MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ASTM D7039 PARA DETERMINAR ENXOFRE EM BENZENO

BRUNA HOLZ XAVIER

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

Pelotas, 2022

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ASTM D7039 PARA DETERMINAR ENXOFRE EM BENZENO

BRUNA HOLZ XAVIER

Monografia apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Profª Dra. Adriane Medeiros Nunes, como pré-requisito para conclusão de curso.

Pelotas, 2022

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA, APROVA A MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

VALIDAÇÃO DO MÉTODO ASTM D7039 PARA DETERMINAR ENXOFRE EM BENZENO

ELABORADA POR

BRUNA HOLZ XAVIER

COMISSÃO EXAMINADORA:

_____

Profª Dra. Adriane Medeiros Nunes / Orientadora (CCQFA-UFPel)

_____

Profª Dra. Mariana Antunes Vieira (CCQFA-UFPel)

_____

Dr. Eliézer Quadro Oreste (PPGQTA-FURG)

Pelotas, 2022

“Dedico este trabalho à minha mãe, pois é graças a ela que ele está aqui – concluído e devidamente entregue. Esta mulher, que tenho a honra e o privilégio de chamar de mãe, não mede, nem nunca mediu esforços para garantir a mim um ensino de qualidade, sempre me incentivando e fazendo de tudo para facilitar ao máximo minha jornada acadêmica.”

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha mãe, que foi – e é – meu alicerce não apenas na graduação, mas em todos os momentos da minha vida. Sempre me apoiando, incentivando e acreditando em mim, até quando eu mesma não acreditava. Todas as vezes que ficava preocupada em demasia com algo e pensava em desistir porque duvidava que conseguiria, ela, com toda paciência e afeto, me acalmava e fazia-me crer que eu iria conseguir sim. Se escrevesse aqui o quanto agradeço, admiro e amo minha mãe, seria possível produzir outra monografia! Então, para expressar, resumidamente, todo meu sentimento de gratidão para esta mulher, finalizo afirmando que meu ciclo acadêmico não foi fácil, mas sei que teria sido inúmeras vezes mais difícil se eu não a tivesse do meu lado.

Agradeço ao meu namorado Lucas, um dos meus maiores incentivadores, que me acompanhou durante toda a graduação, sempre muito compreensível e paciencioso comigo enquanto eu passava por momentos que exigiam mais tempo e atenção da minha parte. A todo o momento foi meu companheiro e me deu força a cada obstáculo, me falando palavras que não me deixavam desistir e, em alguns casos, até sentando do meu lado para resolver minhas dificuldades junto comigo.

À minha amiga Luiza, com quem tive a honra de trabalhar na minha primeira iniciação científica e que a partir de então, além de estar sempre presente – tanto para me ajudar a espairecer quanto para compartilhar comigo suas experiências profissionais e me dar dicas e sugestões –, também foi responsável pela minha contratação no estágio, me indicando à empresa.

Aproveitando, agradeço à *AmSpec* pela oportunidade de estagiar em seus laboratórios e me permitir elaborar meu Trabalho de Conclusão de Curso com base em um dos projetos desenvolvidos dentro da empresa. Com certeza meu período de estágio foi de suma importância para minha evolução profissional, pois me agregou um conhecimento técnico imensurável, o qual será muito bem aproveitado no meu futuro como Química.

À minha supervisora de estágio, Daiane, que foi quem me sugeriu e incentivou a usar este projeto como minha monografia. Sou grata por toda atenção e ensinamentos recebidos por ela, que, apesar de estar sempre envolvida com questões da empresa,

nunca deixou minhas dúvidas sem respostas; assim que eu perguntava algo ou relatava algum problema com o andamento do trabalho, ela me auxiliava, com muita paciência e didática.

Por fim, agradeço à UFPel, ao CCQFA, a todos professores que, de alguma maneira, contribuíram para minha formação superior, à minha orientadora – Professora Adriane – e à banca avaliadora. Sem esta instituição e seus profissionais devidamente qualificados, esse momento, tão aguardado e memorável, não estaria acontecendo. Obrigada por tornarem isso possível, não só para mim, mas para todos os estudantes da rede pública de ensino.

RESUMO

O benzeno, um derivado do petróleo, é um produto das indústrias petroquímicas de primeira geração e, sendo assim, é empregado como matéria prima para a fabricação de inúmeras substâncias e materiais. No entanto, para que este hidrocarboneto aromático possa ser aplicado às suas finalidades apropriadamente, ele deve apresentar determinado valor de pureza, o qual é estabelecido por lei. Em virtude disso, o benzeno é submetido a diversas análises, dentre as quais está a determinação do teor de enxofre, que se faz necessária porque este elemento é considerado uma contaminação ao petroquímico em questão. De acordo com a legislação, a concentração máxima de enxofre permitida em benzeno é 1 ppm. Atualmente, um dos métodos mais usados para fazer tal determinação é a norma ASTM D5453, que quantifica enxofre usando fluorescência ultravioleta. Todavia, além deste método ter um elevado custo, seu escopo não abrange a faixa de concentração de enxofre no benzeno, visto que é empregado para analisar amostras contendo de 1 a 8000 ppm deste elemento. Considerando isso, é de extrema relevância para os laboratórios analíticos que um método para determinar enxofre em benzeno, sem os inconvenientes apresentados pela ASTM D5453, seja encontrado e devidamente validado. O método ASTM D7039, o qual determina o teor de enxofre através de espectrometria de fluorescência de raios X de comprimento de onda monocromática, é uma possibilidade, pois tem menos custos operacionais e, dependendo do equipamento utilizado, pode ser capaz de medir concentrações inferiores a 1 ppm. Portanto, a fim de verificar se este método é apto a determinar enxofre em benzeno, os procedimentos descritos pelo INMETRO – órgão acreditador do laboratório onde este trabalho foi desenvolvido – foram empregados para avaliar os seguintes parâmetros: linearidade e sensibilidade, limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, os quais são mandatórios para o processo de validação em questão. Um R^2 maior que 0,99 indicou uma boa linearidade do método, o qual também se mostrou capaz de analisar amostras com pequenas concentrações de enxofre, visto que apresentou um LQ igual a 0,16 ppm.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....ix

ÍNDICE DE TABELAS.....x

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....xi

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....1

2. REVISÃO DA LITERATURA.....2

2.1 ENXOFRE.....2

2.2 BENZENO.....6

2.3 O MÉTODO ASTM D5453.....8

2.4 O MÉTODO ASTM D7039.....10

2.4.1 SINDIE 2622 – ANALISADOR DE ENXOFRE DA XOS.....12

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....16

2.5.1 SELETIVIDADE.....18

2.5.2 LINEARIDADE.....20

2.5.3 LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....23

2.5.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....25

2.5.5 TENDÊNCIA / EXATIDÃO.....28

2.5.6 PRECISÃO.....35

2.5.6.1 REPETIBILIDADE.....36

2.5.6.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....38

2.5.6.3 REPRODUTIBILIDADE.....38

2.5.7 ROBUSTEZ.....39

3. METODOLOGIA.....41

3.1 OBTENÇÃO DE UMA AMOSTRA CONTROLE.....41

3.2 PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....42

3.2.1 FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....42

3.2.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....42

3.2.3 EXATIDÃO E PRECISÃO.....43

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....43

4.1 VALORES DA AMOSTRA CONTROLE.....43

4.2 FAIXA LINEAR DE TRABALHO.....44

4.3 LD E LQ.....45

4.4 EXATIDÃO E PRECISÃO.....46

5. CONCLUSÃO.....48

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do benzeno.....6

Figura 2: Esquema de um analisador por MWDXRF.....11

Figura 3: Analisador de enxofre Sindie 2622 da XOS.....12

Figura 4: Visor do Sindie 2622.....13

Figura 5: Esquema de funcionamento do Sindie 2622.....14

Figura 6: Exemplo de uma curva de calibração.....22

Figura 7. Valores tabelados de F para um nível de confiança de 95% (P = 0,05).....31

Figura 8. Valores tabelados para t.....32

Figura 9. Curva de calibração para determinação de S em benzeno pela ASTM D7039.....45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Produtos de segunda e terceira geração derivados do benzeno.....7

Tabela 2: Critérios de aceitação para recuperação.....34

Tabela 3: Critérios de aceitação para repetibilidade sugeridos pela AOAC.....37

Tabela 4: Critérios de aceitação para reprodutibilidade sugeridos pela AOAC.....39

Tabela 5: Diferentes técnicas analíticas e os respectivos fatores que devem ser considerados na avaliação da robustez.....40

Tabela 6. Resultados da determinação do teor de enxofre em benzeno pelo método ASTM D5453.....44

Tabela 7. Concentrações da curva de calibração e suas respectivas respostas analíticas.....44

Tabela 8. Resultados da análise de benzeno pela ASTM D7039.....46

Tabela 9. Verificação da repetibilidade do método.....47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP – Agência Nacional do Petróleo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)

ASTM – American Society for Testing and Materials (Sociedade Americana de Testes e Materiais)

DPR – Desvio Padrão Relativo

EDXRF – Energy Dispersive X-ray Fluorescence (Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva)

HPLC – High Performance Liquid Cromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IRMM – Institute for Reference Materials and Measurements (Instituto de Materiais e Medições de Referência)

ISO – International Organization for Standardization (Organização Internacional de Padronização)

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

MR – Material de Referência

MRC – Material de Referência Certificado

MWDXRF – Monochromatic wavelength-dispersive x-ray fluorescence spectrometry (Espectrometria de fluorescência de raios X de comprimento de onda monocromática dispersiva)

NIST – National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)

NOX – Número de oxidação

PPB – Partes por bilhão

PPM – Partes por milhão

SI – Sistema Internacional de Unidades

S10 – Óleo diesel com teor máximo de 10 ppm de enxofre

S50 – Óleo diesel com teor máximo de 50 ppm de enxofre

S500 – Óleo diesel com teor máximo de 500 ppm de enxofre

S1800 – Óleo diesel com teor máximo de 1800 ppm de enxofre

u – Unidade de massa atômica

UV – Ultravioleta

WDXRF – Wavelength-dispersive x-ray fluorescence spectrometry (Espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão em comprimento de onda)

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O benzeno, um hidrocarboneto aromático de fórmula molecular C_6H_6, é um produto resultante da primeira transformação de correntes petrolíferas por processos químicos, como pirólise, craqueamento a vapor, reforma a vapor, reforma catalítica, dealquilação, hidroformação, entre outros.[1;2] Ele é produzido pelas indústrias petroquímicas de primeira geração e serve de matéria-prima para a fabricação de diversos produtos, como, por exemplo, borrachas especiais, tintas, ceras, graxas, nylon, diferentes tipos de resina e vários outros polímeros.[2;3;4]

Devido a sua aplicação tão significativa à indústria, o benzeno deve atender alguns requisitos para que possa ser considerado adequado a uso como matéria-prima. Uma das principais características que este composto precisa apresentar é um alto grau de pureza, o qual pode ser verificado através da realização de testes analíticos específicos, como a determinação do teor de enxofre, por exemplo.

O enxofre, um ametal pertencente à família dos calcogênios, além de ser um poluente em potencial, também é apontado como uma contaminação do benzeno. De acordo com a atual legislação, o teor máximo de enxofre permitido neste petroquímico é 1 mg/kg (1 ppm).[5]

Uma das normas mais empregadas para fazer a determinação da quantidade de enxofre em amostras de benzeno é a ASTM D5453, cujo princípio de funcionamento é baseado em fluorescência ultravioleta.[6] Entretanto, este método possui alguns aspectos negativos, sendo um deles o seu elevado custo operacional, visto que, por fazer uso de gases, requer reposições de tempo em tempo.[7]

Outro ponto desfavorável da norma ASTM D5453 é a faixa de concentração que ela atende com confiabilidade assegurada. De acordo com o documento oficial, este procedimento é aplicado para determinar enxofre em amostras contendo de 1 a 8000 ppm de enxofre, ou seja, não abrange a faixa de concentração deste ametal em benzeno, pois o valor mínimo quantificável é justamente o valor máximo permitido pela legislação (1 ppm).

Em virtude destas desvantagens, o estudo acerca de um novo método para determinar enxofre em benzeno se faz importante. Uma possível alternativa é a norma ASTM D7039, que opera por espectrometria de fluorescência de raios X de

comprimento de onda monocromática dispersiva e já é empregada à quantificação de enxofre em alguns produtos petroquímicos, como gasolina, diesel combustível, combustível para aviação, querosene, biodiesel, misturas de biodiesel e misturas de gasolina-etanol.[8]

Tendo em vista que o benzeno não é uma das matrizes citadas no escopo da norma ASTM D7039, é necessário avaliar se tal método realmente será capaz de determinar, com certa confiabilidade, enxofre em benzeno. Para isso, é realizado um processo denominado validação, o qual tem o objetivo de verificar a eficiência do método proposto, determinando se ele é ou não adequado para desempenhar seu pretendido propósito.[9; 10; 11]

A validação é feita em variadas circunstâncias, como, por exemplo, durante o desenvolvimento de um novo método analítico ou quando ocorre alguma modificação ou implementação em um já normalizado.[11;12;13] A realização deste processo se dá através da avaliação de alguns parâmetros (seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, tendência/exatidão, precisão e robustez), os quais podem ser escolhidos conforme a alteração feita no método, bem como sua finalidade.[10;11;13;14;15]

Portanto, diante do que foi exposto, o objetivo desta monografia foi validar um método analítico normalizado – o ASTM D7039 – para a determinação de enxofre em benzeno usando o equipamento Sindie 2622, um analisador de enxofre da XOS. Para isto, além de avaliar os parâmetros que melhor evidenciam a adequação do método ao uso pretendido, uma amostra desta matriz foi previamente analisada em laboratório terceiro conforme a norma ASTM D5453 e enviada, juntamente com seus resultados, para o local onde este trabalho foi desenvolvido, a fim de servir como amostra controle para os testes de validação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENXOFRE

Pertencente à família dos calcogênios – grupo 16 da tabela periódica –, o enxofre (S) é um ametal de massa atômica igual a 32,06u que, à temperatura ambiente,

se apresenta no estado sólido, na forma de cristais amarelos. É insolúvel em água e, apesar da fama de seu odor fétido característico, o enxofre é inodoro; ele só exala o forte cheiro, que é popularmente comparado ao de um ovo podre, quando se mistura com hidrogênio, formando um composto volátil – o sulfeto de hidrogênio (H_2S) – que é o verdadeiro responsável pelo mau odor.[16;17]

Com uma densidade igual a 1,96 g/cm^3 (1960 kg/m^3 na unidade do SI) e temperaturas de fusão e ebulição iguais a 115,2 °C (388,36 K) e 444,6 °C (717,75 K), respectivamente, o enxofre representa cerca de 3% da massa terrestre, sendo o décimo sexto elemento mais abundante do planeta e o terceiro constituinte majoritário dos minerais, perdendo apenas para o oxigênio e o silício.[16;18;19] Este ametal pode ser encontrado na natureza tanto na sua forma livre, como enxofre elementar (S^0), quanto em diferentes estados de oxidação: na forma de sulfetos (S^{2-}), sulfitos (SO_3^{2-}, onde seu número de oxidação é +4) e sulfatos (SO_4^{2-}, com nox igual a +6).[16]

Existe um grande grupo de compostos de enxofre, os quais podem ser de origem biogênica (produzidos naturalmente, sem precisar de influências) ou de origem antropogênica (derivados da atividade humana). Eles podem se apresentar nas mais diversas formas, desde gases simples até aromáticos policíclicos complexos, e estão presentes em várias matrizes, sejam elas complexas ou não. Por exemplo, no ar – uma mistura gasosa –, o enxofre está presente como um gás, enquanto que em sistemas aquosos ele se apresenta no estado líquido. Além disso, ele também é encontrado em muitas frações do petróleo, onde pode estar em qualquer um dos três estados da matéria (sólido, líquido ou gasoso).[18]

A presença de enxofre no petróleo é explicada pelo fato deste elemento químico estar presente nos solos sedimentares de onde o petróleo é extraído e, sendo assim, se mistura a este produto no momento da extração, se incorporando na composição química tanto do petróleo bruto quanto na de seus derivados.[18] É possível encontrar enxofre em várias frações de petróleo, onde pode se apresentar em diferentes formas, como, por exemplo, tióis (–SH), sulfetos, dissulfetos (S_2^{2-}), tiofenos (C_4H_4S), benzotiofenos (benzeno ligado a um tiofeno), entre outros.[19]

Considerando que uma das principais aplicações de alguns derivados do petróleo é como combustível veicular, a presença de enxofre nesta matriz e em suas frações é um fator preocupante, visto que este elemento químico é responsável por causar muitos

impactos negativos, seja no meio ambiente, na saúde humana ou no próprio veículo onde está sendo usado.[16;17]

Quando derivados de petróleo, como gasolina ou diesel, são utilizados como combustíveis, eles passam por um processo de combustão no interior dos motores, no qual o enxofre presente no combustível reage com o oxigênio e produz, além de outros gases de combustão, óxidos de enxofre (SO_2 e SO_3), os quais são eliminados pelo escapamento do veículo e liberados na atmosfera terrestre.[16;17]

O grande problema associado à emissão desses dois óxidos é a favorável formação de ácido sulfúrico (H_2SO_4), principal responsável pelas chuvas ácidas.[16;17;18;19] Este ácido pode ser gerado tanto pelo SO_3, que reage com a água existente na atmosfera (Reação 1), quanto pelo SO_2, que, ao entrar em contato com oxigênio atmosférico, se oxida e é convertido a SO_3 (Reação 2), o qual passa pelo mesmo processo demonstrado na Reação 1 e forma H_2SO_4.[7;16]

$$SO_{3\,(g)} + H_2O_{\,(l)} \rightarrow H_2SO_{4\,(aq)} \qquad \textbf{Reação 1.}$$

$$SO_{2\,(g)} + \tfrac{1}{2}\, O_{2\,(g)} \rightarrow SO_{3(g)} \qquad \textbf{Reação 2.}$$

Além de alterar o pH natural das águas e dos solos, a chuva ácida também pode facilitar o arraste de metais pesados do solo para a água, contribuindo para a intoxicação dos seres aquáticos com estes elementos.[16]

Mas os efeitos negativos da emissão dos óxidos de enxofre não se resumem somente na formação de chuva ácida. Estes compostos, quando inalados pelos seres humanos, se depositam e/ou são absorvidos nos pulmões, o que aumenta consideravelmente as chances de o indivíduo desenvolver ou ter um agravamento de doenças respiratórias e, até mesmo, cardíacas.[16;17]

Considerando todos esses impactos causados pelos compostos de enxofre liberados na queima dos combustíveis, um grande cuidado das indústrias petrolíferas é gerar produtos com baixo teor deste elemento. A Agência Nacional do Petróleo (ANP) é o órgão responsável por estabelecer os limites máximos de enxofre permitidos nos combustíveis no Brasil, os quais vêm em um constante decréscimo desde as últimas décadas.[7;16;17]

O diesel, por exemplo, até 1994 era comercializado com 13000 ppm de enxofre. Porém, no ano seguinte, este número decaiu consideravelmente e passaram a existir dois tipos deste combustível: o diesel rural, com teor máximo de 1800 ppm de enxofre – também chamado de S1800 – e o diesel metropolitano, cuja concentração de enxofre não deveria ultrapassar a 500 ppm (S500). Alguns anos depois, a ANP emitiu a Portaria Nº 42 de 16/12/2009, onde, além de diminuir ainda mais os limites máximos do teor desse ametal no diesel, também estipulou um prazo para que as refinarias começassem a produzir tal combustível com 50 ppm de enxofre, o atualmente conhecido como S50. Por fim, nos dias atuais, já é possível utilizar diesel com apenas 10 ppm de enxofre – o diesel S10.[7;16]

Diante deste contexto, para garantir que os combustíveis derivados de petróleo sejam fornecidos com o devido teor de enxofre, eles precisam ser submetidos a procedimentos adequados e capazes de quantificar este elemento nestas matrizes. Tal necessidade fez com que diversos métodos analíticos fossem desenvolvidos no decorrer dos anos.

De acordo com Nadkarni, autor do livro *Sulfur: Chemistry Analysis of Fossil Fuel Products*, há mais de cinquenta normas, disponibilizadas pela ASTM, que podem ser empregadas para determinar enxofre em produtos petrolíferos. Além disso, outros órgãos internacionais de normalização, como a ISO, também possuem vários métodos para quantificar esse elemento. Em alguns casos, é possível observar que certas normas emitidas pela ASTM têm equivalência com métodos desenvolvidos pela ISO, ou seja, os resultados obtidos por ambos são iguais, mesmo que o procedimento em si não seja exatamente idêntico. Esta relação possibilita que, se necessário, uma norma substitua a outra sem comprometer os resultados.[20]

A quantificação de enxofre pode ser feita através de variadas técnicas analíticas, como por exemplo:[20]

- Cromatografia iônica ou em fase gasosa;
- Fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) ou por dispersão em comprimento de onda (WDXRF);
- Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente;
- Diversos tipos de técnicas de espectrometria – por infravermelho, por fluorescência no ultravioleta, entre outros.

Contudo, tais métodos permitem determinar enxofre não apenas em combustíveis, como diesel e gasolina, mas também em várias outras matrizes provenientes do petróleo[20], como o benzeno, por exemplo, o qual é um produto das indústrias petroquímicas de primeira geração e, por isso, possui inúmeras aplicações.[1;3]

Sabendo que, por derivar do petróleo, o benzeno apresenta enxofre em sua composição e considerando sua ampla utilização em vários segmentos industriais, também se faz fundamental que ele passe por uma análise que permita a quantificação do ametal em sua composição, a fim de avaliar sua pureza e qualidade.

2.2 BENZENO

O benzeno é um composto orgânico pertencente à classe dos hidrocarbonetos aromáticos, sendo o mais simples deles. Ele é assim classificado em virtude de ser formado apenas por átomos de carbono e hidrogênio (característica própria dos hidrocarbonetos) e por apresentar um aroma significativo. Sua fórmula molecular é C_6H_6, conferindo-o uma massa molar de 78,11 g/mol. Seus seis átomos de carbono se ligam formando um hexágono, onde cada um deles representa um vértice e está ligado a um átomo de hidrogênio. [2;4;21] A estrutura do benzeno está ilustrada na Figura 1.

Figura 1: Estrutura do benzeno.

Devido às características químicas do benzeno, ele é capaz de realizar um processo denominado ressonância, que ocorre fazendo com que as duplas ligações existentes na molécula fiquem em alternância na estrutura.[2] À vista disso, a Figura 1 mostra apenas uma das duas possíveis formas que o benzeno pode assumir, sendo que a segunda estrutura difere na posição das duplas ligações entre os carbonos, mas possui a mesma energia. Esta propriedade química confere ao benzeno uma elevada estabilidade.[21]

Em relação às propriedades físicas, o benzeno tem densidade igual a 876 kg/m^3 e, à temperatura ambiente, se apresenta no estado líquido. Seus pontos de fusão e ebulição são 5,5°C e 80,1°C, respectivamente.[2] Em virtude desta baixa temperatura de ebulição, este composto aromático é uma substância bastante volátil, ou seja, evapora rapidamente.[21]

Da mesma maneira que muitos outros hidrocarbonetos, o benzeno é apolar, o que o torna insolúvel em água, porém miscível com a maioria dos solventes orgânicos, característica esta que fazia com que fosse muito empregado em tintas, como solvente orgânico.[21] Entretanto, sua utilização nesse setor foi substituída por outros produtos orgânicos desde que se descobriu que o benzeno é uma substância extremamente tóxica, atuando até mesmo como um composto cancerígeno.

Todavia, este hidrocarboneto aromático ainda apresenta diversas aplicações. Um exemplo é seu uso como aditivo em combustíveis veiculares, onde tem a função de aumentar a potência dos motores.[2] Além disso, por ser um dos produtos das indústrias petroquímicas de primeira geração, e devido suas propriedades reacionais, o benzeno também é empregado como matéria-prima para a fabricação de diversos itens.[21] A Tabela 1 mostra alguns exemplos de produtos de segunda e terceira geração que podem ser obtidos a partir deste composto.

Tabela 1. Produtos de segunda e terceira geração derivados do benzeno. Adaptado.[1;3]

2ª geração	3ª geração
Etilbenzeno	Copos descartáveis, isopor, embalagens;
Estireno (benzeno + eteno);	Eletrodomésticos, eletroeletrônicos;
Poliestireno;	Telefones, fitas cassetes;
ABS (copolímero de acrilonitrila, butadieno e estireno);	Autopeças, cintos de segurança, capacetes, viseiras;
Cumeno;	Roupas e lingerie, calçados;

Fenol.	Tapetes/carpetes, linhas de pesca; Tintas, adesivos, selantes.

Embora o benzeno seja liberado na natureza por atividades vulcânicas e queimadas, a principal maneira de obter este composto em escala industrial é através da destilação do petróleo bruto ou, ainda, a partir de reações orgânicas de hidrocarbonetos menores e lineares. De acordo com a cadeia petroquímica, o benzeno gerado nas indústrias de primeira geração provém da nafta, a qual, por sua vez, provém do refino do petróleo.[1;2]

No entanto, sabendo que o petróleo extraído dos solos sedimentares contém enxofre (conforme mencionado no item 2.1), o benzeno, por ser um derivado desta substância, também pode apresentar teores deste ametal em sua composição, o que é considerado como uma impureza. Diante da ampla aplicabilidade do benzeno e das consequências advindas do enxofre, uma legislação da ASTM definiu que a concentração máxima permitida deste elemento nesse hidrocarboneto aromático é de 1 ppm.[5]

Portanto, a fim de verificar se o benzeno produzido nas indústrias de primeira geração está apto a ser utilizado como matéria-prima aos demais setores industriais, a determinação da concentração de enxofre neste composto orgânico é uma análise de suma relevância.

Atualmente, um dos métodos empregados para quantificar enxofre em amostras de benzeno é descrito pela norma ASTM D5453 – "*Método de teste padrão para determinação de enxofre total em hidrocarbonetos leves, combustíveis de motor de ignição por centelha, combustíveis de motor diesel e óleo de motor por fluorescência ultravioleta*" – a qual será abordada no item a seguir.

2.3 O MÉTODO ASTM D5453

Este método é empregado para determinar a concentração total de enxofre residual em hidrocarbonetos líquidos que contêm de 1 a 8000 ppm deste elemento em

sua composição química e que apresentam viscosidade de 0,2 a 20 cSt (mm^2/s) à temperatura ambiente, ponto de ebulição entre 25 a 400°C e menos de 0,35% (m/m) de halogênio.[6]

O princípio de funcionamento deste método é baseado no fenômeno de quimiluminescência, que ocorre quando há emissão de luz como consequência de uma reação química.[7] A amostra a ser analisada é inserida, manual ou automaticamente, em um tubo de combustão de quartzo, com dimensão adequada para garantir a combustão total do produto. A alta temperatura no interior do tubo provoca a oxidação do enxofre, convertendo-o a dióxido de enxofre (SO_2) em uma atmosfera de oxigênio (visto que o tubo apresenta uma entrada própria para esse gás). Durante a combustão da amostra são produzidos gases e água; a água é eliminada pela ação de um tubo secador, o qual deve estar anexado ao equipamento, enquanto que os gases de combustão são expostos a radiação ultravioleta (UV) de baixo comprimento de onda que, ao ser absorvida pelo SO_2, causa a excitação desta espécie – SO_2*. No entanto, tendo em vista que este estado excitado (SO_2*) não é o mais estável, o dióxido de enxofre retorna ao seu estado fundamental (SO_2), emitindo fluorescência, a qual é detectada por um tubo fotomultiplicador conectado ao equipamento. O sinal resultante representa a quantidade de enxofre presente na amostra.[6;7]

Uma das matrizes analisadas pelo método ASTM D5453 é o benzeno, porém não é totalmente adequado a tal, visto que, com base na legislação, espera-se encontrar um teor de enxofre inferior a 1 ppm em amostras de benzeno, valor esse que representa o limite de quantificação do método e, portanto, pode comprometer a confiabilidade dos resultados por ele fornecidos. Em outras palavras, o método ASTM D5453 só será aplicado adequadamente à amostras de benzeno fora de especificação, ou seja, contendo um teor de enxofre acima do permitido.

Além disso, outra desvantagem deste método é seu elevado custo em virtude do consumo de gases e da necessidade de manutenção ou substituição das peças em curtos intervalos de tempo, pois é comum acontecer desgastes.[7]

Por estes motivos, se faz relevante o estudo de uma nova maneira de quantificar enxofre em benzeno, visando um método que, além de conseguir abranger a faixa de concentração de analito esperada neste produto, também garanta uma redução de custos, sem perder ou diminuir a confiabilidade dos resultados.

2.4 O MÉTODO ASTM D7039

Intitulado "*Método de ensaio padrão para Enxofre em gasolina, diesel combustível, combustível para aviação, querosene, biodiesel, misturas de biodiesel e misturas de gasolina-etanol por espectrometria de fluorescência de raios X de comprimento de onda monocromática dispersiva*", o método ASTM D7039 é empregado para analisar amostras dos produtos citados na sua denominação, verificando se suas composições, com relação à quantidade de enxofre, estão dentro dos limites especificados na legislação e/ou pelo solicitante do teste.[8]

Conforme descrito pelo escopo do método, ele é aplicável para amostras que apresentem de 3,2 a 2822 ppm de enxofre total em sua composição. Entretanto, tal informação vem acompanhada de ressalvas. Uma delas é o fato de que produtos contendo uma concentração superior a 2822 ppm de enxofre também podem ser analisados, desde que sejam previamente diluídos em solventes adequados, a fim de diminuir este valor, fazendo com que fique dentro da faixa especificada pelo método. No entanto, o analista deve estar ciente de que os testes realizados mediante diluição podem apresentar, além de diferenças na precisão, maiores erros (desvios) do que aqueles feitos em amostras puras.[8]

Outra observação que a norma faz acerca do limite de quantificação é que, dependendo do equipamento utilizado, há a possibilidade de analisar amostras com teor de enxofre inferior a 3 ppm pelo ASTM D7039, visto que a sensibilidade deste método pode variar de acordo com a instrumentação empregada. Todavia, quando isto acontecer, é necessário reavaliar a exatidão do método, pois de acordo com o documento oficial dessa norma, o método não se aplica para concentrações inferiores a 3,2 ppm.[8]

A técnica que o método ASTM D7039 utiliza para fazer a quantificação de enxofre é a espectrometria de fluorescência de raios X de comprimento de onda monocromática dispersiva (MWDXRF), cujo esquema de funcionamento está demonstrado na Figura 2.

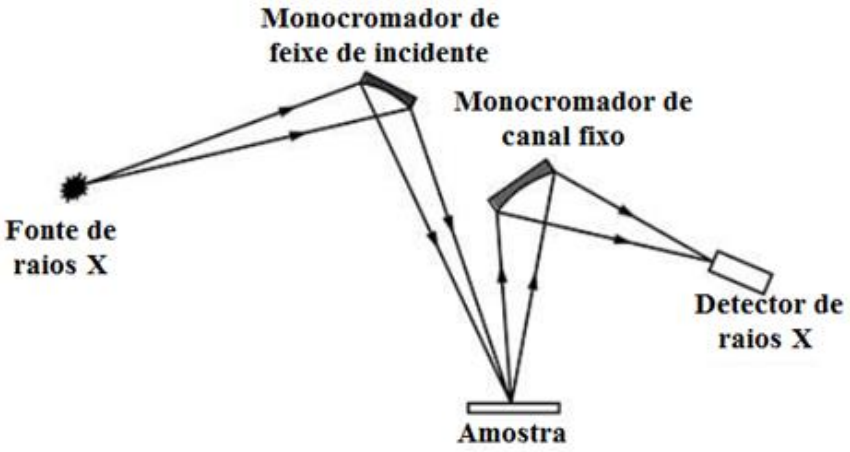

Figura 2: Esquema de um analisador por MWDXRF. Adaptado.[8]

Basicamente, o funcionamento desta técnica ocorre da seguinte maneira:

A amostra a ser analisada é colocada em uma célula analítica, a qual é posicionada devidamente na aparelhagem utilizada. Uma fonte de raios X emite radiação até um monocromador, que é uma espécie de filtro e atua selecionando e deixando passar apenas a radiação no comprimento de onda (λ) desejado. Então, quando os raios X chegam ao monocromador, eles são separados com base em seus diferentes λ e somente um feixe monocromático com um λ adequado para excitar os elétrons da camada K do enxofre é direcionado e incidido na amostra. Ao receber tal energia, o enxofre emite radiação fluorescente do tipo Kα, com λ = 0,5373nm, a qual é captada por um monocromador de canal fixo, também conhecido como analisador, que tem a função de enviar a intensidade (contagens por segundo) da emissão fluorescente na região de raio X até um detector, onde é aplicada em uma equação de calibração para que, dessa maneira, seja convertida na concentração de enxofre – em ppm – na amostra.[7;8]

Além disso, outros fatores positivos envolvidos no método ASTM D7039 são o curto tempo de análise – geralmente o tempo de análise para cada amostra é cerca de cinco minutos –, a simplicidade na preparação da amostra, uma vez que basta vertê-la para uma célula analítica e colocar no equipamento analisador, e o fato de dispensar o uso de gases consumíveis e de altas temperaturas.[8]

Pensando em atender as exigências do método ASTM D7039, a XOS, uma empresa nova-iorquina considerada a fabricante líder de analisadores de raios X, desenvolveu equipamentos que permitem a determinação de enxofre em diversos produtos petrolíferos, desde os que apresentem uma elevada concentração deste

elemento – óleo combustível pesado e petróleo bruto, por exemplo – até aqueles que possuam um teor ultrabaixo de enxofre – como diesel e gasolina.[23]

Dentre os analisadores de enxofre produzidos pela XOS, encontra-se o *Sindie 2622*, o qual opera em conformidade com os métodos ASTM D2622 (*Método de ensaio padrão para Enxofre em derivados de petróleo por espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda*), ISO 20884 (Determinação do teor de enxofre de combustíveis automotivos por espectrometria de fluorescência de raios X dispersiva de comprimento de onda) e ASTM D7039.[23]

2.4.1 SINDIE 2622 – ANALISADOR DE ENXOFRE DA XOS

Sindie é uma linha de equipamentos destinados à determinação do teor de enxofre em produtos petroquímicos, a qual foi desenvolvida pela XOS. Esta empresa, até o momento, já conta com sete diferentes tipos de analisadores de enxofre em sua produção, sendo um deles o Sindie 2622, cuja imagem está representada na Figura 3.[23]

Figura 3: Analisador de enxofre Sindie 2622 da XOS.[23]

Apesar do nome, este equipamento não permite determinar enxofre apenas pela norma ASTM D2622, ele também é compatível com os métodos ASTM D7039 e ISO 20884, o que o torna bastante versátil e apto a realizar análise de enxofre total nos mais variados produtos petroquímicos. De acordo com sua fabricante, o Sindie 2622 foi desenvolvido para analisar desde diesel e gasolina com baixo teor de enxofre até materiais com elevadas concentrações deste ametal, como óleo combustível pesado e petróleo bruto, por exemplo. A XOS garante que, apesar da quantidade de enxofre

presente na amostra, o Sindie 2622 irá fornecer resultados com exatidão e precisão asseguradas.[23]

O Sindie 2622 é um analisador de bancada, que, além de ocupar pouco espaço físico, apresenta a vantagem de não precisar de muitas exigências para operar, visto que requer somente energia elétrica para funcionar, dispensando o uso de gases de conversão, elementos de aquecimento e tubos ou colunas de quartzo.[23]

Outro aspecto positivo atrelado ao Sindie 2622 é a facilidade de manuseio. Sua tela, sensível ao toque, mostra de maneira clara e objetiva todas as opções disponíveis no equipamento, sendo necessário apenas clicar e selecionar o que se deseja: método (*Mode*); faixa de trabalho (*Range*); configurações (*Configure*), onde há mais alternativas, como visualizar o histórico de medições, preparar o aparelho para calibração ou, ainda, escolher a curva de calibração mais adequada à amostra a ser analisada. A Figura 4 exemplifica como é o visor deste equipamento.

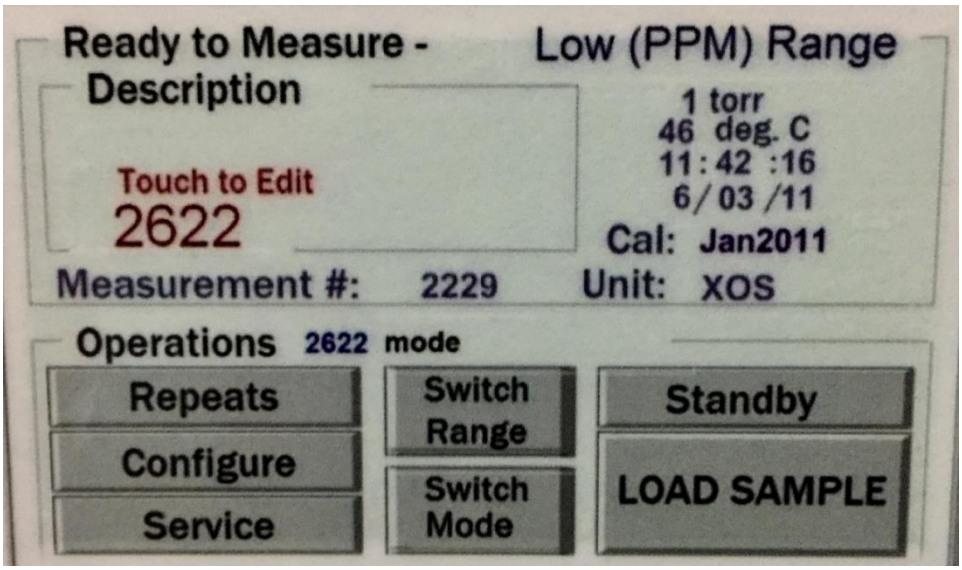

Figura 4: Visor do Sindie 2622.[23]

Ademais, o procedimento de medição do Sindie 2622 também é bastante simples, pois o único trabalho que o analista tem durante a análise da amostra é transferi-la (sem a necessidade de uma etapa anterior de preparo) a um recipiente apropriado – denominado copo amostral –, preenchendo-o até a marca indicada no seu interior, o que equivale a aproximadamente 10 mL. Após esta etapa, utilizando uma película de poliéster translúcida, com resistência térmica e propriedades de isolamento – o *Mylar* –, e um lacre do mesmo material que o copo amostral, esse é vedado e, a

seguir, posicionado devidamente no interior do equipamento, o qual precisa estar previamente ajustado com o método, a faixa de trabalho e a curva de calibração em apropriadas ao material em estudo. O analista, então, pode nomear a amostra usando o teclado contido na tela do Sindie e, por fim, dar início à medição clicando no botão "LOAD SAMPLE", mostrado na Figura 4.[23]

Após alguns minutos – geralmente cinco (300 s) – aparecerá um valor numérico na tela, o qual, caso haja alguma impressora conectada ao equipamento, será automaticamente impresso ao fim da medição, juntamente com outras informações acerca da leitura. Este número já é o resultado final da análise, ou seja, não é necessário realizar cálculos ou conversões, o próprio equipamento informa diretamente a concentração de enxofre na amostra.[23]

Durante o tempo de medição, é o equipamento que faz tudo sozinho. A Figura 5 ilustra o que ocorre no interior do Sindie 2622 enquanto a amostra é analisada.

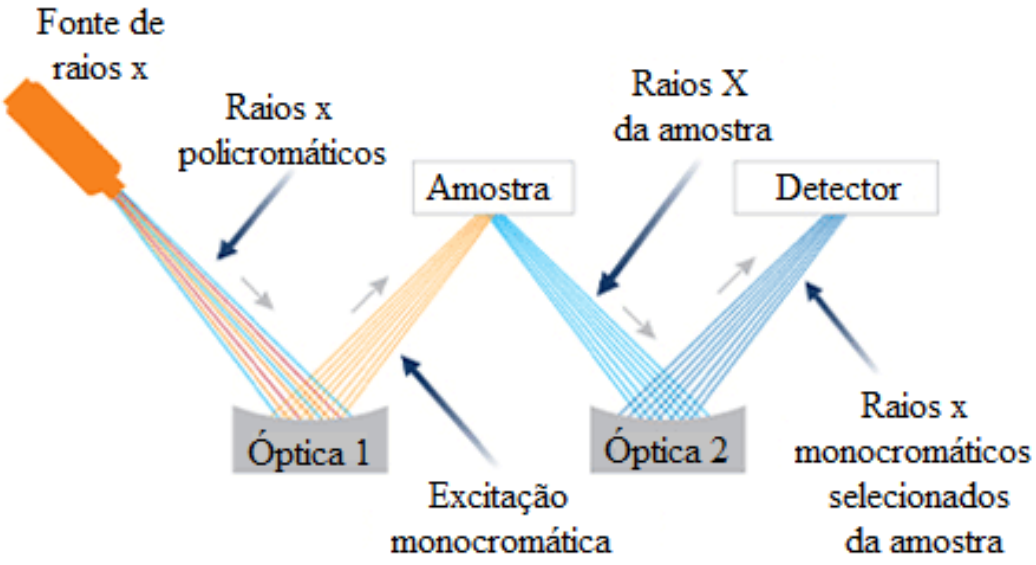

Figura 5: Esquema de funcionamento do Sindie 2622. Adaptado.[22]

O Sindie 2622 é um analisador de enxofre por fluorescência de raios X dispersiva de comprimento de onda monocromático (cuja sigla em inglês é MWDXRF). Devido a isso, este aparelho é equipado com duas ópticas de cristal duplamente curvadas, as quais são responsáveis por aprimorar a instrumentação convencional de WDXRF, uma vez que se baseiam em difração e permitem a passagem de feixes de raios x monocromáticos altamente intensos e em uma estreita faixa de comprimento de onda.[22;23]

Dessa forma, o esquema da Figura 5 pode ser explicado da seguinte maneira:

Uma fonte de raios x, de baixa potência, emite radiação policromática em direção à primeira óptica de cristal duplamente curvada, que tem a função de excitar o analito. Então, ao receber os raios x policromáticos, essa óptica cria um intenso feixe de excitação monocromático ideal, o qual maximiza o sinal desejado ao mesmo tempo em que minimiza as interferências de radiação, melhorando a sensibilidade.[22;23]

O feixe originado na primeira óptica é focado em um pequeno ponto da amostra e, ao atingi-la, promove sua excitação. A radiação emitida durante este processo é direcionada à segunda óptica de cristal, cuja responsabilidade é selecionar apenas os comprimentos de onda de raios x característicos de interesse. Por fim, os raios x monocromáticos selecionados são enviados a um detector, onde são convertidos à resposta analítica, isto é, ao resultado do teor de enxofre na amostra.[22;23]

Equipamentos que operam fundamentados na MWDXRF fornecem vantagens frente aos sistemas convencionais WDXRF. Uma delas é o fato de que a relação sinal-fundo é melhorada quando se emprega a excitação monocromática da amostra. Outro benefício que a configuração MWDXRF apresenta é que a capacidade de focalização da óptica de coleta permite o uso de um detector contador de raios X de área pequena, o que resulta em um baixo ruído do detector e garante uma maior confiabilidade.[22]

Além disso, a excitação monocromática também fornece quantificação simplificada e correção de efeito de matriz, bem como permite analisadores *on-line* robustos e de baixa manutenção, com limites de detecção drasticamente mais baixos e tempos de resposta mais rápidos.[22]

Sendo assim, o equipamento Sindie 2622 foi testado para realizar análises em benzeno através do método ASTM D7039. Conforme a legislação, essa matriz deve apresentar uma concentração de enxofre extremamente baixa – inferior a 1 ppm. Embora a norma ASTM D7039 descreva um limite de quantificação de 3,2 ppm, a XOS garante que seu equipamento apresenta um LD de 0,15 ppm.[23] Portanto, fez-se interessante a realização dos testes que serão abordados mais adiante.

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Qualquer empresa, independentemente do segmento, deve funcionar se baseando no controle de qualidade (CQ) apropriado ao seu setor de atuação. Explicando resumidamente, o CQ é um conjunto de atividades realizado com a finalidade de verificar se os serviços, processos ou produtos estão sendo entregues aos clientes com suas devidas especificações técnicas, ou seja, se atendem os padrões de qualidade previamente definidos a eles.[24]

No âmbito dos laboratórios analíticos a realidade não é diferente, visto que cada vez mais é exigido que estes locais atestem a qualidade de suas medições químicas através de fatores, como comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, por exemplo.[12;25] Diante disso, para garantir que o CQ desses setores seja devidamente mantido e seguido, se faz crucial a escolha de métodos analíticos adequados a cada procedimento oferecido pelo laboratório.[9;24]

Para que um método analítico possa ser empregado na rotina dos laboratórios, é indispensável que este esteja em conformidade com os órgãos responsáveis por normalizar as técnicas analíticas, como a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) e a ASTM (*American Society for Testing and Materials*), por exemplo.[8;12] Além disso, os métodos escolhidos precisam ser avaliados a fim de verificar se, ao serem executados no ambiente em questão, com os equipamentos e materiais ali disponíveis, fornecem resultados confiáveis.[25;26]

Então, quando se pretende implementar um método normalizado à rotina do laboratório, é necessário, primeiramente, comprovar sua eficiência.[26] Para isso, realiza-se um processo denominado validação, o qual, através de estudos experimentais em laboratório, aliados a testes analíticos, garante que o método avaliado atende as respectivas exigências analíticas, assegurando, assim, que os resultados por ele obtidos são confiáveis, reprodutíveis e adequados às finalidades pretendidas.[9;10;14]

Entretanto, não é somente na implementação de métodos analíticos que a validação se faz necessária. É preciso realizar este processo sempre que:[26]

- Deseja-se incorporar um método não normalizado à rotina laboratorial;
- Um método for criado pelo próprio laboratório;

- Houver a transferência de um método de um laboratório para outro (mudança de ambiente);
- Pretender usar métodos normalizados em análises que não se enquadram nos escopos aos quais foram desenvolvidos – executar o método com equipamentos diferentes ou em amostras com uma matriz diferente, por exemplo;
- Forem feitas modificações ou ampliações em métodos normalizados.

O interesse nos processos de validação está crescendo cada vez mais em virtude da, também crescente, ênfase da indústria aos programas de controle de qualidade. Isto é explicado pelo fato de que a validação de métodos analíticos é considerada a primeira etapa para a garantia da qualidade em laboratórios, sendo fundamental para um desempenho eficiente das atividades de rotina.[9;26]

A principal vantagem da validação de métodos analíticos é o grau de confiança por ela estabelecido, o qual vale, não somente para o laboratório desenvolvedor, mas também se estende aos clientes que usufruem de seus serviços. No entanto, este não é o único motivo que justifica a importância de validar métodos analíticos. Além da garantia de qualidade, muitos outros benefícios são provenientes deste procedimento, por exemplo: otimização do processo; redução de custos na qualidade; minimização nas chances de falhas; aprimoramento na eficiência e na produtividade; aumento da produção; maior conscientização dos funcionários sobre os processos; entre outros.[26]

Para que a validação cumpra com seus objetivos, todos os materiais empregados no procedimento – equipamentos, instrumentos, vidrarias – precisam, obrigatoriamente, estar: dentro das especificações, funcionando corretamente e calibrados. Outro ponto essencial a tal processo é que ele seja realizado por profissionais competentes, com conhecimento suficiente na área em questão e capazes de tomar decisões apropriadas durante a realização do processo e interpretar corretamente os resultados obtidos.[14;25]

No Brasil, a validação de métodos analíticos é feita com base nos processos descritos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), na "*Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003*", ou conforme o documento "*DOQ-CGCRE-008, de junho de 2020*" disponibilizado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia).[10;12] Estes dois guias citam que a validação de um método analítico é feita através da verificação de determinados parâmetros, que são: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, tendência ou

exatidão, precisão e robustez, sendo este último opcional. Desta forma, ao serem analisados em conjunto, estes parâmetros são os responsáveis por verificar se o método proposto é ou não adequado para a finalidade desejada.[15]

Contudo, de acordo com a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, quando a validação é realizada porque houve uma modificação em um método normalizado, os parâmetros a serem avaliados vão depender da natureza das alterações feitas, ou seja, não será preciso analisar todos os sete parâmetros descritos anteriormente, somente aqueles que forem significativos às adequações efetuadas ao uso pretendido.[10;11;13;14;15] Para exemplificar, pode ser citado o caso de um método sendo adaptado para análises qualitativas em nível traço, o qual dispensa a avaliação da linearidade. Outro exemplo a ser tomado é o de que não precisam ser feitos testes interlaboratoriais para validar métodos que estão em desenvolvimento para atenderem análises em laboratórios específicos.[10]

Geralmente, o que dita quais testes devem ser feitos nesses casos é o controle de qualidade interno da empresa com base no que consta nos documentos oficiais da ANVISA ou do INMETRO.[24]

2.5.1 SELETIVIDADE

Este termo, muitas vezes, também é chamado de especificidade, como se ambos fossem equivalentes, porém tal relação não está correta. Seletivo é a definição dada ao método que, apesar de produzir respostas para diversos compostos químicos, permite que o sinal do analito seja distinguido dos demais. Em contrapartida, específico é aquele método capaz de fornecer resposta para uma única substância de interesse, ou seja, ele ignora todos os sinais provenientes de compostos que não sejam o analito.[10;25]

Tendo em vista que há um número muito pequeno de métodos analíticos aptos a serem considerados específicos, a IUPAC (sigla em inglês para União Internacional de Química Pura e Aplicada) sugere que seja utilizado somente o termo seletividade, a fim de evitar possíveis conflitos na terminologia.[10] Sendo assim, esse tópico tratará exclusivamente da seletividade, abordando sua definição, a importância em avaliar este parâmetro e de que modo fazer isto.

De acordo com a ANVISA, a seletividade é definida como a capacidade que o método tem de medir exatamente um determinado analito na presença de outros compostos, como impurezas, produtos de degradação, demais constituintes da matriz e, até mesmo, substâncias com propriedades similares.[12] Este é o primeiro parâmetro a ser avaliado durante o processo de validação de um método analítico, pois, além de ser necessário verificar se o método proposto medirá somente o que se pretende mensurar, o sucesso de outros parâmetros, como linearidade, precisão e exatidão, dependem da seletividade, isto é, se o método não for seletivo, não adianta prosseguir com a validação, visto que esses três fatores já estarão automaticamente comprometidos.[10;13]

A avaliação da seletividade pode ser feita por diversas maneiras, sendo uma delas a comparação entre a matriz isenta do analito e a mesma matriz contendo a substância de interesse (padrão). Entretanto, nem sempre é possível obter a matriz sem a presença do analito; neste caso, a análise da seletividade é realizada através de uma técnica conhecida como método de adição de padrão.[10]

O método de adição de padrão é executado por meio da construção de duas curvas analíticas, sendo que em uma delas somente o analito está presente, enquanto que na outra há a matriz contendo o analito. Quando estas curvas estão prontas, elas são sobrepostas entre si e, caso sejam paralelas, pode-se concluir que o método é seletivo, visto que tal resultado indica que a matriz e seus componentes não interferem na determinação do analito.[10;13]

Além desses, há outros procedimentos que podem ser empregados no estudo seletividade, sendo possível encontrar alguns deles no documento “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos” do INMETRO (DOQ-CGCRE-008), onde cita que a seletividade também pode ser avaliada através de:[13]

- Uma análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos já validados;
- Análises em amostras contendo o analito e vários possíveis interferentes em concentrações conhecidas.

O primeiro teste permite verificar se o método proposto está apto a identificar e quantificar a substância de interesse na presença de interferentes, enquanto que o segundo é feito com o intuito de avaliar o efeito de interferentes, investigando se eles

acentuam ou inibem a detecção e/ou quantificação do analito. Tais ensaios são significativos porque o ideal é que o método em processo de validação forneça um nível de seletividade sem interferências expressivas.[13]

2.5.2 LINEARIDADE

A linearidade de um método analítico se refere à capacidade que esse tem, quando operando dentro de um intervalo especificado, de demonstrar que os resultados por ele obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.[12;13;25] Tal intervalo é definido como faixa de trabalho, a qual tem seu extremo mínimo correspondente ao limite de quantificação do método, seu extremo máximo referente à maior concentração de analito na amostra que o procedimento consegue fornecer resposta com o menor grau de incerteza e seu centro apresentando a concentração de analito que é esperada conter na amostra.[13]

Todavia, na maioria das vezes não se sabe a correlação do sinal medido – ou da resposta obtida – com a concentração do analito. Devido a isso, a fim de estabelecer uma relação matemática entre estas duas grandezas, amostras contendo o analito em concentrações conhecidas (chamadas de padrões) são analisadas pelo método em avaliação, e os sinais fornecidos por cada uma delas são relacionados com suas respectivas concentrações em uma ferramenta analítica denominada curva de calibração.[10]

Para construir uma curva de calibração com o menor desvio possível nos sinais analíticos, devem ser utilizados, no mínimo, cinco padrões e cada um deles precisa ser analisado, pelo menos, três vezes. O ideal é optar por concentrações que estejam uniformemente distribuídas na faixa de trabalho pretendida. Geralmente selecionam-se padrões com baixas, médias e altas concentrações, sendo a menor delas próxima, ou igual, ao limite de quantificação do método.[25]

Após a leitura de todos os padrões, um gráfico é plotado. Para isto, os sinais obtidos nas medições são distribuídos no eixo y, enquanto que as respectivas concentrações são dispostas no eixo x. Caso existir uma relação linear entre estes valores, eles podem ser avaliados por uma técnica estatística denominada método dos

quadrados mínimos, que fornecerá a equação da regressão linear, popularmente conhecida como equação da reta:[12;13;26]

$$y = ax + b \qquad \textbf{(1)}$$

Onde:

y = resposta medida na leitura do padrão;

x = concentração do analito na amostra;

a = coeficiente angular (inclinação da curva = sensibilidade);

b = coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando x = 0).

O coeficiente angular traz uma importante informação: ele indica o quão sensível é o método.[13] Quando se fala em sensibilidade, refere-se à capacidade que o procedimento tem de distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Ela é calculada através da seguinte relação:[11;13]

$$S = \frac{dy}{dx} \qquad \textbf{(2)}$$

Onde:

dy = variação entre as respostas medidas ($y_n - y_1$)

dx = variação entre as concentrações dos padrões ($x_n - x_1$)

Se o método analítico for bastante sensível, basta uma pequena diferença nas concentrações de analito para gerar uma grande variação no valor das respostas obtidas nas leituras das amostras. Sendo assim, quanto maior for o coeficiente angular, ou seja, quanto mais inclinada for a curva, mais sensível será o método.[13] Em hipótese alguma o valor desta variável pode ser zero.[11]

Outra informação que também pode ser extraída da curva de calibração é o coeficiente de correlação linear, simbolizado por "R^2", que auxilia na análise da qualidade da reta obtida, verificando o quanto ela se faz adequada como modelo matemático.[10] Em outras palavras, este coeficiente aponta se o método analítico apresenta uma linearidade aceitável. Ele pode ter valores de 0 a 1.

Um R^2 maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados, visto que quanto mais se aproximar de 1,0, menores serão a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes angular e linear. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99, enquanto que o INMETRO considera admissível um valor acima de 0,90.[10]

A Figura 6 exemplifica como seria a imagem de uma curva de calibração obtida com uma excelente linearidade, onde o valor do coeficiente de correlação linear resultou bem próximo a 1,0; todos os pontos se encontram acima da reta traçada e com inclinação diferente de zero.

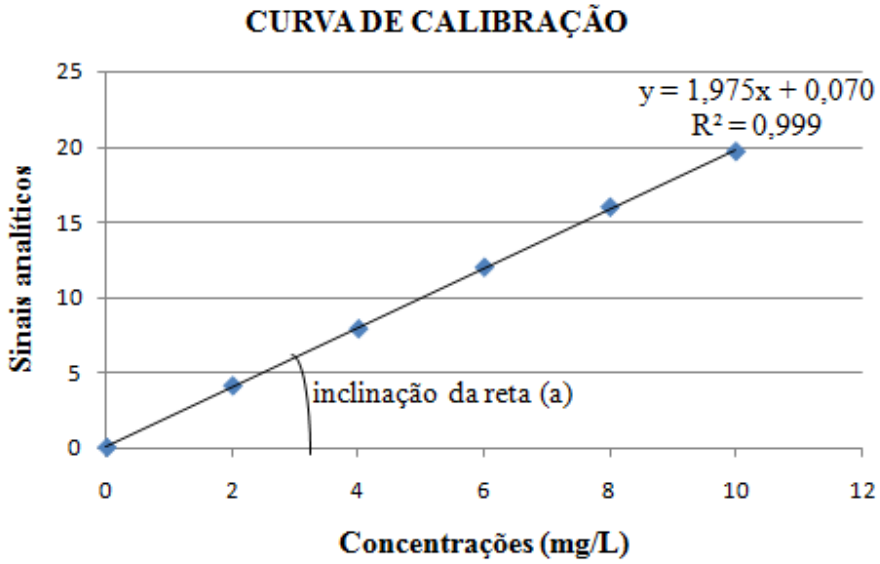

Figura 6: Exemplo de curva de calibração.

É importante que haja uma relação linear em toda a faixa estabelecida para o método.[24] Porém, se isto não for observado, é necessário realizar testes a fim de eliminar a causa da não linearidade. Uma possível correção a ser feita nestes casos é restringir a faixa de trabalho, a qual precisa cobrir apenas as concentrações próximas às esperadas de amostras de teste.[25] Quando se constrói uma curva de calibração empregando amplos intervalos de concentrações, a incerteza da medição aumenta.

2.5.3 LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção (LD) de um método analítico é definido como a *menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não*

necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Ele é expresso em forma de concentração e sua unidade será igual a das concentrações das amostras que estão em análise.[9;10;11;13;26]

De acordo com o guia "Diretrizes para validação e verificação de métodos de teste quantitativos e qualitativos", cuja primeira versão foi publicada em 2004, o LD só é um parâmetro expressamente mandatório quando o método em análise tem o objetivo de medir analitos em concentrações muito baixas, como elementos traço, por exemplo. Nestes casos, é importante que o analista esteja ciente de que deve fazer determinações do limite de detecção para cada matriz em estudo, visto que o LD de um método pode variar em função da amostra.[25]

Há diversos procedimentos que possibilitam determinar o limite de detecção, e a escolha de qual deles utilizar é feita considerando as particularidades do método analítico em questão.[26] Avaliação visual, relação sinal-ruído, técnicas baseadas em parâmetros da curva de calibração ou métodos fundamentados na leitura do branco e no seu desvio padrão são exemplos desses procedimentos e uma breve discussão sobre eles será abordada a seguir.[13;25]

- Método visual:

Nesta técnica, o limite de detecção é considerado a menor concentração de analito capaz de produzir o efeito esperado pelo método – uma mudança de cor, por exemplo.[12;14]

A fim de determinar o LD através do método visual, amostras contendo o analito em concentrações conhecidas são analisadas, juntamente com o branco, até que uma solução contendo um teor mínimo de analito consiga ser diferenciada do branco com significativa confiabilidade. Para tal, são feitas sucessivas diluições.[13]

O método visual pode ser empregado tanto na análise de métodos não instrumentais quanto na de técnicas instrumentais, além de também ter aplicabilidade na determinação do limite de detecção de procedimentos qualitativos.[25]

- Método da relação sinal-ruído:

Esta abordagem só pode ser aplicada para métodos analíticos cujos sinais (ou respostas) apresentem ruído da linha de base, onde o limite de detecção é definido como

sendo, no mínimo, duas vezes o sinal da linha de base, ou seja, a relação sinal-ruído deve ser de pelo menos 2:1 para que seja considerada aceitável como estimativa do LD.[10;11;13;25]

A relação sinal-ruído é determinada mediante uma comparação entre os sinais medidos de amostras contendo o analito em baixas concentrações conhecidas e os ruídos produzidos pelo branco desta amostra. [10;11;13;25] É através destas comparações que é possível estipular qual é a menor concentração em que o analito pode ser identificado com confiança.

Contudo, para que o LD possa ser estabelecido pelo método da relação sinal-ruído, é fundamental que a região do ruído do branco seja a mesma do sinal medido pelas amostras analisadas, caso contrário, há chances de que os resultados obtidos por esta técnica não sejam válidos.[13]

- Método baseado em parâmetros da curva de calibração:

Segundo o INMETRO, há dois procedimentos que permitem determinar o limite de detecção de um método analítico a partir de sua curva de calibração – o simplificado e o completo.[13] Tendo em vista que o presente tópico consta apenas a nível de exemplificação, não se faz necessário abordar de maneira profunda todas as possíveis técnicas de determinação de LD. Sendo assim, somente o método simplificado será discutido neste item.

Para estabelecer o limite de detecção através da curva de calibração, utiliza-se a seguinte equação:

$$LD = \frac{3{,}3.\, s}{S} \qquad \textbf{(3)}$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta de dez leituras do branco (ou coeficiente linear da equação da reta – b) – quando o branco não gerar sinal, deve-se usar o desvio padrão do menor nível da curva de calibração como o valor de “s”;

S = sensibilidade (ou coeficiente angular da equação da reta – a).

Embora amplamente empregado, o método com base em parâmetros da curva de calibração fornece resultados mais confiáveis para análises ao nível de traços, uma vez que, para ensaios com o analito em altas concentrações, os valores de LD obtidos neste procedimento geralmente são informados acima dos reais.[13]

- Método baseado no desvio padrão do branco:

Uma das maneiras de calcular o limite de detecção a partir do branco da amostra é por meio da seguinte equação:[13]

$$LD = \bar{x} + t_{(n-1,1-\alpha)}.s \qquad \textbf{(4)}$$

Onde:

$\bar{x}$ = média dos valores dos brancos da amostra (depende da matriz);

t = abscissa da distribuição de *Student* (depende do tamanho da amostra e do grau de confiança);

s = desvio padrão amostral de dez leituras do branco da amostra (depende da matriz) – precisa ser diferente de zero, caso contrário este método não é válido e não pode ser aplicado para encontrar o LD.

Após definir o limite de detecção por meio de uma das técnicas citadas, ou qualquer outra que seja reconhecida pelos respectivos órgãos nacionais ou internacionais responsáveis por sua acreditação, é necessário, ainda, que se faça uma confirmação do valor encontrado. Para isto, amostras independentes, contendo o analito em concentrações próximas ao LD estabelecido, são analisadas pelo método em questão. Geralmente, seis replicatas são testadas e, caso em alguma delas não seja detectado o analito, é preciso fazer um processo de reavaliação do LD.[13]

2.5.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é definido como a *menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada quantitativamente, ou seja, medida com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas*.[7;13;15] Na prática, o LQ geralmente corresponde à menor concentração dos

padrões empregados para construir a curva de calibração (desconsiderando o branco).[13;24]

Da mesma maneira que o LD, o limite de quantificação também é descrito como uma concentração, a qual assume a mesma unidade das concentrações das amostras em análise. Embora seja possível estipular o LQ a partir o LD, o INMETRO afirma ser mais adequado fazer o oposto: calcular o LD partindo do valor de LQ, conforme a seguinte equação:[13]

$$LD = \frac{LQ}{3{,}3} \qquad (\mathbf{5})$$

A determinação do LQ de um método se faz pertinente, sobretudo, para ensaios quantitativos, principalmente aqueles em que o analito se encontra presente na amostra em concentrações muito baixas, próximas a zero.[14;26] E, após definir o valor deste parâmetro, é necessário realizar testes com amostras independentes – isto é, amostras que não foram utilizadas durante o procedimento de encontrar o LQ –, em concentrações semelhantes ao estabelecido limite de quantificação, a fim de verificar se a exatidão e a precisão alcançadas são satisfatórias.[10]

É possível estabelecer o LQ por meio de diferentes técnicas, as quais devem ser escolhidas de acordo com o tipo do método analítico em estudo. Os procedimentos aceitáveis para executar a determinação do LQ podem ser feitos, por exemplo, por meio de uma avaliação visual, com base na relação sinal-ruído, a partir da curva de calibração ou, ainda, considerando o desvio padrão do branco.[13;26]

O LQ pode ser determinado através de uma avaliação visual do mesmo modo que o LD é; este procedimento está descrito no item 2.5.3 e, portanto, não se faz necessário explicá-lo novamente. O método usado para definir o LQ com base na relação sinal-ruído também é o mesmo que consta em 2.5.3, empregado para a determinação do LD; a única diferença é que, enquanto na estipulação do LD a relação sinal-ruído é de, no mínimo, 2:1, na estimativa do LQ ela é, geralmente, de pelo menos 10:1.[10;13;14] Todavia, alguns documentos regularizados afirmam que, em função do método, também é possível que relações sinal-ruído de 6:1 e 5:1 sejam adotadas.[13]

Apesar de a técnica baseada na relação sinal-ruído ser uma das mais empregadas para estabelecer o LQ de um método, nem sempre ela é adequada. Procedimentos

analíticos de separação, como os cromatográficos e os eletroforéticos, por exemplo, apresentam condições que podem aumentar a relação sinal-ruído e, consequentemente, gerar resultados de LQ mais baixos que os verdadeiros.[10]

Diante disso, em alguns casos o ideal é utilizar o método que se baseia nos parâmetros da curva de calibração, o qual é considerado mais confiável estatisticamente e permite calcular o LQ através da equação a seguir:[10]

$$LQ = \frac{10.s}{S} \qquad (\mathbf{6})$$

Onde:

s = desvio padrão da resposta de dez leituras do branco (quando o branco não gerar sinal, deve-se usar o desvio padrão do menor nível da curva de calibração como o valor de "s");

S = sensibilidade (ou coeficiente angular da equação da reta – a –, que indica a inclinação da reta).

Entretanto, este método também possui limitações, visto que foi comprovado que, quando o teor de analito na amostra é alto, ele fornece valores de LQ acima dos reais. Assim, os resultados obtidos por meio desta técnica serão realmente confiáveis para métodos medindo o analito em nível traço na amostra.[13]

Além desses, outro exemplo de procedimento apto a fornecer o LQ é aquele feito com base no desvio padrão do branco, que emprega a seguinte equação:[13]

$$LQ = \bar{x} + 10.s \qquad \mathbf{(7)}$$

Onde:

$\bar{x}$ = média dos valores dos brancos da amostra (depende da matriz);

s = desvio padrão amostral de dez leituras do brancos da amostra ($s \neq 0$; depende da matriz);

10 = proposto pela IUPAC como valor padrão da equação, porém há a possibilidade de adotar os valores "5" ou "6", de acordo com o rigor analítico requerido.

Com isso conclui-se que o limite de quantificação de um método analítico é um parâmetro capaz de ser definido através de diversas técnicas. Contudo, é importante que o analista esteja ciente de que o valor encontrado para o LQ através de um determinado procedimento pode variar em virtude de alguns fatores, como a matriz ou o equipamento, por exemplo. Sendo assim, a determinação deste parâmetro precisa ser feita individualmente para cada matriz e sempre que método for realizado em um equipamento diferente do que aquele usual.[13]

2.5.5 TENDÊNCIA / EXATIDÃO

Este parâmetro é assim nomeado de acordo com o INMETRO, porém o termo mais popularmente conhecido é *exatidão*, o qual é atribuído pela ANVISA e é definido como sendo o grau de concordância entre os resultados obtidos por um método analítico e o valor considerado verdadeiro, ou seja, a exatidão indica o quão próximo a medição experimental está da real concentração de analito na amostra, o que a torna um parâmetro imprescindível para o propósito da validação.[9;10;14;25]

A tendência (ou exatidão) pode ser expressa como recuperação analítica, onde os valores experimentais são relacionados com o considerado verdadeiro através da seguinte equação:[13]

$$recuperação = \frac{valor\ experimental}{valor\ verdadeiro^{*}}\ x\ 100\ \% \qquad \textbf{(8)}$$

*Quando a exatidão for determinada a partir de um método analítico já validado (tópico que será abordado mais adiante), este termo deve ser substituído pela concentração do analito previamente estabelecida por tal método.

Existem limites definidos dentro dos quais a exatidão deve se enquadrar, com um determinado nível de confiança, para que seja aceita e, consequentemente, torne o método analítico válido. Tais limites dependem do procedimento em análise, e podem variar desde níveis mais elevados de concentração – denominados limites estreitos – até níveis de traços – considerados limites amplos.[10] Além disso, também é necessário que a verificação da exatidão seja feita de maneira adequada ao estudo em questão e conforme a legislação ou diretriz adotada.[10;12] Por exemplo, a ANVISA recomenda que este parâmetro seja verificado a partir de, no mínimo, nove determinações, realizadas

dentro do intervalo linear do método analítico, ou seja, envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto), com três replicatas em cada um deles.[10;12;14;26]

A determinação da exatidão deve ser feita só depois que a linearidade/intervalo linear e a seletividade do método tenham sido estabelecidas[12], e há diversas técnicas disponíveis para tal avaliação, dentre as quais as mais utilizadas são: uso de material de referência certificado (MRC), comparação com um método de referência (ou já validado), ensaios de recuperação, adição de padrão e participação em comparações interlaboratoriais.[10;13;15]

- Uso de materiais de referência certificados (MRC):

Fornecido por órgãos regulatórios, como, por exemplo, o IRMM e o NIST (siglas em inglês para Instituto de Materiais de Referência e Medições e Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, respectivamente), um MRC é um material utilizado como referência em métodos analíticos porque vem acompanhado de um certificado, no qual constam a concentração (ou outra grandeza) de um dado elemento ou grupo químico na matriz em questão e a incerteza associada a tal medição.[10]

Para determinar a exatidão por meio de um MRC, os resultados obtidos pelo método em análise, isto é, a média e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicata precisam ser comparados com os valores descritos no certificado do material de referência. Essa comparação pode ser feita através de diversos critérios, entre os quais podem ser citados os erros relativo e normalizado.[13]

O erro relativo é expresso em porcentagem e é calculado pela equação apresentada a seguir:[13]

$$ER = \frac{X_{lab} - X_V}{X_V} \; x \; 100 \qquad \textbf{(9)}$$

Onde:

ER = erro relativo, em %;

X_{lab} = valor obtido (ou média aritmética dos valores obtidos) experimentalmente;

X_V = valor adotado como verdadeiro (descrito no certificado do MRC usado).

Enquanto que o cálculo do erro normalizado é feito por meio da seguinte equação:

$$EN = \frac{X_{lab} - X_V}{\sqrt{(U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \qquad (\mathbf{10})$$

Onde:

EN = erro normalizado;

U_{lab} = incerteza expandida do resultado obtido experimentalmente;

U_{ref} = incerteza associada ao MRC (descrita no certificado).

Este erro é empregado quando o laboratório calcular a incerteza expandida do seu resultado e ela não ficar dentro do intervalo $X_{lab.} \pm U_{lab}$; e para que o resultado laboratorial seja considerado adequado, o valor calculado para o erro normalizado deve ser menor ou igual a um ($EN \leq 1{,}0$).[13]

O ideal seria sempre utilizar um MRC para avaliar a exatidão de um método analítico, entretanto, o alto custo desses materiais e a diversidade limitada de matrizes e analitos fazem com que seu uso fique restrito.[11]

- Comparação com um método de referência:

Quando esta técnica é a escolhida para determinar a exatidão de um procedimento analítico em desenvolvimento, um método de referência, ou seja, um método já validado (normalizado), que possui exatidão, precisão e nível de incerteza conhecidos, é empregado para analisar uma amostra, a qual também deve ser submetida ao procedimento que se deseja validar. Então, os resultados obtidos em ambas as análises são comparados, avaliando o grau de proximidade entre eles, isto é, o grau de exatidão do método em validação em relação ao de referência.[10;13]

Além de utilizar as mesmas amostras, as análises precisam ser feitas em replicata nos dois métodos, os quais são realizados separadamente e na faixa de concentrações na qual se pretende validar o método.[10;13]

A comparação dos resultados fornecidos pelos dois métodos em estudo pode ser feita por meio de várias técnicas diferentes, como os testes de hipótese, por exemplo,

que iniciam com a aplicação do Teste F seguida do emprego do teste *t* (*Student*).[9;13] O Teste F é a razão das duas variâncias (quadrado do desvio padrão) e avalia se essas grandezas são estatisticamente iguais ou diferentes. Enquanto que o teste *t* (*Student*) compara as médias dos resultados obtidos nos dois métodos, verificando se elas podem ser consideradas estatisticamente iguais.[27]

O Teste F é feito aplicando a seguinte equação:

$$F_{calc.} = \frac{variância\ de\ maior\ valor}{variância\ de\ menor\ valor} \qquad (\mathbf{11})$$

Depois disso, o valor de F calculado é comparado com o tabelado, usando a Figura 7.

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = Número de graus de liberdade* do numerador;
v_2 = Número de graus de liberdade* do denominador;
*Graus de liberdade = n – 1.

Figura 7. Valores tabelados de F para um nível de confiança de 95% (P = 0,05).[27]

O Teste t é feito em seguida, como um complemento ao Teste F, a fim de assegurar que o método em processo de validação apresenta uma boa exatidão. Quando o Teste F resulta em variâncias consideradas estatisticamente iguais, o valor de t é calculado de acordo com a seguinte equação:

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{comb} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \qquad (12)$$

Onde:

$\bar{x}_1$ = média das respostas obtidas pelo “método 1”;

$\bar{x}_2$ = média das respostas obtidas pelo “método 2”;

n_1 = número de replicatas lidas no “método 1”;

n_2 = número de replicatas lidas no “método 2”;

$$s_{comb} = \sqrt{\frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

Após calcular o valor t, utiliza-se a Figura 8 para compará-lo com o valor de t tabelado.

Valor de t para um intervalo de confiança de:	90%	95%	98%	99%
Valor crítico de |t| para P igual a:	0.10	0.05	0.02	0.01
Número de graus de liberdade:*				
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

*Nº graus de liberdade = $n_1 + n_2 - 2$

Figura 8. Valores tabelados para t.[27]

Porém, essa técnica tem uma limitação, visto que nem sempre um método de referência preexistente é encontrado, tornando-a inviável.[11]

- Ensaios de recuperação:

Nestes procedimentos, amostras reais são fortificadas com quantidades conhecidas do analito em, no mínimo, três concentrações diferentes – baixa, média e alta – da faixa de trabalho empregada no método em estudo. Então, elas são analisadas e seus resultados são comparados com os obtidos nas análises da amostra não fortificada.[11;13] Tal comparação irá informar a quantidade do analito recuperado no processo em relação à real quantidade desta substância presente na amostra. A recuperação é dada em porcentagem e seu cálculo é feito através da seguinte equação:[13]

$$Recuperação\ (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3}\ x\ 100 \qquad (\mathbf{13})$$

Onde:
C_1: concentração do analito na amostra fortificada;
C_2: concentração do analito na amostra não fortificada;
C_3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Apesar de muito empregada, a técnica dos ensaios de recuperação tem um pequeno empecilho o qual deve ser considerado durante sua execução. A intenção da fortificação da amostra é simular condições reais, sem interferir de maneira significativa nas interações já existentes na mesma. Entretanto, isto nem sempre é possível, devido ao fato de que a substância adicionada para fortificar a amostra não está necessariamente na mesma forma em que se encontra o analito, o que pode resultar em avaliações errôneas acerca da recuperação.[10;11;13] Por exemplo, se os analitos adicionados na fortificação estiverem em uma forma mais facilmente detectável, o resultado da recuperação será considerado melhor do que realmente é.[10;13]

Sendo assim, é importante tentar adicionar o menor volume possível da solução fortificante a fim de evitar interferências e alteração na matriz da amostra.

Outro ponto que precisa ser considerado nestes ensaios é o estabelecimento de critérios de aceitação para recuperação, os quais são disponibilizados pelas legislações de cada área de atividades e, geralmente, estão relacionados com a concentração.[13] A

Tabela 2 apresenta os critérios sugeridos pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, sigla em inglês), publicados em 2016.

Tabela 2. Critérios de aceitação para recuperação.[28]

Analito (%)	Fração mássica (C)	Unidade	Recuperação média (%)
100	1	100 %	98-102
10	10^{-1}	10 %	98-102
1	10^{-2}	1 %	97-103
0,1	10^{-3}	0,1%	95-105
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	90-107
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	80-110
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	80-110
0,00001	10^{-7}	100 ppb (µg/kg)	80-110
0,000001	10^{-8}	10 ppb (µg/kg)	60-115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb (µg/kg)	40-120

- Adição de padrão:

Nesta técnica, antes do procedimento de preparo da amostra, o analito é adicionado em uma matriz da mesma, a qual já contém esta substância em sua composição, porém em uma concentração ainda indeterminada. Esta adição é feita com quantidades conhecidas do analito e em diferentes níveis de concentração, sendo geralmente adicionados 25, 50 e 100% da concentração esperada de analito na amostra. Então, tanto a amostra pura quanto as que tiveram adição de padrão são analisadas a fim de relacionar as quantidades medidas com as adicionadas.[10]

- Comparações interlaboratoriais:

Neste método, a mesma amostra é analisada em laboratórios diferentes, sob condições operacionais predeterminadas, e os resultados obtidos são comparados. Geralmente, para que estudos interlaboratoriais sejam válidos, é necessário que pelo menos oito laboratórios estejam envolvidos com o desenvolvimento do método em análise. Todavia, caso seja impossível alcançar este número de colaboradores, é aceito fazer este procedimento com cinco participantes, que é o mínimo absoluto.[11]

Além da obrigatoriedade de unir um número mínimo de laboratórios, outro impasse desta técnica é garantir a estabilidade tanto da amostra quanto do analito, ou seja, é difícil assegurar que a concentração da substância a ser medida permaneça a mesma durante todo o período do ensaio interlaboratorial. Em virtude disto, quando a exatidão de um método a ser validado é determinada por estudos colaborativos, usa-se a análise da variância (realizada pelo Teste F, por exemplo), a qual irá indicar se há diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos laboratórios envolvidos.[11]

2.5.6 PRECISÃO

Este parâmetro representa o grau de concordância entre os resultados obtidos durante uma série de medições independentes realizadas em amostragens múltiplas de uma mesma amostra, preparadas conforme indicado no método analítico em estudo e analisadas sob condições nele prescritas.[14;24;26]

A maneira mais comum de expressar a precisão numericamente é por meio de medidas de imprecisão, como desvio padrão e coeficiente de variação, por exemplo.[15] No caso do desvio padrão, há uma relação inversamente proporcional entre ele e a precisão, ou seja, um alto valor de desvio padrão indica que a precisão do método analítico em questão é baixa, e vice-versa.[25] O coeficiente de variação (também conhecido como desvio padrão relativo), por sua vez, está relacionado com a concentração do analito na amostra[9], sendo geralmente expresso em porcentagem e calculado através da seguinte equação:

$$CV = DPR = \left(\frac{DP}{CMD}\right) X\ 100 \qquad \textbf{(14)}$$

Onde:

CV = coeficiente de variação, em %;

DPR = desvio padrão relativo;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

O valor máximo aceitável para o coeficiente de variação muda de acordo com o método analítico e sua finalidade, com a concentração do analito na amostra e com o tipo de matriz. Normalmente, o DPR de métodos empregados na quantificação de compostos em macro quantidades não pode passar de 2%, enquanto que os métodos usados para análise de traços ou impurezas podem apresentar DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.[10]

A fim de que a precisão de um método seja determinada fidedignamente, é preciso que o procedimento para avaliá-la seja feito nas mesmas condições em que o método em questão opera e usando materiais de teste análogos às amostras que serão analisadas rotineiramente pelo mesmo, os quais devem ser preparados conforme descrito no método em análise.[25;26]

Quando um método analítico está em processo de validação em somente um laboratório, o ideal é que a precisão seja obtida por meio de análises feitas em replicata de amostras preparadas independentemente de uma amostra de laboratório, de um material de referência certificado (MRC) ou de um material de referência (MR), sob condições operacionais normais de longo prazo.[25]

A precisão pode ser expressa através de três maneiras diferentes – repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade[10;13] – as quais serão brevemente abordadas a seguir.

2.5.6.1 REPETIBILIDADE

Expressar a precisão na forma de repetibilidade significa que este parâmetro foi avaliado por meio de um conjunto de medições as quais foram realizadas sob condições idênticas, ou seja, somente um analista, trabalhado dentro de um laboratório específico, foi responsável por executar uma série de análises em uma mesma amostra usando o mesmo método e empregando os mesmos equipamentos, reagentes e condições operacionais, em um curto intervalo de tempo.[10;12;24] Em virtude destas características, a repetibilidade também é conhecida como precisão intra-ensaios.[14;26]

A repetibilidade é apresentada quantitativamente em termos da dispersão dos resultados e sua determinação pode ser feita de diferentes maneiras, como, por exemplo, através da análise de padrões ou de materiais de referência ou, ainda, por meio da

técnica de adição do analito ao branco da amostra, a qual deve ser feita em diversas concentrações dentro da faixa de trabalho em questão. No entanto, independente do procedimento adotado para determinar a repetibilidade, é importante que um número considerável de medições seja efetuado, visto que quanto maior for o número de replicatas, melhor será a avaliação da dispersão do método. Além disso, quando poucas repetições são feitas, torna-se difícil estabelecer um desvio padrão confiável.[13]

Sendo assim, a ANVISA, bem como outros órgãos regulamentadores, recomendam que a avaliação da repetibilidade seja feita por meio de, no mínimo, nove determinações cobrindo o intervalo linear preestabelecido para o método em questão, ou seja, usando três níveis de concentração – baixo, médio e alto – e efetuando três medições em cada um deles. Outra maneira possível de verificar a repetibilidade é fazendo pelo menos seis determinações a 100% de uma única concentração de teste.[12;14;26]

O INMETRO aconselha que os laboratórios se baseiem em orientações normativas da legislação referente às suas respectivas áreas de atuação para estabelecer critérios de aceitação para o desvio padrão relativo obtido na avaliação da repetibilidade.[13] Geralmente, tais critérios são relacionados com a concentração, conforme mostrado na Tabela 3, disponibilizada pela AOAC.

Tabela 3. Critérios de aceitação para repetibilidade sugeridos pela AOAC.[28]

Analito (%)	Fração mássica (C)	Unidade	Desvio padrão relativo (%)
100	1	100%	1,3
10	10^{-1}	10%	1,9
1	10^{-2}	1%	2,7
0,1	10^{-3}	0,1%	3,7
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	11
0,00001	10^{-7}	100 ppb (µg/kg)	15
0,000001	10^{-8}	10 ppb (µg/kg)	21
0,0000001	10^{-9}	1 ppb (µg/kg)	30

2.5.6.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Esta medida indica a variabilidade dos resultados em um laboratório, visto que, apesar de ser determinada de maneira semelhante à repetibilidade (usando os mesmos níveis de concentração e o mesmo número mínimo de determinações), sua avaliação é feita mediante alguma alteração intralaboratorial, isto é, diversas análises de uma mesma amostra são realizadas em um único laboratório, empregando o mesmo procedimento, mas ocorrendo em dias diferentes e executadas por analistas e/ou equipamentos distintos.[12;14]

Normalmente, a precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o ideal é que seja calculada somente depois de eliminar os resultados mais discrepantes. As maneiras de determinar e controlar este parâmetro variam de acordo com sua aplicação, bem como com o método de ensaio. Um exemplo é aplicar um gráfico de controle do desvio padrão para replicatas de amostras e padrões estáveis ao longo do tempo; utiliza-se o desvio padrão porque ele pode ser usado para calcular a incerteza de medição, uma vez que é considerado a dispersão mais realista do método.[13]

Em virtude dessa significativa relevância do desvio padrão, recomenda-se verificar se seu valor é substancialmente influenciado por alguma das diferentes condições testadas durante a avaliação da precisão intermediária.[13]

2.5.6.3 REPRODUTIBILIDADE

Também denominada precisão interlaboratorial, a reprodutibilidade representa a concordância entre os resultados obtidos nas análises de uma mesma amostra, feitas pelo mesmo método, sob diferentes condições de ensaio, ou seja, laboratórios, analistas, equipamentos e épocas diferentes.[12;14] Ela é geralmente empregada em estudos colaborativos que têm a finalidade de padronizar métodos analíticos, e sua determinação é dada a partir de, no mínimo, sete medições da mesma amostra.[12;14;26]

Assim como no caso da repetibilidade, também se faz importante estabelecer critérios de aceitação para o desvio padrão relativo resultante na avaliação da reprodutibilidade.[13] Para exemplificar, a Tabela 4 apresenta os critérios sugeridos pela AOAC.

Tabela 4. Critérios de aceitação para reprodutibilidade sugeridos pela AOAC.[28]

Analito (%)	Fração mássica (C)	Unidade	Desvio padrão relativo (%)
100	1	100%	2
10	10^{-1}	10%	3
1	10^{-2}	1%	4
0,1	10^{-3}	0,1%	6
0,01	10^{-4}	100 ppm (mg/kg)	8
0,001	10^{-5}	10 ppm (mg/kg)	11
0,0001	10^{-6}	1 ppm (mg/kg)	16
0,00001	10^{-7}	100 ppb (μg/kg)	22
0,000001	10^{-8}	10 ppb (μg/kg)	32
0,0000001	10^{-9}	1 ppb (μg/kg)	45

2.5.7 ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico avalia a capacidade que esse tem de não ser afetado quando algumas de suas condições experimentais sofrem pequenas, mas deliberadas, variações.[12;14;15] Este parâmetro indica a confiabilidade na estabilidade do método ao longo de uma aplicação de rotina e sua verificação é opcional, sendo tipicamente realizada antes do processo de validação, isto é, durante a fase de desenvolvimento do método, na etapa de otimização.[13]

A determinação da robustez pode ser feita através de experimentos estatísticos, como o planejamento de Plackett-Burman, por exemplo, o qual, além de avaliar este parâmetro, também define o tipo de influência que cada uma das variações feitas nas condições experimentais do método causou nos resultados finais.[13] Quando a robustez de um método quantitativo está sendo avaliada, os mesmos critérios empregados na verificação da exatidão são usados para analisar o impacto que as variações condicionais tiveram nos resultados obtidos, enquanto que para o caso de métodos qualitativos, a determinação da robustez é feita analisando se as alterações nas condições operacionais interferiram significativamente na resposta analítica.[14;25]

Apesar de serem opcionais, os testes de robustez fornecem informações bastante úteis à confiabilidade do método, visto que eles permitem identificar (e, se for o caso, controlar) se há algum fator específico responsável por causar consideráveis alterações nos resultados de duas ou mais medições feitas sob condições diferentes – em laboratórios distintos, por exemplo. Além disso, estes testes também podem estabelecer quais agentes precisam ser melhor trabalhados para que a precisão e a exatidão do método sejam aprimoradas.[11;25]

Os testes de robustez devem ser realizados fazendo uso de amostras em branco, materiais de referência – certificados ou não –, amostras de composição conhecida e afins, e são feitos de acordo com o tipo de procedimento em estudo.[25] A Tabela 5 apresenta alguns exemplos de técnicas juntamente com os principais fatores que podem interferir substancialmente nos resultados por elas fornecidos.

Tabela 5. Diferentes técnicas analíticas e os respectivos fatores que devem ser considerados na avaliação da robustez.[10;14]

Preparo de amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de filtros
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Fluxo da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
Cromatografia gasosa	Velocidade do gás de arraste
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
Outras técnicas analíticas	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criteriosamente e seus resultados deverão ser devidamente apresentados.

A robustez pode ser verificada variando uma condição por vez, mantendo as demais inalteradas para que, dessa maneira, possa se analisar separadamente cada efeito causado no resultado. Isto é chamado de teste de variável única e pode se tornar bastante trabalhoso, uma vez que é provável ser necessário avaliar um grande número de efeitos. Sendo assim, o ideal é realizar o teste de robustez fazendo variações em todas as condições experimentais simultaneamente.[24;25]

Um método analítico que permanece inalterável, mesmo após as variações feitas em suas condições típicas, é considerado robusto e, quanto maior for sua robustez, maiores serão as suas confiabilidade e precisão.[10;13]

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DE UMA AMOSTRA CONTROLE

Tendo em vista que, até o momento, não há um MRC de benzeno disponível no mercado, um laboratório terceiro analisou uma amostra desta matriz através do método ASTM D5453 e enviou os resultados, juntamente com a amostra, para o local onde o presente trabalho foi desenvolvido.

Conforme as informações recebidas, a amostra de benzeno foi lida em triplicata, então a média ($\bar{x}$), o desvio padrão (s) e a variância (s^2) das três medidas foram calculados, pois estes dados são necessários aos procedimentos de validação. Para estabelecer o desvio padrão, aplicou-se a equação 15 mostrada abaixo, e o resultado por ela fornecido foi elevado ao quadrado para, desta forma, calcular o valor da variância.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad \textbf{(15)}$$

Onde:

x_i = valor individual de uma medição;

$\bar{x}$ = média aritmética das medições;

n = número de medições.

3.2 PROCESSO DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O laboratório no qual esta monografia foi desenvolvida é acreditado pelo INMETRO e, em virtude disso, o processo de validação do método ASTM D7039 para determinação de enxofre em benzeno foi feito com base nos procedimentos descritos no documento "*Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008, Revisão 09*" de 2020.

Os parâmetros analisados foram faixe linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

Tendo em vista que o equipamento empregado para realizar os testes já foi especificamente desenvolvido para quantificar enxofre em diversas matrizes diferentes, sendo impossível detectar outros analitos que não sejam este ametal, a verificação da seletividade (especificidade, neste caso) do método não se fez necessária. Além disso, a robustez do método, por ser um parâmetro opcional, também não foi avaliada.

3.2.1 FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A fim de avaliar a faixa linear de trabalho do método, uma curva de calibração foi construída. Para isto, utilizaram-se soluções padrões de 0,5; 2,0; 3,5; 5,0 e 10 ppm de enxofre, além do branco. Estas concentrações foram obtidas a partir de um MRC contendo 20 ppm de enxofre, o qual foi diluído em tolueno grau HPLC, o mesmo que também foi usado como branco.

Após a leitura em triplicata de cada padrão, as médias dos sinais obtidos foram relacionadas com suas respectivas concentrações para, dessa maneira, plotar um gráfico da resposta analítica *versus* concentração, cuja equação da reta (1) permitiu determinar a linearidade do método através do valor do coeficiente de correlação linear – R^2.

A sensibilidade também foi informada pela equação da reta, sendo ela expressada pelo coeficiente angular (a). Porém, com o intuito de confirmar o valor obtido, bem como definir a unidade da sensibilidade, a equação 2 (pg. 21) foi empregada para calcular este parâmetro.

3.2.2 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das equações 3 e 6, respectivamente (pg. 24 e 27). No entanto, devido ao fato de que a leitura do branco não gerou sinal, utilizou-se o desvio padrão das medidas do menor nível da curva analítica, ou seja, 0,5 ppm, o qual foi lido 10 vezes.

3.2.3 EXATIDÃO E PRECISÃO

Para avaliar a exatidão, uma análise em replicata da amostra de benzeno foi feita seguindo o procedimento descrito pela norma ASTM D7039 e os resultados foram comparados aos fornecidos pelo método de referência. Para tal, fizeram-se nove medições, das quais calcularam-se a média, o desvio padrão e a variância das respostas analíticas obtidas. Então, para fazer a comparação destes valores com os referentes ao método ASTM D5453, empregou-se um teste estatístico, o Teste F. Não foi necessário realizar o Teste t *student* e o motivo para isto será apresentado no item 4.4.

Por fim, avaliou-se a precisão, que foi expressa em termos do coeficiente de variação – ou desvio padrão relativo –, o qual foi calculado através da equação 14 (pg. 35) usando os valores obtidos nas análises da amostra pela norma ASTM D7039.

Em seguida, fez-se a verificação da repetibilidade do método. Para isto, o mesmo analista (autora desta monografia), fazendo uso dos mesmos materiais, preparou soluções em três diferentes níveis de concentração: baixo – 1,0 ppm; médio – 5,0 ppm; alto – 10 ppm. Então, cada uma foi analisada em triplicata, totalizando nove medições, todas realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições operacionais. A partir dos resultados, calculou-se o DPR para cada nível de concentração, avaliando, assim, a precisão para a faixa de trabalho em questão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 VALORES DA AMOSTRA CONTROLE

Os resultados obtidos na análise da amostra de benzeno pelo método ASTM D5453 estão apresentados na Tabela 6, juntamente com a média, o desvio padrão e a variância das medidas:

Tabela 6. Resultados da determinação do teor de enxofre em benzeno pelo método ASTM D5453.

Teor de enxofre (ppm)	Média ($\bar{x}$)	Desvio padrão (s)	Variância (s^2)
0,16	0,16 ppm	$5,77x10^{-5}$ ppm	$3,33x10^{-5}$ ppm
0,16			
0,15			

Portanto, considerou-se que a amostra de benzeno empregada no desenvolvimento deste trabalho continha 0,16 ppm de enxofre.

4.2 FAIXA LINEAR DE TRABALHO

Na Tabela 7 são mostradas as concentrações usadas para construir a curva de calibração e as médias dos sinais emitidos por elas durante a leitura no equipamento Sindie 2622.

Tabela 7. Concentrações da curva de calibração e suas respectivas respostas analíticas.

Soluções padrão (ppm)	Respostas analíticas (contagens por segundo)
Branco	0
0,5	73
2,0	171
3,5	312
5,0	507
10,0	949

A partir destes valores, a curva de calibração foi construída, sendo o eixo x representante das concentrações de enxofre e o eixo y referente aos sinais medidos nas leituras dos padrões:

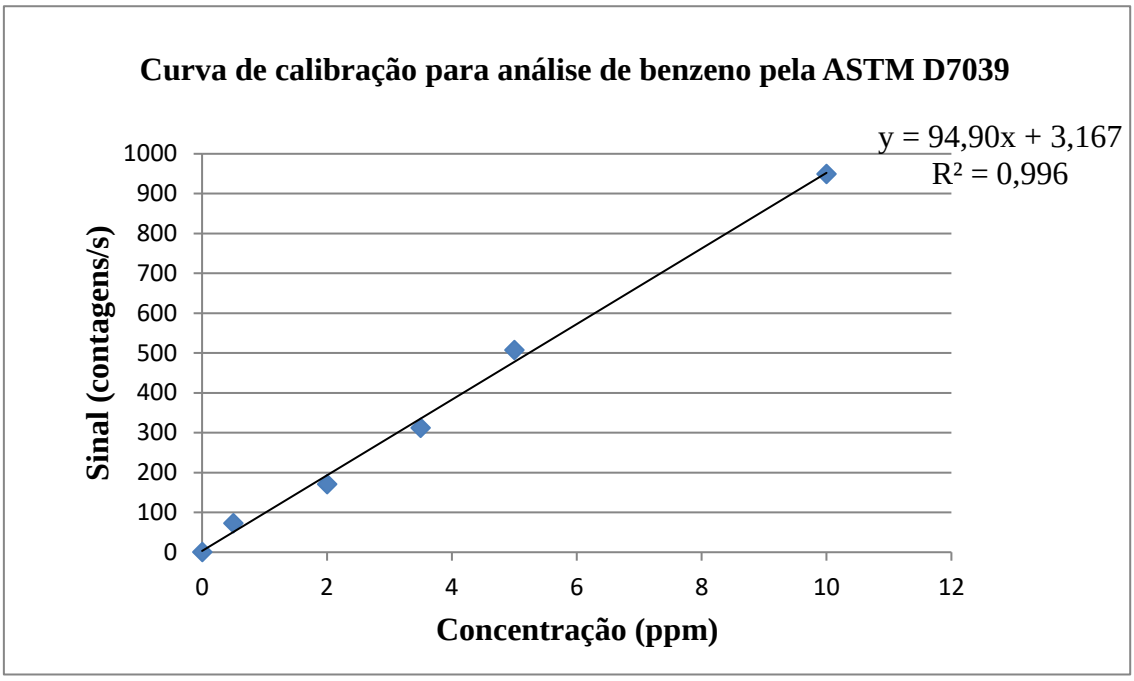

Figura 9. Curva de calibração para determinação de S em benzeno pela ASTM D7039.

A linearidade foi avaliada através do valor do coeficiente de correlação linear, o qual resultou em 0,996, conforme pode ser observado na Figura 9. Sabe-se que, quanto mais próximo a 1,0 for o valor de R^2, melhor será a linearidade do método, ou seja, a resposta analítica acompanha a concentração do analito na amostra de maneira proporcional e linear. Tendo em vista que o INMETRO já considera suficiente um valor de R^2 acima de 0,90[13], pode-se concluir que o método apresentou uma linearidade satisfatória.

Para calcular a sensibilidade, os valores apresentados na Tabela 7 foram usados para determinar o Δy e o Δx, que resultaram em 949 contagens/s e 10 ppm, respectivamente. Substituindo estes dados na equação 2 (pg. 21), obteve-se uma sensibilidade igual a 94,9 constagens/s.ppm, valor este que pode ser confirmado através da equação da reta mostrada na Figura 9, visto que o número que multiplica o "x", ou seja, o coeficiente angular, representa a sensibilidade do método.

4.3 LD E LQ

Conforme descrito anteriormente, a leitura do branco não gerou sinal e, portanto, não pôde ser usada para determinar os limites de detecção e quantificação do método.

Então, a solução padrão de 0,5 ppm de enxofre, por ser o menor nível de concentração da faixa de trabalho, foi lida 10 vezes e o desvio padrão dessas medições (s = 1,52 ppm) foi aplicado nas equações 3 e 6 para estabelecer o LD e o LQ, respectivamente. Com isso, os valores calculados foram os seguintes:

LD = 0,05 ppm de enxofre

LQ = 0,16 ppm de enxofre

4.4 EXATIDÃO E PRECISÃO

Os resultados das nove leituras da amostra de referência de benzeno pela ASTM D7039 usando o equipamento SINDIE 2622 estão apresentados na Tabela 8, onde também constam a média, o desvio padrão e a variância das medidas.

Tabela 8. Resultados da análise de benzeno pela ASTM D7039.

Teor de enxofre (ppm)	Média ($\bar{x}$)	Desvio padrão (s)	Variância (s^2)
0,15	0,16 ppm	0,01 ppm	$1,44x10^{-4}$ ppm
0,15			
0,18			
0,16			
0,15			
0,18			
0,17			
0,16			
0,16			

A partir disso, realizou-se o Teste F, onde a variância mostrada na Tabela 8 ($1,44x10^{-4}$ ppm), por ter sido numericamente maior, foi dividida pela apresentada na Tabela 6 ($3,33x10^{-5}$ ppm), resultando em um valor de F calculado igual a 4,32.

O número de graus de liberdade, dado por “n-1”, do numerador é 8 – pois corresponde à leitura da amostra pela ASTM D7039, onde foram feitas 9 medições –, enquanto que o denominador, representado pela análise em triplicata do benzeno pela

ASTM D5453, tem grau de liberdade igual a 2. De acordo com as informações da Figura 7, o F tabelado para estas condições é igual a 19,37.

O fato de F calculado apresentar um valor inferior ao de F tabelado significa que as variâncias analisadas podem ser consideradas estatisticamente iguais.[27] Além disso, sabendo que a precisão de um método analítico é definida com base em valores de desvio padrão e variância, o Teste F também fornece informações a respeito deste parâmetro. O resultado obtido neste trabalho indica que não há diferença significativa entre a precisão do método proposto e a do considerado como referência.

Conforme o documento do INMETRO – *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008* –, após a realização do Teste F, faz-se o Teste t (Student) como um complemento.[13] Todavia, tendo em vista que o Teste t compara as médias obtidas pelos dois métodos envolvidos no estudo, não foi preciso aplicá-lo neste trabalho, pois a média resultante das leituras da amostra pela norma ASTM D7039 foi igual à obtida nas medições feitas de acordo com o método de referência – ASTM D5453 (0,16 ppm).

Sendo assim, estes dados sugerem que o método em processo de validação apresentou uma exatidão aceitável. Entretanto, ao observar os valores do LQ e das leituras do benzeno pela ASTM D7039 usando o Sindie 2622, percebe-se que algumas medidas da amostra foram inferiores ao LQ. Em virtude disso, seria adequado fazer mais testes para complementar o processo de validação e verificar se realmente o método proposto apresenta uma exatidão aceitável. Ensaios de recuperação e a técnica de adição padrão são boas alternativas a serem consideradas futuramente.

Para a verificação da precisão, primeiramente estipulou-se o desvio padrão relativo das nove medidas, que foi igual a 6,25%. A seguir, avaliou-se a repetibilidade, cujos resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Verificação da repetibilidade do método.

Concentração (ppm)	1ª leitura (ppm)	2ª leitura (ppm)	3ª leitura (ppm)	Média	DP	DPR (%)
1,0	1,09	1,21	1,16	1,15	0,06	5,24

5,0	5,13	5,37	5,08	5,19	0,16	2,99
10,0	10,24	10,26	10,43	10,31	0,10	1,01

De acordo com as informações da Tabela 3 (pg. 37), amostras contendo até 1 ppm do analito podem apresentar um desvio padrão relativo de, no máximo, 11%. Sendo assim, os DPR obtidos para os três níveis de concentração empregados na avaliação da repetibilidade estão dentro do tolerado, indicando que a precisão do método proposto é aceitável. No entanto, ao comparar os valores de DPR mostrados na Tabela 9, é possível notar que o método se mostrou mais preciso durante a quantificação de concentrações de enxofre mais altas do que a faixa esperada para a matriz estudada.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos através das avaliações dos parâmetros de validação testados, é possível concluir que o método ASTM D7039, quando aplicado utilizando o equipamento Sindie 2622, se mostrou capaz de quantificar enxofre em amostras de benzeno. Sendo assim, o método proposto pode ser considerado uma alternativa promissora para resolver as desvantagens e limitações apresentadas por um dos métodos usados atualmente, o ASTM D5453, pois, além de atender a faixa de concentração descrita na legislação para o controle desse contaminante no petroquímico em questão, também apresenta um baixo custo e, ainda, permite a análise da amostra sem a necessidade do preparo da mesma, exigindo a mínima manipulação do analista durante o ensaio.

No entanto, a fim de aprimorar o processo de validação, ainda se faz necessário um estudo mais abrangente acerca da avaliação de alguns parâmetros; um teste de adição padrão ou ensaios de recuperação são alguns exemplos de técnicas que podem complementar a validação do método proposto. Além disso, é importante verificar sua aplicabilidade associada à análise de uma ampla variedade de amostras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1: Gomes, G.; Dvorsak, P.; Heil, T.; *BNDES Setorial*, 2005, 21, 75.

2: Silva, E. F.; *Gestão Ambiental dos Postos Revendedores de Combustíveis no Estado do Rio de Janeiro: Uma Avaliação Crítica na Visão Ocupacional e Ambiental da Presença do Benzeno na Gasolina Automotiva*; Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, Brasil, 2004.

3: Teixeira, M. O.; Vieira, R.; *CNQ-CUT*, 2015, 37p.

4: https://www.braskem.com.br/busca-de-produtos?p=468, acessada em: setembro, 2022.

5: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS; *ASTM D4734-20: Standard Specification for Refined Benzene-545*, 2020, 2p.

6: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS; *ASTM D5453-19a: Standard Test Method for Determination of Total Sulfur in Light Hydrocarbons, Spark Ignition Engine Fuel, Diesel Engine Fuel, and Engine Oil by Ultraviolet Fluorescence*, 2019, 12p.

7: Alves, C. V.; *Uma nova sistemática para análise de enxofre em diesel baseada em fluorescência*, Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2012.

8: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS; *ASTM D7039-15a: Standard Test Method for Sulfur in Gasoline, Diesel Fuel, Jet Fuel, Kerosine, Biodiesel, Biodiesel Blends, and Gasoline-Ethanol Blends by Monochromatic Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry*, 2020, 12p.

9: Barros, C. B.; *Biológico*, 2002, 64, 175.

10: Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Química Nova*, 2004, 27, 771.

11: Brito, N. M.; Amarante J, O. P.; Polese, L.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 2003, 13, 129.

12: Perez, M. A. F.; *Informativo CETEA*, 2010, 22, 1.

13: INMETRO; *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008, Revisão 09*, 2020, 30p.

14: BRASIL, Ministério da Saúde; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 899, de 29 de maio de 2003*.

15: Giudice, G. H.; *Acta de Ciências e Saúde*, 2016, 1, 130.

16: Silva, T. E. P.; Carvalho, D. O.; Silva; M. J. P.; Santos, N. E. S.; Costa, P. P. R.; *IV Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental*, Salvador, Brasil, 2013, 6p.

17: Capana, G. H.; *Estudo do impacto do enxofre presente no diesel na emissão de poluentes e em tecnologia de pós tratamento de gases de escape*, Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.

18: Alexandre, B. R.; *Análise elementar aplicada ao estudo do enxofre total em Gás de Petróleo Liquefeito*, Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Portugal, 2016.

19: Bittencourt, F. R.; *Enxofre nos Combustíveis Fósseis. Uso do Conhecimento Químico na melhoria do Meio Ambiente como Tema Motivador do Ensino de Química*, Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2018.

20: Nadkarni, R. A. K.; *Sulfur: Chemistry and Analysis of Fossil Fuel Products*; ASTM, 2014, p. 9.

21: Sanchez, A. B.; *Determinação de Benzeno em Bebidas Comerciais*; Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2008.

22: https://www.xos.com/MWD-XRF, acessada em: setembro, 2022.

23: https://www.xos.com/sulfur-benchtop/sindie-2622/family?productCategoryId=53596617569, acessada em: setembro, 2022.

24: ANVISA; *Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência a Acreditação*, 2004, 1, 80p.

25: NATA; *Technical Note 17: Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods*, 2012, 32p.

26: Lavanya, G.; Sunil, M.; Eswarudu, M. M.; Eswaraiah, M. C.; Harisudha, K.; Spandana, B. N.; *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2013, 4, 1280.

27: Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5$_a$.ed.; Pearson Education Limited: Harlow, 2005, 285p.

28: AOAC International; *Official methods of analysis of AOAC International*, in *Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)*, Gaithersburg, 2016.