a digestão das amostras e dos extratos foi utilizado forno de micro-ondas MLS 1200 Mega (Milestone, Bergamo, Itália) com controle de potência e tempo, com seis posições para frascos de PTFE ou PFA. Uma centrífuga (Quimis, São Paulo) foi utilizada para a centrifugação dos extratos. Para otimização do método de extração das espécies de Hg utilizando aquecimento convectivo, um bloco digestor TE 005/50 (Tecnal, São Paulo) com controle de temperatura de 50 °C até 450 °C, contendo posição para 15 frascos de PTFE/PFA de 40 mL com tampas rosqueáveis foi utilizado. A temperatura interna do frasco durante o processo de extração foi monitorada através de um termômetro (Incoterm, Porto Alegre) inserido em um dos frascos de PTFE/PFA, selado e posicionado na posição central do bloco digestor. Para homogeneização e enriquecimento da amostra de borra oleosa foi utilizado um agitador mecânico digital RW 20 (Ika, São Paulo), operado a 300 rpm.

Para a determinação de Hg total e Hg²⁺ por CV-AFS, um espectrômetro de fluorescência atômica com vapor frio Mercur Duo Plus (Analytik Jena, Jena, Alemanha), utilizando uma lâmpada de baixa pressão de Hg, operado no comprimento de onda de 253,7 nm e com detecção no ângulo de 90°C com o feixe incidente, foi utilizado. Para comparação dos resultados obtidos por CV-AFS, um HPLC Flexar (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) controlado pelo software Chromera®, operado com bomba quaternária para mistura de solventes, equipado com coluna C₁₈ (Perkin Elmer, 150 x 4,6 mm, 5 µm), com tolerância de pH de 2,5-7,5, foi acoplado *offline* ao ICP-MS Elan 6000 (Perkin Elmer-SCIEX, Thornhill, Canada). O eluato proveniente da coluna foi inserido diretamente em um nebulizador pneumático concêntrico de vidro (Meinhard, Colorado, EUA) acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica de vidro, utilizando um tubo de PTFE. Para verificação do pH das soluções analisadas por HPLC foi utilizado o pHmetro Q-400A (Quimis, São Paulo). As condições de operação do instrumento de HPLC-ICP-MS estão mostradas na Tabela 6.

Table 6. Parâmetros e condições usadas para análise de especiação química de Hg por HPLC-ICP-MS.

Parâmetro	Valor
ICP-MS	
Nebulizador	Meinhard concêntrico
Vazão de gás (Ar, L min ⁻¹)	
Gás nebulizador	1,08
Potência de Radiofrequência (W)	1200
Detector	
Estágio analógico (V)	-1825
Estágio de pulso (V)	1200
Modo	<i>Scanning</i>
<i>Dwell time</i> (ms)	50
Isótopo monitorado	²⁰² Hg
HPLC	
Coluna	C ₁₈ Perkin Elmer (150 x 4,6 mm, 5 µm) 8% metanol
Fase móvel	92% H ₂ O (0,12% L-cisteína (m/v) + 0,01 mol L ⁻¹ acetato de amônio) ^a
Modo	Isocrático
Vazão (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (µL)	20

Fonte: elaborado pela autora (2019)

^a LIU *et al.* 2018.

5.2.2 Amostras e reagentes

As amostras de resíduos oleosos de petróleo foram obtidas em parceria com a indústria de petróleo. Os reagentes utilizados para a digestão e a extração foram H₂O₂ 30% (Vetec, Rio de Janeiro), HNO₃ 65% e HCl 37% (Merck, São Paulo). Os ácidos foram bidestilados abaixo do ponto de ebulição utilizando um sistema de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) e a água foi deionizada e purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), para resistividade final de 18,2 MΩ cm para o preparo das soluções.

Para a geração do vapor atômico de mercúrio, a solução do agente redutor SnCl₂ 3% (m/v), preparada a partir de SnCl₂.2H₂O (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), em meio de HCl 0,36 mol L⁻¹ e a solução de HCl 0,36 mol L⁻¹ foram utilizadas. As soluções da amostra e dos reagentes (SnCl₂ e HCl) foram aspiradas descontinuamente em um sistema em fluxo a uma vazão de 8,0 mL min⁻¹ e 2,0 mL min⁻¹, respectivamente, e argônio com 99,997% de pureza (White Martins, São Paulo) foi utilizado como gás carreador na vazão de 10 L h⁻¹. Para a medição da concentração de Hg²⁺ adicionou-se às soluções de calibração e das amostras, as soluções 0,05%

(m/v) de KMnO_4 (Merck, Rio de Janeiro) e 0,025% (m/v) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha) antes das medições. Para compor as soluções empregadas na técnica de HPLC, metanol (Applichem, Darmstadt, Alemanha), $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Carlo Erba, Milão, Itália), cloridrato de L-cisteína (Fluka, Neu-Ulm, Alemanha) e NaOH (Neon, São Paulo) foram utilizados. A solução padrão de Hg^{2+} foi preparada a partir de uma solução padrão de Hg (Specsol, São Paulo) e a solução de CH_3Hg^+ a partir do cloreto de metilmercúrio 95% (Alfa Aesar, Massachusetts, EUA), preparado com cuidado rigoroso devido à sua alta toxicidade. Cabe destacar que o metilmercúrio é altamente tóxico e o preparo de soluções foi feito utilizando luvas e máscaras especiais para materiais tóxicos, sendo manipulado em capela de exaustão. O descarte dos resíduos foi feito em recipientes especiais para mercúrio e os resíduos foram coletados pelo Departamento de Gestão de Resíduos Sólidos da UFSC para descarte apropriado.

5.2.3 Procedimento experimental

5.2.3.1 Avaliação do método de extração com aquecimento convectivo para fracionamento de mercúrio em amostras de resíduos oleosos de petróleo empregando otimização multivariada

Os fatores massa de amostra, volume de solução, temperatura, tipo e concentração da solução e tempo de extração foram investigados aplicando planejamento multivariado (Doehlert e Box-Behnken) para promover, através da técnica de metodologia de superfície de resposta (RSM), a inspeção visual das superfícies de resposta e identificar a melhor condição para a extração das espécies inorgânicas e orgânicas de Hg com mínima conversão durante a extração. O software Statistica® 13.0 (Statsoft, Tulsa, EUA) foi utilizado para a projeção das superfícies de resposta e análise de dados após execução dos grupos de experimentos.

5.2.3.1.1 Otimização dos fatores massa de amostra e volume de solução extratora aplicando planejamento Doehlert

Primeiramente, a otimização da massa de amostra e do volume de solução foi realizada pela aplicação de um planejamento com matriz Doehlert considerando dois fatores (massa e volume), sendo estudados cinco níveis para o fator volume (volumes de 5,0, 12,5, 20,0, 27,5 e 35,0 mL) e três níveis para o fator massa de amostra (50, 100 e 150 mg) que compuseram sete experimentos efetuados em duplicata. Para estes experimentos, as condições utilizadas para a extração das espécies de Hg da amostra de borra foram: temperatura do bloco digestor de 80 °C, HNO_3 4,0 mol L⁻¹ e tempo de extração de 10 min. Estas condições foram selecionadas por resultarem em baixa conversão de CH_3Hg^+ nos estudos iniciais de otimização do método.

5.2.3.1.2 Otimização dos fatores temperatura, $[\text{HNO}_3]$ ou $[\text{HCl}]$ e tempo de extração aplicando planejamento Box-Behnken

Os fatores temperatura do bloco digestor, concentração da solução e tempo de extração foram otimizados utilizando planejamento Box-Behnken. Neste caso, as soluções ácidas de HNO_3 ou HCl foram avaliadas como meios extratores. Nos planejamentos, três fatores e três níveis por fator foram investigados: temperatura (50, 70 e 90 °C), concentração de HNO_3 ($[\text{HNO}_3]$) (0,0, 4,0 e 8,0 mol L⁻¹) ou concentração de HCl ($[\text{HCl}]$) (0,0, 1,0 e 2,0 mol L⁻¹) e tempo de extração (5, 10, 15 min), resultando em 15 experimentos para cada meio extrator, feitos em duplicata. No decorrer dos experimentos de otimização foram avaliadas a extração de Hg^{2+} e da fração orgânica de Hg, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} e as recuperações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ . A conversão de CH_3Hg^+ foi monitorada tanto em solução padrão em meio aquoso quanto na amostra de borra oleosa no decorrer dos experimentos. Para os estudos de otimização, a mesma amostra foi dividida em três frações: uma delas permaneceu sem enriquecimento, enquanto as outras duas frações foram enriquecidas com 20,0 mg kg⁻¹ de Hg^{2+} ou CH_3Hg^+ . Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com agitação mecânica por 60 min a 300 rpm e armazenadas sob refrigeração (4 °C) por até 4 dias. Subsequentemente, as amostras de borra oleosa sem e com enriquecimento de 20,0 mg kg⁻¹ de Hg^{2+} ou CH_3Hg^+ foram submetidas a extração com

aquecimento convectivo para a determinação de Hg^{2+} no extrato filtrado. O sólido resultante da filtração do extrato foi digerido para verificar a fração de Hg não extraído e o extrato filtrado também foi digerido para verificar a fração orgânica de Hg extraída juntamente com o Hg^{2+} . Para a avaliação da conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} na solução padrão, uma solução composta por $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ foi submetida às condições dos experimentos supracitados, e diluída para a concentração de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para a determinação de Hg^{2+} resultante da conversão.

É importante destacar que apenas Hg^{2+} em solução pode ser diretamente determinado por CV-AFS. Em vista disso, devido à limitação da técnica para determinação de espécies orgânicas como por exemplo CH_3Hg^+ , os mesmos extratos analisados por CV-AFS para a determinação de Hg inorgânico foram digeridos por aquecimento com micro-ondas. Dessa forma, a digestão do extrato fornece a informação do conteúdo total de Hg presente na solução do extrato, incluindo Hg^{2+} (inorgânico) e outras espécies de Hg (tais como espécies orgânicas de Hg). Isto posto, para definir o conteúdo de Hg “orgânico” extraído pelo método otimizado, a concentração de Hg^{2+} determinada no extrato digerido foi subtraída da concentração de Hg^{2+} determinada no extrato não-digerido. A recuperação para Hg^{2+} foi calculada pela diferença entre a concentração de Hg^{2+} determinado na amostra enriquecida e a concentração de Hg^{2+} naturalmente extraído da amostra. A recuperação de CH_3Hg^+ foi calculada pela diferença entre a concentração de Hg^{2+} determinado no extrato digerido da amostra enriquecida com CH_3Hg^+ e a concentração de Hg^{2+} medido no extrato digerido da amostra sem enriquecimento.

5.2.3.2 Digestão da amostra de resíduo de petróleo para a determinação de Hg total

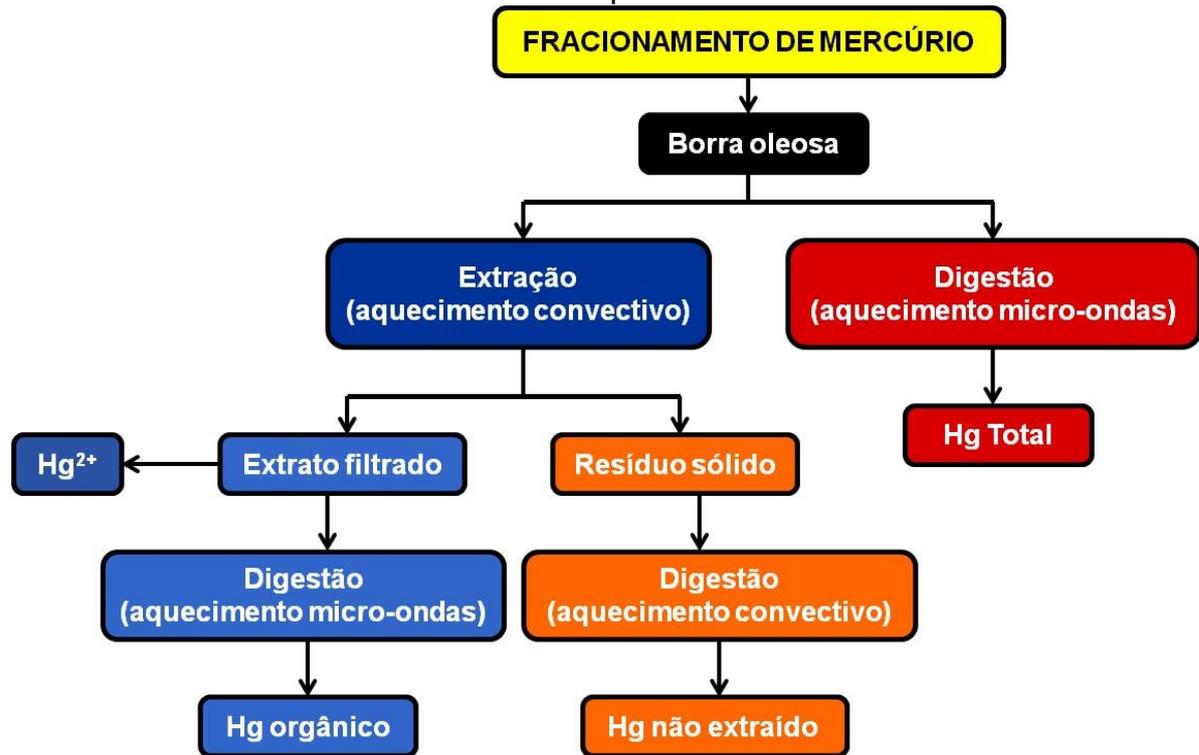
Para a determinação de Hg total nas amostras, alíquotas contendo aproximadamente 0,1 g de borra oleosa foram digeridas em forno de micro-ondas utilizando 6,0 mL de HNO_3 , 1,0 mL de HCl e 1,0 mL de H_2O_2 . Após a adição dos reagentes, os frascos contendo as amostras permaneceram à temperatura ambiente por uma hora antes da aplicação do programa de aquecimento nas seguintes condições: 250 W por 4 min, 400 W por 4 min, 650 W por 3 min e 250 W por 4 min. As amostras digeridas foram resfriadas até temperatura ambiente e diluídas para volume final de 30 mL com água deionizada.

5.2.3.3 Extração das espécies de Hg das amostras de resíduos oleosos de petróleo com aquecimento convectivo para posterior fracionamento

Três amostras de borra oleosa com diferentes composições de água, óleo e sólidos foram utilizadas para a quantificação da fração inorgânica, orgânica e a fração não extraível de Hg pelo método otimizado. Cada amostra de borra oleosa foi avaliada sem e com enriquecimento para a determinação da extração e para testes de adição e recuperação. Neste aspecto, as amostras foram divididas em três frações. Uma das frações permaneceu sem enriquecimento, enquanto as demais frações foram enriquecidas com 20,0 a 200,0 mg kg⁻¹ de solução padrão de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺. As frações foram, então, homogeneizadas mecanicamente por 60 min e armazenadas sob refrigeração durante quatro dias anteriormente a análise. Para a extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa, aproximadamente 0,1 g de amostra foi adicionado aos frascos de PTFE juntamente com 10 mL de HNO₃ 8,0 mol L⁻¹, fechados com as tampas rosqueáveis e submetida ao aquecimento a 90°C por 10 min. Para o monitoramento da temperatura da solução no decorrer do aquecimento, um termômetro foi posicionado dentro de um frasco selado contendo a mesma solução empregada nas extrações. Após o aquecimento, os frascos foram resfriados até temperatura ambiente, o extrato foi filtrado em sistema a vácuo com filtro de 0,45 µm e o extrato foi diluído para a determinação de Hg²⁺ por CV-AFS. Ao mesmo tempo, para verificar o balanço de massa e determinar a fração de Hg não extraída pelo método, o filtro contendo a amostra sólida residual foi digerido por aquecimento convectivo com 6,0 mL de HNO₃, 1,0 mL de HCl e 1,0 mL de H₂O₂ e subsequente aquecimento convectivo a 80 °C por 30 min, 100°C por 40 min e 110°C por 30 min. Após o resfriamento até temperatura ambiente, a solução foi diluída para 30 mL e analisada por CV-AFS.

Para determinação da fração orgânica de Hg no extrato da amostra, 5,0 mL do extrato foram digeridos em forno de micro-ondas com 3,0 mL de HNO₃, 1,0 mL de HCl e 1,0 mL de H₂O₂ e o extrato digerido foi analisado por CV-AFS. Neste caso, a fração orgânica de Hg foi determinada por subtração da concentração de Hg²⁺ no extrato digerido pela concentração de Hg²⁺ no extrato não digerido. Dessa forma, o balanço de massa das frações de Hg neste estudo compreende a soma das frações inorgânica, orgânica e não extraída. O esquema das etapas para o fracionamento do Hg na amostra de borra oleosa está mostrado na Figura 5.

Figura 5: Esquema de procedimentos usados para fracionamento de Hg determinado por CV-AFS.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

5.2.3.4 Determinação de Hg por CV-AFS

As soluções obtidas a partir dos processos de extração com aquecimento convectivo e digestão foram analisadas por CV-AFS após diluição das soluções nos fatores de 500 a 5000 com 0,05% (m/v) de KMnO_4 e 0,025% (m/v) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ em meio de 1% de HNO_3 em meio aquoso. A faixa de trabalho empregada na curva de calibração de Hg^{2+} foi de 0,050 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. O vapor de Hg foi gerado usando a mistura de SnCl_2 3% (m/v) com HCl 0,36 mol L^{-1} como agente redutor e solução de HCl 0,36 mol L^{-1} . Estas soluções foram preparadas previamente à análise e purgadas com argônio 99,996% para a eliminação de contaminação. O limite de detecção foi determinado pela multiplicação do desvio padrão de 10 medições do branco por 3,3, dividido pela inclinação da curva de calibração.

5.2.3.5 Determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS

As mesmas amostras analisadas por CV-AFS foram submetidas à extração com aquecimento convectivo e analisadas por HPLC-ICP-MS. A fase móvel empregada para a separação das espécies de Hg foi a mesma utilizada por Liu *et al.* (2018), e é composta por 92% de uma solução aquosa de L-cisteína 0,12% m/v e acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹ com e 8% de metanol, eluídas em modo isocrático a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. As condições empregadas na análise por HPLC-ICP-MS estão mostradas na Tabela 6. O eluato foi introduzido diretamente no nebulizador pneumático concêntrico e o sinal transiente gerado pelas espécies de Hg foram exportados para Excel® e integrados manualmente no Origin® para determinação da área e da concentração das espécies de Hg na amostra. Antes da injeção do extrato, o pH foi ajustado com NaOH e diluído no meio da fase móvel (L-cisteína + acetato de amônio) para pH final de aproximadamente 5,0. A faixa de trabalho da curva de calibração foi de 10-100 µg L⁻¹ para o Hg²⁺ e de 10-80 µg L⁻¹ para o CH₃Hg⁺. Os limites de detecção foram calculados pela multiplicação do desvio padrão de 10 medições do branco por 3,3, dividido pela inclinação da curva de calibração.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.3.1 Otimização da massa de amostra e volume de solução sobre a extração das espécies de Hg da amostra de resíduo oleoso de petróleo utilizando matriz Doehlert

A relevância dos fatores massa de amostra e volume da solução sobre a extração de Hg^{2+} foi avaliada com aplicação da RSM por meio de experimentos realizados a partir de uma matriz Doehlert. As superfícies de resposta geradas a partir deste planejamento foram inspecionadas visualmente para otimizar a condição de compromisso entre massa de amostra e volume de solução. A matriz de experimentos utilizada está mostrada na Tabela 7, e a resposta está expressa como concentração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}), determinada em duplicatas reais e com o desvio padrão de quatro replicatas analisadas.

Tabela 7. Matriz Doehlert aplicada para otimizar o volume de extrator (mL) e a massa de amostra (mg), valores experimentais reais e valores codificados, entre parênteses, e respostas expressas como concentração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) e desvio padrão (n=4).

Exp.	Volume (mL)	Massa amostra (mg)	Resposta Hg^{2+} (mg kg^{-1})		Desvio padrão (n=4)
1	20,0(0)	100(0)	3,30	3,39	0,74
2	35,0(1)	100(0)	2,65	2,85	0,40
3	27,5(0,5)	150(0,866)	2,00	2,82	0,51
4	5,0(-1)	100(0)	5,20	5,50	1,29
5	12,5(-0,5)	50(-0,866)	6,38	6,84	1,41
6	27,5(0,5)	50(-0,866)	4,07	3,77	0,27
7	12,5(-0,5)	150(0,866)	3,82	4,37	0,55

Fonte: elaborado pela autora (2019)

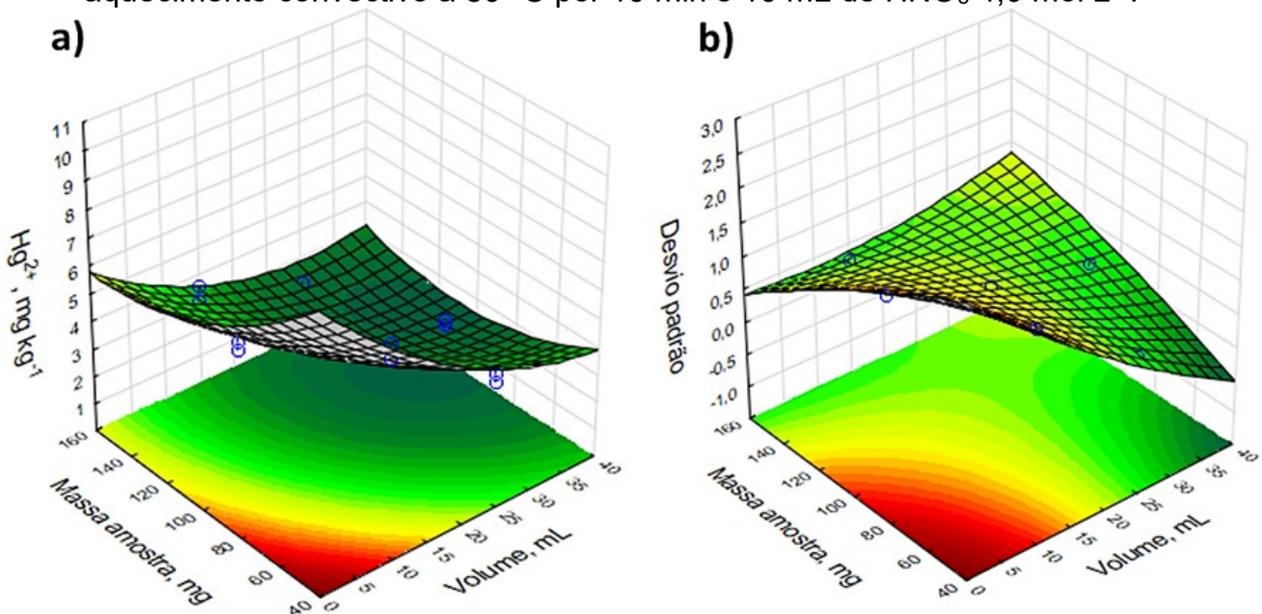
A superfície de resposta originada desta investigação é mostrada na Figura 6. Como visto, a extração de Hg^{2+} varia consideravelmente com uma variação na massa da amostra e volume de solução. Embora os dados da ANOVA mostrados no Apêndice A evidenciem que o modelo apresenta falta de ajuste, uma vez que a superfície foi plotada considerando as réplicas, este efeito pode ser explicado tanto pela heterogeneidade e complexidade da amostra como por outros fatores experimentais não modelados. Por outro lado, o coeficiente de determinação obtido é

de 0,93. Isso significa que aproximadamente 93% da variabilidade das respostas é justificada pelo modelo. É uma medida de quanto o ajuste do modelo se aproxima aos dados experimentais. Neste trabalho, a falta de ajuste do modelo não será substancialmente discutida, priorizando-se a inspeção visual das superfícies de resposta para verificação das condições ótimas e da significância dos fatores avaliados. Os dados estatísticos mostrados na tabela ANOVA (Apêndice A) mostraram que os fatores volume e massa de amostra foram significativos, tanto linear como quadraticamente, enquanto a interação entre esses dois fatores não foi significativa sobre a extração da espécie Hg^{2+} nas amostras. Os termos linear e quadrático são fatores matemáticos envolvidos nos cálculos dos coeficientes da função do modelo que descreve o comportamento dos dados. Normalmente, quando o termo linear é significativo, a superfície de resposta pode não apresentar curvatura, e as respostas tendem para uma região ótima. Já quando o termo quadrático é significativo, a superfície de resposta tende a apresentar uma curvatura que indique um ponto máximo ou mínimo no qual a condição ótima pode estar situada.

Pela inspeção visual da superfície de resposta mostrada na Figura 6a sugere-se que a extração associada a Hg^{2+} diminui quando a massa da amostra e o volume da solução de extração aumentam. Isso é de certa forma esperado, já que massas mais baixas favorecem o contato íntimo entre a solução de extração e a amostra, enquanto os volumes maiores resultam em gradiente de temperatura dentro do frasco de PTFE usado para a extração. Uma vez que o aquecimento convectivo foi empregado e a extração é favorecida sob temperaturas mais altas (como será discutido mais adiante), a solução colocada no fundo do frasco deve ser mais eficientemente aquecida e, portanto, aumentar a extração. O gradiente de temperatura presente quando volumes maiores da solução de extração são usados provavelmente prejudica a difusão do analito. Em geral, massas de amostra e volumes menores são condições ideais para fornecer a maior eficiência possível de extração de Hg. No entanto, quando a repetibilidade do processo é avaliada, percebe-se que a precisão é negativamente afetada sob uso dos menores extremos de massa da amostra e volume da solução, como mostrado na Figura 6b. Pode-se supor que a heterogeneidade natural das amostras é um fator decisivo no uso de alíquotas de pequena massa que, portanto, exige a seleção de uma condição de compromisso para atender tanto à extração ótima quanto à precisão adequada. Nestas circunstâncias, a

condição de compromisso de 100 mg de massa de amostra e 10 mL de solução foi selecionada para estudos posteriores.

Figura 6. Superfície de resposta para a) concentração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) $n=2$) e b) desvio padrão ($n=4$), obtidos a partir da matriz Doehlert para a otimização da massa de amostra e volume de solução (HNO_3), obtidos nas condições experimentais: aquecimento convectivo a $80\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min e 10 mL de HNO_3 $4,0\text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

5.3.2 Avaliação da solução extratora utilizando matriz Box-Behnken para posterior fracionamento de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo

Soluções ácidas diluídas compostas por HNO_3 (DENMARK *et al.* 2018; RAHMAN; KINGSTON, 2005) ou HCl (MARGETINOVA; HOUSEROVA-PELCOVA; KUBAN, 2008; PARK *et al.* 2011; REYES; RAHMAN; KINGSTON, 2009) têm sido descritas na literatura como reagentes para a extração de espécies de Hg para posterior fracionamento e análise de especiação. Entretanto, não há descrição de tais condições particularmente para a análise de espécies de Hg extraídas de amostras de resíduos oleosos de petróleo. Oportunamente, soluções contendo HNO_3 ou HCl foram avaliadas neste trabalho empregando grupos de experimentos com matriz Box-Behnken para a otimização do processo de extração. Além das concentrações de HNO_3 ou HCl , os fatores temperatura do aquecimento convectivo e o tempo de extração também foram estudados. Os detalhes relacionados ao planejamento multivariado estão disponíveis nas Tabelas 9 e 12. Em cada condição, a conversão

de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} , extração de Hg^{2+} e de Hg orgânico e as recuperações para ambas as espécies foram avaliadas sistematicamente. Para este planejamento, uma amostra de borra oleosa sem enriquecimento ou enriquecida com Hg^{2+} ou com CH_3Hg^+ foram consideradas.

5.3.2.1 Otimização da extração de espécies de mercúrio da amostra de borra oleosa com solução de HCl utilizando planejamento de experimentos com matriz Box-Behnken

A solução de HCl foi novamente investigada relativamente a capacidade de extração de espécies de Hg da amostra de borra oleosa, aplicando-se diferentes critérios de avaliação. A extração e recuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ e a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} foram monitoradas durante experimentos com matriz Box-Behnken. Diferentes ajustes de temperatura do bloco digestor (50, 70 e 90 °C), concentrações de HCl (0,0, 1,0 e 2,0 mol L⁻¹) e intervalos de extração (5, 10 e 15 min) foram aplicados, como mostrado na Tabelas 8 e 9.

5.3.2.1.1 Estudo de conversão de CH_3Hg^+ em solução padrão nas otimizações com solução de HCl

Inicialmente, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} foi avaliada em diferentes condições de temperatura, concentrações de HCl e tempo de extração. A matriz do planejamento Box-Behnken com as respectivas condições avaliadas está mostrada na Tabela 8. Após submeter a solução padrão de CH_3Hg^+ na concentração de 100 µg L⁻¹ aos experimentos utilizando a solução de HCl, a solução foi diluída para 1,0 µg L⁻¹ CH_3Hg^+ e posteriormente analisada por CV-AFS. As respostas destes experimentos foram expressas como percentual de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} e estão mostradas na Tabela 8.

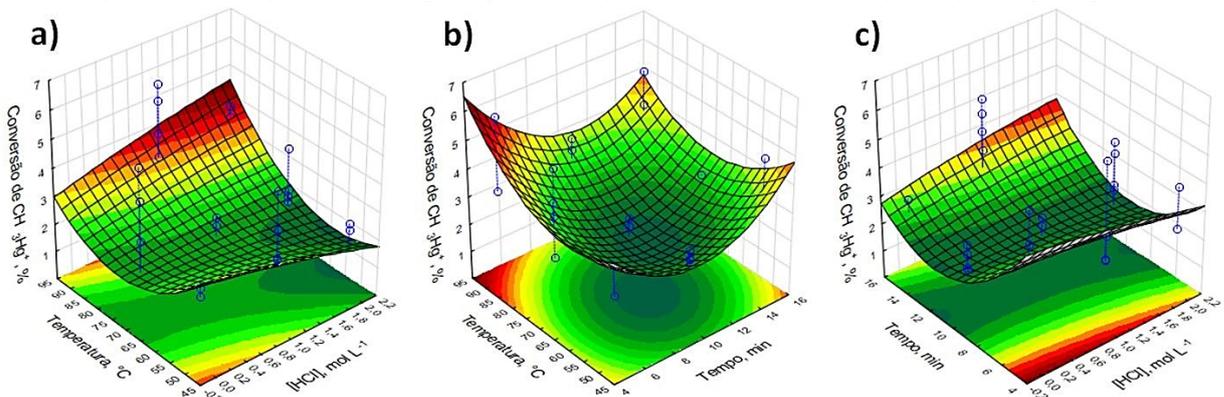
Tabela 8. Matriz Box Behnken utilizada para avaliar a conversão de CH_3Hg^+ na solução padrão durante a otimização da temperatura, $[\text{HCl}]$ e tempo de extração, com os valores reais e valores codificados (-1, 0, +1). Respostas expressas como percentual de conversão de CH_3Hg^+ .

Exp.	Temperatura (°C)	$[\text{HCl}]$ (mol L ⁻¹)	Tempo (min)	Conversão CH_3Hg^+ (%)	
1	50(-1)	0,0(-1)	10(0)	2,80	2,47
2	90(+1)	0,0(-1)	10(0)	1,89	1,98
3	50(-1)	2,0(+1)	10(0)	2,30	2,51
4	90(+1)	2,0(+1)	10(0)	4,05	3,65
5	50(-1)	1,0(0)	5(-1)	2,51	2,48
6	90(+1)	1,0(0)	5(-1)	3,33	5,92
7	50(-1)	1,0(0)	15(+1)	3,52	4,85
8	90(+1)	1,0(0)	15(+1)	5,35	4,19
9	70(0)	0,0(-1)	5(-1)	4,31	5,48
10	70(0)	2,0(+1)	5(-1)	3,84	2,35
11	70(0)	0,0(-1)	15(+1)	2,92	1,45
12	70(0)	2,0(+1)	15(+1)	2,09	1,90
13	70(0)	1,0(0)	10(0)	1,42	1,63
14	70(0)	1,0(0)	10(0)	2,53	2,23
15	70(0)	1,0(0)	10(0)	1,71	1,75

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Após o tratamento estatístico dos dados, as superfícies de resposta foram geradas (Fig. 7), verificando-se, por inspeção visual, o comportamento da conversão de CH_3Hg^+ nas diferentes condições.

Figura 7. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na solução padrão durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$.



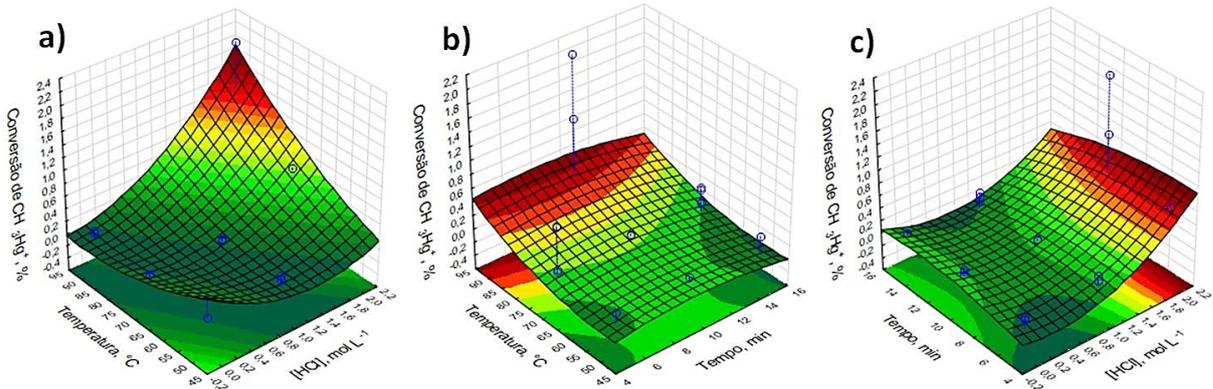
Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos obtidos da ANOVA, apresentados no Apêndice B, mostraram que os fatores temperatura (linear e quadrática) e tempo (quadrático) foram significativos sobre a conversão de CH_3Hg^+ , enquanto a $[\text{HCl}]$ não foi significativa. O coeficiente de determinação foi de 0,54, indicando que apenas 54% dos dados justificam o modelo. Na Figura 7a observa-se que na condição de maior temperatura e $[\text{HCl}]$, a região de cor vermelha representa máxima conversão com valor aproximado de 4%. Já na Figura 7b, cuja superfície gerada relaciona os dois fatores significativos sobre a conversão, observa-se que na região central da superfície de mínimo ocorre menor conversão, aumentando para 4 a 5% em valores máximos de temperatura e tempo de extração. Na Figura 7c, a superfície em forma de telha mostra que a conversão é menor na região central e evidencia que o efeito da $[\text{HCl}]$ não foi significativo ao longo dos experimentos. Apesar dos baixos valores de conversão observados na solução padrão em meio aquoso com a solução de HCl, a conversão deve ser avaliada na matriz da amostra de borra oleosa, a fim de confirmar este efeito frente à complexa matriz desta amostra.

5.3.2.1.2 Estudo de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} na amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HCl

Neste estudo, a amostra de borra oleosa sem enriquecimento e a amostra enriquecida com CH_3Hg^+ (20 mg kg^{-1}) foram submetidas à extração nas diferentes condições experimentais utilizando a solução de HCl (Tabela 9). Uma vez que CH_3Hg^+ não é detectado pelo método de determinação, a concentração de Hg^{2+} resultante da conversão de CH_3Hg^+ foi determinada pela subtração do Hg^{2+} detectado no extrato da amostra enriquecida pela concentração de Hg^{2+} naturalmente extraído da amostra não enriquecida. Dessa forma, em relação ao total de CH_3Hg^+ adicionado foi possível estimar o percentual de conversão de CH_3Hg^+ . As respostas de conversão de CH_3Hg^+ (%) estão mostradas na Tabela 9. As superfícies de resposta geradas pela matriz de experimentos Box-Behnken estão mostradas na Figura 8.

Figura 8. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na amostra de borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HCl}]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HCl}]$.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

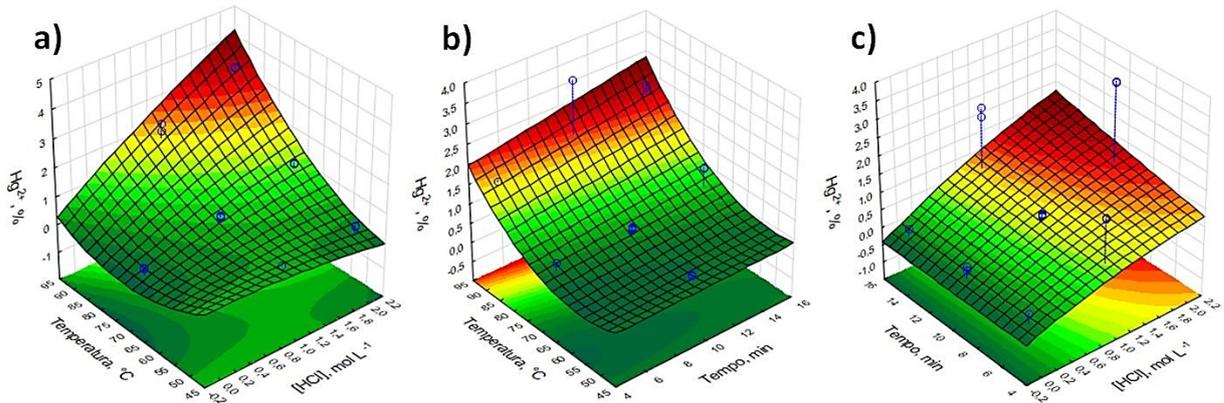
No Apêndice C está mostrada a tabela ANOVA referente às superfícies de resposta apresentadas na Figura 8. Estatisticamente, 76% da variabilidade nas respostas é explicada pelo modelo. Em contraste com o que foi observado nos estudos da conversão de CH_3Hg^+ com a solução padrão, os fatores que se mostraram significativos para a conversão na amostra de borra oleosa foram a temperatura e a $[\text{HCl}]$. Além disso, a interação entre os fatores temperatura e $[\text{HCl}]$ foi significativa. Nas superfícies mostradas na Fig 8, notavelmente, o fator tempo de extração não foi significativo sobre a conversão no decorrer dos experimentos. Por outro lado, nas Figuras 8a, 8b e 8c, observa-se que para os fatores temperatura e $[\text{HCl}]$ a máxima conversão foi atingida nas condições experimentais mais drásticas. Apesar disso, a máxima conversão alcançada foi de 2% nas condições de 90 °C e 2,0 mol L⁻¹ de HCl, consideradas baixas e aceitáveis para proceder a extração das espécies de Hg nestas condições.

5.3.2.1.3 Avaliação da extração de Hg^{2+} e de Hg orgânico da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HCl

Para estes estudos apenas a amostra de borra oleosa sem enriquecimento foi submetida à extração nas diferentes condições experimentais da matriz Box-Behnken (Tabela 9). Para verificar a extração de Hg^{2+} (inorgânico), o extrato filtrado foi analisado por CV-AFS. Adicionalmente, para estimar a concentração de Hg orgânico presente no mesmo extrato, o extrato filtrado foi submetido à digestão com aquecimento por micro-ondas, para determinação do Hg total no extrato. Subtraindo-

se a concentração total de Hg no extrato pela concentração de Hg inorgânico é possível aferir a concentração de Hg orgânico extraída e medida indiretamente. As respostas das extrações de Hg inorgânico e Hg orgânico estão mostradas na Tabela 9. As superfícies de resposta geradas para a extração de Hg^{2+} estão mostradas na Figura 9.

Figura 9. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para a extração de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e [HCl]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HCl].

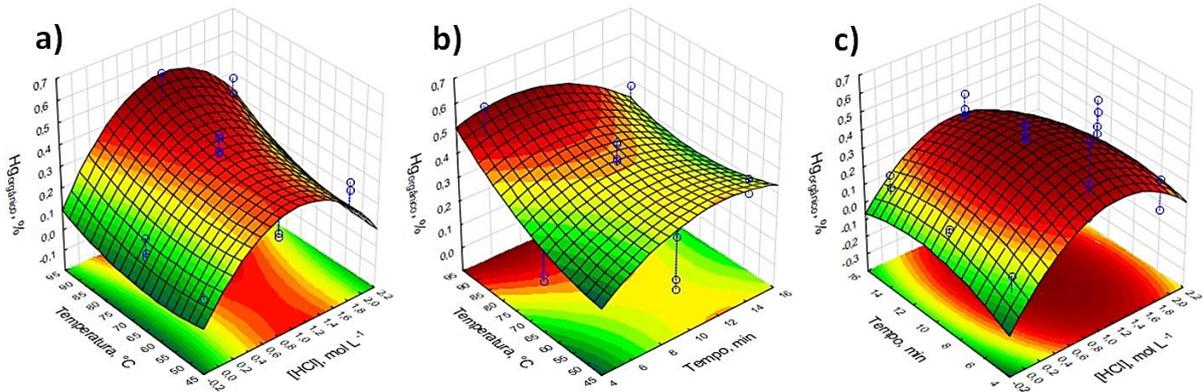


Fonte: elaborado pela autora (2019)

Na Figura 9 os valores máximos de extração de Hg^{2+} alcançados nas condições experimentais mais drásticas foram excessivamente baixos, atingindo um máximo de 3%. Isto corrobora com informações da literatura de que espécies de Hg em sedimentos de petróleo são quimicamente inertes a ácidos diluídos (WILHELM; LIANG; KIRCHGESSNER, 2006). Além disso, a concentração de HCl avaliada foi relativamente baixa e possivelmente o uso de concentrações superiores poderiam apresentar maior efeito sobre a extração. Entretanto, como visto nos estudos preliminares sobre conversão com aquecimento assistido por micro-ondas, concentrações superiores a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ resultaram na conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} aplicando potência de 200 W por 10 min (Fig. 3a). No Apêndice D, está mostrada a tabela ANOVA com os parâmetros estatísticos relativos à superfície de resposta da Figura 9. Apesar da ineficácia do HCl na extração das espécies de Hg, estatisticamente, 96% da variabilidade das respostas é justificada pelo modelo. Em relação à extração de Hg^{2+} , todos os fatores foram significativos em uma mesma proporção, exceto o tempo de extração.

Em conformidade com as respostas obtidas para Hg^{2+} , na Figura 10 estão mostradas as superfícies de resposta obtidas para a extração de Hg orgânico.

Figura 10. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para a extração de Hg orgânico (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e [HCl]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HCl].



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos da ANOVA para a extração de Hg orgânico (%) estão mostrados no Apêndice E. Apesar de as superfícies geradas na Figura 10 serem de máximo, apenas 73% da variabilidade das respostas justificam o modelo. Complementarmente, os três fatores foram significativos. Como pode ser observado nas superfícies, nas condições de máxima temperatura (Figura 10a e 10b) e nas condições médias de [HCl] e tempo (Figura 10a, 10b e 10c), a máxima extração de Hg orgânico foi de 0,4% do total de Hg presente na amostra. Estes resultados mostram, novamente, que HCl não teve potencial para extrair Hg inorgânico da amostra de borra oleosa, assim como não extraiu espécies de Hg orgânico. Estas espécies podem estar presentes na amostra em baixas concentrações dificultando a detecção por CV-AFS.

5.3.2.1.4 Avaliação da recuperação das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HCl

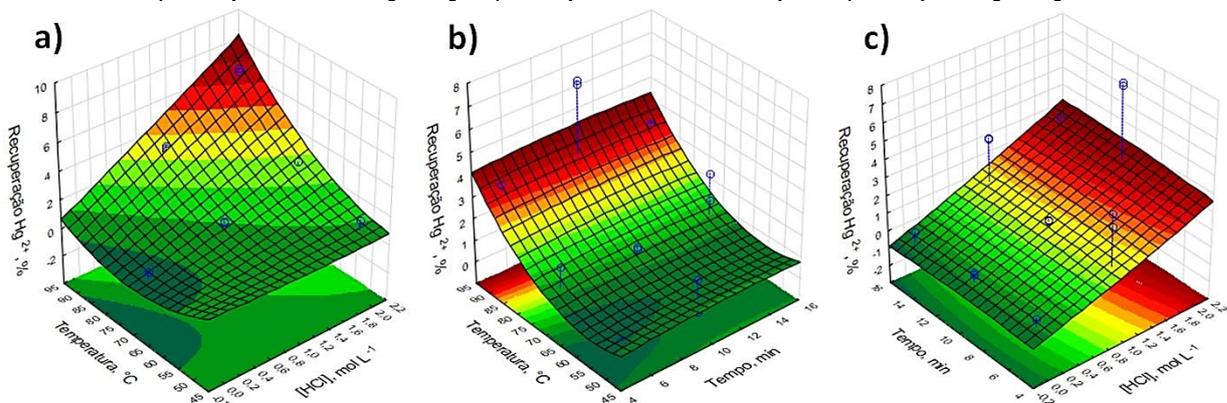
Para avaliar a recuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ adicionados na amostra previamente durante as diferentes condições experimentais (Tabela 9) e avaliar a eficiência do método, as amostras enriquecidas com as duas espécies foram analisadas. Para avaliar o percentual de Hg^{2+} recuperado, tanto a amostra sem enriquecimento como a amostra enriquecida com Hg^{2+} foram submetidas à extração e posterior determinação de Hg^{2+} por CV-AFS. Assim, o Hg^{2+} determinado na amostra enriquecida foi subtraído da concentração de Hg^{2+} extraído naturalmente da amostra.

Dessa forma, foi estabelecido o percentual de recuperação de Hg^{2+} adicionado, nas diferentes condições experimentais.

Por outro lado, para avaliar a recuperação de CH_3Hg^+ adicionado, a amostra enriquecida com CH_3Hg^+ foi submetida à extração e posteriormente procedeu-se a digestão do extrato. Subtraindo-se a concentração de Hg^{2+} determinada no extrato digerido da amostra enriquecida com CH_3Hg^+ pela concentração de Hg^{2+} presente no extrato digerido da amostra sem enriquecimento, foi possível estimar a concentração de Hg^{2+} proveniente do CH_3Hg^+ adicionado. As respostas correspondentes aos percentuais de recuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ obtidos em cada condição experimental com HCl estão mostradas na Tabela 9.

A Figura 11 mostra as superfícies de resposta geradas para a recuperação de Hg^{2+} adicionada na amostra de borra oleosa. A tabela ANOVA associada a estes dados está mostrada no Apêndice F.

Figura 11. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e [HCl]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HCl].

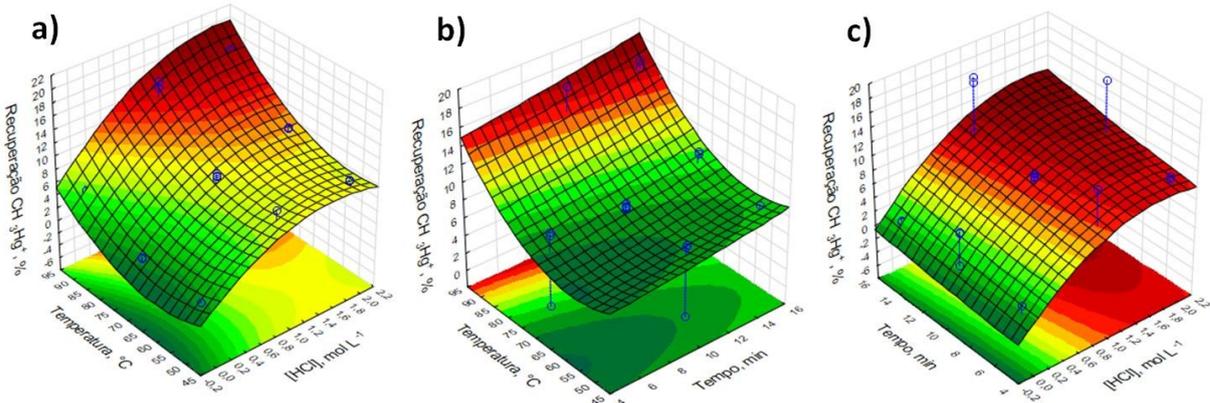


Fonte: elaborado pela autora (2019)

O tratamento estatístico revela que 94% da variabilidade nos resultados é justificada pelo modelo ajustado (Fig. 11). Além disso, os fatores significativos sobre a recuperação de Hg^{2+} foram temperatura, [HCl] e a interação da temperatura com [HCl]. Nestas superfícies, o tempo de extração não foi um fator significativo. Na Figura 11a, a qual mostra a superfície gerada para os dois fatores significativos, o valor máximo encontrado para recuperação de Hg^{2+} foi de 7%. Este valor é significativamente baixo e demonstra que HCl na concentração de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ não foi suficiente para promover a recuperação de Hg^{2+} adicionado na matriz. Isto reforça o comportamento observado nos estudos sobre a extração de Hg^{2+} (Fig. 9).

Na Figura 12 são mostradas as superfícies de resposta obtidas para a recuperação de CH_3Hg^+ adicionado na amostra de borra oleosa. No Apêndice G estão mostrados os dados estatísticos referentes a este estudo, fornecidos pela ANOVA.

Figura 12. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de CH_3Hg^+ (%) na borra oleosa durante experimentos de otimização para a) temperatura e [HCl]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HCl].



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Nessas superfícies (Fig. 12), o coeficiente de determinação foi de 0,98, sendo que todos os fatores foram significativos, exceto tempo de extração. Como observado (Fig. 12), a recuperação de CH_3Hg^+ na condição mais drástica (90 °C, 2,0 mol L⁻¹ e 15 min) foi de 17%, um valor superior ao encontrado para a recuperação de Hg^{2+} (Fig. 11). Neste caso, é evidente que o HCl tem uma capacidade ligeiramente maior de extrair CH_3Hg^+ quando comparada a Hg^{2+} . Um efeito semelhante foi observado nos estudos com extração assistida por micro-ondas (Tabela 4), entretanto com amostra biológica (TORT-2). Todavia, espécies orgânicas, incluindo CH_3Hg^+ , não foram eficientemente extraídas (Fig. 10), possivelmente, pelo fato de estarem em baixíssima concentração na amostra de borra oleosa.

Tabela 9. Matriz Box-Behnken e respostas da extração de Hg^{2+} , extração de Hg orgânico, conversão de CH_3Hg^+ e recuperações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , referentes a otimização da temperatura, [HCl] e tempo de extração.

Exp.	T (°C)	[HCl] (mol L ⁻¹)	Tempo (min)	Extração Hg^{2+} (%)		Extração Hg_{org} (%)		Conversão CH_3Hg^+ (%)		Rec. Hg^{2+} (%)		Rec. CH_3Hg^+ (%)	
1	50	0,0	10	0,12	0,12	0,07	0,03	0,00	0,00	0,0	0,0	0,4	0,4
2	90	0,0	10	0,01	0,03	0,07	0,09	0,07	0,10	0,1	0,0	5,2	5,1
3	50	2,0	10	0,44	0,42	0,29	0,25	0,01	0,01	1,5	1,5	8,4	8,2
4	90	2,0	10	3,38	3,37	0,37	0,44	2,10	1,18	6,7	6,9	17,3	17,3
5	50	1,0	5	0,13	0,13	0,19	0,21	0,03	0,03	0,4	0,4	5,5	5,5
6	90	1,0	5	1,64	1,66	0,37	0,60	0,11	0,03	3,7	3,0	12,1	12,1
7	50	1,0	15	0,30	0,30	0,35	0,29	0,09	0,09	0,5	0,5	9,0	9,0
8	90	1,0	15	2,26	2,49	0,32	0,44	0,00	0,15	3,5	3,4	16,1	16,9
9	70	0,0	5	0,04	0,04	0,07	0,07	0,03	0,00	0,0	0,0	0,9	0,9
10	70	2,0	5	0,60	0,60	0,21	0,04	0,65	0,66	1,8	1,8	9,2	8,8
11	70	0,0	15	0,01	0,01	0,16	0,09	0,03	0,01	0,0	0,0	0,8	0,9
12	70	2,0	15	1,27	1,29	0,02	0,02	0,21	0,25	1,7	2,9	10,5	10,7
13	70	1,0	10	0,55	0,60	0,47	0,48	0,04	0,03	1,0	1,0	7,8	7,8
14	70	1,0	10	0,63	0,60	0,40	0,41	0,01	0,04	1,1	1,1	8,6	8,2
15	70	1,0	10	0,58	0,60	0,34	0,19	0,04	0,02	1,0	1,0	8,0	8,1

Fonte: elaborado pela autora (2019)

5.3.2.2 Otimização da extração de espécies de mercúrio da amostra de borra oleosa com solução de HNO_3 utilizando planejamento de experimentos Box-Behnken

As soluções diluídas de HNO_3 foram avaliadas devido à conhecida eficiência para a extração de espécies de Hg (RAHMAN; KINGSTON, 2005). A otimização das condições de extração considerando diferentes temperaturas (50, 70 e 90 °C), concentrações de HNO_3 (0,0, 4,0 e 8,0 mol L⁻¹) e intervalos de extração (5, 10 e 15 min) foi feita usando planejamento de experimentos Box-Behnken.

Após o tratamento estatístico dos dados e produção das superfícies de resposta, a conversão de CH_3Hg^+ , extração e recuperação das espécies de Hg foram investigadas. Os dados associados a esses experimentos serão mostrados nas seções seguintes.

5.3.2.2.1 Estudo de conversão de CH_3Hg^+ em solução padrão nas otimizações com solução de HNO_3

Inicialmente, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} foi avaliada sob diferentes condições de temperatura, concentração da solução de HNO_3 e tempo de extração. A matriz do planejamento Box-Behnken está mostrada na Tabela 10. Após submeter a solução padrão de CH_3Hg^+ na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ aos experimentos utilizando a solução de HNO_3 , a solução foi diluída para $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ CH_3Hg^+ e posteriormente analisada por CV-AFS. As respostas obtidas por meio destes experimentos foram expressas como percentual de conversão de CH_3Hg^+ e estão mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Matriz Box Behnken utilizada para avaliar a conversão de CH_3Hg^+ na solução padrão durante a otimização da temperatura, $[\text{HNO}_3]$ e tempo de extração, em diferentes condições. Respostas expressas como percentual de conversão de CH_3Hg^+ .

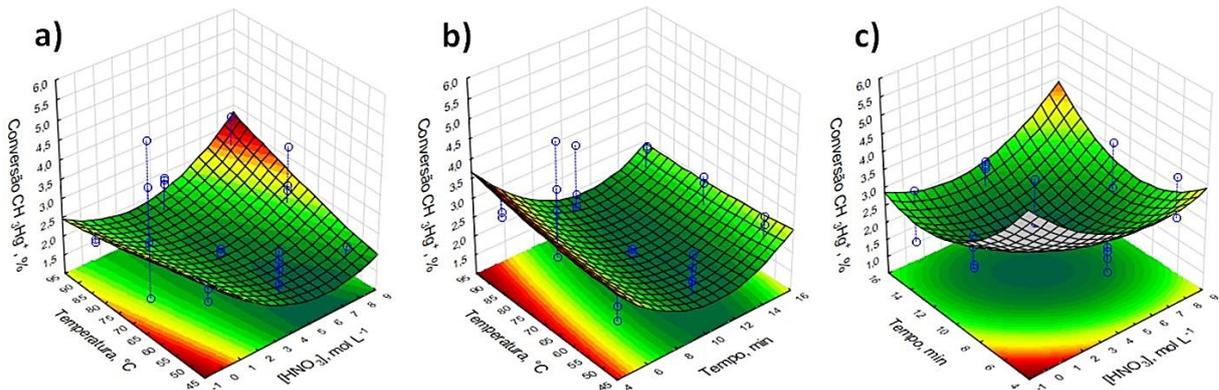
Exp.	Temperatura (°C)	$[\text{HNO}_3]$ (mol L ⁻¹)	Tempo (min)	Conversão CH_3Hg^+ (%)	
1	50	0,0	10	2,80	2,47
2	90	0,0	10	1,89	1,98
3	50	8,0	10	2,13	2,12
4	90	8,0	10	3,61	2,32
5	50	4,0	5	2,03	2,41
6	90	4,0	5	2,72	2,59
7	50	4,0	15	2,87	2,65
8	90	4,0	15	2,77	2,71
9	70	0,0	5	4,31	5,48
10	70	8,0	5	3,76	2,60
11	70	0,0	15	2,92	1,45
12	70	8,0	15	2,75	1,83
13	70	4,0	10	1,77	1,64
14	70	4,0	10	1,77	1,72
15	70	4,0	10	1,67	1,89

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos da ANOVA estão mostrados no Apêndice H. As superfícies de resposta foram geradas para verificar, por inspeção visual, as regiões

que englobassem as condições nas quais houvesse maior ou menor conversão de CH_3Hg^+ . Na Figura 13 estão mostradas as superfícies de resposta obtidas para conversão de CH_3Hg^+ na solução padrão utilizando solução de HNO_3 .

Figura 13. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na solução padrão nos experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

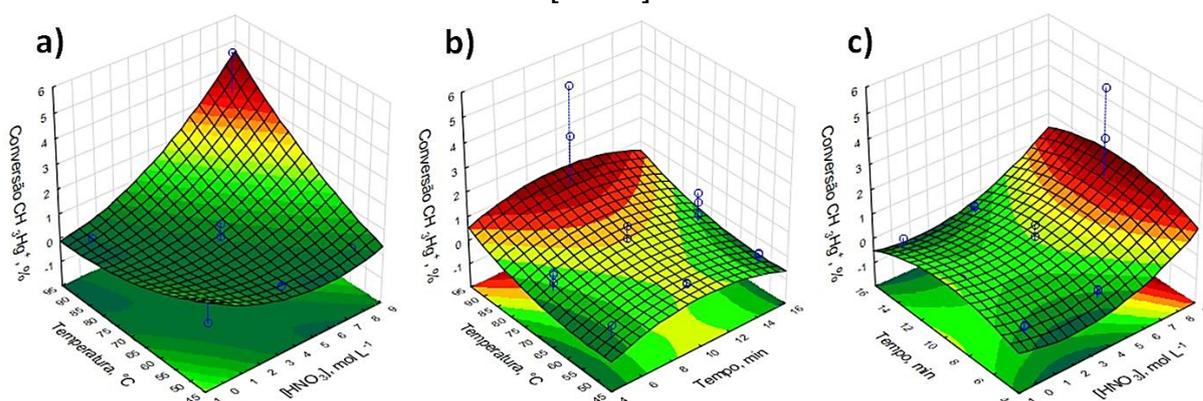
Estatisticamente, as superfícies de resposta mostradas na Figura 13, apresentaram um coeficiente de determinação de 0,56. Nesse contexto, as respostas mostram-se insatisfatoriamente ajustadas ao modelo. Além disso, a partir dos dados da ANOVA, os fatores significativos foram tempo, $[\text{HNO}_3]$, a interação de temperatura e $[\text{HNO}_3]$, a interação entre $[\text{HNO}_3]$ e tempo. A inspeção visual das superfícies de resposta revela que a conversão máxima encontrada foi de aproximadamente 4% em solução padrão de CH_3Hg^+ (Fig 13a, 13b e 13c). Em vista da obtenção de respostas imprecisas, a verificação da conversão de CH_3Hg^+ na amostra de borra oleosa é imprescindível para obter informações mais esclarecedoras sobre este efeito na matriz complexa.

5.3.2.2.2 Estudo de conversão de CH_3Hg^+ na amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HNO_3

Para avaliar o efeito de conversão de CH_3Hg^+ na borra oleosa, a amostra sem enriquecimento e a amostra enriquecida com CH_3Hg^+ (20 mg kg^{-1}) foram submetidas à extração nas diferentes condições experimentais utilizando a solução de HNO_3 (Tabela 12).

As respostas de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} (%) estão mostradas na Tabela 12, e as superfícies de resposta geradas pela matriz de experimentos Box-Behnken estão mostradas na Figura 14. No Apêndice I estão mostrados os dados estatísticos da ANOVA.

Figura 14. Superfície de resposta obtida a partir de matriz de design Box-Behnken para conversão de CH_3Hg^+ (%) na amostra de borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

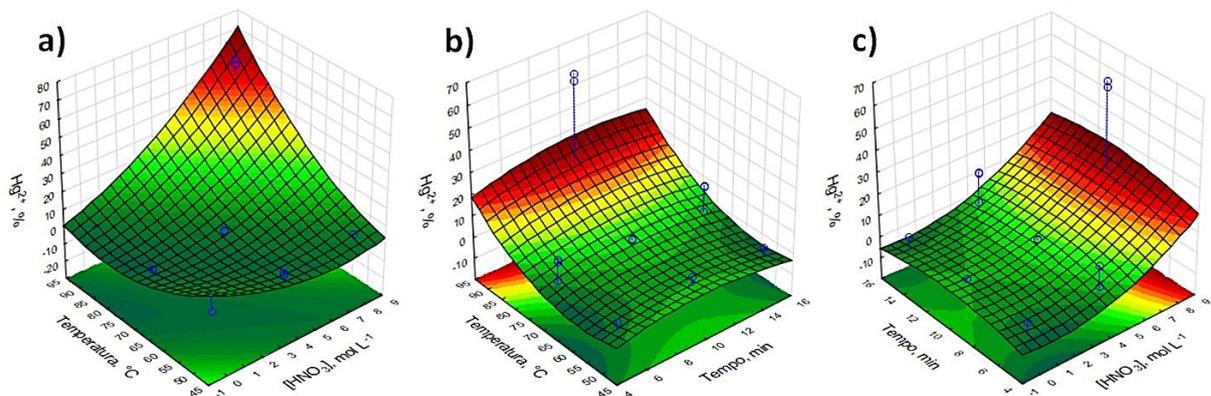
A Figura 14 mostra, o efeito de conversão de CH_3Hg^+ na matriz da amostra. Estatisticamente, a partir dos dados da ANOVA, 72% da variabilidade das respostas é explicada pelo modelo. Adicionalmente, os fatores temperatura, $[\text{HNO}_3]$, tempo e a interação de temperatura e $[\text{HNO}_3]$ foram significativos. Visualmente, pode-se inferir, pela Figura 14a, que o uso combinado de HNO_3 $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ e extração a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ gerou máxima conversão de CH_3Hg^+ , ainda assim atingindo apenas 4%. Em relação ao fator tempo, nas Figuras 14b e 14c, evidencia-se que 10 min de extração foram suficientes para alcançar máxima conversão (4%) nas condições mais drásticas de temperatura e $[\text{HNO}_3]$. Este valor de conversão, ainda assim, é baixo, e pode ser considerado aceitável para aplicação de um método de extração, visto que na amostra de borra oleosa não foram detectadas espécies orgânicas de Hg.

5.3.2.2.3. Avaliação da extração de Hg^{2+} e de Hg orgânico da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HNO_3

A extração das espécies de Hg foi determinada pela medição no extrato (para Hg^{2+}) e no extrato digerido (para CH_3Hg^+) e verificação da proporção extraída em

relação à concentração total de Hg na amostra. Para verificar a extração das espécies de Hg, a amostra de borra oleosa sem enriquecimento foi submetida à extração nas diferentes condições experimentais da matriz Box-Behnken utilizando a solução de HNO_3 (Tabela 12). Para determinar a concentração das espécies, os mesmos processos aplicados para a solução de HCl, descritos na seção 5.3.2.1.3, foram empregados neste estudo. As respostas de extração de Hg inorgânico e Hg orgânico estão mostradas na Tabela 12. As superfícies de resposta geradas para a extração de Hg^{2+} estão mostradas na Figura 15.

Figura 15. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para extração de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$.

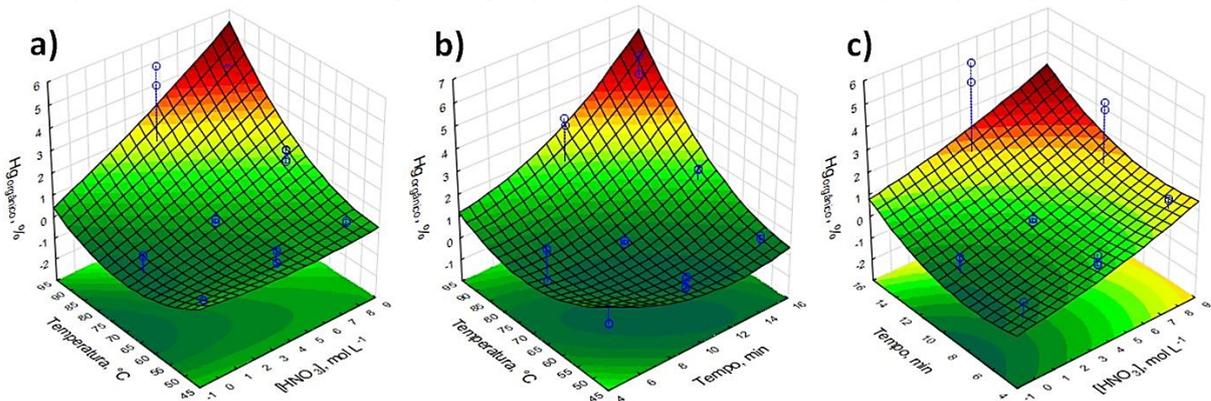


Fonte: elaborado pela autora (2019)

O tratamento estatístico dos dados a partir da ANOVA (Apêndice J), gerou um coeficiente de determinação de 0,89, enquanto todos os fatores mostraram-se significativos. Através das superfícies de resposta mostradas na Figura 15, pode-se observar que ocorre um aumento da extração de Hg^{2+} com o aumento da temperatura e $[\text{HNO}_3]$, principalmente (Fig. 15a). Visualmente, ocorre um aumento abrupto na quantidade extraída de Hg^{2+} próximo das condições 90 °C e 8,0 mol L⁻¹. Nessa condição, 60% do Hg total da amostra foi extraído como Hg^{2+} . Em relação ao fator tempo (Fig. 15b e 15c), 10 min de extração foram suficientes para fornecer a máxima extração de Hg^{2+} observada, nas condições máximas de temperatura e $[\text{HNO}_3]$ avaliadas. Essa condição parece satisfatória para extrair espécies de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa, em vista da complexidade da matriz oleosa e das diferentes formas de Hg que podem estar presentes nesta amostra.

No que concerne a extração de Hg orgânico, na Figura 16 são mostradas as superfícies de resposta geradas após o tratamento dos dados. As respostas são expressas em percentual de Hg orgânico e estão presentes na Tabela 12.

Figura 16. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para extração de Hg orgânico (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e [HNO₃]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HNO₃].



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos da ANOVA (Apêndice K) mostraram que 90% da variabilidade dos dados são justificadas pelo modelo. Além disso, todos os fatores foram significativos, exceto a interação de [HNO₃] e tempo. Na Fig. 16a, a condição máxima de temperatura, garantiu maior extração de Hg orgânico da amostra (5%), tanto na concentração de 4,0 como de 8,0 mol L⁻¹ de HNO₃. Na Fig. 16b, observa-se que na temperatura de 90 °C e 10 min em torno de 4% do Hg total foi extraído como Hg orgânico, enquanto nesta mesma temperatura e tempo de 15 min 5% de Hg total foi correspondente à fração orgânica. Já na Fig. 16c, apesar de a interação dos fatores tempo e [HNO₃] não ser significativa, mostra-se que nas condições mais drásticas destes fatores, a máxima extração de Hg “orgânico” obtida foi de 5% em relação ao Hg total. Destes 5% referentes ao Hg “orgânico”, não são conhecidas as espécies presentes nesta fração.

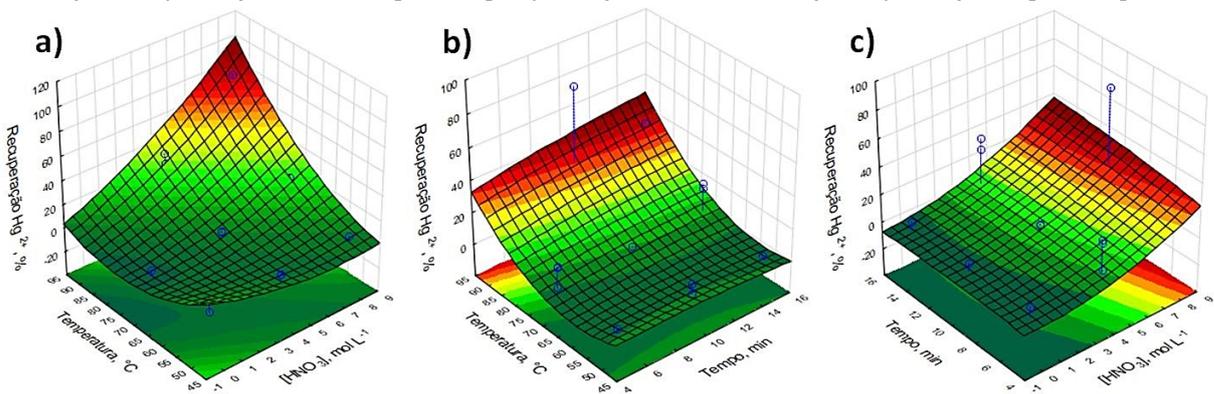
5.3.2.2.4 Avaliação da recuperação das espécies Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ da amostra de borra oleosa durante as otimizações com solução de HNO₃

Para avaliar a recuperação das espécies de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ adicionadas na amostra sob as diferentes condições experimentais (Tabela 12), as amostras enriquecidas com ambas espécies foram analisadas. As respostas correspondentes

aos percentuais de recuperação das espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ obtidos em cada condição experimental com HNO_3 estão mostradas na Tabela 12.

Na Figura 17 estão mostradas as superfícies de resposta obtidas para a recuperação de Hg^{2+} adicionado na amostra de borra oleosa.

Figura 17. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de Hg^{2+} (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e $[\text{HNO}_3]$; b) temperatura e tempo; c) tempo e $[\text{HNO}_3]$.



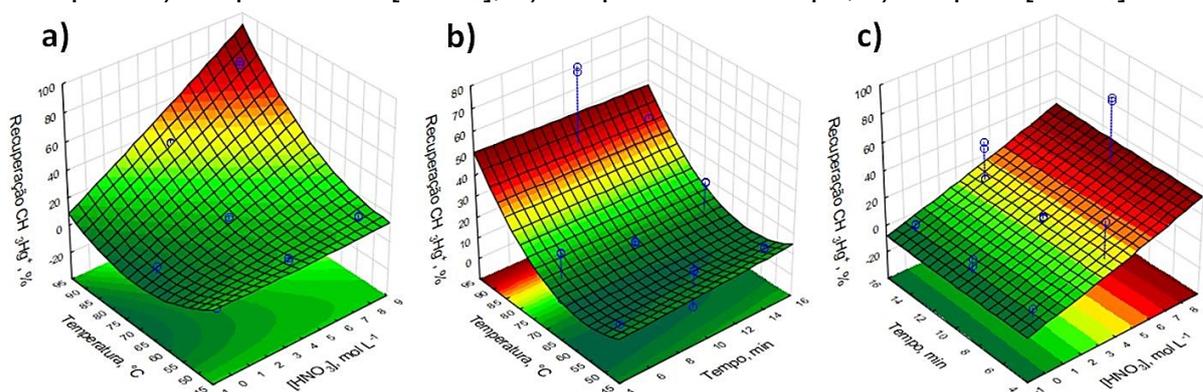
Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos da ANOVA (Apêndice L) revelaram que 93% da variabilidade das respostas é explicada pelo modelo ajustado e todos os fatores foram significativos, exceto o fator tempo. Como mostrado nos demais estudos com a solução de HNO_3 , a falta de ajuste é significativa. Isso é esperado, visto que se busca uma condição de maior extração ou recuperação das espécies, e com o aumento das condições, é natural um aumento da resposta para condições mais drásticas. Dessa forma, as respostas experimentais acabam tendo valores distintos dos preditos pela função quadrática de uma superfície de máximo, desejável, resultando em falta de ajuste do modelo. Apesar disso, a variabilidade dos dados com o modelo ainda é bem justificada e, neste trabalho, foi suficiente para validar as respostas obtidas e proceder com a inspeção visual das superfícies de resposta. Na Fig. 17a pode-se observar que nas máximas condições de temperatura e $[\text{HNO}_3]$ (90 °C e 8,0 mol L^{-1} , respectivamente) a recuperação de Hg^{2+} adicionado na amostra foi de 80%, o qual foi o máximo obtido nos experimentos. Já nas Fig. 17b e 17c, pode-se observar que em 10 min de extração foi alcançada a recuperação máxima de 80% do Hg^{2+} adicionado. Isto mostra que a condição de 90 °C, 8,0 mol L^{-1} de HNO_3 e 10 min gerou melhor recuperação de Hg^{2+} , sendo considerada aceitável para ser empregada como estratégia de extração. Coincidentemente, Nevado *et al.* (2008), encontraram

recuperações próximas a 100% para espécies de Hg em amostras de sedimento, empregando extração assistida por micro-ondas a 80 °C com HNO₃ 6,0 mol L⁻¹.

Referente à recuperação de CH₃Hg⁺, na Figura 18 estão mostradas as superfícies de resposta obtidas com a solução de HNO₃.

Figura 18. Superfície de resposta obtida a partir de matriz Box-Behnken para recuperação de CH₃Hg⁺ (%) na borra oleosa durante os experimentos de otimização para a) temperatura e [HNO₃]; b) temperatura e tempo; c) tempo e [HNO₃].



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Neste caso, como mostrado na Tabela ANOVA (Apêndice M), 96% da variabilidade das respostas justificam o modelo. Para as superfícies da Figura 18, os fatores temperatura, [HNO₃], a interação de temperatura e [HNO₃] e a interação de temperatura e tempo foram significativos. O fator tempo não foi significativo, como mostrado nas Fig. 18b e 18c, não resultando em variação significativa das respostas no decorrer dos experimentos. Pode-se observar nas superfícies de resposta que uma recuperação máxima de 75% foi atingida na máxima condição de temperatura e [HNO₃].

É prudente inferir que a complexidade e hidrofobicidade das amostras de borra oleosa contribuem significativamente para os valores de recuperação baixos encontrados nestes estudos. Sugere-se que o Hg²⁺ tem a capacidade de se ligar a diferentes compostos na matriz orgânica, tais como tióis, formando espécies de Hg estáveis e hidrofóbicas que não são eficientemente extraídas para a fase aquosa (AVELLAN *et al.* 2018; GAULIER *et al.* 2015).

Após os estudos da avaliação das soluções HCl e HNO₃ sobre a extração das espécies de Hg com aquecimento convectivo, ficou claro que a extração usando solução de HNO₃ foi mais eficiente tanto para Hg²⁺ quanto para CH₃Hg⁺ do que a extração com HCl. Ao mesmo tempo, a conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺ foi limitada a

4%, sob a mesma condição (90 °C, HNO₃ 8,0 mol L⁻¹ e 10 min) e este valor foi considerado aceitável para os estudos posteriores, almejando aplicação da função desejabilidade.

5.3.2.2.5 Aplicação da função desejabilidade para otimização do método de extração das espécies Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ de borra oleosa utilizando a solução de HNO₃

Em estudos que apresentam diversas respostas para um mesmo grupo de experimentos, a otimização de uma condição que satisfaça a todas as respostas, pode ser efetuada pelo uso de cálculos matemáticos.

Como visto anteriormente, nos estudos com a solução de HNO₃, obteve-se respostas para a extração, taxa de conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺ e recuperação das espécies. Apesar de a maioria dessas respostas convergirem para uma mesma condição experimental, a função de desejabilidade foi utilizada neste estudo, para a determinação de uma condição de compromisso para extração das frações de Hg e fornecer uma maximização da resposta. Os cálculos foram realizados considerando a conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺ (o percentual de 4% de conversão na máxima condição foi considerado aceitável), a máxima extração para Hg²⁺ e Hg orgânico e a máxima recuperação para Hg²⁺ e CH₃Hg⁺, parâmetros muito relevantes na otimização da condição experimental. Nesse processo, a desejabilidade individual foi calculada para todas as respostas obtidas, classificando-se como 0 as respostas indesejáveis e como 1 as respostas desejáveis. É importante considerar que a conversão mínima de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺ é desejada durante o processo de extração. Mesmo que a condição mais severa (90 °C por 10 min, 8,0 mol L⁻¹ de HNO₃) tenha apresentado uma conversão de 4%, este valor foi considerado insignificante e foi classificado como resposta desejável. (Tabela 12). A Equação 4 foi usada para os cálculos considerando as respostas máximas como desejáveis, na qual (di) é a desejabilidade individual, (y) é a resposta monitorada, (L) é a menor resposta aceitável, (T) é a resposta alvo e (s) é um peso dado à resposta. Posteriormente, a desejabilidade global (D) foi calculada usando a Equação 5, que combina as desejabilidades individuais para uma condição de compromisso (PEREIRA FILHO, 2017, p 75). Os dados calculados pela ANOVA gerada pelo tratamento estatístico e as desejabilidades individuais e globais são mostrados na Tabela 11 e Tabela 12, respectivamente. Os dados da ANOVA mostraram que os fatores temperatura e [HNO₃] e tempo foram significativos quanto

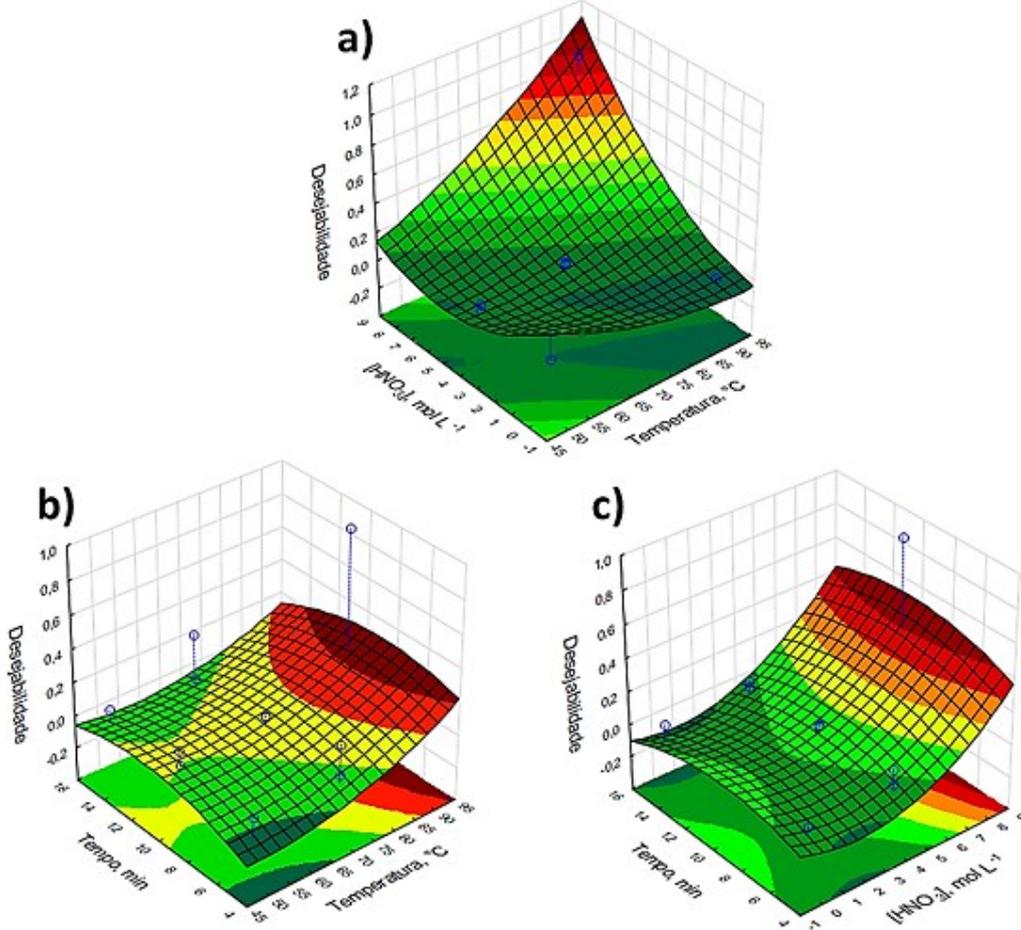
a função quadrática. Isso indica que a superfície de resposta tende a apresentar curvatura em relação aos níveis estudados para estes fatores. A interação dos fatores também foi significativa, como mostrado na Tabela 11. Esses dados mostraram que o fator tempo foi significativo nas respostas apenas quando interagindo com outros fatores. Particularmente, o fator mais significativo nas respostas para função desejabilidade considerando $p \leq 0,05$ é a $[\text{HNO}_3]$, seguida pela interação da temperatura e $[\text{HNO}_3]$ e após pela temperatura, como mostrado na Tabela 11. Outro aspecto relevante é que 85% da variabilidade a resposta é explicada pelo modelo, independentemente da falta de ajuste encontrada.

As superfícies de resposta mostradas na Figura 19 demonstram que a função de desejabilidade da melhor resposta para extração das espécies de Hg culmina com a condição máxima avaliada para temperatura e $[\text{HNO}_3]$, 90°C e $8,0 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, e o tempo de 10 min de extração. É interessante notar que os fatores temperatura e concentração de HNO_3 e suas interações apresentaram maior efeito na extração e estabilidade das espécies de Hg do que o tempo de extração, conforme apresentado na Tabela 11 e na Figura 19. Devido à complexidade das amostras de borra oleosa, um máximo de 4% de conversão de CH_3Hg^+ foi considerado aceitável neste estudo, pela adoção de HNO_3 $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ e 90°C por 10 min como condição otimizada. Esta condição proporcionou melhor extração e recuperação de espécies de Hg considerando a conversão aceitável de CH_3Hg^+ após cálculos de desejabilidade individual. Cabe destacar que testes de estabilidade e recuperação para espécies de Hg foram sistematicamente realizados para todas as amostras analisadas.

$$di = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases} \quad (4)$$

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (5)$$

Figura 19. Superfícies de resposta da desejabilidade global para conversão de CH_3Hg^+ , extração de Hg^{2+} e Hg orgânico e recuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ durante a otimização dos fatores (a) $[\text{HNO}_3]$ e temperatura (b) tempo e temperatura (c) tempo e $[\text{HNO}_3]$ na extração das espécies de Hg da borra oleosa com aquecimento convectivo para posterior fracionamento.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Tabela 11. ANOVA para a desejabilidade global de conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} , extração de Hg^{2+} e Hg orgânico e recuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ para a otimização da extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa com solução de HNO_3 .

$R^2 = 0,84593$.

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	0,104265	1	0,104265	1346,963	0,000742	Significativo
Temperatura (Q)	0,015003	1	0,015003	193,814	0,005120	Significativo
[HNO_3] (L)	0,276923	1	0,276923	3577,466	0,000279	Significativo
[HNO_3] (Q)	0,077408	1	0,077408	1000,001	0,000999	Significativo
Tempo (L)	0,000070	1	0,000070	0,901	0,442792	
Tempo (Q)	0,025809	1	0,025809	333,419	0,002986	Significativo
Temperat. x [HNO_3]	0,184293	1	0,184293	2380,820	0,000420	Significativo
Temperat. x Tempo	0,003926	1	0,003926	50,720	0,019152	Significativo
[HNO_3] x Tempo	0,001534	1	0,001534	19,815	0,046941	Significativo
Falta de ajuste	0,126413	3	0,042138	544,361	0,001834	Significativo
Erro puro	0,000155	2	0,000077			
SQ total	0,821488	14				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, gl = graus de liberdade, SQ = soma quadrática, MQ = média quadrática.

Tabela 12. Matriz Box-Behnken, respostas e desejabilidades individuais e global calculadas para extração de Hg^{2+} (%), extração de Hg orgânico (%), conversão de CH_3Hg^+ (%), recuperações de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (%) para otimização do método de extração de espécies de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo.

Exp.	T (°C)	[HNO ₃] (mol L ⁻¹)	Tempo (min)	Resposta								Desejabilidade individual					Desejab. Global		
				Ext. Hg^{2+} (%)	Ext. Hg_{org} (%)	Conversão CH_3Hg^+ (%)	Recuperação Hg^{2+} (%)	Recuperação CH_3Hg^+ (%)	Hg^{2+} ext. (%)	Hg_{org} ext. (%)	CH_3Hg^+ conv. (%)	Hg^{2+} rec. (%)	CH_3Hg^+ rec. (%)						
1	50	0,0	10	0,12	0,12	0,07	0,03	0,00	0,00	0,0	0,0	0,4	0,4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	90	0,0	10	0,01	0,03	0,07	0,09	0,07	0,08	0,0	0,0	5,2	5,2	0,00	0,01	0,02	0,00	0,06	0,00
3	50	8,0	10	4,31	4,47	0,44	0,54	0,23	0,21	6,1	6,1	17,3	17,8	0,07	0,09	0,05	0,08	0,23	0,09
4	90	8,0	10	58,34	61,38	4,07	3,74	5,15	3,13	80,0	80,1	76,4	74,1	1,00	0,77	1,00	1,00	1,00	0,95
5	50	4,0	5	0,44	0,44	0,13	0,18	0,00	0,00	1,0	1,0	9,5	9,3	0,01	0,02	0,00	0,01	0,12	0,00
6	90	4,0	5	10,01	9,96	0,25	0,56	0,03	0,00	20,7	22,9	38,3	38,5	0,17	0,07	0,00	0,27	0,51	0,09
7	50	4,0	15	1,39	1,41	0,62	0,74	0,00	0,05	1,7	1,6	11,6	11,8	0,02	0,13	0,01	0,02	0,15	0,04
8	90	4,0	15	15,65	15,40	5,48	4,65	0,00	0,00	30,3	38,3	38,9	34,3	0,26	1,00	0,00	0,43	0,48	0,00
9	70	0,0	5	0,04	0,04	0,07	0,07	0,03	0,00	0,0	0,0	0,9	0,9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
10	70	8,0	5	8,99	9,67	1,48	1,56	0,36	0,46	13,0	12,6	23,3	23,1	0,16	0,29	0,10	0,16	0,30	0,19
11	70	0,0	15	0,01	0,01	0,16	0,09	0,03	0,01	0,0	0,0	0,8	0,9	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
12	70	8,0	15	12,15	12,54	1,98	2,01	0,57	0,93	23,1	19,8	24,9	25,3	0,21	0,39	0,18	0,27	0,33	0,26
13	70	4,0	10	2,85	2,85	0,00	0,33	0,93	0,00	3,9	3,7	10,8	10,5	0,05	0,02	0,11	0,05	0,14	0,06
14	70	4,0	10	2,60	3,13	0,28	0,14	0,00	0,10	4,2	3,6	12,1	12,4	0,05	0,03	0,01	0,05	0,16	0,04
15	70	4,0	10	2,73	2,94	0,12	0,15	0,43	0,00	4,1	4,1	12,0	12,2	0,05	0,02	0,05	0,05	0,16	0,05

Fonte: elaborado pela autora (2019)

5.3.3 Fracionamento de Hg em amostras de borra oleosa

As condições otimizadas para extração e fracionamento do Hg, obtidas a partir da otimização multivariada, foram 90 °C, HNO₃ 8,0 mol L⁻¹ e 10 min de extração. Três amostras de borra oleosa foram estrategicamente escolhidas para o fracionamento, com base na diferença de composição em relação às fases sólida e líquida. Todas as amostras foram analisadas sem e com adição prévia de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ para avaliar a conversão de CH₃Hg⁺, a extração de Hg²⁺ e de espécies orgânicas e a recuperação após extração com aquecimento convectivo em bloco digestor. Devido à incapacidade da técnica empregada (CV-AFS) para determinar diretamente as espécies orgânicas de Hg (por exemplo, CH₃Hg⁺), o extrato foi digerido por aquecimento com micro-ondas e o conteúdo de Hg “orgânico” foi definido subtraindo a concentração de Hg²⁺ determinada no extrato digerido pela concentração de Hg²⁺ determinada no extrato não digerido.

A Tabela 13 mostra o Hg total determinado nas três amostras, obtidas após digestão assistida por micro-ondas. Dados sobre a extração de Hg²⁺ e Hg orgânico e recuperações obtidas após o enriquecimento da amostra com os analitos também estão disponíveis na Tabela 13. A amostra A é mais rica em água e óleo, com menor teor de sólidos. A amostra B, por outro lado, tem uma proporção pequena de água e óleo e alta quantidade de sólidos, enquanto a amostra C é pobre em água e rica em óleo e em sólidos. A amostra A foi coletada da camada superficial do tanque de resíduos e as amostras B e C foram coletadas da camada inferior do tanque. A recuperação de Hg²⁺ foi menor nas amostras com maior teor de óleo (amostras A e C), o que reforça a hipótese de menor extração devido à interação desfavorável entre a amostra e a solução de extração aquosa. Pode-se também supor que o maior teor de óleo agregue complexidade à composição da amostra, o que leva a uma extração ainda menor para espécies de Hg hidrofóbicas estáveis (AVELLAN *et al.* 2018; GAULIER *et al.* 2015). Observa-se, na Tabela 13, que apenas 49% do Hg²⁺ adicionado foi recuperado da amostra A. Consequentemente, supõe-se que há uma subestimação do valor de Hg²⁺ extraído dessa amostra (45% - Tabela 13). É sugerido que grande parte do Hg presente em amostras similares esteja fortemente associado à matéria orgânica na matriz da amostra, em formas difíceis de serem extraídas (RENNEBERG; DUDAS, 2001).

A observação acima referida contrasta com os resultados derivados da amostra B. Devido provavelmente à baixa quantidade de óleo nesta amostra, aproximadamente 100% de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ adicionados puderam ser recuperados com sucesso. Além disso, as espécies de mercúrio orgânico naturalmente presentes nas amostras não foram detectadas após os processos de extração e digestão aplicados neste trabalho, corroborando com informações da literatura (BLOOM, 2000; YUN *et al.* 2013).

O presente método aplicado para o fracionamento das espécies de mercúrio em borra oleosa evidenciou que de 45 a 66% do Hg presente na amostra corresponde à fração inorgânica. Os testes de recuperação variaram de 49 a 102% para Hg^{2+} e 89 a 106% para CH_3Hg^+ . O teor restante de mercúrio presente na amostra de borra oleosa é, portanto, classificado como não extraível (Tabela 13). Sabe-se que a distribuição de Hg em óleo bruto não é concentrada somente nas formas iônica (orgânica e inorgânica), mas também como Hg^0 e Hg particulado, mesmo na forma de HgS particulado (BLOOM, 2000; GAJDOSECHOVA *et al.* 2016; GAULIER *et al.* 2015; LIANG; HORVAT; DANILCHIK, 1996; WILHELM; BLOOM, 2000). É razoável supor que essa mesma distribuição possa ser encontrada em resíduos oleosos.

Foi previamente constatado em amostras de sedimentos de petróleo provenientes de tanques de armazenamento que cerca de 90% do Hg total estava associado à fase sólida dos sedimentos na forma de Hg particulado ($\beta\text{-HgS}$) (AVELLAN *et al.* 2018). Apesar desses valores variarem de uma amostra para outra, dependendo da composição, essas informações complementam os resultados obtidos neste trabalho e fornecem uma previsão da composição das amostras de resíduos oleosos de petróleo.

Assim, a extração sob as condições realizadas neste estudo é limitada à quantidade real de Hg orgânico e inorgânico nessas amostras, uma vez que Hg^0 e Hg particulado provavelmente permanecerão na amostra e dificilmente no meio extrator (aquoso).

Tabela 13. Amostras analisadas por CV-AFS para fracionamento de Hg após extração com aquecimento convectivo na condição: 90 °C por 10 min com HNO₃ 8,0 mol L⁻¹.

Amostra	Hg total (mg kg ⁻¹)	Extração			Extrato digerido		Hg não- extraível (%)
		Hg ²⁺ (mg kg ⁻¹)	Hg ²⁺ (%)	Recuperação Hg ²⁺ (%)	Hg org. (mg kg ⁻¹)	Recuperação CH ₃ Hg ⁺ (%)	
A 	24,3 ± 0,3	11,0 ± 0,6	45	49	< LOD	100	55
B 	63,7 ± 0,1	42,0 ± 0,3	66	102	< LOD	106	34
C 	354 ± 9	186 ± 4	52	86	< LOD	89	48

Fonte: elaborado pela autora (2019)

5.3.4 Determinação de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ por HPLC-ICP-MS

Como forma de estabelecer uma comparação, as três amostras de borra oleosa foram submetidas à extração por aquecimento convectivo e os extratos foram posteriormente analisados por HPLC-ICP-MS usando 8% de metanol e 92% de uma solução aquosa contendo L-cisteína 0,12% (m/v) e NH₄CH₃CO₂ 0,01 mol L⁻¹ como fase móvel (LIU *et al.* 2018). O ajuste do pH das soluções da amostra foi feito com NaOH e a diluição das soluções no mesmo meio que a fase móvel (pH final de aproximadamente 5,0). Os resultados são apresentados na Tabela 14. A vantagem imediata do uso de HPLC-ICP-MS em comparação a CV-AFS é a possibilidade de realizar uma determinação específica das espécies com o uso de padrões. Os resultados quantitativos são apresentados na Tabela 14.

O teste *t* para um nível de confiança de 95% revelou, estatisticamente, a ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos para Hg²⁺ por CV-AFS e os obtidos por HPLC-ICP-MS. Deve-se ressaltar, ainda, que o CH₃Hg⁺ não foi detectado nos extratos analisados por HPLC-ICP-MS, o que reforça a ausência de concentração significativa desta espécie nos extratos da amostra. A ausência de picos não atribuídos a Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ também sugere que outras espécies de Hg estavam abaixo do limite de detecção ou não puderam ser extraídas. Os valores de LOD e LOQ obtidos para Hg²⁺ por CV-AFS foram 0,07 e 0,2 ng g⁻¹, enquanto para HPLC-ICP-MS o LOD e LOQ foram de 0,01 e 0,03 mg kg⁻¹, respectivamente. As vantagens de usar

a CV-AFS são claras, pois o método em si é mais rápido, significativamente mais sensível e tem custos operacionais muito mais baixos comparados ao uso de HPLC-ICP-MS.

Tabela 14. Comparação das concentrações de Hg^{2+} nas amostras de borra oleosa determinadas por CV-AFS e HPLC-ICP-MS após extração com aquecimento convectivo.

Amostra	CV-AFS			HPLC-ICP-MS		
	Hg^{2+} (mg kg^{-1})	Hg org. (mg kg^{-1})	RSD (%)	Hg^{2+} (mg kg^{-1})	CH_3Hg^+ (mg kg^{-1})	RSD (%)
A	11,0 ± 0,6	< LOD	5,5	11,7 ± 0,8	< LOD	6,8
B	42,0 ± 0,3	< LOD	0,7	44,8 ± 2,7	< LOD	6,0
C	186 ± 4	< LOD	2,3	187 ± 6	< LOD	3,2

Fonte: elaborado pela autora (2019)

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A partir das otimizações da extração com aquecimento convectivo e determinação por CV-AFS, observou-se que massas de amostras e volumes menores de extrator foram mais favoráveis para a extração de Hg^{2+} , considerando as particularidades do aquecimento convectivo. Os estudos mostraram que melhores respostas de concentração de Hg^{2+} foram obtidas nas condições mais drásticas estudadas e que a solução de HNO_3 mostrou maior extração de Hg^{2+} do que HCl . O uso da abordagem multivariada, função desejabilidade, foi considerada adequada para encontrar uma condição de compromisso entre a máxima extração, aceitável conversão de CH_3Hg^+ , e máximas recuperações das espécies. O método adotado mostrou adequada extração de Hg^{2+} para maioria das amostras, apesar de uma grande quantidade do Hg presente na amostra não ser extraído. Isso se deve, provavelmente, à presença de complexos hidrofóbicos, HgS e/ou Hg^0 insolúveis, que são considerados menos tóxicos que as espécies iônicas aqui estudadas (Hg^{2+} e CH_3Hg^+). Em suma, o método desenvolvido permite detectar baixas concentrações de Hg^{2+} por CV-AFS, com alta sensibilidade e precisão, comparado ao uso de métodos mais tradicionais como HPLC-ICP-MS. Este método demonstrou ser simples, rápido e de baixo custo, permitindo adequada aplicação para o fracionamento de Hg em amostras oleosas, particularmente na ausência de técnicas específicas para análise de especiação.

6 ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO QUÍMICA DE MERCÚRIO EM RESÍDUOS OLEOSOS DE PETRÓLEO POR HPLC-ICP-MS

Neste capítulo foram efetuadas as investigações para separação e determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS e para a otimização do método de extração das espécies de Hg das amostras de resíduos oleosos de petróleo utilizando banho de ultrassom e de aquecimento. Para estes estudos, planejamento de experimentos de matriz Doehlert e Box-Behnken foram utilizados para a otimização multivariada e para a inspeção visual das condições ótimas de trabalho aplicando metodologia de superfície de resposta. A extração das espécies, conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} e a recuperação das espécies foram monitoradas durante a otimização do método de extração, a fim de comprovar a eficácia e exatidão do método de extração otimizado.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os fatores envolvidos na separação das espécies de Hg no cromatógrafo a líquido com coluna C₁₈ (composição e vazão da fase móvel).
- Otimizar a vazão do gás nebulizador e a potência de radiofrequência do ICP-MS para a detecção de espécies de Hg.
- Investigar o efeito de diferentes soluções e solventes na extração de espécies de Hg da amostra de borra oleosa.
- Otimizar as condições experimentais para extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa utilizando extração assistida por ultrassom e aquecimento.
- Avaliar, durante a otimização dos fatores envolvidos na extração, a conversão de CH₃Hg⁺ em Hg²⁺, a extração das espécies e as recuperações de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺.
- Proceder a digestão assistida por micro-ondas e a extração assistida por ultrassom e aquecimento para quantificação das espécies Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ nas amostras de borra oleosa com diferentes composições.
- Verificar a exatidão do método com testes de adição e recuperação das espécies em cada amostra avaliada e comparar com os resultados obtidos pelo método oficial 3200 da US EPA.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Instrumentação

As amostras foram pesadas em balança analítica (Bel Engineering, M 254Ai, Milão – Itália). Para a digestão das amostras de borra oleosa foi utilizado forno de micro-ondas (MLS 1200 Mega, Milestone, Bergamo – Itália) com controle de potência e sem controle de temperatura do sistema, equipado com seis posições para frascos de PTFE ou PFA. Para a extração das espécies de Hg das amostras de borra oleosa foi utilizado um banho ultrassônico com aquecimento, operado na frequência fixa de 60 Hz e potência fixa de 1800 W, (Thornton, 30 LTS, São Paulo). Para extração pelo método EPA 3200 um vórtex (V1, IKA, Staufen, Alemanha) foi utilizado para a agitação e homogeneização da amostra com a solução extratora. Para centrifugação dos extratos uma centrífuga (Quimis, São Paulo - Brasil) foi utilizada.

Para a determinação de Hg total nas amostras de borra oleosa foi utilizado um espectrômetro de fluorescência atômica com vapor frio (Mercur Duo Plus, Analytik Jena, Jena - Alemanha), utilizando uma lâmpada de baixa pressão de Hg, operado no comprimento de onda de 253,7 nm e com detecção no ângulo de 90 °C com o feixe incidente.

Para a determinação das espécies de Hg, um HPLC (Perkin Elmer, Flexar, Massachusetts, USA) controlado pelo software Chromera®, operado com bomba quaternária para mistura de solventes, equipado com coluna C₁₈ (Perkin Elmer, 150 x 4,6 mm, 5 µm) foi acoplado *offline* ao instrumento de ICP-MS (Perkin Elmer-SCIEX, Thornhill, Canada). O eluato proveniente da coluna foi inserido diretamente em um nebulizador pneumático concêntrico de vidro (Meinhard, Colorado, USA) acoplado a uma câmara de nebulização ciclônica de vidro, utilizando um tubo de PTFE. Para verificação do pH das soluções analisadas por HPLC foi utilizado o pHmetro (Quimis, Q-400A, São Paulo).

6.2.2 Amostras e reagentes

Amostras de borra oleosa com diferentes composições e coletadas em diferentes regiões dos tanques de armazenamento de resíduos foram obtidas em parceria com a indústria do petróleo. Os reagentes utilizados para a digestão e a

extração foram H_2O_2 30% (Vetec, Rio de Janeiro), HNO_3 65% e HCl 37% (Merck, São Paulo). Os ácidos foram bidestilados abaixo do ponto de ebulição utilizando um sistema de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) e a água foi deionizada e purificada em um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), para resistividade final de 18,2 $\text{M}\Omega$ cm para o preparo das soluções.

Metanol grau HPLC (Applichem, Darmstadt, Alemanha), $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ (Carlo Erba, Milão, Itália), cloridrato de L-cisteína (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), xileno (Applichem, Darmstadt, Alemanha), KOH (Neon, São Paulo), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), etanol absoluto grau HPLC (Applichem, Darmstadt, Alemanha), clorofórmio (Applichem, Darmstadt, Alemanha) de grau analítico foram utilizados. As soluções que compunham a fase móvel foram previamente filtradas utilizando filtros membrana de 0,22 μm (Merck Millipore, Carrigtohill, Ireland), e os extratos obtidos da extração assistida por ultrassom foram filtrados com filtros seringa de PTFE (0,22 μm) (Analítica, São Paulo).

Para a determinação de Hg por CV-AFS, solução do agente redutor SnCl_2 3% (m/v), preparada a partir de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), em meio de HCl 0,36 mol L^{-1} e a solução de HCl 0,36 mol L^{-1} foram utilizadas. As soluções da amostra e dos reagentes (SnCl_2 e HCl), foram aspiradas descontinuamente em um sistema em fluxo a uma vazão de 8,0 mL min^{-1} e 2,0 mL min^{-1} . Argônio com 99,997% de pureza (White Martins, São Paulo) foi utilizado para as análises por CV-AFS e ICP-MS. Para a medição da concentração de Hg^{2+} nas amostras por CV-AFS, adicionou-se às soluções de calibração e das amostras KMnO_4 0,05% (m/v) (Merck, Rio de Janeiro) e $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ 0,025% (m/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A solução padrão de Hg^{2+} foi preparada a partir de uma solução padrão de Hg (Specsol, São Paulo) e a solução de CH_3Hg^+ a partir do cloreto de metilmercúrio 95% (Sigma-Aldrich, Buchs, Suíça), preparado com cuidado rigoroso devido à sua alta toxicidade. O descarte dos resíduos foi feito em recipientes especiais para mercúrio e os resíduos foram coletados pelo departamento de gestão de resíduos sólidos da UFSC para descarte apropriado.

6.2.3 Procedimento experimental

6.2.3.1 Otimização das condições instrumentais para a determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS

6.2.3.1.1 Otimização da fase móvel do instrumento de HPLC

Para esta otimização, a fase móvel utilizada por Liu *et al.* (2018) foi empregada como ponto de partida para o estudo da composição da fase móvel. Para isso, diferentes concentrações de L-cisteína e acetato de amônio foram variadas em um planejamento de matriz Doehlert. A concentração de L-cisteína foi variada em três níveis (0,12, 0,26 e 0,4% (m/v)) e a concentração de acetato de amônio foi variada em cinco níveis (0,01, 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 mol L⁻¹). Somaram-se 7 experimentos efetuados em duplicata, avaliando-se o aumento de contagens das espécies de Hg em cada composição. Nessas condições, uma solução padrão contendo concentrações individuais de 50 µg L⁻¹ de Hg²⁺ e 35 µg L⁻¹ de CH₃Hg⁺, preparada na solução da fase móvel (L-cisteína 0,12% m/v + acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹) para ajuste do pH, foi analisada para verificar as contagens e a separação das espécies de Hg nos diferentes experimentos, avaliando-se, também, o pH das soluções investigadas. Os sinais cromatográficos das espécies foram integrados em relação a área, e as respostas foram expressas como contagens de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ (a.u., *arbitrary unit*).

A proporção ideal de metanol, e, conseqüentemente, a proporção da mistura de L-cisteína e NH₄CH₃CO₂ e da vazão da fase móvel sobre as contagens de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ (a.u.) e a separação das espécies, foram avaliadas com uma matriz de planejamento Doehlert. Assim, o fator proporção de metanol foi avaliado em 3 níveis (0,0, 4,0 e 8,0%) enquanto o fator vazão da fase móvel foi avaliado em cinco níveis (0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1,0 mL min⁻¹). Para isso uma solução padrão de 50 µg L⁻¹ de Hg²⁺ e 35 µg L⁻¹ de CH₃Hg⁺ preparada com a solução da fase móvel (L-cisteína 0,26% m/v + acetato de amônio 0,03 mol L⁻¹) foi analisada em duplicata, num volume de 20 microlitros.

6.2.3.1.2 Otimização da vazão de gás nebulizador e da potência de radiofrequência do ICP-MS

Para a otimização dos parâmetros do ICP-MS um planejamento de matriz Doehlert foi aplicado variando-se as condições de vazão do gás nebulizador em 5 níveis (0,8, 0,9, 1,0, 1,1 e 1,2 L min⁻¹) e as condições de potência de radiofrequência em 3 níveis (900, 1000 e 1100 W). As contagens das espécies foram monitoradas através da análise de uma solução padrão de 50 µg L⁻¹ de Hg²⁺ e 35 µg L⁻¹ de CH₃Hg⁺, em duplicata, diluída na solução da fase móvel.

6.2.3.2 Otimização da extração assistida por ultrassom e por aquecimento sobre a extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa

6.2.3.2.1 Avaliação de diferentes soluções sobre a extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa

Inicialmente, para avaliar o comportamento de diferentes soluções sobre a extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa, diferentes reagentes foram avaliados. As soluções L-cisteína 0,1% m/v, acetato de amônio 0,01 mol L⁻¹, a composição da fase móvel (L-cisteína 0,26% m/v + acetato de amônio 0,03 mol L⁻¹), metanol 1% v/v, HNO₃ 0,1 mol L⁻¹, HCl 0,1 mol L⁻¹, KOH 0,1% m/v e 2-mercaptoetanol 0,1% v/v, individualmente, foram utilizadas como meios extratores.

Para este estudo, aproximadamente 0,25 g de amostra de borra oleosa foi pesada em frascos de polipropileno, adicionando-se 10 mL de solução. Para avaliação do efeito de extração por temperatura e por ultrassom, individualmente, as amostras foram submetidas à extração em banho de ultrassom por 30 min ou à extração com aquecimento em banho na temperatura de 60°C por 30 min. Os extratos foram filtrados com filtro seringa de 0,22 µm e diluídas num fator de 10 com a solução da fase móvel para ajuste do pH, e analisadas por HPLC-ICP-MS nas condições instrumentais otimizadas. As amostras foram analisadas em duplicata, fazendo-se três medições da solução para cada replicata.

6.2.3.2.2 Otimização da massa de amostra e volume de solução para a extração das espécies de Hg

Para avaliar a massa de amostra e o volume de solução na extração foi aplicado um planejamento de matriz Doehlert. A massa de amostra foi avaliada em

três níveis (0,1, 0,3 e 0,5 g), enquanto o volume foi avaliado em cinco níveis (5, 10, 15, 20 e 25 mL). A concentração da solução foi de 0,1% m/v de L-cisteína para os diferentes volumes. Durante os experimentos aplicou-se temperatura do banho de 60 °C e ultrassom por 30 min. As soluções do extrato foram filtradas, diluídas e analisadas, em duplicata, efetuando-se três injeções para cada replicata.

6.2.3.2.3 Avaliação do uso de solvente orgânico para o aumento do contato da amostra com a solução extratora sobre a extração das espécies de Hg

Os solventes orgânicos, xileno, clorofórmio e etanol foram incluídos nos estudos de extração das espécies de Hg para verificar o efeito da solubilização da fração oleosa da amostra e aumento do contato com a solução extratora, para verificar a melhora da extração das espécies de Hg.

Para estes experimentos, alíquotas contendo aproximadamente 0,1 g de amostra foram adicionadas em frasco de polipropileno juntamente com 0,5 mL do solvente (xileno, clorofórmio ou etanol) e 15 mL de L-cisteína 0,6% m/v. Os frascos foram submetidos a aquecimento em banho na temperatura de 60°C e ultrassom por 40 min. Após resfriamento as soluções foram filtradas com filtro seringa, diluídas num fator de 10 e analisadas imediatamente por HPLC-ICP-MS.

6.2.3.2.4 Aplicação de um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ para triagem dos fatores significativos na extração das espécies de Hg

Alguns fatores foram incluídos no planejamento de experimentos, incluindo o uso de xileno para o aumento do contato da amostra com a solução extratora, e da solução de 2-mercaptoetanol, para verificar o aumento da extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa. Em vista do grande número de fatores envolvidos na otimização da extração, foi aplicado um planejamento fatorial fracionário para avaliar a significância dos fatores estudados. Neste planejamento, os fatores volume de xileno, concentração de L-cisteína, concentração de 2-mercaptoetanol, temperatura do banho e tempo de ultrassom foram avaliadas para teste de significância em relação a extração de Hg^{2+} utilizando gráfico de Pareto.

Nesse planejamento foram realizados 11 experimentos ao total, avaliando-se pontos de mínimo (-1) e de máximo (+1) com triplicata do ponto central (0). Na Tabela

15 estão mostradas as condições utilizadas nesta matriz de experimentos. 0,1 g de amostra foram adicionados em frascos de polipropileno, com volume final de 15 mL em relação aos volumes de xileno avaliados e volume de L-cisteína em diferentes concentrações.

Tabela 15. Fatores e níveis (-1, 0, +1) avaliados aplicando-se planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ na triagem dos fatores significativos envolvidos no método de extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa.

Fatores	Ponto mínimo	Ponto central	Ponto máximo
	(-1)	(0)	(+1)
Xileno, mL	0,1	0,4	0,7
L-cisteína, % m/v	0,1	0,7	1,3
2-mercaptoetanol, % v/v	0,0	0,3	0,6
Temperatura do banho, °C	40	60	80
Tempo de ultrassom, min	5	35	65

Fonte: elaborado pela autora (2019)

6.2.3.2.5 Otimização dos fatores envolvidos com o método de extração

Para a otimização dos fatores significativos na extração das espécies de Hg (concentração de L-cisteína, volume de xileno e temperatura do banho) foi aplicado um planejamento Box-Behnken. Nesse caso, alíquotas contendo aproximadamente 0,1 g de amostra de borra oleosa foram pesadas e adicionadas em frascos de polipropileno, aplicando-se as diferentes condições apresentadas na Tabela 16. Cabe destacar que o tempo de aplicação de ultrassom foi fixado em 30 min.

Tabela 16. Fatores e níveis (-1, 0, +1) avaliados aplicando-se matriz Box-Behnken na otimização do método de extração das espécies de Hg da amostra de borra oleosa.

Fatores	Ponto mínimo	Ponto central	Ponto máximo
	(-1)	(0)	(+1)
[L-cisteína], % m/v	0,1	0,7	1,3
Xileno, mL	0,5	0,9	1,3
Temperatura do banho, °C	40	60	80

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Para estas condições, em cada experimento foi avaliada a extração das espécies de Hg, a conversão das espécies de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} e a recuperação de

Hg^{2+} e CH_3Hg^+ adicionados. A amostra de borra oleosa foi separada em três frações, dentre as quais uma permaneceu sem enriquecimento enquanto as demais foram enriquecidas com as espécies. Essas frações foram enriquecidas com 100 mg kg^{-1} de CH_3Hg^+ ou 200 mg kg^{-1} Hg^{2+} , individualmente, homogeneizadas, e após 24 h submetidas ao estudo de otimização. Nesse aspecto, a recuperação de CH_3Hg^+ foi avaliada considerando-se a concentração de CH_3Hg^+ adicionada e a concentração de CH_3Hg^+ determinada após a aplicação das condições mostradas na Tabela 16. A conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} foi avaliada pelo aumento da concentração da espécie Hg^{2+} na amostra enriquecida com CH_3Hg^+ em comparação com a concentração de Hg^{2+} da amostra sem enriquecimento, e pela observação da diminuição da concentração do CH_3Hg^+ adicionado. Enquanto a recuperação de Hg^{2+} foi monitorada pela diferença entre a concentração de Hg^{2+} na amostra enriquecida e a concentração de Hg^{2+} na amostra sem enriquecimento, após a aplicação das condições mostradas na Tabela 16.

6.2.3.3 *Análise de especiação química de Hg em amostras de borra oleosa*

Após a otimização do método de extração assistida por ultrassom e aquecimento e da determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS, treze amostras de borra oleosa de diferentes composições foram analisadas. Aproximadamente 0,1 g de amostra foram pesados em frascos de polipropileno, adicionando-se 1,2 mL de xileno, sob agitação manual, para a solubilização da amostra. Em seguida, 13,8 mL de uma solução de L-cisteína 1,3% m/v foi adicionada aos mesmos frascos. Os frascos foram colocados em banho de aquecimento, e, quando a temperatura de 60 °C foi alcançada, ultrassom com frequência de 60 KHz foi aplicado por 30 min, mantendo-se a temperatura em $60^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ neste período. Durante a extração, os frascos foram agitados manualmente, de 5 em 5 min, para a mistura das fases e aumento da extração. Após o resfriamento da solução, os extratos foram filtrados com filtro-seringa de 0,22 μm e diluídos num fator de 10 a 20, com a solução da fase móvel (L-cisteína 0,26% m/v + acetato de amônio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$). As soluções foram analisadas por HPLC-ICP-MS empregando as condições descritas na Tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros e condições usadas para análise de especiação química de Hg por HPLC-ICP-MS.

Parâmetro	Valor
ICP-MS	
Nebulizador	Meinhard concêntrico
Vazão de gás (Ar, L min ⁻¹)	
Gás nebulizador	1,0
Potência de Radiofrequência (W)	1000
Detector	
Estágio analógico (V)	-1937
Estágio de pulso (V)	1000
Modo	<i>Scanning</i>
Dwell time (ms)	50
Isótopo monitorado	²⁰² Hg
HPLC	
Coluna	C ₁₈ Perkin Elmer (150 x 4,6 mm, 5 µm) 4% metanol
Fase móvel	96% H ₂ O (0,26% L-cisteína (m/v) + 0,03 mol L ⁻¹ acetato de amônio)
Modo	Isocrático
Vazão (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (µL)	20

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Cabe ressaltar que os instrumentos foram acoplados no modo *offline*, o que exigiu que os sinais cromatográficos fossem exportados para um arquivo Excel® e, posteriormente, para o Origin® para que os sinais cromatográficos plotados fossem integrados. Diante disso, as curvas de calibração das espécies de Hg²⁺ e CH₃Hg⁺ nas concentrações de 10 a 100 µg L⁻¹ foram feitas pela injeção de cada ponto em quadruplicata para posterior determinação da concentração das espécies nas amostras analisadas. Nessas condições, os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ, respectivamente) foram estimados pelo desvio padrão de 10 medidas da solução do branco, multiplicado por 3,3 (para o LOD) ou por 10 (para o LOQ), dividido pela inclinação da curva de calibração.

6.2.3.4 Avaliação da exatidão do método de extração das espécies de Hg

Em vista da falta de um material de referência certificado similar à matriz das amostras em estudo, a exatidão do método de extração foi avaliada principalmente por testes de adição e recuperação das espécies de Hg²⁺ (300 mg kg⁻¹) e CH₃Hg⁺ (200 mg kg⁻¹) nas treze amostras quantificadas. Além disso, três destas amostras, as quais apresentaram matrizes com diferentes composições de água, óleo e sólidos, foram

submetidas a testes de adição e recuperação em três diferentes níveis de concentrações de Hg^{2+} (50, 100 e 300 mg kg^{-1}). O enriquecimento foi feito pela homogeneização da solução padrão nas amostras e armazenamento por pelo menos 24 h previamente ao estudo.

Como uma alternativa, a comparação com o método EPA 3220 foi realizada. Apesar de este método ser recomendado para amostras sólidas como solos e sedimentos, foi aplicado para duas das amostras em estudo para fins de comparação. No método EPA, aproximadamente 0,5 g de amostra foram adicionados em frascos de 50 mL de polipropileno com 2,5 mL de solução (HCl 2,0% v/v + etanol 10% m/v), submetidos ao vórtex por 1 minuto, sonicação por 7 min à 60 °C e centrifugação por 5 min a 3200 rpm. O extrato foi transferido para frasco de 50 mL, e a amostra foi repetidamente submetida à extração por mais três vezes. Ao final, os extratos foram coletados juntamente, diluídos para 25 mL e posteriormente analisados por HPLC-ICP-MS.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.3.1 Otimização das condições instrumentais para a determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS

6.3.1.1 Otimização da composição da fase móvel para a separação das espécies de Hg

Inicialmente, um método da literatura (LIU *et al.* 2018) foi reavaliado neste trabalho para a determinação das espécies de Hg em amostras de borra oleosa por HPLC-ICP-MS.

Para tanto, a composição da fase móvel, constituída por L-cisteína e acetato de amônio foi investigada em diferentes concentrações, aplicando-se um planejamento Doehlert. Durante este estudo, uma solução padrão composta por 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ foi analisada para avaliar as contagens das espécies (a.u.), em relação à área integrada dos sinais cromatográficos. Na Tabela 18, estão mostradas as condições experimentais avaliadas na matriz Doehlert e as respostas, em duplicata, referentes às contagens das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ . Nas diferentes composições de L-cisteína e acetato de amônio os valores de pH das soluções variaram entre 2,8 a 5,5.

Tabela 18. Matriz Doehlert, condições experimentais e respostas das contagens de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ obtidas nas otimizações das soluções de L-cisteína e acetato de amônio na composição da fase móvel.

Exp.	Acetato de amônio (mol L^{-1})	L-cisteína (% m/v)	Contagens (a.u.) ^a			
			Hg^{2+}		CH_3Hg^+	
1	0,03	0,26	2705	2782	1938	1924
2	0,05	0,26	1946	2020	1335	1399
3	0,04	0,4	2354	2362	1675	1647
4	0,01	0,26	2077	2370	1530	1690
5	0,02	0,12	2362	2406	1710	1695
6	0,04	0,12	1885	1957	1345	1374
7	0,02	0,4	2236	2268	1553	1566

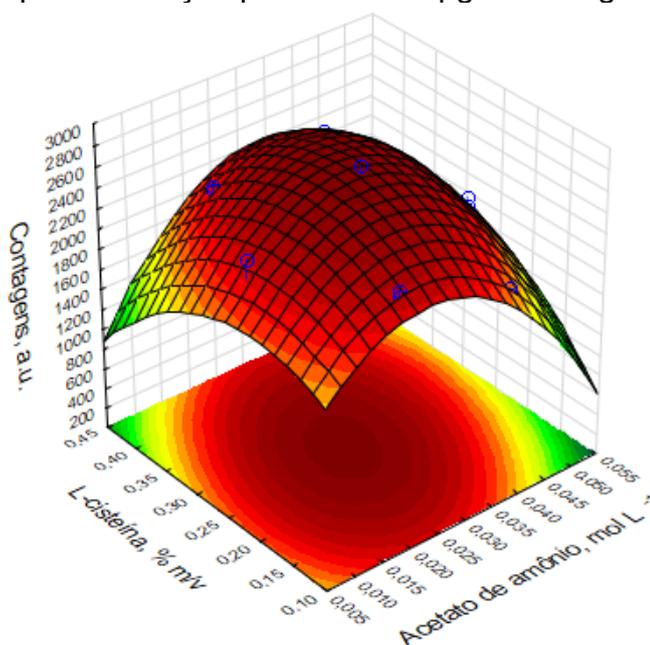
Fonte: elaborado pela autora (2019)

^a(a.u.) *arbitrary unit*

Nos experimentos descritos na Tabela 18, apenas as contagens das espécies foram monitoradas. Visto que a variação das concentrações das soluções não resultou em alteração do tempo de retenção das espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , tampouco na variação do perfil do sinal cromatográfico, a resolução dos sinais não foi avaliada nas respostas.

Na Figura 20 está mostrada a superfície de resposta obtida para as contagens de Hg^{2+} nas diferentes condições experimentais. Nesse caso, a superfície de resposta para as contagens de CH_3Hg^+ não foi mostrada pois apresentou o mesmo perfil que a superfície de resposta para a espécie Hg^{2+} .

Figura 20. Superfície de resposta obtida de uma matriz Doehlert na otimização dos componentes da fase móvel (L-cisteína e acetato de amônio) sobre as contagens para a solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} .



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos obtidos pela ANOVA (Apêndice N) mostraram que o modelo não apresenta falta de ajuste. Isso indica que os valores experimentais estão concordantes com os valores preditos pelo modelo. Para a superfície da Figura 20, 94% da variabilidade nas respostas é justificada pelo modelo. Estatisticamente, foi determinada a significância para todos os fatores. Como observado na Fig. 20, visualmente, a condição ótima de contagens de Hg^{2+} está indicada no ponto central da superfície de máximo, composta pela solução de 0,26% m/v de L-cisteína e 0,03 mol L⁻¹ de acetato de amônio. Adicionalmente, o pH desta solução manteve-se em

4,7, o qual está num valor intermediário à faixa de tolerância recomendada para a coluna de separação em fase reversa (C_{18}) de 2,5 a 7,5, além de favorecer o aumento das contagens das espécies de Hg. A partir disso, optou-se por utilizar essa composição de fase móvel durante a separação das espécies de Hg.

6.3.1.2 Otimização da proporção de metanol e da vazão da fase móvel sobre as contagens e separação das espécies de Hg

Neste estudo, fatores envolvidos diretamente com a separação das espécies de Hg foram avaliados por planejamento Doehlert. Para isso, diferentes condições de vazão da fase móvel (0,6 a 1,0 mL min⁻¹) e proporções de metanol (0 a 8%) foram avaliadas, tanto para verificação das contagens das espécies de Hg como para os fatores resolução e coeficiente de seletividade, necessários para a separação adequada das espécies.

Nesse contexto, o coeficiente de seletividade (α) é a capacidade de separação entre duas espécies e quanto maior o valor desse coeficiente, para valores superiores a 1,0, melhor a separação. Já a resolução (R_s), prevê a separação de duas espécies levando em consideração os tempos de retenção entre as duas espécies e a largura da base dos sinais, fornecendo com maior confiabilidade a qualidade da separação entre duas espécies. A resolução e a seletividade são calculadas, normalmente, empregando as equações 6 e 7, respectivamente. Na equação 6, o tempo de retenção líquido (t_s) é igual ao tempo de retenção bruto (t_R) menos o tempo morto (t_M). Na equação da resolução (Eq. 7), w_1 e w_2 são as larguras de base dos sinais cromatográficos das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (EITH *et al.* 2006).

$$\alpha = \frac{t_{S2}}{t_{S1}} \quad (6)$$

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{(w_1 + w_2)}{2}} \quad (7)$$

A Tabela 19 mostra as condições experimentais da matriz Doehlert e as respostas, em duplicata, para as contagens das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , e os valores de resolução e seletividade, calculados utilizando as Equações 6 e 7.

Tabela 19. Matriz Doehlert aplicada para otimização da vazão da fase móvel e proporção de metanol na fase móvel, respostas para as contagens referentes a solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , resolução e seletividade.

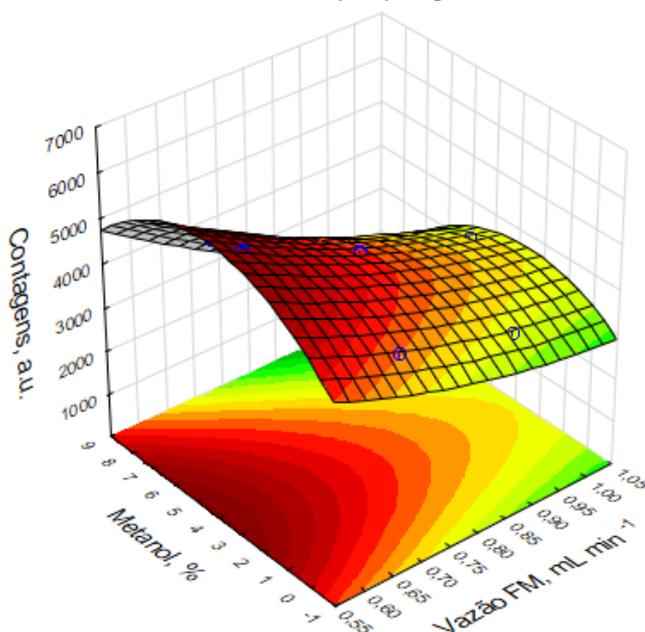
Exp.	Vazão FM (mL min^{-1})	Metanol (%)	Contagens (a.u.) ^a				Resolução	Seletividade
			Hg^{2+}		CH_3Hg^+			
1	0,8	4	4540	4574	3126	3119	4,6	1,9
2	1,0	4	3759	3770	2567	2578	4,4	1,9
3	0,9	8	2778	2795	1944	1816	3,0	1,6
4	0,6	4	5694	5737	3826	3811	4,2	1,9
5	0,7	0	4285	4279	2760	2785	4,9	2,1
6	0,9	0	3552	3546	2292	2280	4,6	2,0
7	0,7	8	4078	4076	2787	2740	2,6	1,6

Fonte: elaborado pela autora (2019)

^a(a.u.) *arbitrary unit*

A partir dos dados da Tabela 19, a superfície de resposta para as contagens de Hg^{2+} foi projetada e está mostrada na Figura 21. A superfície de resposta para as contagens de CH_3Hg^+ novamente não foi mostrada na Figura 21, pois apresentou o mesmo perfil que a superfície de resposta para a espécie Hg^{2+} . Os dados estatísticos da ANOVA para as respostas da Figura 21 estão mostrados no Apêndice O.

Figura 21. Superfície de resposta para as contagens referentes a solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} após aplicação de planejamento Doehlert para otimização da vazão da fase móvel e proporção de metanol.

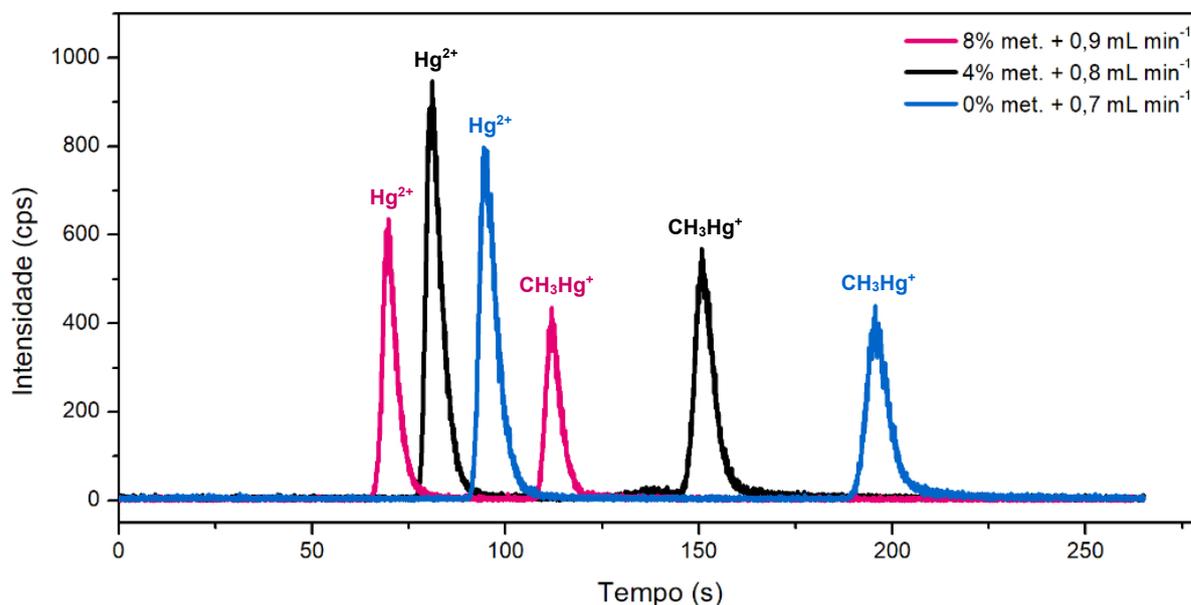


Fonte: elaborado pela autora (2019)

Para a superfície de resposta relacionada às contagens de Hg^{2+} (Fig. 21), o coeficiente de determinação obtido foi de 0,99, mostrando que 99% da variabilidade dos dados é justificada pelo modelo ajustado e todos os fatores foram significativos.

Como pode ser visto na Figura 21, as contagens foram superiores quando utilizadas proporções de 4% de metanol e vazões de fase móvel inferiores a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Em proporções de metanol de até 4% na fase móvel houve um aumento da sensibilidade das espécies de Hg, o qual pode ser decorrente da reação de transferência de carga do carbocátion (C^+) para as espécies de Hg; pelo aumento na eficiência de nebulização; ou pelo deslocamento da zona de densidade iônica (SOUZA *et al.* 2010). Em contrapartida, em proporções mais elevadas de metanol (8%) e em vazões superiores a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, as contagens reduziram consideravelmente. Particularmente, em proporções de metanol superiores a 5% ocorre redução da estabilidade do plasma e aumento da deposição de carbono nos cones do ICP (SOUZA *et al.* 2010). Além disso, em vazões e proporções de metanol mais elevadas, observou-se redução do tempo de interação das espécies com a coluna C_{18} , diminuindo o tempo de retenção, e, também, as contagens por segundo para cada espécie. Esse efeito de redução do tempo de retenção e da área dos sinais cromatográficos pode ter sido acarretado pela deterioração da eficiência de nebulização com o aumento da vazão da fase móvel (YAO *et al.*, 2017). Ao mesmo tempo, o aumento da proporção de metanol para valores acima de 5% pode reduzir a resolução dos sinais cromatográficos das espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (LIN; CHANG; JIANG, 2008). A vantagem deste efeito é que os sinais ficam mais estreitos, apesar da redução das contagens e do tempo de retenção das espécies. Quanto à redução destas condições, tanto na ausência de metanol e em vazões de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ da fase móvel, os sinais apresentaram contagens maiores; entretanto, os picos ficaram mais alargados, podendo prejudicar a separação em determinadas condições. Na Figura 22, estão mostrados os perfis dos sinais cromatográficos dos experimentos 1, 3 e 5, referentes as maiores e menores condições avaliadas na Tabela 19, considerando as contagens das espécies com o tempo (s). Nesse contexto, soluções padrões de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ , na mesma solução, foram analisadas. Em todos os experimentos, observa-se que o primeiro sinal (mais intenso) refere-se a espécie Hg^{2+} e o segundo sinal (menos intenso) é relativo à espécie CH_3Hg^+ .

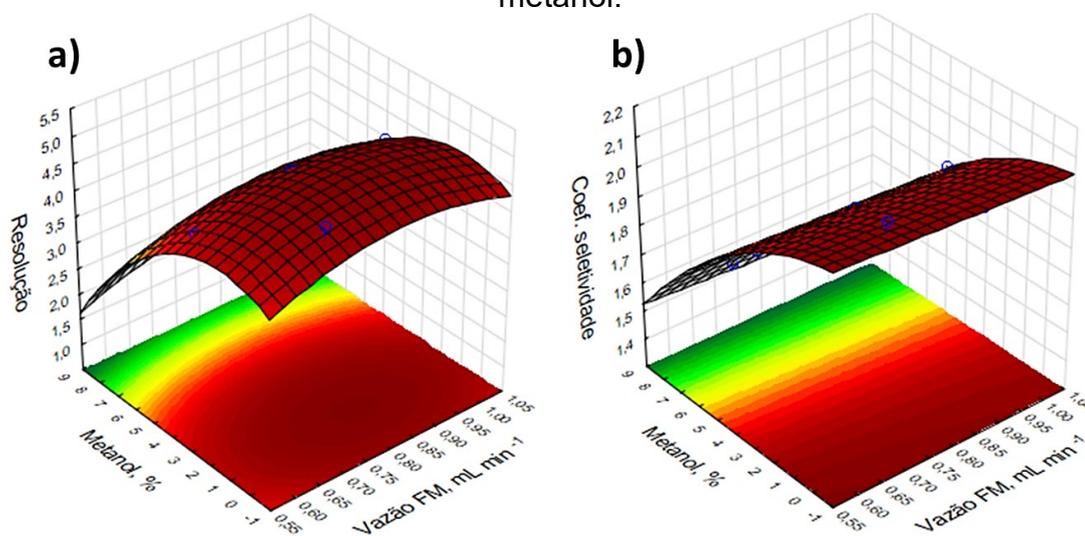
Figura 22. Perfil dos sinais cromatográficos das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ em solução padrão, obtidos nas diferentes condições experimentais para otimização da separação, avaliando-se a proporção de metanol (%) e a vazão da fase móvel (mL min^{-1}).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

O perfil dos sinais cromatográficos mostrados na Figura 22, complementa os dados mostrados na Figura 21, evidenciando que em condições reduzidas de proporção de metanol e vazões de fase móvel, ocorre aumento do tempo de análise. A partir disso, mostrou-se necessário avaliar a resolução e a seletividade dos sinais nestas condições. Considerando os valores de resolução dos sinais e o coeficiente de seletividade, na Figura 23 são mostradas as superfícies de resposta geradas a partir da Tabela 19.

Figura 23. Superfícies de resposta para a) resolução e b) coeficiente de seletividade relacionados a separação das espécies de Hg em solução padrão, nas diferentes condições experimentais de otimização de vazão da fase móvel e proporção de metanol.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados estatísticos da ANOVA (Apêndice P) mostraram que para a resolução (Fig 23a), o coeficiente de determinação foi de 0,97 e apenas o fator proporção de metanol foi significativo. Para a seletividade (Fig 23b), os dados estatísticos da ANOVA (Apêndice Q) também mostram que a proporção de metanol foi significativa e o coeficiente de determinação foi de 0,98. Nesse caso, o parâmetro falta de ajuste não foi atribuído pois não foram utilizadas replicatas na resposta.

A partir da Figura 23 pode-se observar que a vazão de fase móvel não foi significativa sobre a resolução e seletividade para a separação das espécies de Hg. Por outro lado, proporções de metanol menores que 4% forneceram maior resolução e seletividade dos sinais do que em proporções de metanol superiores (8%). Cabe destacar que quanto maior a resolução e seletividade na análise cromatográfica, melhor é a separação das espécies; entretanto, se esses valores forem relativamente superiores a 2,0 ou 1,5, respectivamente, além de gerar sinais mais alargados, pode acarretar no aumento do tempo de análise. Embora, nas condições avaliadas, as espécies tenham sido completamente separadas em todas as condições, procurou-se uma condição de compromisso entre a obtenção de contagens razoavelmente elevadas das espécies, e resolução e seletividade intermediárias. A finalidade disso é garantir uma boa separação das espécies, evitando o aumento desnecessário do tempo de análise e os sinais alargados.

Em vista disso, a condição de separação utilizando 4% de metanol e uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ foi selecionada para o prosseguimento dos estudos de otimização. Cabe ressaltar que o fabricante da coluna C_{18} recomenda o uso desta vazão por garantir separação satisfatória. Concomitantemente ao uso de 4% de metanol, ficou estabelecida uma proporção de 96% da mistura (L-cisteína 0,26% m/v + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ $0,03 \text{ mol L}^{-1}$) durante a análise cromatográfica com eluição isocrática.

No que concerne às condições de separação das espécies de Hg nas análises cromatográficas, diferentes volumes de injeção (20, 60 e $100 \mu\text{L}$) foram avaliados. Apesar do aumento de sinal com o aumento no volume de injeção, observou-se a coeluição das espécies de Hg quando volumes superiores a $20 \mu\text{L}$ foram utilizados. Nesse contexto, o volume de injeção manteve-se fixo em $20 \mu\text{L}$, a fim de favorecer a separação das espécies de Hg e evitar sinais muito alargados.

6.3.1.3 Otimização da vazão de gás nebulizador e da potência de radiofrequência do instrumento de ICP-MS

A vazão do gás nebulizador e a potência de radiofrequência são as principais variáveis instrumentais do ICP-MS em relação aos efeitos de ionização no plasma e sensibilidade. A interação destes fatores utilizando planejamento Doehlert foi avaliada para verificar o efeito sobre as contagens das espécies de Hg. A Tabela 20 mostra as condições experimentais avaliadas e as respostas em termos de contagens para as espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ .

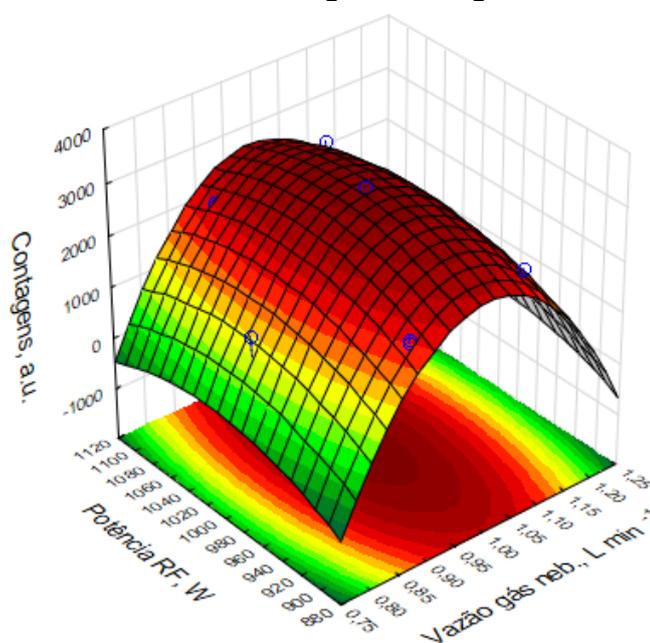
Tabela 20. Matriz Doehlert e condições experimentais empregadas na otimização da vazão de gás nebulizador e da potência de radiofrequência e respostas de contagens referentes a solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} e $35 \mu\text{g L}^{-1}$ de CH_3Hg^+ .

Exp.	Vazão do gás neb. (L min^{-1})	Potência de RF (W)	Contagens (a.u.)			
			Hg^{2+}		CH_3Hg^+	
1	1,0	1000	3166	3123	2038	2044
2	1,2	1000	946	955	583	600
3	1,1	1100	2450	2449	1613	1590
4	0,8	1000	1309	1293	848	855
5	0,9	900	1916	1988	1252	1267
6	1,1	900	2339	2331	1544	1502
7	0,9	1100	2128	2160	1398	1385

Fonte: elaborado pela autora (2019)

A superfície de resposta gerada para as contagens de Hg^{2+} está mostrada na Figura 24. Em detrimento de as espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ serem indistintamente ionizadas no plasma e serem detectadas como ^{202}Hg , apenas a superfície de resposta para as contagens de Hg^{2+} foi apresentada. Além disso, as superfícies de resposta e os dados estatísticos foram similares para ambas as espécies, dispensando a necessidade de apresentação de ambas as superfícies de resposta.

Figura 24. Superfície de resposta para a otimização da vazão do gás nebulizador e da potência de RF obtidas por matriz de planejamento Doehlert. Resposta expressa como contagens de Hg^{2+} .



Fonte: Elaborado pela autora (2019)

Os dados da ANOVA relacionados à superfície de resposta da Figura 24 estão mostrados no Apêndice R. A Figura 24 revela que a interação dos fatores gerou uma superfície de máximo que favorece a visualização da condição experimental ideal. Estatisticamente, os dois fatores foram significativos e observou-se que 94% da variabilidade das respostas foram justificadas pelo modelo da superfície de resposta da Figura 24.

No que concerne ao efeito de ionização no plasma, vazões de gás nebulizador muito baixas fazem com que as espécies permaneçam mais tempo no plasma com alta energia, ocasionando aumento da quantidade de íons de dupla carga, os quais prejudicam a confiabilidade da concentração do analito. O contrário também é indesejável, no sentido de não permitir a ionização adequada das espécies de Hg

diminuindo a sensibilidade para este elemento. Nessas circunstâncias, a condição ótima de análise foi estabelecida a uma vazão de $1,0 \text{ L min}^{-1}$ de gás nebulizador e potência de radiofrequência de 1000 W.

6.3.2 Otimização do processo de extração de espécies de Hg da amostra de borra oleosa

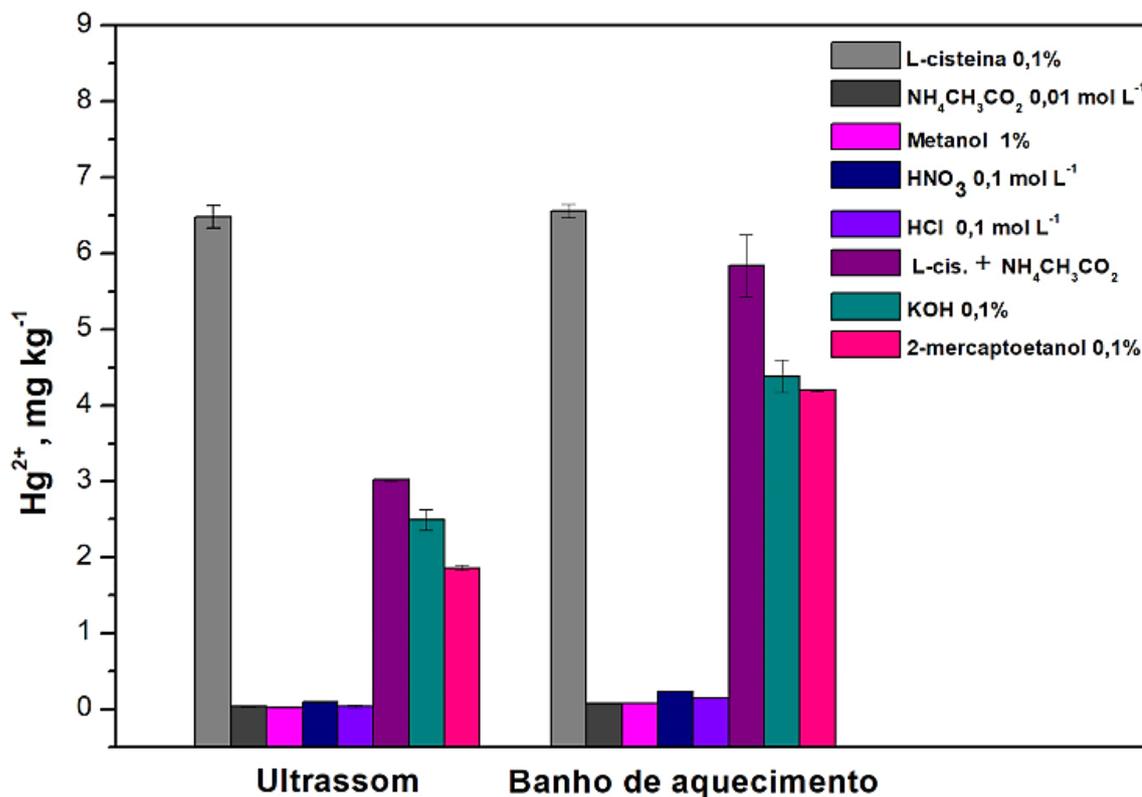
Diferentes métodos têm sido discutidos na literatura acerca da extração de espécies de Hg de diversos tipos de matrizes (YAO *et al.* 2017). Dentre eles destacam-se a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por micro-ondas. Neste trabalho, a extração assistida por ultrassom foi utilizada para a extração de espécies de Hg da amostra de borra oleosa, empregando também aquecimento como um recurso para maximizar a extração. Adicionalmente, foram discutidos estudos de otimização relacionados à avaliação de extratores e condições experimentais relevantes para o método de extração em estudo.

6.3.2.1 Avaliação de diferentes soluções sobre a extração das espécies de Hg

Os estudos tiveram início com a investigação de diferentes meios extratores para as espécies de Hg. Soluções de L-cisteína 0,1% m/v, acetato de amônio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, a composição da fase móvel (L-cisteína 0,26% m/v + acetato de amônio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$), 2-mercaptoetanol 0,1% v/v, metanol 1% v/v, HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e KOH 0,1% m/v foram avaliadas. Optou-se por avaliar a solução da própria fase móvel como extratora, além das soluções que a compõe (L-cisteína, acetato de amônio e metanol), individualmente, a fim de aumentar a compatibilidade da solução extratora com a fase móvel empregada. As soluções de L-cisteína, 2-mercaptoetanol, metanol, HNO_3 , HCl e KOH (JAGTAP; MAHER, 2015, KRUG; ROCHA, 2016, p 521) são conhecidas por apresentarem um efeito positivo sobre a extração de espécies de Hg de amostras diversas e foram empregadas, neste trabalho, em baixas concentrações, para avaliar o potencial extrator destas soluções em amostras de borra oleosa. Essas soluções foram adicionadas, individualmente, a alíquotas de aproximadamente 0,25 g de amostra de borra oleosa e submetidas à extração assistida por ultrassom ou à extração em banho termostaticado. As concentrações de

Hg²⁺ foram determinadas por HPLC-ICP-MS nas condições instrumentais otimizadas e estão representadas na Figura 25.

Figura 25. Efeito de diferentes soluções sobre a extração de Hg²⁺ (mg kg⁻¹) da amostra de borra oleosa, empregando-se extração assistida por ultrassom ou por aquecimento.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Como ponto de partida, as amostras com seus respectivos meios extratores foram submetidas ao ultrassom por 30 min e ao aquecimento em banho na temperatura de 60 °C por 30 min, separadamente, a fim de se verificar o efeito destes métodos sobre a extração. A maior eficiência aparente para extração de Hg²⁺ foi obtida com a utilização de solução de L-cisteína 0,1% (m/v), seguida pela solução da fase móvel (L-cisteína 0,26% m/v + NH₄CH₃CO₂ 0,03 mol L⁻¹), da solução de KOH 0,1% (m/v) e da solução de 2-mercaptoetanol 0,1% (v/v), como mostrado na Figura 25. Cabe destacar que a espécie CH₃Hg⁺ não foi detectada em nenhuma das soluções.

A L-cisteína é um agente complexante contendo enxofre que possui alta afinidade pelo Hg. Particularmente, neste estudo, o uso desta solução como extratora é imprescindível em vista da melhor resposta em comparação aos demais reagentes avaliados. O emprego de L-cisteína na solução extratora pode aumentar a extração e

mobilização de Hg^{2+} num fator de aproximadamente 40 vezes superior comparado à extração com água, dependendo da concentração adotada (BOLLEN; BIESTER, 2011). Apesar do efeito positivo do uso da solução de L-cisteína, não é conhecido se a concentração de Hg^{2+} observada na Figura 25 é proveniente apenas da extração de Hg^{2+} da amostra. Na condição de extração avaliada, pode haver contribuição da conversão de outras espécies no meio em relação a maior concentração de Hg^{2+} obtida com esta solução. Ainda assim, a solução de L-cisteína, individualmente, foi selecionada como a solução mais apropriada para a extração das espécies de Hg da borra oleosa.

As soluções de HNO_3 e HCl apresentam, na literatura, efeitos vantajosos sobre a extração de espécies de Hg. Além disso, no Capítulo 2 foi mostrado que com o uso de HNO_3 $8,0 \text{ mol L}^{-1}$ como extrator, 45 a 66% do Hg total foi extraído como Hg^{2+} nas amostras de borra oleosa após determinação por CV-AFS. Entretanto, nesta investigação, concentrações baixas das soluções ácidas foram avaliadas ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com vistas a evitar a etapa de neutralização para o controle do pH final do extrato previamente a injeção no instrumento HPLC-ICP-MS. Consequentemente, a extração de Hg^{2+} com o uso destas soluções foi consideravelmente reduzida.

No que concerne ao uso de ultrassom ou aquecimento para a extração das espécies, nota-se que ambos têm efeito positivo sobre a extração. Entretanto, o uso de aquecimento melhorou a extração quando foram usadas a solução da fase móvel e solução de KOH . Em relação a avaliação do uso da solução de fase móvel como extrator, a L-cisteína presente nessa solução (L-cisteína $0,26\% \text{ m/v}$ + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ $0,03 \text{ mol L}^{-1}$) estava em uma concentração superior a concentração da solução de L-cisteína avaliada individualmente ($0,1\% \text{ m/v}$), e resultou em efeito reduzido sobre a extração (Figura 25). Ainda, as soluções de acetato de amônio $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ e metanol $1\% \text{ v/v}$, avaliadas individualmente, as quais também compõe a fase móvel, não apresentaram efeitos positivos sobre a extração de Hg^{2+} (Figura 25). Em relação ao uso da solução de 2-mercaptoetanol, apesar de não favorecer significativamente a extração na concentração avaliada ($0,1\% \text{ v/v}$), comparado a solução de L-cisteína ($0,1\% \text{ m/v}$), apresenta grande potencial na extração de espécies de Hg, visto que na literatura diversos estudos mostram a eficiência deste reagente para amostras diversas (SOUZA; CAMPIGLIA; BARBOSA, 2013); (CHENG *et al.* 2014).

Em virtude da melhor extração obtida com as soluções de L-cisteína e KOH , ambas soluções foram avaliadas individualmente e misturadas, submetidas à extração

com ultrassom e com aquecimento, individualmente ou simultaneamente, sobre a extração de Hg^{2+} . As concentrações determinadas de Hg^{2+} , em mg kg^{-1} , estão mostradas na Tabela 21.

Tabela 21. Avaliação das soluções de L-cisteína e KOH, individualmente e misturadas, sobre a extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) da amostra, submetidas ao aquecimento em banho e ao ultrassom, individualmente ou simultaneamente.

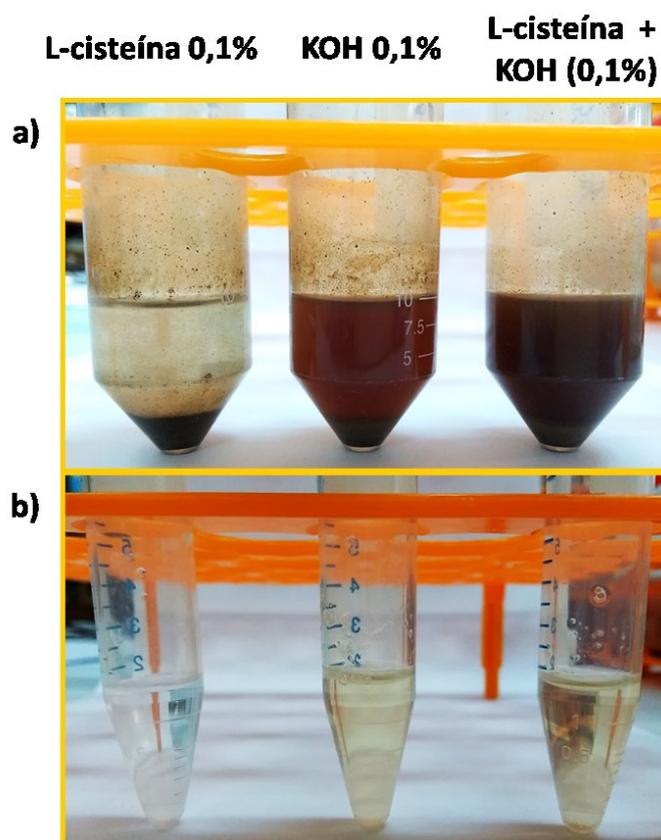
Solução	Hg^{2+} , mg kg^{-1}		
	Banho de aquecimento	Ultrassom	Aquecimento + Ultrassom
L-cisteína (0,1% m/v)	6,56 ± 0,09	6,48 ± 0,15	7,59 ± 0,07
KOH (0,1% m/v)	4,38 ± 0,21	2,49 ± 0,14	2,56 ± 0,07
L-cisteína + KOH (0,1% m/v)	7,73 ± 0,17	6,80 ± 0,27	7,76 ± 0,07

Fonte: elaborado pela autora (2019)

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 21, observa-se que as concentrações de Hg^{2+} na solução da mistura de L-cisteína e KOH foram ligeiramente maiores que as concentrações de Hg^{2+} da solução de L-cisteína, avaliada individualmente, e consideravelmente superiores às concentrações de Hg^{2+} na solução de KOH individualmente, nas três condições avaliadas. Uma justificativa para a melhora na extração com a mistura de L-cisteína e KOH pode ser o fato de que com o aumento do pH ocorre a desprotonação do grupo (-SH) da cisteína, deixando o S⁻ livre para se ligar ao Hg^{2+} da amostra, aumentando assim a extração. Em relação ao método de extração, a concentração de Hg^{2+} obtida com aquecimento e ultrassom, simultaneamente, foi superior à concentração de Hg^{2+} obtida apenas com o aquecimento, para as soluções de L-cisteína e a mistura de L-cisteína e KOH. Avaliando-se estatisticamente estes dados, observou-se que não há diferença significativa entre a concentração de Hg^{2+} na solução de L-cisteína e da mistura (L-cisteína e KOH) quando utilizando extração com aquecimento e ultrassom, simultaneamente ($p \geq 0,05$) (Tabela 21) e, também, não há diferença significativa entre o uso de extração com aquecimento ou com aquecimento e ultrassom com a solução da mistura (L-cisteína e KOH) (Tabela 21). Por outro lado, há diferença significativa ($p \leq 0,05$) para 95% de confiança na comparação entre aquecimento e aquecimento e ultrassom com a solução de L-cisteína individualmente (Tabela 21). A partir destes resultados, optou-se por utilizar o aquecimento e ultrassom simultaneamente nas extrações, e utilizar apenas a solução de L-cisteína para extração das espécies.

Complementarmente, observando-se o aspecto visual das soluções contendo KOH (Figura 26), um precipitado foi formado, de coloração marrom, que mesmo sob filtração de 0,22 μm , resultou em solução levemente amarelada após a diluição num fator de 10. Nesse contexto, para evitar a injeção de alta concentração de sais e partículas na coluna cromatográfica, optou-se pelo uso exclusivo de L-cisteína na solução extratora.

Figura 26. Comparação do aspecto visual das soluções L-cisteína, KOH e da mistura a) após extração com aquecimento e ultrassom, simultaneamente, centrifugação e b) após filtração com filtro 0,22 μm e diluição num fator de 10.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

6.3.2.2 Avaliação da massa de amostra e volume de solução extratora para extração das espécies de Hg

Para avaliar a massa de amostra e o volume de solução na extração foi aplicado o planejamento Doehlert mostrado na Tabela 22. Na tabela estão mostrados os valores reais e os valores codificados, entre parênteses, referentes aos níveis dos fatores volume e massa de amostra, avaliados neste grupo de experimentos. Para a

extração, L- cisteína 0,1% m/v foi utilizada como solução extratora, aplicando-se temperatura do banho de 60 °C e ultrassom por 30 min.

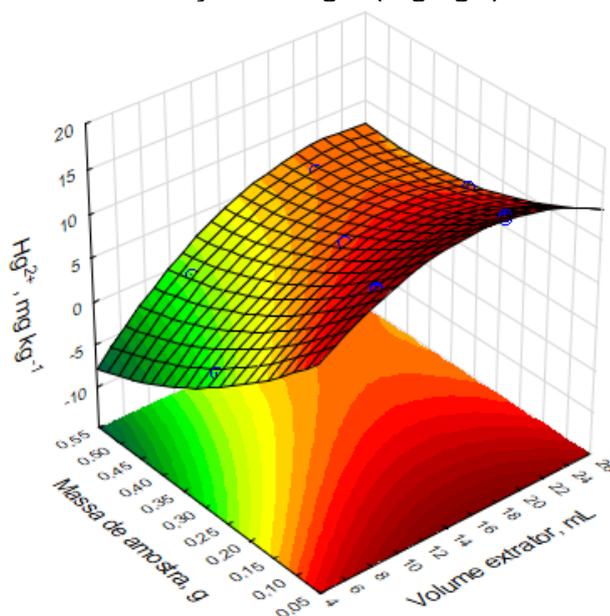
Tabela 22. Matriz Doehlert para otimização do volume de solução extratora e da massa de amostra e resposta referente à extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) da amostra de borra oleosa.

Experimento	Volume (mL)	Massa de amostra (g)	Hg^{2+} (mg kg^{-1})	
1	15	0,3	8,36	8,37
2	25	0,3	8,30	8,36
3	20	0,5	7,04	6,98
4	5	0,3	0,12	0,12
5	10	0,1	13,07	13,15
6	20	0,1	14,47	14,75
7	10	0,5	0,98	0,98

Fonte: elaborado pela autora (2019)

A superfície de resposta gerada a partir da Tabela 22 está mostrada na Figura 27.

Figura 27. Superfície de resposta gerada a partir da matriz Doehlert referente a otimização do volume (mL) e massa de amostra (g). Resposta expressa como extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}).



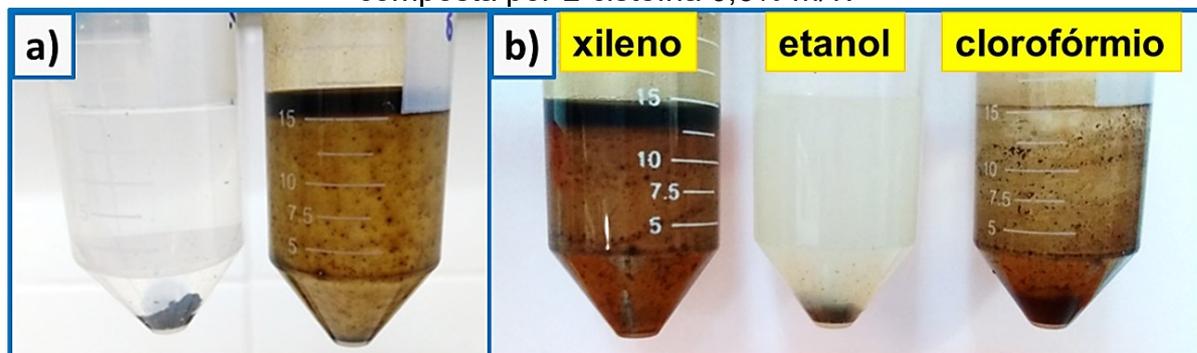
Fonte: elaborado pela autora (2019)

O tratamento estatístico estabelecido pela ANOVA (Apêndice S) revelou que 99% da variabilidade das respostas é justificada pelo modelo. Ambos fatores se mostraram significativos na extração de Hg^{2+} . A partir da análise da Tabela 22 e da superfície de resposta (Fig. 27), observa-se que massas de amostra menores que 0,2 g e volumes de solução de L-cisteína 0,1% m/v entre 10 e 20 mL favoreceram a extração de Hg^{2+} . Nessas condições, massas menores permitiram o contato íntimo da amostra com a solução extratora, enquanto em volumes maiores houve uma maior transferência de massa da amostra para a solução extratora, favorecidas pelo efeito do ultrassom. Por outro lado, a extração foi prejudicada quando a massa de 0,5 g foi avaliada com volume de solução menor que 10 mL. Isso indica que em massas maiores e volumes menores de solução, a extração e transferência das espécies é dificultada devido a menor interação da amostra com a solução extratora. A partir disso, pode-se inferir que um volume mínimo de 10 mL é primordial para que ocorra uma maior distribuição das espécies extraídas de Hg para a solução extratora e que massas menores de amostra favorecem essa interação. Nesse contexto, a condição de massa e volume escolhidas foi de 0,1 g de amostra e 15 mL de solução extratora composta por L-cisteína.

6.3.2.3 Avaliação do uso de solvente orgânico para o aumento do contato da amostra com a solução extratora sobre a extração das espécies de Hg

A fim de melhorar a extração de Hg^{2+} , um teste foi feito utilizando 0,5 mL de xileno para solubilizar a fração oleosa da amostra e aumentar o contato da amostra com a solução extratora composta por L-cisteína 0,6% m/v. Na Figura 28a estão mostrados, na esquerda, o frasco contendo apenas a amostra e a solução extratora aquosa e, na direita, o frasco contendo a amostra com 0,5 mL de xileno e a solução extratora. A partir deste teste, foi observado que o uso do solvente (xileno), como mostrado na Figura 28a, melhorou o contato da amostra com a solução extratora e aumentou em 3,3 vezes a extração de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa.

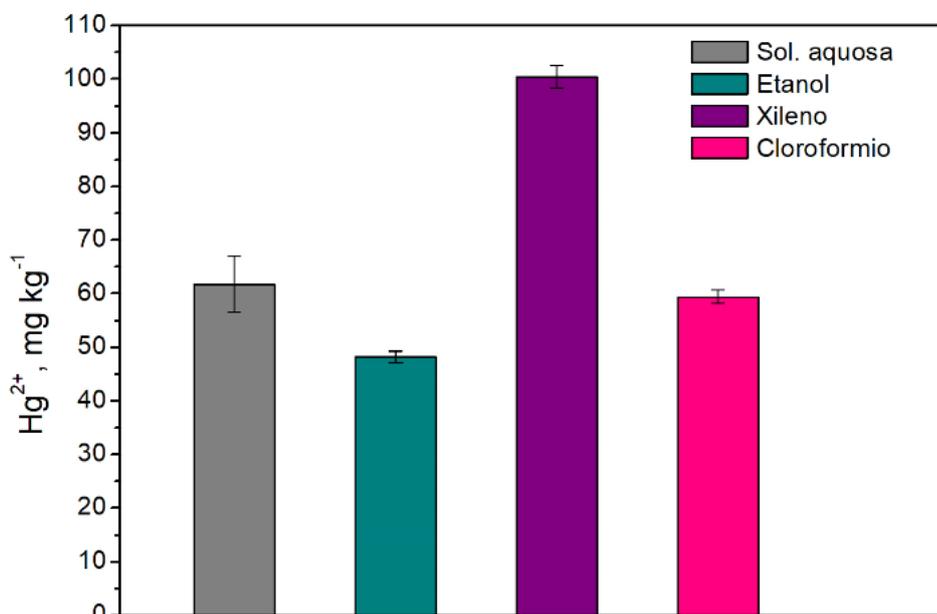
Figura 28. Aspecto visual das soluções contendo diferentes solventes orgânicos para a solubilização da fração oleosa da amostra. Em **a)** estão mostrados a amostra na ausência de solvente orgânico (à esquerda) e a amostra na presença de 0,5 mL xileno (à direita), e em **b)** a amostra na presença de 0,5 mL dos solventes xileno, etanol ou clorofórmio para a solubilização da amostra. A solução extratora é composta por L-cisteína 0,6% m/v.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Visto que o uso de solvente sobre a solubilização da fração oleosa na extração de Hg^{2+} foi vantajoso (Figura 28a), além do xileno, os solventes etanol absoluto e clorofórmio foram avaliados. Na Figura 28b, estão mostrados os frascos contendo a amostra, 0,5 mL do solvente orgânico e a solução de L-cisteína 0,6% m/v. Foi observado que xileno e clorofórmio apresentaram maior efeito sobre a solubilização da amostra do que o etanol. Nesse contexto, é importante destacar que o aumento da solubilização depende largamente da quantidade de fração oleosa da amostra. Como a amostra em estudo apresenta uma grande fração hidrofóbica, o uso de solvente orgânico, principalmente xileno, permitiu uma maior solubilização da matriz oleosa e aumento do contato com a solução extratora. Após a extração assistida por ultrassom e aquecimento, os extratos foram filtrados e analisados por HPLC-ICP-MS. As concentrações de Hg^{2+} obtidas com cada solvente utilizado estão mostradas na Figura 29.

Figura 29. Concentrações de Hg^{2+} obtidas após a solubilização da fase oleosa da amostra de borra oleosa com diferentes solventes orgânicos. (n=2)



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Na Figura 29 é mostrado que o uso de xileno na solubilização da amostra resultou em maior extração de Hg^{2+} , comparado ao uso dos solventes etanol e clorofórmio. Particularmente, com o uso de etanol, a amostra não foi solubilizada suficientemente a ponto de melhorar o contato com a solução extratora. Além disso, esse solvente prejudicou a extração de Hg^{2+} , possivelmente dificultando a transferência de massa para a solução extratora, resultando em concentração reduzida de Hg^{2+} comparativamente à amostra contendo apenas a solução extratora aquosa (Fig. 29).

A partir disso, optou-se por usar o xileno como cossolvente durante o processo de extração, visto que resultou em maior eficiência na solubilização da amostra, aumentando o contato da amostra com a solução extratora, e, conseqüentemente, melhorando a extração de Hg^{2+} .

6.3.2.4 Aplicação de um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ para triagem dos fatores significativos na extração

A inclusão de alguns fatores na otimização do método de extração, com o objetivo de maximizar a extração, foi então considerada. Um elevado número de fatores, conseqüentemente, resultaria em um número elevado de experimentos o que

seria desfavorável em se tratando de análise cromatográfica. Dessa forma, optou-se por fazer um planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$, reduzindo o número de experimentos para um total de 11 (incluindo a triplicata do ponto central para a estimativa do erro puro e da falta de ajuste). Nestas circunstâncias, os fatores: volume de xileno, concentração de L-cisteína, concentração de 2-mercaptoetanol, temperatura do banho e tempo de ultrassom foram investigadas quanto a significância, para verificar, através do gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, os fatores mais significativos para a extração das espécies de Hg^{2+} . A solução de 2-mercaptoetanol foi inserida neste estudo para avaliar se a combinação de L-cisteína e 2-mercaptoetanol resultaria na maximização da extração, apesar de o 2-mercaptoetanol ter apresentado um efeito de extração reduzido em relação à L-cisteína (Figura 25).

Na Tabela 23 estão mostrados os fatores e os níveis avaliados para cada fator, assim como as respostas de extração de Hg^{2+} .

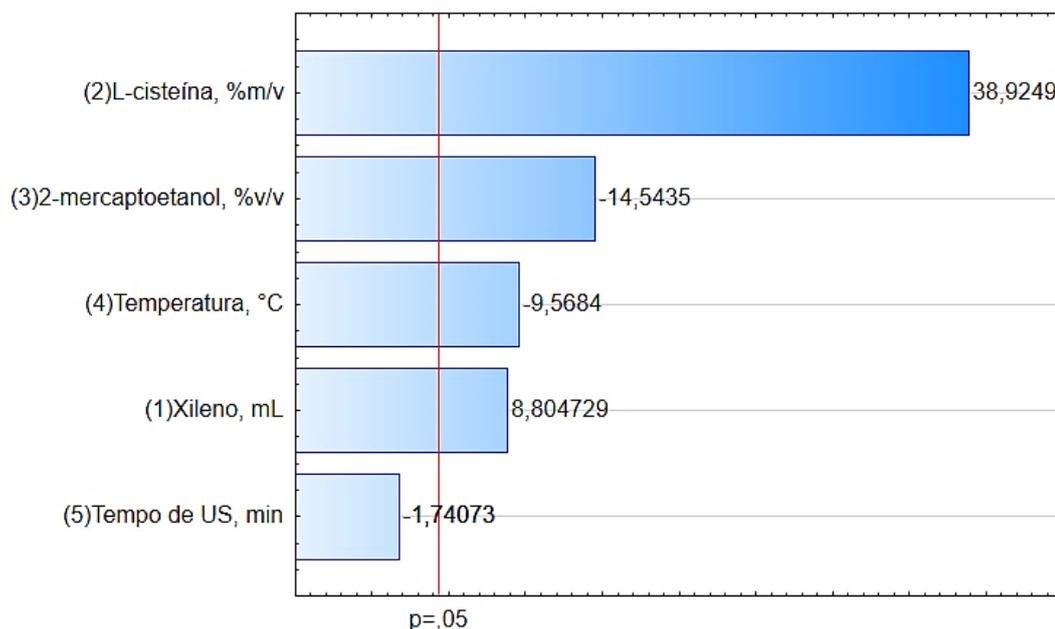
Tabela 23. Valores reais dos fatores (xileno, L-cisteína, 2-mercaptoetanol, temperatura e tempo de ultrassom) avaliados no planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ e respostas expressas como concentração de Hg^{2+} ($mg\ kg^{-1}$).

Exp.	Xileno (mL)	L-cisteína (% m/v)	2-mercaptoet. (% v/v)	Temperat. (°C)	Tempo US (min)	Hg^{2+} ($mg\ kg^{-1}$)
1	0,1	0,1	0	80	65	9,6
2	0,7	0,1	0	40	5	122,3
3	0,1	1,3	0	40	65	298,6
4	0,7	1,3	0	80	5	279,8
5	0,1	0,1	0,6	80	5	25,7
6	0,7	0,1	0,6	40	65	76,6
7	0,1	1,3	0,6	40	5	168,5
8	0,7	1,3	0,6	80	65	180,5
9	0,4	0,7	0,3	60	35	162,4
10	0,4	0,7	0,3	60	35	162,0
11	0,4	0,7	0,3	60	35	151,3

Fonte: elaborado pela autora (2019)

A partir dos dados da Tabela 23, o gráfico de Pareto para extração de Hg^{2+} foi gerado e está mostrado na Figura 30.

Figura 30. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados obtido a partir do planejamento fatorial fracionário $2^{(5-2)}$ para verificação de significância dos fatores considerando a extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}).



Fonte: elaborado pela autora (2019)

A Figura 30 mostra que a concentração de L-cisteína (% m/v) foi mais significativa e quanto maior a concentração melhor a extração. A concentração de 2-mercaptoetanol (% v/v) foi também significativa; entretanto, quanto menor a concentração avaliada maior foi a quantidade extraída de Hg^{2+} . Nesse caso, com o uso de L-cisteína e 2-mercaptoetanol como extratores na mesma solução, concentrações reduzidas de Hg^{2+} foram encontradas, como mostrado na Tabela 23. O terceiro fator mais significativo sobre a extração de Hg^{2+} foi a temperatura. Neste caso, o gráfico de Pareto (Fig. 30) mostra que quanto menor a temperatura melhor a extração. Particularmente, na temperatura de 80°C houve deformação parcial dos frascos de polipropileno devido à alta temperatura, podendo favorecer a perda das espécies durante o processo, além de possibilitar a degradação da L-cisteína, reduzindo a extração. Nesse sentido, a temperatura de 60°C parece ser mais favorável para a extração de Hg^{2+} . Por fim, o volume de xileno mostrou-se significativo, evidenciando, no gráfico de Pareto (Fig. 30), que quanto maior o volume de xileno maior a extração. Opostamente a estes fatores, o tempo de ultrassom mostrou não ser significativo na extração, indicando que este pode ser excluído da otimização, podendo ser fixado idealmente em intervalos de tempo menores que 35 min de exposição.

6.3.2.5 Avaliação do efeito da solução de 2-mercaptoetanol e L-cisteína sobre a extração e determinação de Hg^{2+}

Como mostrado na Tabela 23, o uso da solução de 2-mercaptoetanol na presença de L-cisteína como extratores, resultou na redução da extração e/ou medição de Hg^{2+} , enquanto o gráfico de Pareto (Figura 30) sugere que quanto menor a concentração de 2-mercaptoetanol melhor é a extração. A justificativa para esta observação é desconhecida; porém, alguns estudos investigativos serão efetuados para avaliar esse comportamento.

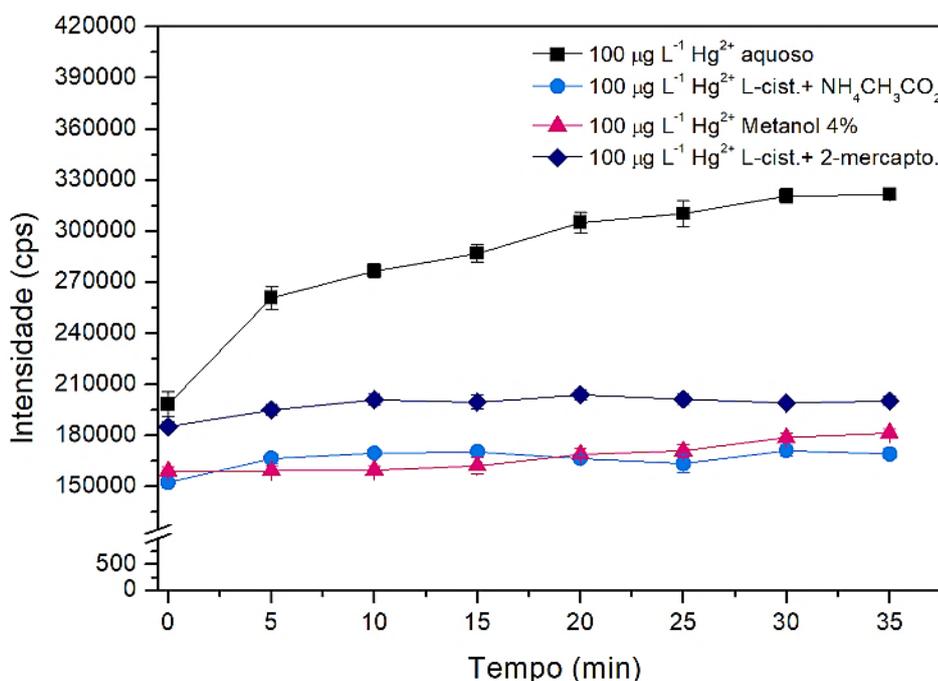
Sugere-se que diversos fatores podem estar induzindo a redução da extração/medição de Hg^{2+} nestas circunstâncias: o 2-mercaptoetanol pode estar inibindo o potencial de extração da L-cisteína durante o preparo da amostra, ou o 2-mercaptoetanol pode ter sido retido na fase composta pelo xileno, reduzindo, assim, a extração efetiva das espécies por algum mecanismo prejudicial; o uso de 2-mercaptoetanol pode estar reduzindo a intensidade de Hg^{2+} por efeitos desconhecidos deste no plasma indutivamente acoplado (ICP); o 2-mercaptoetanol pode estar se comportando incompativelmente com a fase móvel utilizada, composta por L-cisteína, acetato de amônio e metanol. Nesse aspecto, a presença majoritária de L-cisteína, pode estar desencadeando efeitos indesejáveis a nível de separação na coluna C_{18} , considerando as particularidades do 2-mercaptoetanol e da L-cisteína sobre a separação das espécies de Hg.

Considerando a etapa do preparo da amostra, esse efeito de redução da intensidade de Hg^{2+} na solução contendo 2-mercaptoetanol e L-cisteína pode estar relacionado ao uso de xileno para a solubilização da fase orgânica da amostra. Nesse caso, o xileno pode estar retendo o 2-mercaptoetanol na fase orgânica, ou, de alguma forma, prejudicando a complexação do 2-mercaptoetanol com o Hg durante o processo de extração mediado por ultrassom e aquecimento, reduzindo, assim, a extração de Hg^{2+} da amostra mesmo na presença de L-cisteína.

No que concerne ao comportamento das soluções no ICP, foram efetuadas avaliações quanto a intensidade do Hg^{2+} em diferentes soluções utilizadas no preparo da amostra e durante a análise, incluindo a solução de 2-mercaptoetanol. Soluções contendo $100 \mu g L^{-1}$ de Hg^{2+} em meio aquoso (2% v/v HNO_3), em solução de L-cisteína 0,26% m/v + $NH_4CH_3CO_2$ $0,03 mol L^{-1}$, em solução de 4% v/v de metanol e em solução

da mistura de L-cisteína 0,1% m/v + 0,06% v/v de 2-mercaptoetanol foram analisadas por ICP-MS com nebulização pneumática para a verificação da intensidade do Hg^{2+} e a estabilidade das medidas por um determinado intervalo de tempo (Fig. 31).

Figura 31. Intensidades do Hg^{2+} em diferentes soluções utilizadas nos processos de extração e determinação, analisadas em intervalos de 5 min utilizando ICP-MS.



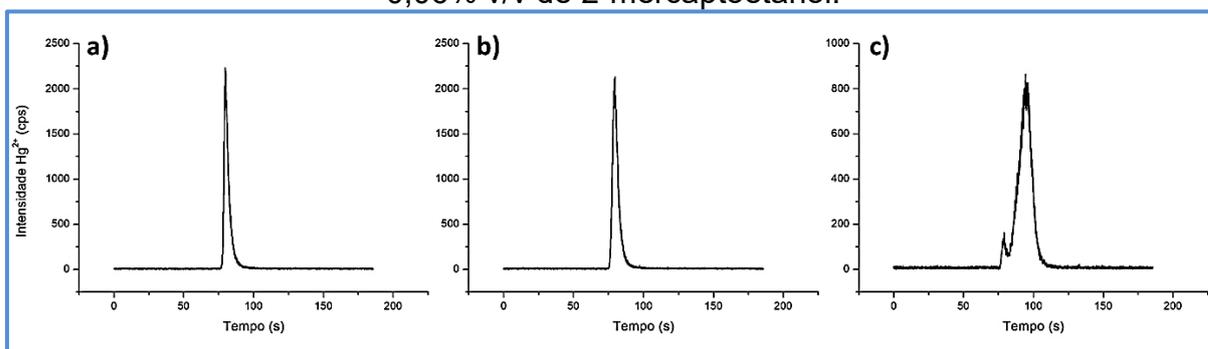
Fonte: elaborado pela autora (2019)

A partir deste estudo, procurou-se monitorar a intensidade de Hg^{2+} nestas soluções e verificar possíveis alterações da intensidade desta espécie no ambiente do ICP com o tempo.

Como pode ser observado, a intensidade de sinal para Hg na solução aquosa aumentou gradativamente com o tempo. Isso ocorreu devido ao efeito de memória causado no sistema de nebulização pneumática e nas mangueiras do sistema de fluxo. Para a limpeza do sistema, solução de 2-mercaptoetanol 0,06% v/v foi utilizada após a análise desta solução para que a intensidade voltasse a valores próximos de zero. A Figura 31 mostra também que a intensidade de Hg^{2+} para L-cisteína e 2-mercaptoetanol manteve-se constante com o tempo e apresentou intensidade maior do que com as soluções de metanol 4% v/v e de L-cisteína + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$. Com esse resultado pode-se inferir que o uso de 2-mercaptoetanol não afeta a intensidade de Hg^{2+} diretamente no plasma, mostrando que não é esse o motivo pelo qual o 2-mercaptoetanol prejudica a medição de Hg^{2+} na presença de L-cisteína.

Nesse caso, para verificar a intensidade das mesmas soluções supracitadas utilizando HPLC-ICP-MS e verificar o perfil do sinal de Hg^{2+} , estas soluções, exceto a solução aquosa contendo 2% de HNO_3 , foram injetadas no HPLC-ICP-MS no volume de 20 μL . Na Figura 32, estão mostrados os cromatogramas obtidos para a intensidade de Hg^{2+} nas soluções analisadas.

Figura 32. Cromatogramas obtidos por HPLC-ICP-MS após a injeção de solução contendo Hg^{2+} 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ em meio de a) solução de metanol 4% v/v b) solução de L-cisteína 0,26% m/v + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ 0,03 mol L^{-1} e c) solução de L-cisteína 0,1% m/v + 0,06% v/v de 2-mercaptoetanol.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Como observado na Figura 32, as intensidades de Hg^{2+} e o perfil dos sinais dos cromatogramas das Fig. 32a e Fig. 32b são semelhantes. As áreas dos sinais foram de 8789 e 10199 para as Fig. 32a e 32b, respectivamente. Nesse caso, a área do sinal obtida para Hg^{2+} no meio de metanol 4% v/v foi reduzida provavelmente pelo fato deste componente diminuir a interação do Hg^{2+} com a fase estacionária da coluna de separação. Esse efeito, já diagnosticado anteriormente (Fig. 22), mostra que, apesar de o tempo de retenção não ser diferente entre as Figuras 32a e 32b, o sinal do Hg^{2+} com a solução de metanol parece estar levemente mais estreito do que o sinal com a solução de L-cisteína + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$. Notavelmente, na Fig. 32c, o perfil do sinal de Hg^{2+} na solução de L-cisteína + 2-mercaptoetanol está alargado e apresentou este perfil nas replicatas avaliadas. Quanto à área do sinal de Hg^{2+} (9347) mostrada na Fig. 32c, essa não foi consideravelmente influenciada pelo alargamento do sinal comparado à área do sinal obtida pela solução de L-cisteína + $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$.

Nesse contexto, é sugerido que a presença de 2-mercaptoetanol na solução contendo L-cisteína promova alargamento do sinal de Hg^{2+} , devido à possível incompatibilidade com a solução da fase móvel estabelecida neste trabalho, o qual emprega uma concentração maior de L-cisteína comparada à concentração de 2-

mercaptoetanol utilizada (0,06% v/v). Estes dois reagentes têm sido extensivamente utilizados na extração de espécies de Hg^{2+} , em matrizes diversas, eficientemente. Na literatura, trabalhos específicos mostram que o uso de L-cisteína, em determinadas concentrações, comparado ao uso de 2-mercaptoetanol altera o tempo de retenção das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ (JAGTAP *et al.* 2011). Além disso, sugestivamente, no que concerne à extração e à determinação destas espécies utilizando estes reagentes, nota-se que quando um desses reagentes é utilizado majoritariamente no preparo, parece ser também utilizado na composição da fase móvel (YAO *et al.* 2017). Procede-se dessa forma, provavelmente, para evitar variação na detecção das espécies, alteração nos tempos de retenção e prejuízo da resolução nos sinais cromatográficos. É relatado que os valores de pK desses dois complexos com espécies Hg^{2+} são diferentes, da ordem de 15,13 para 2-mercaptoetanol- Hg^{2+} , e 7,32 para cisteína- Hg^{2+} . Enquanto os complexos de 2-mercaptoetanol são neutros, os complexos de L-cisteína têm uma carga positiva em pH 5,3. Isso resulta em uma interação mais forte do 2-mercaptoetanol com a fase estacionária da coluna de separação, enquanto o complexo de L-cisteína com carga positiva tem um tempo de retenção muito menor na coluna. Por isso, o uso destes dois reagentes numa mesma separação pode causar interações divergentes que acabam prejudicando o perfil do sinal, causando alargamento e prejudicando a resolução dos sinais (JAGTAP *et al.* 2011).

Dessa maneira, com a fase móvel estabelecida neste trabalho, que compreende uma eluição isocrática composta por 96% de solução aquosa contendo a mistura de L-cisteína e acetato de amônio e 4% de metanol, optou-se por não empregar o 2-mercaptoetanol durante a extração das espécies de Hg a fim de evitar prejuízo da determinação das espécies de Hg.

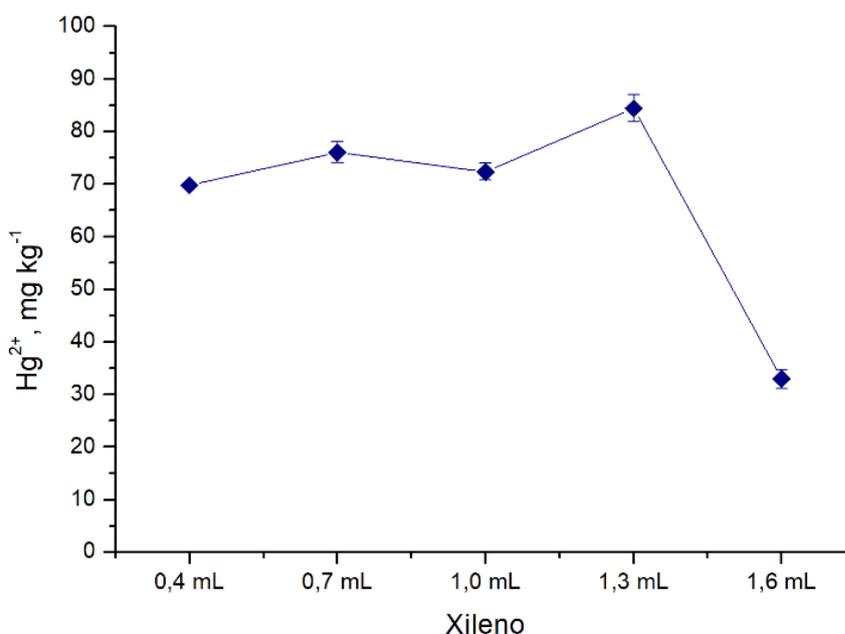
6.3.2.6 Otimização dos fatores associados à extração aplicando planejamento Box-Behnken

Para a otimização dos fatores significativos na extração das espécies de Hg (concentração de L-cisteína, volume de xileno e temperatura do banho), foi aplicado um planejamento Box-Behnken. Paralelamente, como o tempo de aplicação do ultrassom não foi significativo (Figura 30), este não foi considerado no planejamento e foi fixado em 30 min para garantir uma boa extração aplicando-se ultrassom e

temperatura. Em cada experimento foi avaliada a extração das espécies de Hg, a conversão das espécies de CH_3Hg^+ e a recuperação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ utilizando a amostra de borra oleosa sem enriquecimento e as amostras enriquecidas com 100 mg kg^{-1} de CH_3Hg^+ e 200 mg kg^{-1} de Hg^{2+} . Para os cálculos de porcentagem de extração das espécies foi considerada a extração das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ na amostra sem enriquecimento em relação ao Hg total na amostra. A recuperação de CH_3Hg^+ foi avaliada considerando-se a concentração de CH_3Hg^+ adicionada e a concentração de CH_3Hg^+ determinada. A conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} foi avaliada pelo aumento da concentração da espécie Hg^{2+} na amostra enriquecida com CH_3Hg^+ em comparação com a concentração de Hg^{2+} da amostra sem enriquecimento, e pela observação da diminuição da concentração do CH_3Hg^+ adicionado. Enquanto a recuperação de Hg^{2+} foi monitorada pela diferença entre a concentração de Hg^{2+} na amostra enriquecida e a concentração de Hg^{2+} na amostra sem enriquecimento.

Inicialmente, para verificar a melhor faixa de volumes de xileno a ser aplicada no planejamento Box-Behnken, um teste univariado foi realizado.

Figura 33. Avaliação de diferentes volumes de xileno sobre a extração de espécies de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa.



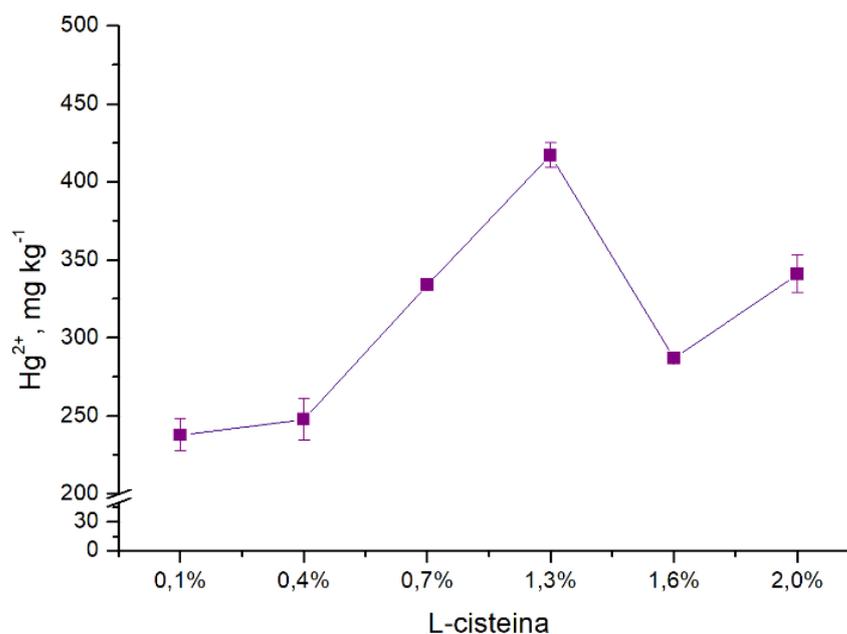
Fonte: elaborado pela autora (2019)

Como pode ser visto na Figura 33, a faixa de volumes de xileno avaliada, a partir do volume de 0,4 mL até 1,3 mL foi considerada adequada para aplicação da otimização multivariada relativa à extração das espécies de Hg^{2+} . Entre 0,4 mL e 1,0

mL, o comportamento foi semelhante, tendo seu ápice no volume de 1,3 mL e decaindo depois desse volume. Nesse caso, volumes muito altos podem estar associados com uma dificuldade de interação entre a fase extratora aquosa e a fase orgânica, prejudicando a difusão das espécies para a solução extratora reduzindo a extração. Dessa forma, o domínio foi restrito a um volume máximo de 1,3 mL de xileno para ser empregado no planejamento Box-Behnken.

Da mesma forma, para verificar uma faixa ótima de concentração da solução de L-cisteína utilizada para extrair as espécies, um teste univariado em diferentes concentrações foi efetuado (Figura 34).

Figura 34. Avaliação de diferentes concentrações de L-cisteína sobre a extração de espécies de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Nesse caso, observa-se que entre 0,1 e 1,3% m/v de L-cisteína houve um aumento crescente na extração de Hg^{2+} , decaindo em concentrações superiores. Em concentrações superiores a 1,3% já não há mais uma contribuição efetiva da concentração da L-cisteína sobre a extração das espécies. A partir dessa concentração, apesar da diferença de valores de concentração de Hg^{2+} observada em 1,6 e 2,0% de L-cisteína, os dados estão muito mais suscetíveis a desvios entre os valores de concentração que podem oscilar em torno de um valor médio. A partir disso, uma faixa de concentração com valores até 1,3% m/v de L-cisteína foi escolhida para posterior avaliação.

A Tabela 24 mostra os fatores, os níveis reais e as respostas para o planejamento Box-Behnken utilizado para a otimização do método de extração.

Tabela 24. Matriz Box-Behnken utilizada para a otimização dos fatores volume de xileno, concentração de L-cisteína e temperatura, condições experimentais avaliadas e respostas para a extração de Hg^{2+} , conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} e recuperação das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ .

Exp.	xileno (mL)	L-cisteína (%)	Temperatura (°C)	Extração Hg^{2+} (%)	Conversão CH_3Hg^+ (%)	Rec. CH_3Hg^+ (%)	Rec. Hg^{2+} (%)
1	0,5	0,1	60	27,3	2,9	94,8	53,2
2	1,3	0,1	60	28,3	5,4	93,8	71,6
3	0,5	1,3	60	44,4	5,6	93,8	79,2
4	1,3	1,3	60	47,3	7,0	87,9	74,1
5	0,5	0,7	40	30,0	1,9	89,9	90,6
6	1,3	0,7	40	36,0	2,1	91,3	77,1
7	0,5	0,7	80	18,8	14,5	82,1	30,9
8	1,3	0,7	80	19,5	12,4	84,7	66,5
9	0,9	0,1	40	22,3	3,9	94,6	24,6
10	0,9	1,3	40	37,0	4,5	90,5	56,3
11	0,9	0,1	80	7,2	10,6	87,8	14,6
12	0,9	1,3	80	42,7	15,8	81,2	10,9
13	0,9	0,7	60	40,8	4,0	92,9	66,0
14	0,9	0,7	60	39,9	3,4	93,0	65,9
15	0,9	0,7	60	40,3	3,6	93,7	66,7

Fonte: elaborado pela autora (2019)

A partir dos dados da Tabela 24 obtidos para cada experimento foram plotadas as superfícies de resposta para a extração de Hg^{2+} , conversão de CH_3Hg^+ e recuperação de CH_3Hg^+ e Hg^{2+} . A espécie CH_3Hg^+ não foi detectada nas amostras de borra.

ANOVA (Tabela 25) e as superfícies de resposta da Figura 35 foram geradas no que concerne a extração de Hg^{2+} nas diferentes condições experimentais (Tabela 24). Após o tratamento estatístico dos dados, a ANOVA (Tabela 25) mostrou que 96% da variabilidade nas respostas são justificadas pelo modelo. Além disso, todos os fatores foram significativos exceto a interação entre xileno e L-cisteína, como pode ser observado na Tabela 25 e na Figura 35c.

Tabela 25. ANOVA para a extração de Hg^{2+} (%) da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken avaliando-se volume de xileno (mL), concentração de L-cisteína (% m/v) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$).
 $R^2 = 0,9628$.

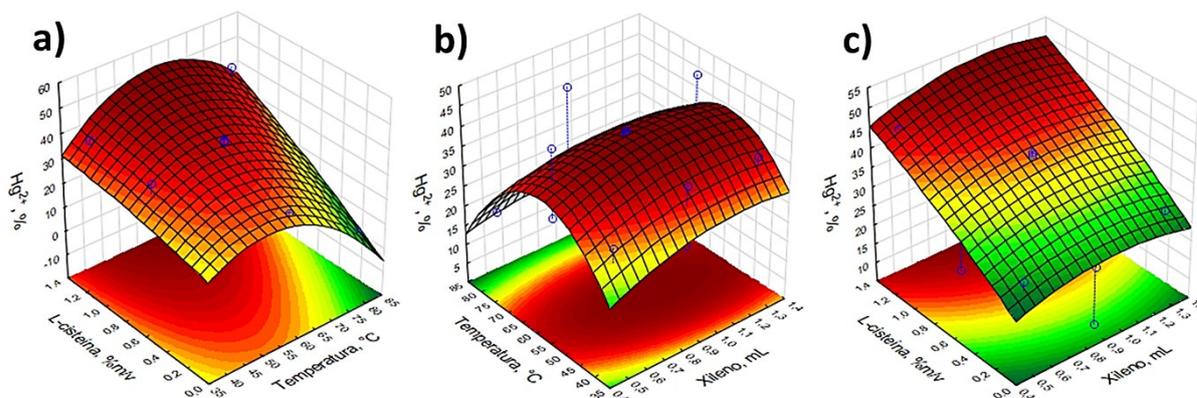
Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Xileno (L)	14,045	1	14,0450	69,074	0,014170	Significativo
Xileno (Q)	20,681	1	20,6810	101,710	0,009689	Significativo
L-cisteína (L)	930,961	1	930,9612	4578,498	0,000218	Significativo
L-cisteína (Q)	4,813	1	4,8126	23,668	0,039748	Significativo
Temperatura (L)	172,051	1	172,0512	846,154	0,001180	Significativo
Temperatura (Q)	522,136	1	522,1356	2567,880	0,000389	Significativo
Xileno x L-cisteína	0,902	1	0,9025	4,439	0,169717	
Xileno x temperat.	7,023	1	7,0225	34,537	0,027755	Significativo
L-cist. x temperat.	108,160	1	108,1600	531,934	0,001875	Significativo
Falta de ajuste	67,693	3	22,5642	110,971	0,008944	Significativo
Erro puro	0,407	2	0,2033			
SQ total	1831,264	14				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Na Figura 35a, pode-se observar que a região de máxima extração envolvendo L-cisteína e temperatura ocorreu na concentração de 1,3% m/v de L-cisteína (nível máximo) e na temperatura de 60°C (ponto central). Como previamente relatado, na temperatura de 80°C pode-se observar redução da concentração de Hg^{2+} , possivelmente devido à perda das espécies durante o processo de extração ou por degradação da L-cisteína devido à alta temperatura aplicada (Fig. 35a e 35b). Em relação ao volume de xileno, quando avaliada a interação com a temperatura (Fig. 35b) e com a concentração de L-cisteína (Fig. 35c), observa-se que em volumes superiores a 0,7 mL a extração foi discretamente maior, apesar deste fator não ser tão significativo quanto os fatores temperatura e concentração de L-cisteína. A partir desta análise, a condição de temperatura de 60°C , volume de xileno de aproximadamente 1,2 mL e concentração de L-cisteína de 1,3% m/v parece ser favorável para a máxima extração de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa. Embora a máxima extração de Hg^{2+} tenha sido de apenas 47,3% em relação ao Hg total, é esperado uma baixa concentração de espécies iônicas (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) em amostras de resíduos oleosos de petróleo, uma vez que a espécie predominante em amostras desta natureza é o Hg particulado, principalmente na forma de HgS (AVELLAN *et al.* 2018).

Figura 35. Superfícies de resposta para a extração de Hg^{2+} (%) da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Temperatura e volume de xileno; c) Concentração de L-cisteína e volume de xileno.

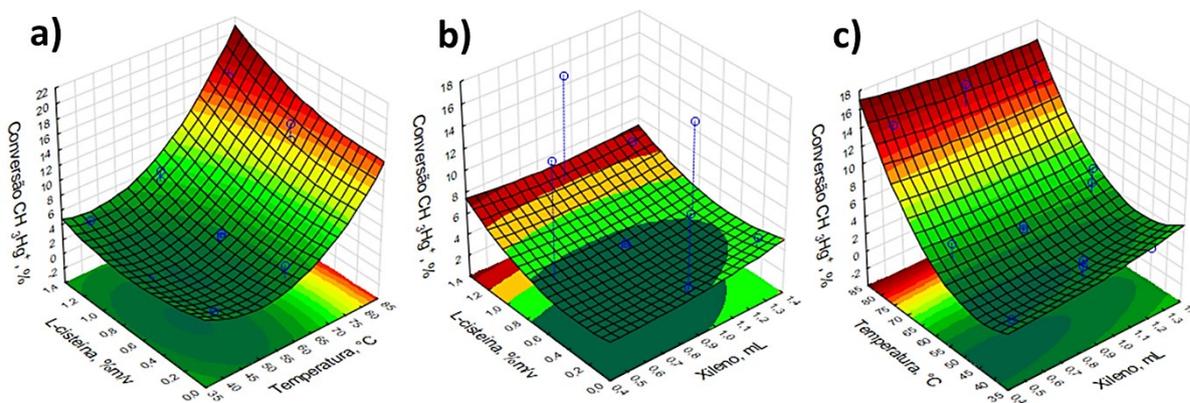


Fonte: elaborado pela autora (2019)

É conhecido que durante todos os experimentos não foi detectado CH_3Hg^+ . Na literatura é sugerido que CH_3Hg^+ e $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ estão presentes em baixas concentrações em amostras de petróleo cru e que quando CH_3Hg^+ é detectado em concentrações sub-ppb, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ pode sequer ser detectado na amostra (BLOOM, 2000).

Apesar disso, neste trabalho, a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} também foi monitorada nas condições experimentais da Tabela 24, após a análise da amostra enriquecida com CH_3Hg^+ . Os dados estatísticos da ANOVA (Apêndice T), obtidos para as superfícies da Figura 36 mostram que 97% da variabilidade dos dados é justificada pelo modelo. Nesse caso, os fatores mais significativos sobre o modelo quadrático gerado foram a temperatura e a concentração de L-cisteína. A concentração de L-cisteína e a temperatura foram também significativas na função linear, assim como a interação de L-cisteína e temperatura foi significativa. O uso de xileno como cossolvente de extração, nesse contexto, não foi significativo sobre a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} .

Figura 36. Superfícies de resposta para a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} na amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Concentração de L-cisteína e volume de xileno; c) Temperatura e volume de xileno.



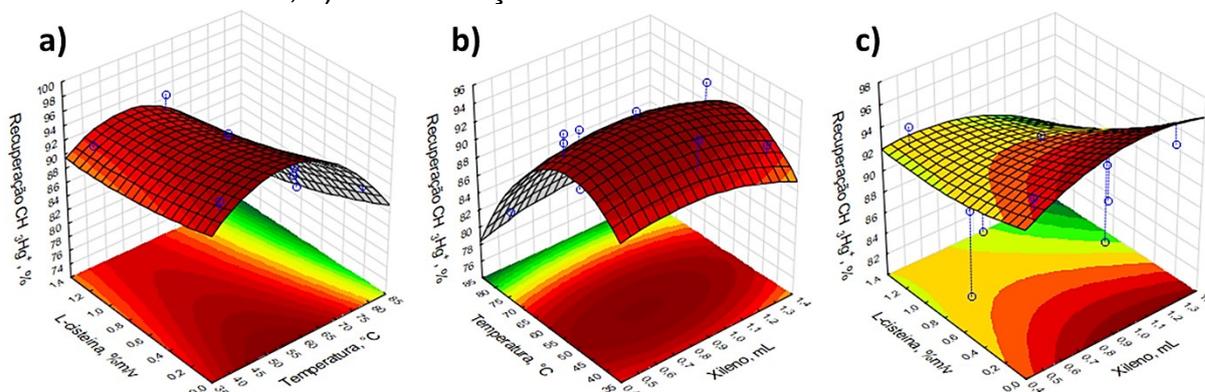
Fonte: elaborado pela autora (2019)

A partir da inspeção visual das superfícies da Figura 36a e 36c confirmou-se o efeito significativo da temperatura sobre a conversão de CH_3Hg^+ . Com o aumento da temperatura, para valores máximos ($80\text{ }^\circ\text{C}$) observa-se uma conversão de até 16%. Nessa temperatura, o aumento da conversão pode estar associado não somente a conversão, mas a possível perda das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ durante o processo de extração. Observando-se a Fig 36b, constata-se que conversão de CH_3Hg^+ de até 7% foi atingida nas condições mais drásticas de concentração de L-cisteína (1,3% m/v) e volume de xileno (1,3 mL). A partir disso, nota-se que na condição que resultou em máxima extração de Hg^{2+} (temperatura de $60\text{ }^\circ\text{C}$, 1,2 mL de xileno e 1,3% m/v de L-cisteína) ocorreu uma conversão de aproximadamente 7%. Em virtude da não-detecção de espécies orgânicas com o método de extração estabelecido, a conversão de CH_3Hg^+ foi, de certa maneira, negligenciável neste estudo, priorizando-se a maior extração do Hg^{2+} .

A eficiência de recuperação das espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ adicionadas na amostra de borra oleosa também foi avaliada em cada condição experimental descrita na Tabela 24.

As superfícies de resposta geradas para a recuperação de CH_3Hg^+ na otimização do método de extração estão mostradas na Figura 37.

Figura 37. Superfícies de resposta para a recuperação de CH_3Hg^+ da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planeamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Temperatura e volume de xileno; c) Concentração de L-cisteína e volume de xileno.

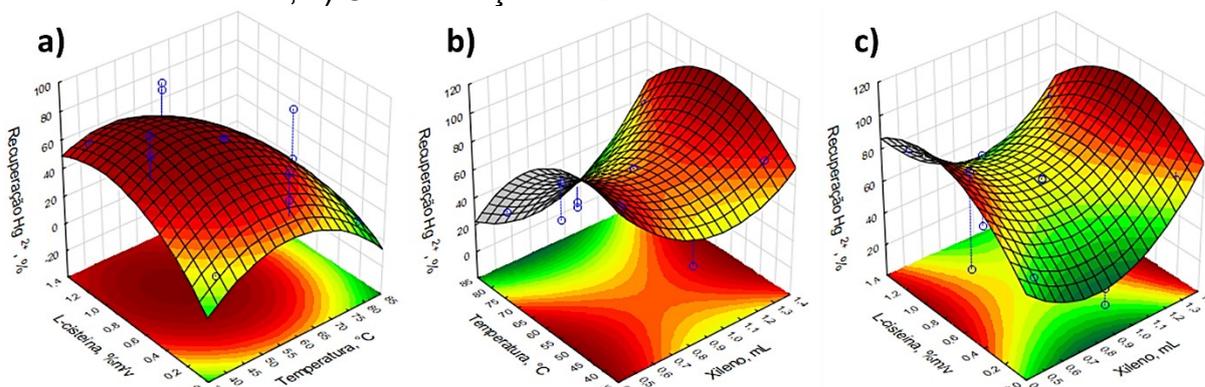


Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados da ANOVA (Apêndice U) mostraram um coeficiente de determinação de 0,93, indicando que os dados experimentais estão bem explicados pelo modelo. Os fatores concentração de L-cisteína (linear), temperatura (linear e quadrático) e a interação de xileno e L-cisteína mostraram-se significativos para a recuperação de CH_3Hg^+ . A partir da superfície de resposta das Figuras 37a e 37b, observa-se que a recuperação foi superior em temperaturas inferiores a 60°C (93 a 95%) e que a recuperação foi reduzida para aproximadamente 90% com o aumento da concentração de L-cisteína em valores superiores a 0,6% m/v (Fig. 37a e 37c). Dessa forma, a combinação do aumento da concentração com o aumento de temperatura e do volume de xileno reduziu de 95 para 80% a recuperação de CH_3Hg^+ . Essa recuperação reduzida também está associada com perdas por volatilização e conversão de CH_3Hg^+ observadas, principalmente, nas condições mais drásticas de temperatura (80°C) e concentração de L-cisteína (1,3% m/v). Apesar dessas particularidades, a condição ideal para a extração de Hg^{2+} ainda garantiu uma recuperação razoável de CH_3Hg^+ (88%), considerando a complexidade da matriz da amostra.

Convenientemente, a recuperação da espécie Hg^{2+} adicionada na amostra também foi monitorada, e as superfícies de resposta mostradas na Figura 38.

Figura 38. Superfícies de resposta para recuperação de Hg^{2+} na amostra de borra oleosa após otimização do método de extração utilizando planejamento Box-Behnken: a) Concentração de L-cisteína e temperatura; b) Temperatura e volume de xileno; c) Concentração de L-cisteína e volume de xileno.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os dados da ANOVA estão mostrados no Apêndice V. No que concerne a recuperação de Hg^{2+} , todos os fatores e suas interações foram significativos. Além disso, 99% da variabilidade nas respostas foi explicada pelo modelo. Nas Fig. 38b e 38c, é possível ver o perfil de superfície de sela. Pontos de sela não oferecem uma região bem definida para escolha de valores ótimos. Entretanto, nas Figuras 38b e 38c, é possível observar que os pontos de maior volume de xileno (1,3 mL), coincidem com temperaturas próximas de 60°C (Fig 38b) e concentração superior de L-cisteína (1,3% m/v) (Fig. 38c). Dessa forma, essas superfícies auxiliam na escolha das condições ótimas.

Como pode ser observado na Tabela 24 e nas superfícies de resposta da Fig 38, ocorreu uma considerável variação de valores de recuperação de Hg^{2+} ao longo de todos os experimentos que, muitas vezes, não foram satisfatórias. A grande heterogeneidade e complexidade da matriz da amostra foi o principal fator desencadeador desta oscilação. Cabe ressaltar que adições e recuperações de Hg^{2+} foram anteriormente avaliadas e, na presença de maior quantidade de óleo na amostra, foram reportadas recuperações de Hg^{2+} mais baixas (Tabela 13 – Capítulo 2). Em detrimento da grande complexidade da matriz da amostra de borra oleosa, possivelmente, o Hg^{2+} adicionado interage fortemente com a matriz da amostra formando compostos que são difíceis de extrair com o método aplicado. Na Fig. 38a, a recuperação de Hg^{2+} foi superior em concentrações de L-cisteína superiores a 0,8% m/v e em temperaturas próximas a 55°C (aproximadamente 70% de recuperação). Por outro lado, para xileno, as regiões de maior recuperação apareceram

isoladamente, em volumes menores e maiores, caracterizando a superfície no formato de sela (Fig. 38b e 38c). É fundamental destacar que na condição na qual previamente se observou maior extração de Hg^{2+} , a recuperação de Hg^{2+} foi de aproximadamente 74% na amostra de borra oleosa avaliada. Como mencionado, as baixas recuperações de Hg^{2+} da matriz oleosa estão intimamente relacionadas a grande reatividade do Hg^{2+} adicionado, formando compostos estáveis com a matriz da amostra.

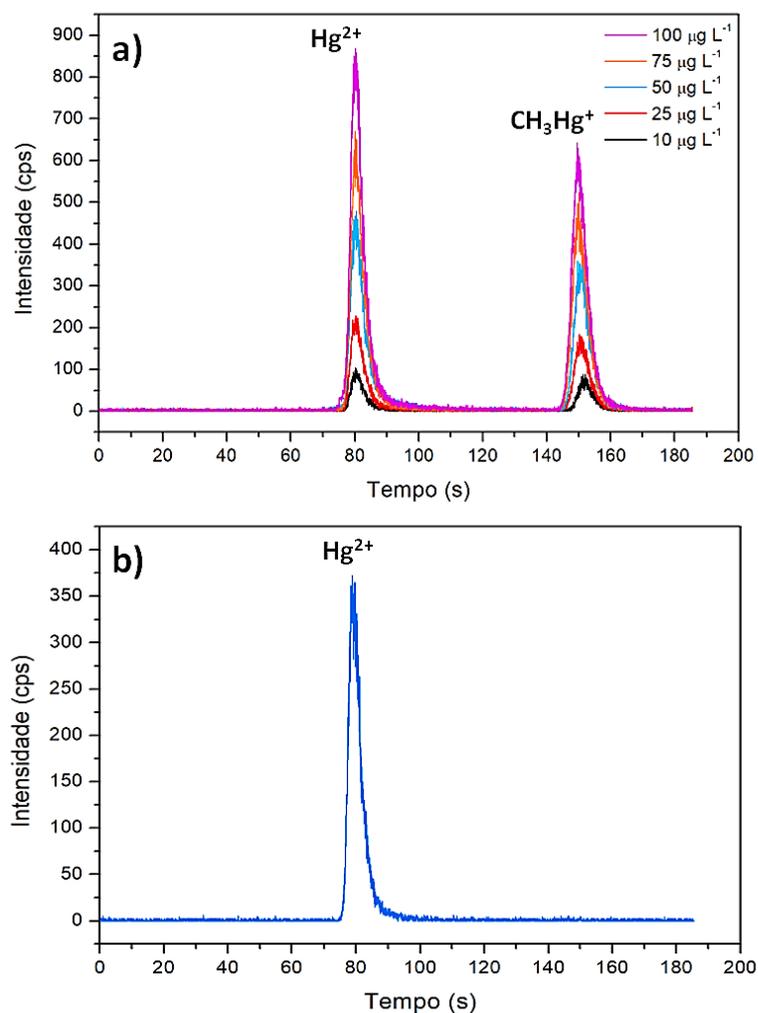
Após a avaliação da extração, conversão e recuperação nas condições experimentais para a otimização de um método de extração de Hg^{2+} , as seguintes condições foram selecionadas: 1,2 mL de xileno, 1,3% m/v de L-cisteína e temperatura de 60°C. Apesar de os valores de conversão e recuperação nestas condições serem razoáveis, nas superfícies inspecionadas as regiões que tenderam às máximas respostas, geralmente, corresponderam às condições experimentais mencionadas. A partir disso, o método otimizado foi empregado para a quantificação de Hg^{2+} das amostras de lodo e borra oleosa.

6.3.3 Análise de especiação química de Hg em amostras de borra oleosa

Após a otimização do método de extração assistida por ultrassom e aquecimento e da determinação das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS, treze amostras de lodo e borra oleosa de diferentes composições foram submetidas à extração e analisadas por HPLC-ICP-MS. Alíquotas contendo aproximadamente 0,1 g de amostra foram pesadas em frascos de polipropileno e adicionou-se 1,2 mL de xileno e 13,8 mL de solução de L-cisteína 1,3% m/v, submetendo-se ao aquecimento em banho na temperatura de 60 °C simultânea à aplicação de ultrassom por 30 min.

Os perfis cromatográficos das espécies de Hg obtidas para a construção da curva de calibração nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ estão mostrados na Figura 39.

Figura 39. Perfil dos sinais cromatográficos para **a)** Hg^{2+} e CH_3Hg^+ nas soluções de calibração (10 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$). **b)** Hg^{2+} em uma amostra de borra oleosa diluída num fator de 10.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Como pode ser visto na Figura 39a, em um tempo de análise de três min foi possível separar as espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ utilizando eluição isocrática. Já na Figura 39b está mostrado o perfil do sinal cromatográfico de Hg^{2+} extraído de uma amostra de borra oleosa diluída num fator de 10, cujo tempo de retenção manteve-se em 80 segundos. Cabe destacar que mesmo em tempos de análise superior não foi detectada outra espécie de Hg além de Hg^{2+} .

Os parâmetros de mérito gerados a partir da curva de calibração estão mostrados na Tabela 26. O limite de detecção foi calculado como sendo 3,3 vezes o desvio padrão de 10 medições do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração.

Tabela 26. Parâmetros das curvas de calibração das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ após medição por HPLC-ICP-MS (n=4).

Espécie	Faixa	Equação	R ²	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Hg^{2+}	10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	$y = -32,75407 + 44,28343 x$	0,9998	0,05	0,2
CH_3Hg^+	10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	$y = 20,12208 + 37,27788 x$	0,9993	0,06	0,2

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Para a quantificação nas amostras de lodo e borra oleosa provenientes da indústria do petróleo, amostras com diferentes proporções de água, óleo e sólidos, coletadas de camadas superficiais e mais profundas de tanques de armazenamento de resíduos, foram analisadas. Na Figura 40 estão mostradas as amostras submetidas à extração e análise de especiação por HPLC-ICP-MS. Há uma grande diferença na composição entre as amostras avaliadas. A amostra 1 foi coletada da camada superficial de tanques de armazenamento e apresenta majoritariamente uma fase oleosa e líquida, com baixo teor de sólidos. Essa amostra possui menor concentração de Hg total comparado às amostras 2 a 13, coletadas da camada inferior dos tanques. As amostras 2 e 3 também apresentam uma grande quantidade de óleo e menor quantidade de sólidos, entretanto, são bastante pastosas e apresentam uma alta concentração de Hg total. Nas amostras 4 a 11 a composição de óleo é menor, com maior concentração de sólidos na composição. E por fim, as amostras 12 e 13 possuem baixo teor de óleo e água e alto teor de sólidos.

Figura 40. Amostras de lodo e borra oleosa submetidas à extração e análise de especiação de Hg por HPLC-ICP-MS.



Fonte: elaborado pela autora (2019)

Os resultados das análises das amostras exibidas na Figura 40 estão mostrados na Tabela 27, com os respectivos valores de Hg total, medidos por CV-

AFS após digestão das amostras, e as concentrações de Hg^{2+} determinadas por HPLC-ICP-MS após o processo de extração. Complementarmente, testes de adição e recuperação das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ foram efetuados em todas as amostras para a verificação da exatidão do método. A conversão da espécie CH_3Hg^+ em Hg^{2+} não foi avaliada visto que esta espécie não foi extraída e detectada pela metodologia aplicada.

Tabela 27. Concentração de Hg total obtida por CV-AFS e extração de Hg^{2+} e recuperação das espécies Hg^{2+} e CH_3Hg^+ após extração com aquecimento e ultrassom e análise por HPLC-ICP-MS (n=2).

Amostra	Hg total (mg kg^{-1}) ^a	Extração ^b				
		Hg ²⁺ (mg kg^{-1})	Hg ²⁺ (%)	RSD (%)	Recuperação Hg ²⁺ (%) ^c	Recuperação CH ₃ Hg ⁺ (%) ^d
1	12,0 ± 0,3	5,5 ± 0,1	45	1,8	70	96
2	143,6 ± 2,2	111,1 ± 5,9	77	5,3	86	92
3	169,3 ± 11,2	126,3 ± 2,6	75	2,1	83	93
4	870,4 ± 2,3	417,1 ± 8,0	48	1,9	74	88
5	585,0 ± 14,2	286,1 ± 16,2	49	5,7	74	101
6	137,0 ± 1,7	50,4 ± 1,0	37	2,0	92	89
7	324,0 ± 2,8	98,2 ± 5,9	30	6,0	77	89
8	274,2 ± 2,3	83,8 ± 4,9	31	5,8	71	87
9	217,6 ± 5,8	110,0 ± 1,5	51	1,4	79	88
10	337,7 ± 11,4	181,5 ± 4,4	54	2,4	82	88
11	216,9 ± 6,6	111,7 ± 5,7	51	5,1	73	95
12	97,4 ± 1,8	35,8 ± 0,2	37	0,6	70	80
13	444,3 ± 2,5	225,4 ± 10,7	51	4,7	97	91

Fonte: elaborado pela autora (2019)

^a Hg total determinado após digestão e análise por CV-AFS.

^b Extração assistida por ultrassom e aquecimento na temperatura de 60°C por 30 min.

^c Amostras enriquecidas com 300 mg kg^{-1} de Hg^{2+} .

^d Amostras enriquecidas com 200,0 mg kg^{-1} de CH_3Hg^+ .

Como pode ser visto na Tabela 27, a concentração de Hg^{2+} variou amplamente nas amostras analisadas, com valores entre 30 e 77% em relação ao Hg total, dependendo da composição da amostra. Percebe-se que a maior extração foi alcançada nas amostras 2 e 3. É relatado, na literatura, que grande parte do Hg está ligado à fase óleo nessas matrizes tornando difícil a sua recuperação em processos de preparo de amostras (GAULIER et al, 2015), (WILHELM; LIANG;

KIRCHGESSNER, 2006). Isso está condizente com estudos prévios (Tabela 13) nos quais observou-se que em matrizes com maior teor de óleo as recuperações de Hg^{2+} foram reduzidas utilizando solução aquosa na extração de espécies de Hg. Sugere-se que com o uso de solvente orgânico (xileno) como cossolvente de extração, foi possível maximizar a extração e recuperação das espécies nas amostras com maior teor oleoso (amostras 1, 2 e 3) devido à solubilização da matriz oleosa e aumento do contato da matriz com a solução extratora aquosa composta por L-cisteína 1,3% m/v. Visualmente, na Figura 40, a amostra 1 tem alto teor de óleo e água, enquanto as amostras 2 e 3 apresentam também alto teor de óleo mas baixo teor de água e sólidos, sendo mais pastosas. Nas demais amostras (4 a 13) o teor de óleo e água é reduzido e o teor de sólidos aumenta. Cabe ressaltar que as amostras avaliadas nos estudos de fracionamento (Tabela 13) não são as mesmas amostras avaliadas no estudo de especiação química (Figura 40).

Através dos resultados apresentados na Tabela 27, verifica-se que o método de extração forneceu extração de Hg^{2+} da ordem de 30 a 77% do Hg total das amostras. Pode-se observar que a eficácia de extração de Hg^{2+} , varia amplamente, e está relacionada com a grande heterogeneidade da composição entre as amostras avaliadas (Figura 40). Entretanto, a metodologia aplicada fornece informações apenas das espécies iônicas de Hg (Hg^{2+} e CH_3Hg^+) em amostras de borra oleosa. Esses resultados complementam os dados obtidos por Avellan *et al.* (2018) referentes à análise de especiação de Hg especificamente na fase sólida de amostras de sedimentos de petróleo de tanques de armazenamento, utilizando espectroscopia de absorção de raios X. Nesse estudo, os autores mostraram que grande parte do Hg total presente nesses resíduos está associado aos sólidos apresentando-se na forma de Hg particulado, mais especificamente (β -HgS). Esses estudos estão em concordância com dados obtidos para amostras de petróleo cru, a nível de Hg particulado na forma de HgS (GAULIER *et al.* 2015); (GAJDOSECHOVA *et al.* 2016). Assim, é prudente afirmar que HgS particulado está presente nas amostras de borra oleosa, e que a elevada concentração de enxofre presente nestas amostras favorece a formação destas espécies (AVELLAN *et al.* 2018). Nesse sentido, a solução de L-cisteína tem maior capacidade de extrair espécies de Hg^{2+} lábeis do que espécies de Hg ligadas fortemente à matéria orgânica e HgS quimicamente estáveis (BOLLEN; BIESTER, 2011).

As recuperações razoáveis alcançadas neste estudo, principalmente da espécie Hg^{2+} e a variabilidade nas concentrações de Hg nas amostras analisadas (RSD = 0,6 a 6,0%) (Tabela 27), são atribuídas à heterogeneidade e complexidade da amostra.

As recuperações da espécie CH_3Hg^+ neste estudo variaram de 80 a 101% enquanto as recuperações para Hg^{2+} foram de 70 a 97% (Tabela 27). É relevante destacar que as recuperações de CH_3Hg^+ são superiores às recuperações de Hg^{2+} . Esse comportamento foi observado também para os estudos de fracionamento de Hg no Capítulo 2 (Tabela 13), cujas recuperações de CH_3Hg^+ variaram de 89 a 106%, enquanto as recuperações de Hg^{2+} variaram de 49 a 102%. Quando o Hg^{2+} é adicionado na forma líquida às amostras, essa espécie reage mais facilmente com os componentes da matriz do que a espécie CH_3Hg^+ adicionada. O Hg^{2+} forma compostos mais difíceis de serem extraídos, enquanto o CH_3Hg^+ adicionado, mostrou-se mais facilmente recuperável da matriz da amostra. Apesar disso, a solução de L-cisteína na concentração de 1,3% m/v mostrou-se adequada para a extração e recuperação das espécies de Hg dessas amostras, combinada com uma análise de até 3 min das espécies de Hg, apesar de apenas a espécie Hg^{2+} ter sido detectada.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conjuntamente com resultados da literatura relacionados à especiação de Hg tanto na fase óleo como na fase sólida de amostras de petróleo cru ou de sedimentos de tanque de armazenamento (AVELLAN *et al.* 2018; GAJDOSECHOVA *et al.* 2016; GAULIER *et al.* 2015; YUN *et al.*, 2013), é possível adquirir conhecimento suficiente sobre a composição destes produtos, a fim de encontrar estratégias para o gerenciamento junto a cadeia de processos do petróleo.

6.3.4 Avaliação da exatidão do método de extração das espécies de Hg

Para verificar a exatidão do método de extração e quantificação, além dos testes de adição e recuperação das espécies de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ , cujos resultados estão mostrados na Tabela 27, três destas amostras, as quais apresentaram matrizes com diferentes composições de água, óleo e sólidos, foram submetidas a testes de adição e recuperação em três diferentes níveis de concentrações de Hg^{2+} (50, 100 e 300 mg kg^{-1}).

Adicionalmente, para a comparação com uma metodologia oficial, o método EPA 3200, recomendado para amostras sólidas como sedimentos e solos foi empregado. Este método fornece menor conversão de espécies aliado à recuperação satisfatória das espécies de Hg (RAHMAN; KINGSTON, 2004). Outro método descrito pela EPA 3200, baseado em extração assistida por micro-ondas, foi empregue por Rahman *et al.* (2010) para análise de especiação de Hg em amostras de petróleo, alcançando baixas conversões das espécies com o método utilizado. Entretanto, por falta de instrumentação adequada e para compatibilidade com o método adotado, o método utilizando extração assistida com ultrassom foi empregado.

Na Tabela 28 estão mostradas as concentrações adicionadas (50, 100 e 300 mg kg⁻¹), as concentrações obtidas e o percentual de recuperação de Hg²⁺ nessas amostras.

Tabela 28. Testes de adição e recuperação da espécie Hg²⁺ nas amostras de borra oleosa nos níveis de 50, 100 e 300 mg kg⁻¹ (n=2).

Amostra	Enriquecimento Hg ²⁺ (mg kg ⁻¹)	Hg ²⁺ determinado (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%)
1	0	5,5 ± 0,1	
	50	50,9 ± 2,0	91
	100	76,3 ± 2,6	71
	300	216,3 ± 16,2	70
6	0	50,4 ± 1,0	
	50	91,4 ± 2,2	82
	100	143,4 ± 4,3	93
	300	325,3 ± 10,6	92
13	0	225,4 ± 10,7	
	50	271,0 ± 9,2	91
	100	318,1 ± 7,6	93
	300	516,9 ± 13,1	97

Fonte: elaborado pela autora (2019)

Como pode ser observado na Tabela 28, para a amostra 1, recuperações entre 70 e 91% foram obtidas. Essa amostra apresenta matriz mais oleosa e líquida, que tende a agregar mais o Hg²⁺, tornando difícil a recuperação desta espécie. Nesse

sentido, o uso de xileno como solvente favoreceu não somente a extração como recuperação de Hg^{2+} da matriz da amostra, apesar da recuperação de 70% de Hg^{2+} ainda ser consideravelmente baixa. Em relação às amostras 6 e 13, as quais apresentam uma menor concentração de óleo na composição as recuperações variaram de 82 a 93% e 91 a 97%, respectivamente. Pode-se constatar, a partir das recuperações obtidas na Tabela 28, que o método de extração utilizado forneceu recuperações satisfatórias das espécies de Hg^{2+} nessas amostras, embora não possamos afirmar que o método seja eficaz para a extração das espécies de Hg pois não há conhecimento de quais são as espécies efetivamente presentes nas amostras analisadas por HPLC-ICP-MS.

Para comparação dos resultados, o método da US EPA 3200, indicado para amostras sólidas, foi aplicado. É importante destacar que não há método oficial para a determinação de espécies de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo, entretanto, o método 3200, apesar de ser melhor aplicável a amostras sólidas como solos e sedimentos, foi o método que mais se aproximou desta aplicação. Nesse caso, duas amostras, mais sólidas e com baixo teor de óleo (12 e 13) foram escolhidas para serem submetidas ao processo de extração do método 3200. Após a extração, as amostras foram diluídas e analisadas por HPLC-ICP-MS conforme otimizado.

Na Tabela 29 estão mostradas as concentrações de Hg^{2+} relativas à extração com o método otimizado neste trabalho e com o método EPA 3200.

Tabela 29. Concentrações de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) obtidas após extração com o método otimizado neste trabalho e com o método de extração EPA 3200 ($n=2$).

Amostra	Hg total (mg kg^{-1})	Extração*	Extração (EPA 3200)
		Hg^{2+} (mg kg^{-1})	Hg^{2+} (mg kg^{-1})
12	$97,4 \pm 1,8$	$35,8 \pm 0,2$	$9,75 \pm 0,13$
13	$444,3 \pm 2,5$	$225,4 \pm 10,7$	$5,17 \pm 0,46$

Fonte: elaborado pela autora (2019)

* Extração assistida por ultrassom e aquecimento 60°C por 30 min.

Como pode ser visto na Tabela 29, concentrações de Hg^{2+} obtidas com a aplicação do método EPA 3200 foram significativamente inferiores às determinadas com o método otimizado neste trabalho. É possível que o método EPA 3200 tenha maior eficiência na extração de CH_3Hg^+ (RAHMAN; KINGSTON, 2004), indetectável nestas amostras. Sugere-se que para a extração de espécies de Hg, especialmente

Hg^{2+} , soluções ácidas muito diluídas não sejam capazes de extrair estas espécies de matrizes mais complexas (WILHELM; LIANG; KIRCHGESSNER, 2006). Esses dados concordam com os estudos efetuados neste trabalho referentes ao uso de solução diluída de HCl para extração das espécies de Hg nas amostras de borra oleosa. Como observado nos estudos de fracionamento mostrados no Capítulo 2, a extração de Hg^{2+} utilizando HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ resultou na extração de apenas 3% em relação ao total, comparado à extração de 60% desta espécie quando utilizando HNO_3 $8,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Adicionalmente, um método EPA 3200 adaptado para amostras oleosas foi também aplicado. Uma amostra foi solubilizada em xileno e submetida à extração com ultrassom e aquecimento a 60°C por 15 min utilizando solução de HCl 2,0% v/v + etanol 10% m/v. Entretanto, aplicando-se este método, não foi possível extrair Hg^{2+} em uma concentração satisfatória para comparação com o método otimizado neste trabalho. Dessa forma, o método comparativo aplicado (EPA 3200) não foi suficiente para servir como parâmetro de comparação com o método em estudo pois conferiu extração de concentrações consideravelmente baixas de Hg^{2+} , visto que este método não é proposto para amostras de borra oleosa.

6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A otimização das condições de separação de Hg^{2+} e CH_3Hg^+ permitiram a separação das espécies em até 3 min por HPLC, garantindo intensidade satisfatória das espécies, resolução e seletividade dos sinais cromatográficos. Aliado a isso, a otimização da vazão do gás nebulizador e da potência de radiofrequência do ICP-MS contribuíram para a detecção destas espécies satisfatoriamente. Em relação à extração das espécies de Hg das amostras de borra oleosa, a solução de L-cisteína mostrou-se mais eficaz para a extração das espécies do que as demais soluções avaliadas. O uso de xileno como co-solvente na extração melhorou a extração de Hg da amostra oleosa pelo aumento do contato com a solução extratora. A extração de Hg^{2+} variou consideravelmente entre as amostras avaliadas, dependendo da composição da amostra em relação a fase oleosa e sólida, enquanto CH_3Hg^+ não foi extraído com o método utilizado. Apesar de o método oficial (3200) não garantir satisfatória extração das espécies de Hg^{2+} da amostra, para comparação dos resultados, os testes de adição e recuperação foram satisfatórios para avaliar a exatidão do método, considerando a complexidade da matriz da amostra.

7 CONCLUSÕES FINAIS

Métodos simples, rápidos e de custo relativamente baixo foram desenvolvidos neste trabalho para fracionamento e análise de especiação de Hg em resíduos oleosos de petróleo. Inicialmente, estudos preliminares com extração assistida por micro-ondas mostraram que o uso de KMnO_4 nas soluções analisadas por CV-AFS foram primordiais para garantir aumento da intensidade na detecção de Hg^{2+} . Para estudos de otimização das soluções de HNO_3 e HCl com aquecimento convectivo, melhores respostas sobre a extração de Hg^{2+} e recuperações das espécies foram obtidas nas condições mais drásticas. Nesse caso, HNO_3 foi mais eficiente para a extração das espécies de Hg das amostras de borra oleosa. O emprego de abordagem multivariada mostrou-se interessante para a otimização das condições experimentais e através do uso de função desejabilidade foi possível obter uma condição de compromisso para a extração de frações de Hg considerando conversão de CH_3Hg^+ negligenciável, para posterior detecção por CV-AFS. O método desenvolvido permitiu detectar baixas concentrações de Hg^{2+} , com alta sensibilidade e precisão, comparado ao uso de métodos como HPLC-ICP-MS.

Para a análise de especiação química de Hg em amostras de resíduos oleosos de petróleo, um método rápido foi otimizado empregando banho de ultrassom e aquecimento. A solução de L-cisteína foi a mais eficiente para a extração das espécies de Hg dentre as soluções avaliadas. O uso de xileno como co-solvente aumentou a extração de Hg da amostra oleosa pela solubilização e aumento do contato com a solução extratora. A extração de Hg^{2+} variou consideravelmente entre as amostras avaliadas, dependendo da composição da amostra em relação a fase oleosa e sólida, enquanto CH_3Hg^+ não foi extraído com o método utilizado. A separação das espécies foi alcançada em até 3 min, garantindo satisfatória resolução dos sinais cromatográficos obtidos pela separação no cromatógrafo a líquido e detecção por ICP-MS. Esse método permite a análise de especiação de Hg por HPLC-ICP-MS, considerando espécies iônicas (Hg^{2+} e CH_3Hg^+), porém, mais estudos devem ser efetuados no que concerne a detecção de espécies de Hg metálico e particulado nestas amostras, permitindo uma avaliação mais abrangente das espécies de Hg presentes nestas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR ISO 10004 (2004a) Resíduos sólidos**: Classificação. Rio de Janeiro, Brasil: ABNT.
- AL-FUTAISI, A. *et al.* Assessment of alternative management techniques of tank bottom petroleum sludge in Oman. **J. Hazard. Mater.**, 141, 557–564, 2007.
- ALI, M. F.; ABBAS, S. A review of methods for the demetallization of residual fuel oils. **Fuel Process. Technol.**, 87, 573–584, 2006.
- ALMEIDA, I. L. S. *et al.* Suitable extraction of soils and sediments for mercury species and determination combined with the cold vapor generation atomic absorption spectrometry technique. **Microchem. J.**, 124, 326–330, 2016.
- ALONSO, E. V. *et al.* Mercury speciation in sea food by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction. **Talanta**, 77, 53–59, 2008.
- AVELLAN, A. *et al.* Speciation of mercury in selected areas of the petroleum value chain. **Environ. Sci. Technol.**, 52, 1655–1664, 2018.
- BALDRIAN, P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 63, 560–563, 2004.
- BATISTA, B. L. *et al.* Mercury speciation in seafood samples by LC–ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. **Food Chem.**, 126, 2000–2004, 2011.
- BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, 76, 965–977, 2008.
- BHATTACHARYYA, J. K.; SHEKDAR, A. V. Treatment and disposal of refinery sludges: Indian scenario. **Waste Manage. Res.**, 21, 249–261, 2003.
- BLOOM, N. S. Analysis and stability of mercury speciation in petroleum hydrocarbons. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 366, 438–443, 2000.
- BOJES, H. K.; POPE, P. G. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. **Regul. Toxicol. Pharm.**, 47, 288–295, 2007.
- BOLLEN, A.; BIESTER, H. Mercury extraction from contaminated soils by L-cysteine: species dependency and transformation processes. **Water Air Soil Pollut.**, 219, 175–189, 2011.

BRASIL (2010a). **Lei 12.305, de 02 de agosto de 2010** - institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em: 30 jul. 2017.

CAI, C. *et al.* Thermochemical sulphate reduction and the generation of hydrogen sulphide and thiols (mercaptans) in Triassic carbonate reservoirs from the Sichuan Basin, China. **Chem. Geol.**, 202, 39–57, 2003.

CANÁRIO, J. *et al.* Mercury and methylmercury in the Atlantic sector of the Southern Ocean. **Deep-Sea Res. II**, 138, 52–62, 2017.

CAPELLO, J. L.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Room temperature sonolysis-based advanced oxidation process for degradation of organomercurials: application to determination of inorganic and total mercury in waters by flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry. **Anal. Chem.**, 72, 4979–4984, 2000.

CARRASCO, L.; DÍEZ, S.; BAYONA, J. M. Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, 1216, 8828–8834, 2009.

CATTANI, I. *et al.* Characterization of mercury species in soils by HPLC–ICP-MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films. **Talanta**, 74, 1520–1526, 2008.

CERQUEIRA, V. S. *et al.* Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, 95, 338-345, 2014.

CHEN, G.; LAI, B.; MAO, X. Reflux open-vessel digestion system can overcome volatilization loss in mercury speciation analysis. **Talanta**, 191, 209–215, 2019.

CHENG, H. *et al.* Online anion exchange column preconcentration and high performance liquid chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for mercury speciation analysis. **Anal. Chim. Acta**, 828, 9–16, 2014.

CHIOU, C. S.; JIANG, S. J.; DANADURAI, K. S. K. Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography–vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochim. Acta, part B**, 56, 1133-1142, 2001.

CONAMA. **Resolução nº 313, de 29 de outubro de 2002**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=335>>. Acesso em: 14/01/2019.

COULIBALY, M. *et al.* Some aspects of speciation and reactivity of mercury in various matrices. **C. R. Chim.**, 19, 832-840, 2016.

DA SILVA, L. J.; ALVES, F. C.; DE FRANCA, F. P. A review of the technological solutions for the treatment of oily sludges from petroleum refineries. **Waste Manag. Res.**, 30, 1016-1030, 2012.

DENMARK, L. S. *et al.* Removal of inorganic mercury by selective extraction and coprecipitation for determination of methylmercury in mercury contaminated soils by chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS), **Anal. Chim. Acta**, **1041**, 68-77, 2018.

EITH, C. *et al.* **Práticas em cromatografia de íons**: Uma introdução. 2ª edição. São Paulo: Metrohm, 2006, 142p.

FAKHRI, A. Investigation of mercury (II) adsorption from aqueous solution onto copper oxide nanoparticles: optimization using response surface methodology. **Process Saf. Environ.**, **93**, 1–8, 2015.

FAO, **Codex Alimentarius Commission: 02-06 July 2018**. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/1143286/icode/>>. Acesso em: 07 de maio de 2019.

FELDMANN, J. What can the different current detection methods offer for element speciation?. **Trends Anal. Chem.**, **24**, 228-242, 2005.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. **Appl. Spectrosc. Rev.**, **42**, 475-491, 2007.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices: a review. **Microchem. J.**, **121**, 227–236, 2015.

FINSTER, M. E. *et al.* Mercury-impacted scrap metal: source and nature of the mercury. **J. Environ. Manage.**, **161**, 303-308, 2015.

GAJDOSECHOVA, Z. *et al.* Hg speciation in petroleum hydrocarbons with emphasis on the reactivity of Hg particles. **Energy Fuels**, **30**, 130–137, 2016.

GAO, E. *et al.* Speciation of mercury in coal using HPLC–CVAFS system: comparison of different extraction methods. **J. Anal. At. Spectrom.**, **23**, 1397–1400, 2008.

GAO, E.; LIU, J. Rapid determination of mercury species in sewage sludge by high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic-fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction. **Anal. Sci.**, **27**, 637-641, 2011.

GAULIER, F. *et al.* Mercury speciation in liquid petroleum products: Comparison between on-site approach and lab measurement using size exclusion chromatography with high resolution inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-HR MS). **Fuel Process. Technol.**, **131**, 254–261, 2015.

HEJAZI, R. F.; HUSAIN, T.; KHAN, F. I. Landfarming operation of oily sludge in arid region: human health risk assessment. **J. Hazard. Mater.**, **99**, 287–302, 2003.

HU, G.; LI, J.; ZENG, G. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: a review. **J. Hazard. Mater.**, 261, 470–490, 2013.

HUANG, Q. *et al.* Characterization of emulsified water in petroleum sludge. **Fuel**, 118, 214–219, 2014.

IBÁÑEZ-PALOMINO, C.; LOPEZ-SANCHEZ, J. F.; SAHUQUILLO, A. Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: Do they meet user needs?: a review. **Anal. Chim. Acta**, 720, 9–15, 2012.

ISSARO, N.; ABI-GHANEM, C.; BERMOND, A. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: a review of the chemical reagents used for mercury extraction. **Anal. Chim. Acta**, 631, 1–12, 2009.

IUPAC. **Gold book**. Disponível em:
<<https://goldbook.iupac.org/html/F/FT06825.html>>. Acesso em: 29 de maio de 2019.

JAGTAP, R. *et al.* Measurement of methyl mercury (I) and mercury (II) in fish tissues and sediments by HPLC-ICPMS and HPLC-HGAAS. **Talanta**, 85, 49–55, 2011.

JAGTAP, R.; MAHER W. Measurement of mercury species in sediments and soils by HPLC-ICPMS. **Microchem. J.**, 121, 65–98, 2015.

JIMÉNEZ-MORENO, M. *et al.* Fast method for the simultaneous determination of monomethylmercury and inorganic mercury in rice and aquatic plants. **Talanta**, 176, 102–107, 2018.

JOHNSON, O. A.; MADZLAN, N.; KAMARUDDIN, I. Encapsulation of petroleum sludge in building blocks. **Constr. Build. Mater.**, 78, 281–288, 2015.

KHALIL, N. M.; ALGAMAL, Y.; SALEEM, Q. M. Exploitation of petroleum waste sludge with local bauxite raw material for producing high-quality refractory ceramics. **Ceram. Int.**, 44, 18516–18527, 2018.

KRIIPSALU, M.; MARQUES, M.; MAASTIK, A. Characterization of oily sludge from a wastewater treatment plant flocculation-flotation unit in a petroleum refinery and its treatment implications. **J. Mater. Cycles Waste**, 10, 79–86, 2008.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. ed. São Paulo: SBQ, 2016, 572p.

LEERMAKERS, M. *et al.* Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. **Trends Anal. Chem.**, 24, 383–393, 2005.

LEOPOLD, K.; FOULKES, M.; WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters: a review. **Anal. Chim. Acta**, 663, 127–138, 2010.

LIANG, L.; HORVAT, M.; DANILCHIK, P. A novel analytical method for determination of picogram levels of total mercury in gasoline and other petroleum based products. **Sci. Total Environ.**, 187, 57-64, 1996.

LINDQVIST, O. *et al.* Mercury in the swedish environment: recent research on causes, consequences and corrective methods. **Water Air Soil Pollut.**, 55, xi-261, 1991.

LIN, L.; CHANG, L.; JIANG, S. Speciation analysis of mercury in cereals by liquid chromatography chemical vapor generation inductively coupled plasma-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 56, 6868–6872, 2008.

LING, C. C.; ISA, M. H. Bioremediation of oil sludge contaminated soil by co-composting with sewage sludge. **J. Sci. Ind. Res.**, 65, 364–369, 2006.

LIU, H. *et al.* Speciation analysis of trace mercury in sea cucumber species of *apostichopus japonicus* using high-performance liquid chromatography conjunction with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Biol. Trace Elem. Res.**, 186, 554–561, 2018.

MARGETINOVA, J.; HOUSEROVA-PELCOVA, P.; KUBAN, V. Speciation analysis of Mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction. **Anal. Chim. Acta**, 615, 115–123, 2008.

MARIN, J. A. *et al.* Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. **Biodegradation**, 17, 251–261, 2006.

MARYUTINA, T. A.; TIMERBAEV, A. R. Metal speciation analysis of petroleum: myth or reality?. **Anal. Chim. Acta**, 991, 1-8, 2017.

MAZLOVA, E. A.; MESHCHERYAKOV, S. V. Ecology ecological characteristics of oil sludges. **Chem. Tech. Fuels Oils**, 35, 49-53, 1999.

MELLO, P. A. *et al.* Sample preparation methods for subsequent determination of metals and non-metals in crude oil: a review. **Anal. Chim. Acta**, 746, 15– 36, 2012.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S., JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Quím. Nova**, 23, 487-495, 2000.

MICHALKE, B. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. **Ecotox. Environ. Safe.**, 56, 122–139, 2003.

MOJAMMAL, A. H. M. *et al.* Mass balance and behavior of mercury in oil refinery facilities. **Atmos. Pollut. Res.**, 10, 145–151, 2019.

MOUSAVI, A. Are thiolate anions the only natural organic matter ligands for which mercury(II) has an exceptionally high affinity in aquatic ecosystems?. **Rev. Chim.**, 66, 774-777, 2015.

NEVADO, J. J. B. *et al.* Determination of monomethylmercury in low- and high-polluted sediments by microwave extraction and gas chromatography with atomic fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta**, 608, 30–37, 2008.

NIXON, D. E.; MUSSMANN, G. V.; MOYER, T. P. Inorganic, organic, and total mercury in blood and urine: cold vapor analysis with automated flow injection sample delivery. **J. Anal. Toxicol.**, 20, 17–22, 1996.

PALMISANO, F., ZAMBONIN, G.; CARDELLICCHIO, N. Speciation and simultaneous determination of mercury species in dolphin liver by liquid chromatography with online cold vapor atomic absorption spectrometry. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 346, 648–652, 1993.

PARK, M. *et al.* Estimation of mercury speciation in soil standard reference materials with different extraction methods by ion chromatography coupled with ICP-MS, **Environ. Geochem. Health**, 33, 49–56, 2011.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento Fatorial em Química**: maximizando a obtenção de resultados. 1. ed. São Paulo: Editora da Universidade Federal de São Carlos, 2017, 88p.

PONTES, F. V. M. *et al.* Investigation of the Grignard reaction and experimental conditions for the determination of inorganic mercury and methylmercury in crude oils by GC-ICPMS. **Fuel**, 116, 421–426, 2014.

POPP, M.; HANNA, S.; KOELLENSPERGER, G. Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry: a review. **Anal. Chim. Acta**, 668, 114–129, 2010.

QUEVAUVILLER, P.; MAIER, E. A.; GRIEPNK, B. **Quality control of results of speciation analysis**. Em: Caroli, S. Element Speciation in Bioinorganic Chemistry. New York: Wiley, 1996, 195–222.

RAHMAN, G. M. M.; KINGSTON, H. M. Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate extraction methods for determining mercury speciation in soils and sediments. **Anal. Chem.**, 76, 3548-3555, 2004.

RAHMAN, G. M. M.; KINGSTON, H. M. S. Development of a microwave-assisted extraction method and isotopic validation of mercury species in soils and sediments. **J. Anal. At. Spectrom.**, 20, 183–191, 2005.

RAHMAN, G. M. M. *et al.* Speciation of mercury in crude oil using speciated isotope dilution mass spectrometry. **Spectroscopy**, 25, 36–41, 2010.

RAI, R.; MAHER, W.; KIRKOWA, F. Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, **17**, 1560-1563, 2002.

RAVICHANDRAN, M. Interactions between mercury and dissolved organic matter: a review. **Chemosphere**, **55**, 319–331, 2004.

REYES, L. H.; RAHMAN, G. M. M.; KINGSTON, H. M. S. Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. **Anal. Chim. Acta**, **631**, 121–128, 2009.

REIS, A. T. *et al.* Extraction of available and labile fractions of mercury from contaminated soils: the role of operational parameters. **Geoderma**, **259–260**, 213–223, 2015.

RENNEBERG, A. J., DUDAS, M. J. Transformations of elemental mercury to inorganic and organic forms in mercury and hydrocarbon co-contaminated soils. **Chemosphere**, **45**, 1103-1109, 2001.

RITGER, A. L.; CURTIS, A. N.; CHEN, C. Y. Bioaccumulation of mercury and other metal contaminants in invasive lionfish (*Pterois volitans/miles*) from Curaçao. **Mar. Pollut. Bull.**, **131**, 38–44, 2018.

SEGADE, S. R.; BENDICHO, C. Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection–cold vapor technique. **J. Anal. At. Spectrom.**, **14**, 263-268, 1999.

SEGADE, S. R.; TYSON, J. F. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent. **Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.**, **58**, 797-807, 2003.

SHADE, C. W.; HUDSON, R. J. M. Determination of MeHg in environmental sample matrices using Hg–thiourea complex ion chromatography with on-line cold vapor generation and atomic fluorescence spectrometric detection. **Environ. Sci. Technol.**, **39**, 4974–4982, 2005.

SHI, J. B. *et al.* The speciation and bioavailability of mercury in sediments of Haihe River, China. **Environ. Int.**, **31**, 357–365, 2005.

SHIE, J. L. *et al.* Oxidative thermal treatment of oil sludge at low heating rates. **Energy Fuels**, **18**, 1272–1281, 2004.

SILVA, D. S. *et al.* Doehlert design in the optimization of ultrasound assisted dissolution of fish fillet samples with tetramethyl ammonium hydroxide for metals determination using FAAS. **Food Chem.**, **273**, 71–76, 2019.

SOUZA, S. S. *et al.* A fast sample preparation procedure for mercury speciation in hair samples by high-performance liquid chromatography coupled to ICP-MS. **J. Anal. At. Spectrom.**, 25, 79–83, 2010.

SOUZA, S. S.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA, JR. F. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography–cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, 761, 11– 17, 2013.

SUTTON, K.; SUTTON, R. M. C.; CARUSO, J. A. Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, 789, 85–126, 1997.

SYSALOVA J. *et al.* Mercury species in formerly contaminated soils and released soil gases. **Sci. Total Environ.**, 584–585, 1032–1039, 2017.

TAO, G.; WILLIE, S. N.; STURGEON, R. E. Determination of inorganic mercury in biological tissues by cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium solubilization. **J. Anal. At. Spectrom.**, 14, 1929-1931, 1999.

TORRES, D. P.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Simple mercury fractionation in biological samples by CV AAS following microwave-assisted acid digestion or TMAH pre-treatment. **Microchem. J.**, 93, 206–210, 2009.

TSENG, C. M. *et al.* Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. **J. Anal. At. Spectrom.**, 12, 743–750, 1997.

TUTSCHKU, S.; SCHANTZ, M. M.; WISE, S. A. Determination of methylmercury and butyltin compounds in marine biota and sediments using microwave-assisted acid extraction, solid-phase microextraction, and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometric detection. **Anal. Chem.**, 74, 4694–4701, 2002.

UBANI, O.; ATAGANA, H. I.; THANTSHA, M. S. Biological degradation of oil sludge: a review of the current state of development, **Afr. J. Biotechnol.**, 12, 6544-6567, 2013.

UBILLÚS, F. *et al.* Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. **Food Chem.**, 71, 529-533, 2000.

USEPA. **Hazardous waste listings:** a user-friendly reference document (Draft, March 2008). Disponível em:

<<http://www.epa.gov/osw/hazard/wastetypes/pdfs/listingref.pdf>>,

<<https://www.epa.gov/hwgenerators/steps-complying-regulations-hazardous-waste>>.

Acesso em: 14 janeiro 2019.

- UZUN, Y.; ŞAHAN, T. Optimization with response surface methodology of biosorption conditions of Hg(II) ions from aqueous media by *Polyporus Squamosus* fungi as a new biosorbent. **Arch. Environ. Prot.**, 43, 37–43, 2017.
- VAZQUEZ, M. J. *et al.* Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments, **Anal. Chem.**, 69, 221-225, 1997.
- WANG, Y. *et al.* Analysis of oil content in drying petroleum sludge of tank bottom. **Int. J. Hydrog. Energy**, 42, 18681-18684, 2017.
- WEBB, J. *et al.* Mercury concentrations in urine of a merindian populations near oil fields in the peruvian and ecuadorian amazon. **Environ. Res.**, 151, 344–350, 2016.
- WHO. World Health Organization. **Mercury and health**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>>. Acesso em: 07 de maio de 2019.
- WILHELM, S. M. Avoiding exposure to mercury during inspection and maintenance operations in oil and gas processing. **Process Saf. Progr.**, 18, 178-188, 1999.
- WILHELM, S. M.; BLOOM, N. Mercury in petroleum. **Fuel Process. Technol.**, 63, 1–27, 2000.
- WILHELM, S. M.; LIANG, L.; KIRCHGESSNER, D. Identification and properties of mercury species in crude oil. **Energy Fuels**, 2006, 20, 180-186.
- XU, N. *et al.* Effects of ultrasound on oily sludge deoiling. **J. Hazard. Mater.**, 171, 914–917, 2009.
- YAO, C. H. *et al.* Speciation of mercury in fish oils using liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchem. J.**, 133, 556–560, 2017.
- YUN, Z. *et al.* Evaluation of different extraction procedures for determination of organic Mercury species in petroleum by high performance liquid chromatography coupled with cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Talanta**, 106, 60-65, 2013.
- ZAHIR, F. *et al.* Low dose mercury toxicity and human health. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 20, 351-360, 2005.
- ZHANG, Y.; MIRÓ, M.; KOLEV, S. D. A novel on-line organic mercury digestion method combined with atomic fluorescence spectrometry for automatic mercury speciation. **Talanta**, 189, 220–224, 2018.

APÊNDICES

Apêndice A – Tabela ANOVA para a extração de Hg^{2+} (mg kg^{-1}) da amostra de borra oleosa após estudos da massa de amostra e volume de extrator com uso de matriz Doehlert aplicando aquecimento convectivo à 80 °C por 10 min e 10 mL de HNO_3 4,0 mol L^{-1} . $R^2 = 0,9333$.

Fator	SQ	GI	MQ	F	p	
Volume (L)	15,3385	1	15,3385	146,7452	0,000006	Significativo
Volume (Q)	0,6644	1	0,6644	6,3567	0,039738	Significativo
Massa amostra (L)	8,2055	1	8,20552	78,5030	0,000047	Significativo
Massa amostra (Q)	1,3244	1	1,3244	12,6710	0,009224	Significativo
Volume x Massa	0,5289	1	0,5289	5,0603	0,059241	
Falta de ajuste	1,0865	1	1,0865	10,3951	0,014569	Significativo
Erro puro	0,73167	7	0,10452			
SQ total	27,26031	13				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice B – Tabela ANOVA para a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} (%) na solução padrão utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HCl] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,5452$

Fator	SQ	GI	MQ	F	p	
Temperatura (L)	2,98525	1	2,98525	5,74244	0,028335	Significativo
Temperatura (Q)	6,01561	1	6,01561	11,57167	0,003395	Significativo
[HCl] (L)	0,02481	1	0,02481	0,04772	0,829672	
[HCl] (Q)	0,04041	1	0,04041	0,07774	0,783753	
Tempo (L)	0,97469	1	0,97469	1,87493	0,188731	
Tempo (Q)	11,33160	1	11,33160	21,79755	0,000220	Significativo
Temperatura x [HCl]	2,29630	1	2,29630	4,41719	0,050791	
Temperat. x Tempo	1,19851	1	1,19851	2,30546	0,147298	
[HCl] x Tempo	1,29346	1	1,29346	2,48811	0,133135	
Falta de ajuste	12,29341	3	4,09780	7,88257	0,001643	Significativo
Erro puro	8,83756	17	0,51986			
SQ total	46,46121	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice C – Tabela ANOVA para a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} (%) na amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HCl] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,7620$

Fator	SQ	GI	MQ	F	p	
Temperatura (L)	0,756900	1	0,756900	29,21730	0,000047	Significativo
Temperatura (Q)	0,106338	1	0,106338	4,10480	0,058750	
[HCl] (L)	1,458056	1	1,458056	56,28283	0,000001	Significativo
[HCl] (Q)	0,594565	1	0,594565	22,95098	0,000170	Significativo
Tempo (L)	0,031506	1	0,031506	1,21618	0,285479	
Tempo (Q)	0,051796	1	0,051796	1,99940	0,175414	
Temperatura x [HCl]	1,193512	1	1,193512	46,07110	0,000003	Significativo
Temperat. x Tempo	0,001512	1	0,001512	0,05838	0,811958	
[HCl] x Tempo	0,092450	1	0,092450	3,56869	0,076060	
Falta de ajuste	0,900638	3	0,300213	11,58858	0,000224	Significativo
Erro puro	0,440400	17	0,025906			
SQ total	5,635787	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice D – Tabela ANOVA para a extração de Hg^{2+} (%) na amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HCl] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,9615$

Fator	SQ	GI	MQ	F	p	
Temperatura (L)	10,36840	1	10,36840	5716,631	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	1,93646	1	1,93646	1067,671	0,000000	Significativo
[HCl] (L)	7,54876	1	7,54876	4162,017	0,000000	Significativo
[HCl] (Q)	0,10487	1	0,10487	57,818	0,000001	Significativo
Tempo (L)	0,59676	1	0,59676	329,022	0,000000	Significativo
Tempo (Q)	0,00051	1	0,00051	0,283	0,601788	
Temperatura x [HCl]	4,63601	1	4,63601	2556,072	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	0,15401	1	0,15401	84,915	0,000000	Significativo
[HCl] x Tempo	0,25205	1	0,25205	138,968	0,000000	Significativo
Falta de ajuste	0,99744	3	0,33248	183,313	0,000000	Significativo
Erro puro	0,03083	17	0,00181			
SQ total	26,71039	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice E – Tabela ANOVA para a extração de Hg orgânico (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HCl] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,7342$

Fator	SQ	GI	MQ	F	p	
Temperatura (L)	0,065025	1	0,065025	9,70664	0,006291	Significativo
Temperatura (Q)	0,012063	1	0,012063	1,80068	0,197279	
[HCl] (L)	0,061256	1	0,061256	9,14406	0,007654	Significativo
[HCl] (Q)	0,360128	1	0,360128	53,75834	0,000001	Significativo
Tempo (L)	0,000306	1	0,000306	0,04572	0,833237	
Tempo (Q)	0,042467	1	0,042467	6,33924	0,022127	Significativo
Temperatura x [HCl]	0,005512	1	0,005512	0,82288	0,377018	
Temperat. x Tempo	0,025313	1	0,025313	3,77854	0,068656	
[HCl] x Tempo	0,012800	1	0,012800	1,91073	0,184775	
Falta de ajuste	0,097662	3	0,032554	4,85954	0,012776	Significativo
Erro puro	0,113883	17	0,006699			
SQ total	0,795950	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice F – Tabela ANOVA para a recuperação de Hg²⁺ (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HCl] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,9439$

Fator	SQ	GI	MQ	F	p	
Temperatura (L)	31,64063	1	31,64063	533,4452	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	7,05003	1	7,05003	118,8600	0,000000	Significativo
[HCl] (L)	38,13063	1	38,13063	642,8634	0,000000	Significativo
[HCl] (Q)	0,04388	1	0,04388	0,7398	0,401703	
Tempo (L)	0,12250	1	0,12250	2,0653	0,168837	
Tempo (Q)	0,05388	1	0,05388	0,9084	0,353906	
Temperatura x [HCl]	13,78125	1	13,78125	232,3450	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	0,00000	1	0,00000	0,0000	1,000000	
[HCl] x Tempo	0,12500	1	0,12500	2,1074	0,164790	
Falta de ajuste	4,40375	3	1,46792	24,7483	0,000002	Significativo
Erro puro	1,00833	17	0,05931			
SQ total	96,45500	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice G – Tabela ANOVA para a recuperação de CH_3Hg^+ (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HCl] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,9830$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	193,9056	1	193,9056	3669,457	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	48,8063	1	48,8063	923,607	0,000000	Significativo
[HCl] (L)	359,1025	1	359,1025	6795,632	0,000000	Significativo
[HCl] (Q)	60,6851	1	60,6851	1148,401	0,000000	Significativo
Tempo (L)	22,3256	1	22,3256	422,489	0,000000	Significativo
Tempo (Q)	0,1078	1	0,1078	2,040	0,171286	
Temperatura x [HCl]	9,0313	1	9,0313	170,907	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	0,4050	1	0,4050	7,664	0,013150	Significativo
[HCl] x Tempo	1,3613	1	1,3613	25,760	0,000094	Significativo
Falta de ajuste	11,3212	3	3,7737	71,414	0,000000	Significativo
Erro puro	0,8983	17	0,0528			
SQ total	717,0670	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice H – Tabela ANOVA para a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} (%) na solução padrão utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, $[\text{HNO}_3]$ e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,5648$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	0,07553	1	0,075529	0,33036	0,572978	
Temperatura (Q)	0,03052	1	0,030518	0,13348	0,719356	
$[\text{HNO}_3]$ (L)	0,30175	1	0,301754	1,31984	0,266528	
$[\text{HNO}_3]$ (Q)	2,72550	1	2,725500	11,92108	0,003040	Significativo
Tempo (L)	2,20757	1	2,207573	9,65572	0,006403	Significativo
Tempo (Q)	4,56578	1	4,565776	19,97028	0,000338	Significativo
Temperat. x $[\text{HNO}_3]$	1,17742	1	1,177419	5,14992	0,036552	Significativo
Temperat. x Tempo	0,10394	1	0,103945	0,45465	0,509203	
$[\text{HNO}_3]$ x Tempo	1,65642	1	1,656416	7,24501	0,015442	Significativo
Falta de ajuste	5,60629	3	1,868763	8,17379	0,001380	Significativo
Erro puro	3,88669	17	0,228629			
SQ total	21,81364	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice I – Tabela ANOVA para a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} (%) na amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, $[\text{HNO}_3]$ e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,7214$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	3,97006	1	3,970056	23,95732	0,000137	Significativo
Temperatura (Q)	0,61393	1	0,613928	3,70475	0,071159	
$[\text{HNO}_3]$ (L)	7,31702	1	7,317025	44,15461	0,000004	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ (Q)	2,45926	1	2,459263	14,84043	0,001277	Significativo
Tempo (L)	0,03151	1	0,031506	0,19012	0,668300	
Tempo (Q)	2,00962	1	2,009621	12,12706	0,002851	Significativo
Temperat. x $[\text{HNO}_3]$	7,39201	1	7,392013	44,60712	0,000004	Significativo
Temperat. x Tempo	0,00080	1	0,000800	0,00483	0,945418	
$[\text{HNO}_3]$ x Tempo	0,05611	1	0,056113	0,33861	0,568269	
Falta de ajuste	6,53446	3	2,178154	13,14408	0,000109	Significativo
Erro puro	2,81713	17	0,165714			
SQ total	33,56247	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice J – Tabela ANOVA para a extração de Hg^{2+} (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, $[\text{HNO}_3]$ e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. $R^2 = 0,8900$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	1561,830	1	1561,830	5168,453	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	396,429	1	396,429	1311,874	0,000000	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ (L)	1837,623	1	1837,623	6081,112	0,000000	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ (Q)	258,859	1	258,859	856,623	0,000000	Significativo
Tempo (L)	22,491	1	22,491	74,429	0,000000	Significativo
Tempo (Q)	82,349	1	82,349	272,512	0,000000	Significativo
Temperat. x $[\text{HNO}_3]$	1544,012	1	1544,012	5109,489	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	10,488	1	10,488	34,708	0,000018	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ x Tempo	4,636	1	4,636	15,342	0,001110	Significativo
Falta de ajuste	705,555	3	235,185	778,281	0,000000	Significativo
Erro puro	5,137	17	0,302			
SQ total	6438,522	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice K – Tabela ANOVA para a extração de Hg orgânico (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HNO₃] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. R² = 0,9021

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	16,32160	1	16,32160	515,8342	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	4,78542	1	4,78542	151,2401	0,000000	Significativo
[HNO ₃] (L)	14,38306	1	14,38306	454,5677	0,000000	Significativo
[HNO ₃] (Q)	0,18029	1	0,18029	5,6979	0,028874	Significativo
Tempo (L)	8,16531	1	8,16531	258,0595	0,000000	Significativo
Tempo (Q)	2,66955	1	2,66955	84,3695	0,000000	Significativo
Temperat. x [HNO ₃]	5,72911	1	5,72911	181,0651	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	8,54911	1	8,54911	270,1895	0,000000	Significativo
[HNO ₃] x Tempo	0,08820	1	0,08820	2,7875	0,113311	
Falta de ajuste	5,99454	3	1,99818	63,1512	0,000000	Significativo
Erro puro	0,53790	17	0,03164			
SQ total	66,73827	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice L – Tabela ANOVA para a recuperação de Hg²⁺ (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, [HNO₃] e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo. R² = 0,9352

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	4057,69	1	4057,690	1713,878	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	1039,52	1	1039,520	439,070	0,000000	Significativo
[HNO ₃] (L)	3624,04	1	3624,040	1530,714	0,000000	Significativo
[HNO ₃] (Q)	243,27	1	243,270	102,752	0,000000	Significativo
Tempo (L)	118,81	1	118,810	50,183	0,000002	Significativo
Tempo (Q)	9,11	1	9,105	3,846	0,066460	
Temperat. x [HNO ₃]	2734,30	1	2734,301	1154,908	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	70,21	1	70,211	29,656	0,000044	Significativo
[HNO ₃] x Tempo	37,41	1	37,411	15,802	0,000979	Significativo
Falta de ajuste	783,53	3	261,176	110,315	0,000000	Significativo
Erro puro	40,25	17	2,368			
SQ total	12720,70	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice M – Tabela ANOVA para a recuperação de CH_3Hg^+ (%) da amostra de borra oleosa utilizando matriz Box-Behnken avaliando-se a temperatura, $[\text{HNO}_3]$ e tempo de extração durante a otimização da extração com aquecimento convectivo.
 $R^2 = 0,9586$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Temperatura (L)	3387,24	1	3387,240	3438,138	0,000000	Significativo
Temperatura (Q)	1103,26	1	1103,259	1119,837	0,000000	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ (L)	4472,27	1	4472,266	4539,468	0,000000	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ (Q)	3,73	1	3,727	3,783	0,068509	
Tempo (L)	1,38	1	1,381	1,401	0,252783	
Tempo (Q)	0,14	1	0,135	0,137	0,715407	
Temperat. x $[\text{HNO}_3]$	1399,21	1	1399,205	1420,230	0,000000	Significativo
Temperat. x Tempo	8,40	1	8,405	8,531	0,009532	Significativo
$[\text{HNO}_3]$ x Tempo	1,90	1	1,901	1,930	0,182708	
Falta de ajuste	432,05	3	144,017	146,181	0,000000	Significativo
Erro puro	16,75	17	0,985			
SQ total	10827,49	29				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice N – Tabela ANOVA referente a otimização dos componentes da fase móvel do HPLC (L-cisteína e acetato de amônio) utilizando matriz Doehlert.
 $R^2 = 0,9403$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Acetato de amônio (L)	27,0938	1	27,0938	15,67407	0,005468	Significativo
Acetato de amônio (Q)	126,1008	1	126,1008	72,95090	0,000060	Significativo
L-cisteína (L)	10,8112	1	10,8112	6,25444	0,040939	Significativo
L-cisteína (Q)	68,6408	1	68,6408	39,70957	0,000404	Significativo
Acet. am. x L-cisteína	37,4113	1	37,4113	21,64287	0,002336	Significativo
Falta de ajuste	1,0800	1	1,0800	0,62479	0,455212	
Erro puro	12,1000	7	1,7286			
SQ total	220,6543	13				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice O – Tabela ANOVA referente a otimização da vazão da fase móvel e da proporção de metanol sobre as contagens de Hg^{2+} , após aplicação de planejamento Doehlert. $R^2 = 0,9996$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Vazão FM (L)	5851925	1	5851925	23468,05	0,000000	Significativo
Vazão FM (Q)	44652	1	44652	179,07	0,000003	Significativo
Metanol (L)	468028	1	468028	1876,94	0,000000	Significativo
Metanol (Q)	2046277	1	2046277	8206,21	0,000000	Significativo
Vazão FM x Metanol	155403	1	155403	623,22	0,000000	Significativo
Falta de ajuste	1752	1	1752	7,03	0,032907	Significativo
Erro puro	1746	7	249			
SQ total	9989033	13				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice P – Tabela ANOVA referente a otimização da vazão da fase móvel e da proporção de metanol sobre a resolução dos sinais, após aplicação de planejamento Doehlert. $R^2 = 0,9734$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Vazão FM (L)	0,020833	1	0,020833	0,33557	0,620951	
Vazão FM (Q)	0,060000	1	0,060000	0,96644	0,429218	
Metanol (L)	3,802500	1	3,802500	61,24832	0,015938	Significativo
Metanol (Q)	0,666667	1	0,666667	10,73826	0,081854	
Erro	0,124167	2	0,062083			
SQ total	4,677143	6				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice Q – Tabela ANOVA referente a otimização da vazão da fase móvel e da proporção de metanol sobre o coeficiente de seletividade dos sinais, após aplicação de planejamento Doehlert. $R^2 = 0,9808$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Vazão FM (L)	0,000833	1	0,000833	0,40000	0,591752	
Vazão FM (Q)	0,000000	1	0,000000	0,00000	1,000000	
Metanol (L)	0,202500	1	0,202500	97,20000	0,010132	Significativo
Metanol (Q)	0,006667	1	0,006667	3,20000	0,215535	
Erro	0,004167	2	0,002083			
SQ total	0,217143	6				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice R – Tabela ANOVA para a otimização da vazão do gás nebulizador e da potência de radiofrequência do ICP-MS sobre as contagens de Hg²⁺ utilizando matriz Doehlert. R² = 0,9436

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Vazão gás neb. (L)	26	1	26	0,043	0,841448	
Vazão gás neb. (Q)	5433802	1	5433802	8993,170	0,000000	Significativo
Potência RF (L)	46971	1	46971	77,739	0,000049	Significativo
Potência RF (Q)	417511	1	417511	690,999	0,000000	Significativo
VGN x RF	3003	1	3003	4,970	0,061023	
Falta de ajuste	359840	1	359840	595,551	0,000000	Significativo
Erro puro	4230	7	604			
SQ total	6456879	13				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice S – Tabela ANOVA para a otimização da massa de amostra e volume de solução extratora sobre a extração de Hg²⁺ utilizando matriz Doehlert. R² = 0,9994

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Volume de extrator (L)	95,6004	1	95,6004	14532,09	0,000000	Significativo
Volume de extrator (Q)	22,8528	1	22,8528	3473,82	0,000000	Significativo
Massa de amostra (L)	194,6365	1	194,6365	29586,43	0,000000	Significativo
Massa de amostra (Q)	6,0492	1	6,0492	919,53	0,000000	Significativo
Volume x Massa	10,2604	1	10,2604	1559,68	0,000000	Significativo
Falta de ajuste	0,1541	1	0,1541	23,43	0,001877	Significativo
Erro puro	0,0461	7	0,0066			
SQ total	361,3983	13				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice T – Tabela ANOVA para a conversão de CH_3Hg^+ em Hg^{2+} na amostra de borra oleosa após otimização do método de extração avaliando temperatura, concentração de L-cisteína e volume de xileno utilizando planejamento Box-Behnken. $R^2 = 0,9745$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Xileno (L)	0,5093	1	0,5093	5,207	0,149997	
Xileno (Q)	0,3465	1	0,3465	3,542	0,200533	
L-cisteína (L)	12,8974	1	12,8974	131,864	0,007498	Significativo
L-cisteína (Q)	6,0202	1	6,0202	61,551	0,015861	Significativo
Temperatura (L)	208,0107	1	208,0107	2126,714	0,000470	Significativo
Temperatura (Q)	52,6148	1	52,6148	537,936	0,001854	Significativo
Xileno x L-cisteína	0,2949	1	0,2949	3,015	0,224647	
Xileno x Temperat.	1,3406	1	1,3406	13,707	0,065834	
L-cist. x Temperat.	5,1994	1	5,1994	53,158	0,018297	Significativo
Falta de ajuste	7,2602	3	2,4201	24,743	0,039096	Significativo
Erro puro	0,1956	2	0,0978			
SQ total	291,9487	14				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice U – Tabela ANOVA para a recuperação de CH_3Hg^+ da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração avaliando temperatura, concentração de L-cisteína e volume de xileno utilizando planejamento Box-Behnken. $R^2 = 0,9359$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Xileno (L)	1,1250	1	1,1250	3,3750	0,207594	
Xileno (Q)	5,0256	1	5,0256	15,0769	0,060382	
L-cisteína (L)	40,5000	1	40,5000	121,5000	0,008130	Significativo
L-cisteína (Q)	1,2564	1	1,2564	3,7692	0,191710	
Temperatura (L)	120,1250	1	120,1250	360,3750	0,002763	Significativo
Temperatura (Q)	98,5641	1	98,5641	295,6923	0,003365	Significativo
Xileno x L-cisteína	6,2500	1	6,2500	18,7500	0,049414	Significativo
Xileno x Temperat.	1,0000	1	1,0000	3,0000	0,225403	
L-cist. x Temperat.	2,2500	1	2,2500	6,7500	0,121690	
Falta de ajuste	18,2500	3	6,0833	18,2500	0,052395	
Erro puro	0,6667	2	0,3333			
SQ total	294,9333	14				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.

Apêndice V – Tabela ANOVA para a recuperação de Hg^{2+} da amostra de borra oleosa após otimização do método de extração avaliando temperatura, concentração de L-cisteína e volume de xileno utilizando planejamento Box-Behnken. $R^2 = 0,9956$

Fator	SQ	GI	MQ	F	P	
Xileno (L)	156,645	1	156,645	824,45	0,001211	Significativo
Xileno (Q)	1706,769	1	1706,769	8983,00	0,000111	Significativo
L-cisteína (L)	399,031	1	399,031	2100,16	0,000476	Significativo
L-cisteína (Q)	1219,682	1	1219,682	6419,38	0,000156	Significativo
Temperatura (L)	1975,061	1	1975,061	10395,06	0,000096	Significativo
Temperatura (Q)	1694,882	1	1694,882	8920,43	0,000112	Significativo
Xileno x L-cisteína	138,062	1	138,062	726,64	0,001373	Significativo
Xileno x Temperat.	602,703	1	602,703	3172,12	0,000315	Significativo
L-cist. x Temperat.	313,290	1	313,290	1648,89	0,000606	Significativo
Falta de ajuste	37,463	3	12,488	65,72	0,015025	Significativo
Erro puro	0,380	2	0,190			
SQ total	8541,717	14				

Fonte: elaborado pela autora (2019)

L = linear, Q = quadrático, SQ = soma quadrática, GI = graus de liberdade, MQ = média quadrática.