



Natalia Cambiaghi Atilio

Planejamento de experimentos para otimização e confiabilidade metrológica de um novo sistema de medição de pH em etanol hidratado combustível

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio.

Orientador: Elcio Cruz de Oliveira
Co-orientador: Fernando Luis Fertoni

Rio de Janeiro
Setembro de 2022

Natalia Cambiaghi Atilio

Planejamento de experimentos para otimização e confiabilidade metrológica de um novo sistema de medição de pH em etanol hidratado combustível

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação) da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo:

Prof. Elcio Cruz de Oliveira

Orientador

Programa de Pós-Graduação em Metrologia – PUC-Rio

Prof. Fernando Luis Fertoni

Co-orientador

UNESP

Prof^a. Cecilia Cristina Marques Dos Santos

Instituto Adolfo Lutz – IAL

Prof^a. Célia Aparecida Lino dos Santos

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

Prof. Tony Rogério de Lima Dadamos

SPR Soluções metrológicas

Rio de Janeiro, 23 de setembro de 2022

Todos os direitos reservados. A reprodução, total ou parcial, do trabalho é proibida sem autorização do autor, do orientador e da universidade.

Natalia Cambiaghi Atilio

Graduou-se em Licenciatura em Química na UNESP (Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto-SP) em janeiro de 2020. Participou de congressos nacionais e internacionais de Química Analítica e Metrologia.

Ficha Catalográfica

Atilio, Natalia Cambiaghi

Planejamento de experimentos para otimização e confiabilidade metrológica de um novo sistema de medição de pH em etanol hidratado combustível / Natalia Cambiaghi Atilio; orientador: Elcio Cruz de Oliveira; co-orientador: Fernando Luis Fertoni. – 2022.

81 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Centro Técnico Científico, Programa de Pós-Graduação em Metrologia, 2022.

Inclui bibliografia

1. Metrologia – Teses. 2. Metrologia para Qualidade e Inovação – Teses. 3. PH de etanol. 4. Etanol hidratado combustível. 5. Indicadores de pH. 6. Eletrodos. 7. Eletrodo. I. Oliveira, Elcio Cruz de. II. Fertoni, Fernando Luis. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Centro Técnico Científico. Programa de Pós-Graduação em Metrologia. IV. Título.

CDD: 389.1

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha família por todo suporte e incentivo, em especial à minha mãe Alessandra, minha vó Maria, meu tio Fábio e ao meu querido vô Armando “In Memoriam”.

Ao meu orientador Professor Elcio Cruz de Oliveira pela confiança, incentivo, apoio e todo ensinamento que me proporcionou durante esses dois anos.

Ao meu co-orientador Professor Fernando Luis Fertoni pelo estímulo e parceria para a realização deste trabalho.

À CAPES e à PUC-Rio, pelos auxílios concedidos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus amigos por todo apoio, paciência e compreensão, em especial ao Vinícius e ao João Pedro que sempre estiveram do meu lado me dando todo apoio e suporte necessário.

À Equipe SPR Soluções Metrológicas, por todo suporte, parceria e ajuda sem os quais esse trabalho não seria possível.

Aos meus colegas, professores e colaboradores da PUC-Rio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Atilio, Natalia Cambiaghi; Cruz, Elcio de Oliveira; Fertoni, Fernando Luis. **Planejamento de experimentos para otimização e confiabilidade metrológica de um novo sistema de medição de pH em etanol hidratado combustível.** Rio de Janeiro, 2022. 81p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

O pH constitui um dos parâmetros de controle de qualidade do etanol combustível, sendo estabelecido pela norma brasileira ABNT NBR 10891, cujo escopo é específico para etanol hidratado combustível, e pela norma americana ASTM D 6423, a qual o foco é o etanol anidro combustível. Neste contexto, o presente estudo apresenta uma análise crítica à composição dos eletrodos utilizados pelos diferentes sistemas de medições para pH de etanol, devido à presença de água na composição do eletrodo de vidro. Com isso, o objetivo do presente estudo consistiu em uma proposta de um novo sistema para medição de pH de etanol hidratado combustível, o qual foi o único solvente utilizado, empregando como referência indicadores ácido-base. Por meio do planejamento de experimentos Box-Behnken foi possível determinar a condição otimizada esperada para o novo sistema de medição, o qual foi comparado com os sistemas propostos pelos referenciais normativos e posteriormente com o intervalo de pH definido pelos indicadores. Os resultados revelaram que os valores de pH obtidos pelos diferentes sistemas utilizados, incluindo o proposto pelo presente estudo, são estatisticamente diferentes entre si, e que somente os valores obtidos pelo novo sistema de medição se adequa à faixa de pH encontrada pelos indicadores. O eletrodo otimizado apresentou uma sensibilidade de resposta adequada à equação de Nernst, tendo um comportamento operacional adequado ao novo sistema de medição proposto pelo presente estudo.

Palavras-chave

pH de etanol; etanol hidratado combustível; indicadores de pH; eletrodos; eletrodo modificado; metrologia.

Abstract

Atilio, Natalia Cambiaghi; Cruz, Elcio de Oliveira (Advisor); Fertoni, Fernando Luis (Advisor). **Design of experiments for metrological optimization and reliability of a new pH measurement system in hydrated fuel ethanol.** Rio de Janeiro, 2022. 81p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Metrologia (Área de concentração: Metrologia para Qualidade e Inovação), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The pH is one of the quality control parameters of fuel ethanol, established by the Brazilian standard ABNT NBR 10891, whose scope is specific for hydrated fuel ethanol, and by the American standard ASTM D 6423, which focuses on anhydrous ethanol fuel. In this context, the present study presents a critical analysis of the composition of the electrodes used by the different measurement systems for ethanol pH, due to the presence of water in the composition of the glass electrode. Thus, the objective of the present study was to propose a new system for measuring the pH of hydrated fuel ethanol, which was the only solvent used, using acid-base indicators as a reference. Box-Behnken Design made possible to determine the optimal condition expected for the new measurement system, which was compared with the systems proposed by the normative references and later with the pH range defined by the indicators. The results revealed that the pH values obtained by the different systems used, including the one proposed by the present study, are statistically different from each other, and that only the values obtained by the new measurement system are suitable for the pH range found by the indicators. The optimized electrode presented an adequate response sensitivity to the Nernst equation, having an operational behavior adequate to the new measurement system proposed by the present study.

Keywords

Ethanol pH; hydrous ethanol fuel; pH indicators; electrodes; modified electrode; metrology.

Sumário

1.	Introdução	12
1.1.	Contextualização	12
1.2.	Motivação	14
1.3.	Objetivos: geral e específicos	14
1.4.	Estrutura da dissertação	15
2.	Etanol combustível	17
2.1.	História do etanol no Brasil	17
2.1.1.	Início da produção brasileira	17
2.1.2.	Etanol – comércio mundial	18
2.2.	Avaliação da Qualidade do Etanol Combustível	19
2.2.1.	pH	19
2.2.1.1.	Determinação do intervalo de pH dos indicadores	22
2.2.2.	pH de etanol	24
3.	Metodologia	28
3.1.	Planejamento de experimentos	28
3.1.1.	Definição	28
3.1.2.	Box-Behnken Design (BBD)	30
3.2.	Testes paramétricos e não-paramétricos	32
3.2.1.	Shapiro-Wilk	33
3.2.2.	Testes paramétricos	34
3.2.2.1.	Teste de Grubbs	34
3.2.2.1.1.	Teste de Grubbs para um valor discrepante observado	35
3.2.2.1.2.	Teste de Grubbs para dois valores discrepantes observados	35
3.2.2.2.	Teste-F: Duas amostras para variância	36
3.2.2.3.	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes	37
3.2.3.	Testes não-paramétricos	37
3.2.3.1.	Intervalo interquartilício	37
3.2.3.2.	Teste de Wilcoxon	38
3.2.3.3.	Teste de Friedman	39
4.	Parte Experimental	41
4.1.	Determinação do pKa em meio etanólico	41
4.2.	Construção da proposta da nova arquitetura para o eletrodo de vidro	44
4.2.1.	Variáveis escolhidas	44
4.2.1.1.	Preparo da solução tamponante em meio etanólico	45
4.2.1.2.	Solução de cloreto de lítio em meio etanólico	46
4.2.2.	Construção do eletrodo de vidro modificado	47
4.2.2.1.	Preparação do eletrodo de referência interno	47

4.2.2.2.	Preparação do eletrodo de referência externo	49
4.2.3.	Planejamento de experimentos	51
4.3.	Estudos realizados com o eletrodo otimizado	52
4.3.1.	Medições utilizando os três eletrodos	53
4.3.2.	Determinação do pH por indicadores de pH	54
4.3.3.	Comportamento do eletrodo otimizado em uma suposta curva de calibração	54
5.	Resultados e discussão	56
5.1.	Determinação do pKa em meio etanólico	56
5.2.	Construção do eletrodo de vidro - planejamento de experimento – Box-Behnken	60
5.3.	Estudos realizados com o eletrodo otimizado	61
5.3.1.	Comparação entre os três eletrodos	62
5.3.1.1.	Correção do potencial de junção líquida do eletrodo A	62
5.3.1.2.	Teste de normalidade	63
5.3.1.3.	Testes paramétricos	63
5.3.1.3.1.	Teste de Grubbs	63
5.3.1.3.2.	Teste F: Duas amostras para variância	64
5.3.1.3.3.	Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes	64
5.3.1.4.	Testes não-paramétricos	65
5.3.1.4.1.	Intervalo interquartilício	65
5.3.1.4.2.	Teste de Wilcoxon	65
5.3.1.4.3.	Teste de Friedman	66
5.3.2.	Determinação do pH por indicadores de pH	67
5.3.3.	Comportamento do eletrodo otimizado em uma suposta curva de calibração	74
6.	Conclusões e trabalhos futuros	76

Lista de Figuras

Figura 1. Eletrodo de vidro combinado	20
Figura 2. Perfil espectral de soluções variando o pH para estudo do comportamento do indicador.	23
Figura 3. Representação da variação de absorvância com o pH (linhas curvas) e a extrapolação da parte linear para determinação dos intervalos para três diferentes indicadores: a: Azul de bromofenol; b: Azul de bromotimol e; c: Azul de timol, todos para meio aquoso.	23
Figura 4. Representação da formação do potencial de junção líquida (i). Acúmulo de cargas gerado na interface devido ao potencial de junção líquida.	25
Figura 5. Esquema do processo de planejamento experimental	29
Figura 6. Planejamento Box-Behnken. (a) Representação geométrica, como derivado de um cubo. (b) Representação como planejamentos fatoriais 2^3 entrelaçados.	31
Figura 7. Esquema de escolhas para testes paramétricos e não-paramétricos	33
Figura 8. Representação esquemática do boxplot (horizontal)	38
Figura 9. Valor pH <i>versus</i> mV obidos pelo sistema de calibração do medidor de pH	43
Figura 10. a) Corpo de fundo depositado no fundo do béquer logo após a adição do acetato de lítio e ácido acético. b) Solução tamponante em meio etanólico após 7 dias de agitação constante e ininterrupta.	46
Figura 11: a) Eletrodo de vidro combinado com as marcações do local de “cortes”. b) Parte interna do eletrodo após o corte “C”	48
Figura 12. a) Modificação em andamento do eletrodo interno: região de solda do fio de cobre/fio de prata, isolado com parafilme; b) Modificação na vidraria; c) Eletrodo interno finalizado.	49
Figura 13. Modificação em andamento do eletrodo externo (referência): a) Eletrodo montado evidenciando a região da solda e ponteira de micropipeta utilizada como corpo para o eletrodo de referência externo; b) Eletrodo finalizado e preenchido com solução de concentração adequada de LiCl.	50
Figura 14. Célula de medição utilizando o eletrodo modificado. a) Termômetro bimetálico (Pt/Pt-Rh 13 %). b) Eletrodo de vidro modificado internamente; c) Eletrodo de referência; d) Solução tamponante preparada em EHC.	51

Figura 15. Espectros obtidos para cada uma das alíquotas utilizando o indicador vermelho de metila	57
Figura 16. Representação gráfica dos valores de pH como função do valor de $\log ([\text{Ind}^-]/[\text{HInd}])$.	58
Figura 17. Representação gráfica dos valores de Absorvância x pH para a determinação dos valores da faixa de viragem do indicador vermelho de metila, em amarelo os pontos que apresentam melhor correlação e foram utilizados para realizar a extrapolação da curva.	59
Figura 18. a) Espectro do indicador vermelho de metila. Azul: solução de EHC acidificada. Preto: solução de EHC basificada. Vermelho: solução tamponante b) Deconvolução da curva solução tamponante	67
Figura 19. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador vermelho de metila	69
Figura 20. Espectro obtido para o indicador alaranjado de xilenol	70
Figura 21. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador alaranjado de xilenol	70
Figura 22. Espectro obtido para o indicador azul de bromofenol	71
Figura 23. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador azul de bromofenol	72
Figura 24. Espectro obtido para o indicador verde de bromocresol	72
Figura 25. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador verde de bromocresol	73
Figura 26. Valores de pH <i>versus</i> mV obtidos para as diferentes soluções a partir do eletrodo C.	75

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABNT	Associação Brasileira de Norma Técnicas
ASTM	American Society for Testing and Materials
BBD	Box-Behnken Design
DoE	Design of Experiments
EHC	Etanol Hidratado Combustível
E_{jl}	Potencial de Junção Líquida
EPE	Empresa Brasileira de Pesquisas Energéticas
MRC	Material de Referência Certificado
ST	Solução Tamponante

1. Introdução

A matriz energética brasileira representa todo o conjunto de fontes de energia utilizado no país para suprir sua demanda. Devido à crise mundial do petróleo na década de 70 e crescente preocupação ambiental, nos últimos anos, houve um aumento na procura de fontes de energia que geram baixa emissão de gases na atmosfera.

Em 2019, as fontes renováveis de energia, que incluem bioenergia, eólica, hidráulica e solar, chegaram a 46,3 % de participação na matriz energética brasileira, sendo 7,0 % representada pelo etanol combustível. No entanto, com a escassez hídrica de 2021, aliado ao impacto gerado pela pandemia de COVID-19, a participação das energias renováveis na matriz energética reduziu para 44,7 %, consequentemente o uso do etanol acompanhou essa tendência, sendo agora de 5,9 % [1].

A Empresa Brasileira de Pesquisas Energéticas (EPE) divulgou, em 2020, dados que indicam uma redução nos derivados de petróleo no consumo final de energia do país, com projeção de redução em mais de 2 % até o ano de 2029. A justificativa dessa previsão reside no fato da redução pela crescente oferta de gás natural e biocombustíveis [2].

1.1. Contextualização

O etanol, atualmente, é um dos biocombustíveis mais utilizados e para que se garanta a sua eficiência, sua produção deve atingir requisitos de qualidade estabelecidos para o comércio nacional e à exportação. Assim, esta dissertação tomou como recorte o estudo de um dos requisitos de qualidade, o pH do etanol hidratado combustível.

A qualidade do etanol combustível é essencial para garantir o bom rendimento do motor. A presença de contaminantes ou pH irregular podem ocasionar formação de depósitos nas peças metálicas, e entupimento de filtros,

bicos injetores e bomba de combustível, como também desgaste e corrosão das peças do motor [3].

O pH do etanol é um dos parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade do combustível, sendo estabelecido nacionalmente pela ABNT NBR 10-891:2018 e internacionalmente pela ASTM D 6423:2020. No entanto, tais documentos possuem exigências contraditórias, uma vez que utilizam sistemas diferentes para realizar a medição. A principal diferença entre as normas está na composição do eletrodo, corroboram os estudos comparativos, que tem mostrado que os valores obtidos são significativamente diferentes [4].

A norma estrangeira é aplicada ao etanol anidro combustível, a qual utiliza de um eletrodo específico Orion, Ross Sure-Flow, com solução interna de cloreto de potássio em meio aquoso [5].

A utilização da norma ABNT NBR 10891 é indicada para o etanol hidratado combustível, sendo o foco da pesquisa. O pH deste composto é medido por meio de um eletrodo de vidro combinado tendo o eletrodo externo preenchido com solução de cloreto de lítio em meio etanólico; no entanto, a solução interna do eletrodo de vidro, ainda, é aquosa [6]. Essa diferença de composição das soluções pode ocasionar distorções nos resultados de medição de pH. A diferença na composição dos solventes também se faz presente no processo de calibração do sistema de medição utilizado para realizar as leituras de pH, uma vez que o material de referência certificado (MRC) utilizado é preparado em meio aquoso. Para que a calibração seja confiável, este estudo sugere que as soluções tamponantes de pH de calibração sejam produzidas com o mesmo solvente da amostra [7].

Partindo dos pontos tratados anteriormente, esta pesquisa de mestrado se propõe a analisar criticamente os sistemas de medição descritos pela norma ABNT NBR 10-891:2018, estudar e propor um novo sistema para medição de pH de etanol que possui como único solvente o etanol hidratado.

1.2. Motivação

O Brasil é um grande produtor de etanol; prova disto, é que em agosto de 2020, o país exportou 341,73 milhões de litros, a maior exportação feita nos últimos 7 anos [8]. Para que a exportação seja possível, é essencial que o produto esteja dentro dos parâmetros de qualidade necessários. Após uma vasta pesquisa bibliográfica, encontrou-se uma lacuna na literatura, a medição do pH do etanol.

A medição do pH é uma técnica potenciométrica, comumente usada no campo da química analítica. O método de medição de pH é baseado na atividade de íons hidrogênio, e seu conceito é aplicável apenas a soluções aquosas [9].

Dentro desse contexto, os aspectos motivadores deste tema de pesquisa destacam-se:

- Uma análise crítica do sistema utilizado pela norma ABNT NBR 10-891 para a medição.
- Reserva de mercado para à produção de equipamentos de laboratório, em especial de eletrodos de vidro combinado modificado segundo esse estudo.
- Os resultados da dissertação poderão contribuir para a melhoria do sistema de medição de pH de etanol hidratado combustível e posterior sugestão de revisão à norma ABNT NBR 10-891.

1.3. Objetivos: geral e específicos

A pesquisa tem como objetivo geral otimizar um novo sistema para medição de pH do etanol hidratado combustível.

Para tal, foram definidos como objetivos específicos:

- Analisar referenciais normativos e abordagens por diferentes métodos para medição de pH de etanol.
- Avaliar por meio de indicadores colorimétricos a faixa de viragem em meio etanólico como referência na medição de pH em etanol.

- Otimizar um novo sistema para medição de pH do etanol, utilizando o etanol hidratado combustível como único solvente.
- Avaliar se há diferença entre os resultados obtidos pelo sistema de medição desenvolvido com os apresentados pela ABNT NBR 10891 e pela ASTM D 6423.
- Determinar o pH da solução etanólica estudada pelos indicadores de pH e compará-lo com os resultados obtidos pelos diferentes sistemas de medições utilizados no estudo.
- Analisar o comportamento do eletrodo proposto em diferentes valores de pH, a fim de comparar o coeficiente angular obtido com a resposta ideal proposta pela equação de Nernst.

1.4. Estrutura da dissertação

A dissertação estrutura-se em seis capítulos, incluindo esta introdução como capítulo 1.

O capítulo 2 descreve o etanol combustível, mostrando toda a sua história e importância para o Brasil, seguido pela avaliação da qualidade do biocombustível e finaliza abordando os conceitos químicos relevantes para o tema.

O capítulo 3 define as ferramentas utilizadas para garantir a confiabilidade metrológica e a otimização do sistema proposto neste trabalho: planejamento de experimentos, planejamento de Box-Behnken, testes de detecção de *outliers* e testes de hipóteses paramétricos e não-paramétricos.

O capítulo 4 apresenta a parte experimental realizada, informando o preparo das soluções e a arquitetura do novo sistema de medição de pH juntamente com os valores obtidos das medições.

O capítulo 5 apresenta o tratamento estatístico, com base nas ferramentas descritas no capítulo 3, dos resultados obtidos a partir dos experimentos realizados no capítulo 4, com uma discussão sobre o funcionamento do novo sistema para medição de pH do etanol hidratado combustível.

E por fim, o capítulo 6 apresenta algumas conclusões importantes verificadas no capítulo anterior, além de apresentar sugestões para trabalhos futuros.

2. Etanol combustível

2.1. História do etanol no Brasil

Uma das razões para o Brasil dar início à produção de etanol a partir da cana-de-açúcar foi a necessidade de amenizar as sucessivas crises do setor açucareiro e a tentativa de reduzir a dependência do petróleo importado. Algumas décadas depois, o país já era capaz de produzir em grande escala, e assim, conseguir atender o mercado internacional [10].

2.1.1. Início da produção brasileira

Na década de 1920, o extinto Instituto de Açúcar e do Alcool (IAA) e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) buscaram no exterior a melhor tecnologia disponível até então para a produção do álcool etílico, com isso, as primeiras ações de introdução do etanol na matriz energética brasileira datam do início do século XX [10].

Foi no início da década de 1970, quando o Brasil atingiu o ponto máximo da crise energética, devido à crise mundial do petróleo, que o Programa Nacional do Alcool (Proálcool) foi criado, na tentativa de explorar o etanol como um potencial energético a fim de minimizar, em longo prazo, a dependência brasileira do petróleo internacional. Este programa tinha como objetivo estimular a produção de etanol, para assim, conseguir atender o mercado energético global [10-11].

Em meados de 1980, houve um aumento significativo na produção de etanol no Brasil, o percentual de cana processada subiu de 10 % para 70 % entre os anos de 1975 e 1985, devido à junção das destilarias de etanol às usinas de açúcar já existentes. Tal estratégia foi responsável por fortalecer a produção de etanol sem prejudicar a de açúcar [11-12].

No início dos anos 2000, ocorreram dois grandes incentivos para o uso de etanol como combustível. O primeiro ocorreu no ano de 2003 com a implantação do carro *flex*, o que passou a permitir ao consumidor a liberdade de escolha do combustível na hora de abastecer. Outro marco importante foi a implantação do Protocolo de Kyoto, que entrou em vigor em 2005, o qual trazia a preocupação com a qualidade de vida futura no planeta devido aos altos índices de poluição gerada pela emissão de gases causadores do agravamento do efeito estufa na atmosfera. Esta iniciativa na área de biocombustíveis se destacou como uma das soluções viáveis, o que abriu as portas do mercado mundial para o etanol brasileiro [13-14].

Entre 1975 e 2010, houve um grande avanço na cadeia produtiva do etanol no Brasil, onde a produtividade agrícola teve um aumento de 73 % e de 44 vezes na produção anual de etanol [15].

2.1.2. Etanol – comércio mundial

O Brasil, atualmente, é o terceiro país que mais produz etanol no mundo e tem como principal matéria prima a cana-de-açúcar. Demais matérias primas também podem ser utilizadas, exemplos destas são o milho, beterraba, mandioca e entre outras. O Brasil é superado somente pelos Estados Unidos e pelos Países Baixos, os três países juntos representam aproximadamente 51 % da produção global [10][14].

O etanol combustível pode ser hidratado, usado diretamente como combustível; ou anidro, adicionado à gasolina, tendo como principal diferença o teor de água presente no etanol. Para o etanol hidratado, a concentração máxima de água permitida é de 7,5 % (m/m); entretanto, no anidro, esta concentração decresce para 0,7 % (m/m). A produção de etanol anidro e hidratado durante a safra de 2019/20, chegou perto dos 35 bilhões de litros, sendo o maior valor produzido nos últimos anos [15-17].

A exportação do etanol acompanhou o crescimento da produção de biocombustíveis, atingindo um novo recorde. Em agosto de 2020, o país realizou a maior exportação no período de um mês nos últimos 7 anos, como resultado, o ano

de 2020 teve uma exportação acumulada de 2,67 bilhões de litros, um volume 40,2 % maior quando comparado ao valor exportado em 2019. A projeção de produção e exportação para o ano de 2021 eram positivas, no entanto devido aos impactos causados pela pandemia de COVID-19 houve uma queda de 8,28 % na produção de etanol e um decréscimo de 27 % na exportação [8,18-19].

2.2. Avaliação da Qualidade do Etanol Combustível

Condutividade elétrica, massa específica, índice de acidez, resíduo por evaporação e potencial do íon hidrogênio (pH), foco do presente trabalho, são algumas das especificações necessárias para que o etanol possa ser comercializado, podendo variar de acordo com a natureza do etanol, hidratado ou anidro [20].

2.2.1. pH

A medição de pH pode ser realizada por meio de uma técnica potenciométrica, sendo uma das técnicas mais usadas na área da química analítica por ser simples e de baixo custo em comparação com as demais. O pH de uma solução pode ser medido com confiabilidade e de forma rápida utilizando um sistema de medição de pH, popularmente conhecido como pHmetro. Este instrumento possui um par de eletrodos conectados a um potenciômetro, Figura 1, o qual entra em contato com a solução que se deseja medir o pH [21-22].

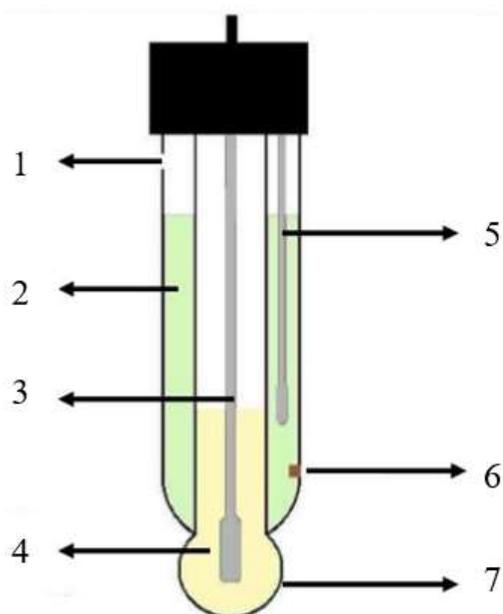


Figura 1. Eletrodo de vidro combinado

Fonte (adaptado): <https://pt.slideshare.net/MrciaAnjos/potenciometria-49287920>

A Figura 1 ilustra a estrutura de um eletrodo de vidro combinado, utilizado no sistema de medição de pH, com suas principais partes numeradas de 1 até 7, sendo elas:

- 1: Orifício de abertura, para enchimento e reposição do eletrólito utilizado.
- 2: Compartimento do eletrodo de referência, eletrodo externo ao bulbo de vidro.
- 3: Eletrodo de Ag/AgCl.
- 4: Compartimento do eletrodo interno, o qual estará imerso em uma solução cujo pH permanece constante; a composição da solução interna ao bulbo depende do fabricante do eletrodo.
- 5: Eletrodo de Ag/AgCl.
- 6: Diafragma, uma membrana semipermeável.
- 7: Bulbo de vidro, uma fina membrana de vidro sensível ao próton H^+ .

Para realizar a medição de pH, o eletrodo de vidro combinado é inserido na solução que se deseja medir. De modo simplista, o eletrodo irá medir a diferença de potencial gerada entre as interfaces interna e externa ao eletrodo de membrana

de vidro, oriunda da diferença nas atividades da atividade dos íons H^+ , interna e externa ao bulbo de vidro. Então, o potenciômetro irá converter a diferença de potencial gerada nas interfaces em valor de pH.

Outro modo que se pode medir o pH de soluções é utilizando indicadores ácido-base. O indicador ácido-base se trata de uma substância que muda de cor com variações bruscas de concentração hidrogeniônica. É, normalmente, um ácido orgânico fraco ou uma base fraca orgânica em solução aquosa em concentrações muito baixas, da ordem de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O indicador não dissociado apresenta uma cor diferente do produto dissociado. No caso de um indicador ácido ($HInd$), a dissociação ocorre de acordo com o equilíbrio, Equação (1) [23]:



A cor do ânion indicador (Ind^-) é diferente daquela do indicador ácido. Se a solução na qual o indicador é adicionado for ácida, isto é, conter uma grande quantidade de íons hidrogênios (H^+), o equilíbrio da Eq. (1) será deslocado para a esquerda, tornando visível a cor da forma ácida do indicador não dissociado. Se, no entanto, a solução é tornada alcalina, o equilíbrio se desloca para direita (forma básica), mudando a coloração do indicador. Cada indicador possui um intervalo de pH muito bem definido, possuindo uma coloração específica para a solução ácida e outra para a básica de seu respectivo intervalo.

A partir da combinação de mais de um indicador, em experimentos realizados em separado, o pH de uma solução pode ser estimado; visto que, é possível encontrar um intervalo de variação de pH e compará-lo com os valores de pH obtidos a partir do sistema de medição de pH (pHmetro) [22].

No entanto, para um valor específico em detrimento a uma faixa, o uso de indicadores pode não ser tão confiável, uma vez que dependem da percepção visual; isto é, a mudança de cor pode ser observada em função da relação entre as concentrações das espécies ácida e básica (10/1 ou 1/10), o que pode variar de um analista para outro, para obter um resultado. Assim, uma técnica analítica de elevada sensibilidade a ser aplicada para contornar esta questão é a espectrofotometria de absorção eletrônica na região do ultravioleta – visível, baseada nas propriedades dos átomos e moléculas de absorver ou emitir energia

eletromagnética em uma determinada região do espectro eletromagnético. A espectrofotometria a faz na região das radiações do ultravioleta, UV, (190 – 340) nm e luz visível (340 – 800) nm. Essa técnica é utilizada para mensurar o quanto uma substância absorve luz em um determinado comprimento de onda, a partir de um feixe de luz na região UV ou visível que passa através da amostra.

Na prática, quando se faz uso da técnica espectrofotométrica, a quantidade de luz absorvida ou transmitida é proporcional à concentração da substância de interesse analítico presente na solução sob estudo. Como uma impressão digital, saber exatamente a cor absorvida, nos permite identificar e quantificar materiais diferentes. O espectro de absorção é uma varredura da absorvância *versus* o comprimento de onda. Ao realizar a análise de um espectro é possível identificar quatro tipos de efeitos, que são dependentes da interação de curta distância que as moléculas do corante desenvolvem com o solvente, sendo eles [23]:

- Deslocamento batocrômico: Quando ocorre o deslocamento do pico de absorção para um comprimento de onda de maior valor;
- Deslocamento hipsocrômico: Quando ocorre o deslocamento do pico de absorção para um comprimento de onda de menor valor;
- Efeito hiperocrômico: Aumento da intensidade do pico de absorção;
- Efeito hipocrômico: Diminuição da intensidade do pico de absorção [23].

2.2.1.1.

Determinação do intervalo de pH dos indicadores

Quando se avalia o comportamento espectrofotométrico de um indicador ácido-base verifica-se a presença de duas bandas, isso se deve à diferente coloração do ânion *Ind⁻* e do indicador ácido *Hind*.

A Figura 2 ilustra o perfil espectral de uma solução com um determinado indicador tendo seu pH variado. No comprimento de onda $\lambda = 428$ nm, é observado uma banda referente à presença da espécie ácida, conforme a solução tem o seu pH basificado ocorre um deslocamento batocrômico, apresentando a banda com λ máximo = 597 nm. Isso evidencia que a mudança de cor não é algo repentino, à medida que o pH aumenta, a concentração da espécie *Ind⁻* aumenta constantemente,

e conseqüentemente também a absorvância, enquanto a forma colorida H_{ind} diminui proporcionalmente. Outro aspecto importante é a presença do ponto isoabsortivo (isosbético); isto é, o comprimento de onda no qual todas as espécies absorventes têm a mesma absorvância, de modo que a lei de Beer não é afetada pelo equilíbrio, em $\lambda = 495 \text{ nm}$, evidenciando a presença de duas espécies em equilíbrio.

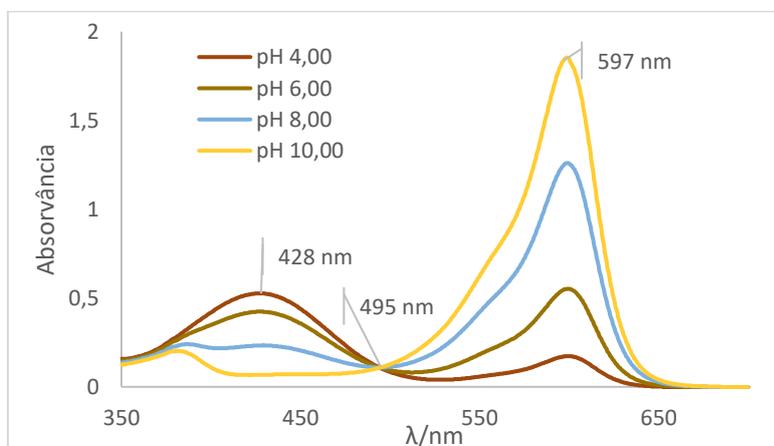


Figura 2. Perfil espectral de soluções variando o pH para estudo do comportamento do indicador. Fonte: Autor.

Segundo Batters, é possível determinar o intervalo de viragem do indicador estudado a partir da variação dos valores de absorvâncias normalizados *versus* os valores de pH, obtidos para a espécie básica, conforme ilustrado na Figura 3 [24].

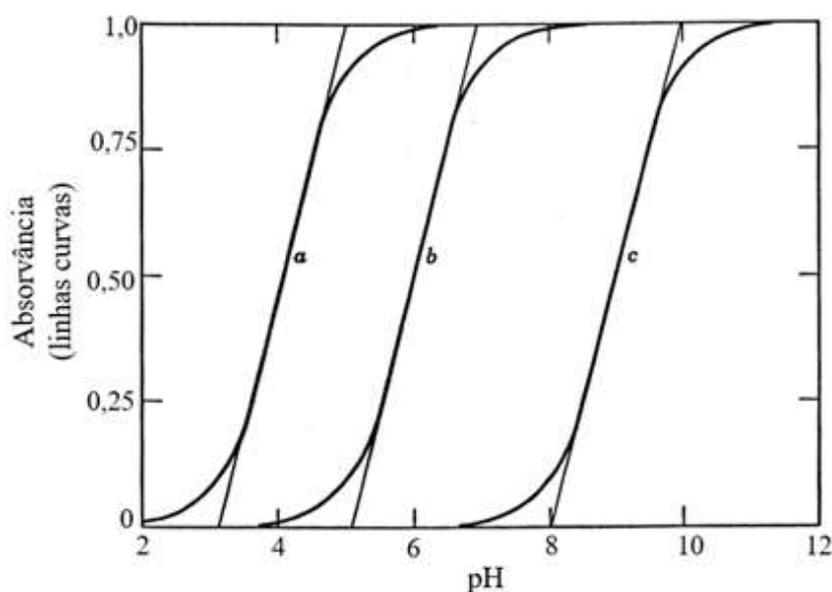


Figura 3. Representação da variação de absorvância com o pH (linhas curvas) e a extrapolação da parte linear para determinação dos intervalos para três diferentes indicadores: a: Azul de bromofenol; b: Azul de bromotimol e c: Azul de timol, todos para meio aquoso.

Fonte (Adaptado): Bates, 1964

A Figura 3 apresenta a determinação do intervalo de pH de três indicadores diferentes para o meio aquoso, onde a extrapolação da curva para absorvância igual

a 1 e 0 marcam aproximadamente os limites superiores e inferiores, respectivamente, da faixa de viragem [24], a considerar que se trata de resultado normalizados.

2.2.2. pH de etanol

A técnica potenciométrica para determinação de pH é baseada na atividade do íon hidrogênio, cujos conceitos são normalmente aplicáveis às soluções aquosas. Um determinado meio para ser considerado aquoso é necessário que ele possua, no mínimo, 30 % de água em sua composição. Este conceito não se aplica a misturas etanólicas em água; pois o etanol hidratado combustível (EHC) possui no máximo 7,5 % de água (m/m). Assim, as medições de pH que são conduzidas em amostras de etanol, etanol hidratado combustível (EHC), podem apresentar diversos problemas, tais como: (i) a instabilidade das leituras; (ii) necessidade de tempos longos de resposta; e (iii) resultados dependentes do tipo de eletrodo utilizado. Esses problemas ocorrem, provavelmente, devido à baixa condutividade do solvente, desidratação da membrana de vidro do eletrodo, com o tempo de medição, e o desenvolvimento e variação do potencial de junção líquida (E_{jl}) [23, 25-27].

Este potencial de junção líquida pode se desenvolver em uma interface, que no caso do eletrodo de vidro combinado, ocorre em seu diafragma. O E_{jl} desenvolvido no diafragma é resultado do equilíbrio de sistemas líquidos (água/água; água/etanol; etanol/etanol). Esse potencial pode ocorrer em situações em que as espécies iônicas presentes nas soluções possuem diferentes valores de mobilidade iônica, ou, quando se trata dos mesmos eletrólitos, porém com concentrações diferentes. Essa diferença na mobilidade ou concentração iônica promove a separação de cargas na interface, gerando assim, o potencial de junção líquida (E_{jl}). O desenvolvimento deste potencial, que pode assumir valor positivo ou negativo, é somado ao potencial global da célula, comprometendo os resultados da medição. A Figura 4 mostra um exemplo de potencial de junção líquida.



Figura 4. (i) Representação da formação do potencial de junção líquida. (ii) Acúmulo de cargas gerado na interface devido ao potencial de junção líquida.

Fonte (Adaptado):

[https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840768/LOQ4001/Final%203a%20Aula%20\(Parte%20II\)%20S%202019%20\(Potenciometria\)%20S%202019%20-%20Arao.pdf](https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840768/LOQ4001/Final%203a%20Aula%20(Parte%20II)%20S%202019%20(Potenciometria)%20S%202019%20-%20Arao.pdf)

A Figura 4 (i) ilustra uma solução aquosa de cloreto de sódio, NaCl, e água, separadas por uma membrana semipermeável, uma interface. Após um tempo, devido à interface, os íons presentes na solução de NaCl se locomovem através dela; essa locomoção é diferente para cada íon em função de suas diferentes mobilidades iônicas. A Tabela 1 apresenta os valores de mobilidade dos íons, mostrando que a mobilidade do ânion Cl^- é maior quando comparada com a do cátion Na^+ . A consequência dessa diferença é ilustrada na Figura 4 (i), a qual o ânion Cl^- apresenta um vetor de locomoção, na cor azul, maior do que o vetor que representa o cátion Na^+ , na cor amarela. Devido a essa diferença, um acúmulo de cargas positivas e negativas será gerado próximo à interface, Figura 4 (ii). Esse acúmulo de cargas é o responsável por gerar o potencial de junção líquida. O E_{ji} é capaz de alcançar valores muito elevados, podendo chegar a alguns centésimos de volt, a depender da diferença na mobilidade iônica. Estes valores interferem e conseqüentemente comprometem a confiabilidade da medição de pH [25-27].

Tabela 1. Mobilidade iônica sob diluição infinita, para temperaturas de 18° e 25° C.

Íon	Mobilidade a 18 °C ($\text{S cm}^2 \text{equiv.}^{-1}$)	Mobilidade a 25 °C ($\text{S cm}^2 \text{equiv.}^{-1}$)
Na^+	43,5	50,1
Cl^-	65,5	76,6

Fonte (Adaptado): OHLWEILER, 1968.

A norma brasileira ABNT NBR 10891 e a norma estrangeira ASTM D 6423 descrevem o método potenciométrico para determinação do pH em etanol hidratado combustível e método de ensaio padrão para determinação do pHe de misturas de etanol combustível e etanol combustível desnaturado, respectivamente.

A norma estrangeira é aplicada somente ao etanol anidro combustível, a qual impõe o uso do eletrodo Orion, Ross Sure-Flow, e utiliza solução interna de cloreto de potássio em meio aquoso. O eletrodo utilizado pelo sistema proposto pela norma ASTM é preenchido com solução aquosa, o que pode gerar um possível potencial de junção líquida no diafragma, devido à diferença do meio das soluções. Tal fato ocorre, pois, o eletrodo externo ao bulbo de vidro está preenchido por uma solução aquosa e a solução a ser medida está em meio alcoólico. Este valor de potencial irá comprometer a medição correta de pHe do combustível [5].

A utilização da norma ABNT NBR 10891 é indicada para o etanol hidratado combustível, sendo o foco da presente pesquisa. O pH do etanol hidratado é medido por meio de um eletrodo de vidro combinado tendo o eletrodo externo preenchido com solução de cloreto de lítio (LiCl) em meio etanólico; no entanto, a solução interna do eletrodo de vidro, continua sendo aquosa. Esta diferença de composição das soluções faz com que seja gerado uma diferença de potencial, entre o eletrodo de referência interno e o externo, diferente de zero, causando distorções nos resultados da medição de pH, conforme tratado anteriormente.

Outro aspecto a ser apontado é a diferença na composição dos solventes, também se faz presente no processo de calibração do sistema de medição utilizado para realizar as leituras de pH, uma vez que o material de referência certificado (MRC) utilizado é preparado em meio aquoso. Tal situação impõe a diferença físico-química de composição das soluções: MRC aquosa e amostra etanólica (EHC).

Essa arquitetura na construção do eletrodo pode acarretar o desenvolvimento do potencial de junção líquida na região do diafragma, afetando, assim, os resultados da calibração/ajuste do sistema de medição, o que compromete os resultados das medições. Para se estar de posse de um procedimento de calibração confiável, sugere-se que as soluções tamponantes de pH a serem usadas para a calibração/ajuste em meio etanólico (EHC) sejam produzidas com o mesmo solvente que compõe a amostra [4-6].

A modificação na composição de eletrodos visa a melhoria na capacidade e seletividade na detecção de mensurandos de interesse e está presente em diversas áreas e aplicações analíticas. Vários estudos são encontrados na literatura propondo

diversos métodos de modificação para tal fim, como exemplo eletrodo modificado de carbono vítreo para a análise de agentes tóxicos presentes em fármacos e na indústria alimentícia [28-29], biosensores modificados para detecção de etanol como composto orgânico tóxico e volátil em fluido corporal simulado [30], eletrodo de grafeno dopado com nitrogênio para detecção de agente antimicrobiano frequentemente utilizado em produtos de higiene pessoal [31], eletrodo de platina modificado com Mn_3O_4 e quitosana para detecção simultânea de selênio e níquel em meio aquoso [32].

Devido à grande importância da produção e comércio nacional e internacional de etanol hidratado combustível para o Brasil, o presente trabalho buscou, por meio de planejamento de experimentos desenvolver uma nova proposta para a composição de um novo eletrodo de vidro combinado para medição de etanol hidratado combustível, no qual o potencial de junção líquida seja otimizado (minimizado); isto é, se aproxime a zero.

3. Metodologia

Este capítulo descreve toda a metodologia utilizada no presente trabalho, que está dividida em duas partes. A primeira parte é uma introdução à técnica de planejamento de experimentos, onde foram abordados o planejamento Box-Behnken. A segunda parte é uma revisão e descrição dos testes paramétricos e não-paramétricos estatísticos que serão utilizados pelo presente trabalho, abordando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os testes para detecção de *outliers*, e por fim, os testes para comparação de amostras.

3.1. Planejamento de experimentos

3.1.1. Definição

Ao iniciar uma pesquisa, independente da área, há sempre o interesse em saber quais são as variáveis importantes para aquele estudo, assim como os limites inferior e superior dessas variáveis. O planejamento de experimentos (Design of Experiments – DoE) é uma ferramenta eficaz que auxilia o pesquisador a determinar as variáveis que exercem maior influência no processo a ser estudado. Esta técnica estatística é considerada como muito importante, pois é possível evitar que o resultado seja uma montanha de números estéreis, o que dificultaria a extração de qualquer possível conclusão. Os principais resultados de quando se utiliza um planejamento de experimento são [33-34]:

- Redução da variação do processo e melhor concordância entre os valores nominais obtidos e os valores pretendidos;
- Redução do tempo do processo;
- Redução do custo operacional;
- Melhoria no rendimento do processo.

E algumas aplicações típicas:

- Avaliação de diferentes materiais;
- Seleção de parâmetros de projeto;
- Determinação de parâmetros de projeto que melhorem o desempenho de produtos;
- Obtenção de produtos que sejam mais fáceis de fabricar, que sejam projetados, desenvolvidos e produzidos em menos tempo, que tenham melhor desempenho e confiabilidade que os produzidos pelos competidores [33].

A Figura 5 apresenta uma representação esquemática do processo de planejamento experimento adaptada de (Montgomery & Runger, 2013), o qual se deseja determinar os fatores que afetam a resposta e se há a existência de interações entre os fatores de interesse de um determinado sistema. Com isso, é possível extrair o máximo de informações úteis, realizando o mínimo de experimentos possíveis [33-35].



Figura 5. Esquema do processo de planejamento experimental
Fonte (adaptado): MONTGOMERY e RUNGER, 2013.

Os experimentos devem ser realizados sequencialmente, sendo o primeiro deles chamado de experimento exploratório ou de peneiramento (*screen experiment ou screening*), o qual é usada para estimar a magnitude e direção dos efeitos dos fatores, ou seja, determinar a influência de algumas variáveis, identificando quais são as variáveis importantes (variáveis críticas). Os experimentos subsequentes são usados para definir os níveis das variáveis críticas identificadas anteriormente, resultando em um melhor desempenho do processo. Em suma, o planejamento experimental permite eficiência e economia no processo

experimental, e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões [33, 36-38].

Para realizar um eficiente DoE, é necessário que seja realizada a estimação de parâmetros antes de começar a realizar os experimentos e, os objetivos e os critérios devem estar bem claros, de modo a dar subsídios para a escolha:

- Das variáveis envolvidas nos experimentos;
- Da faixa de variação das variáveis selecionadas;
- Dos níveis escolhidos para essas variáveis. No caso de muitos fatores, é melhor escolher inicialmente dois níveis (valores das variáveis experimentais);
- Da variável de resposta;
- Do planejamento experimental. Nessa etapa, há que se considerar o tamanho da amostra (número de réplicas), a seleção de uma ordem de realização dos tratamentos e se há vantagem em fazer a blocagem dos experimentos; dos métodos de análise dos resultados dos experimentos. Os métodos estatísticos são usados para guiar uma tomada objetiva de decisão [33].

3.1.2. Box-Behnken Design (BBD)

Fatorial à três níveis, composição central, Doehlert e Box-Behnken são alguns dos planejamentos de experimentos mais utilizados. O presente estudo utilizou o planejamento Box-Behnken (BBD), o qual é utilizado quando o experimento apresenta três ou mais fatores e apenas três níveis são empregados para cada fator. Sua principal vantagem é a redução do número de ensaios para estudar um maior número de fatores, de modo geral os níveis dos fatores são escolhidos a partir das informações de seus limites inferiores e superiores. O BBD é considerado um planejamento esférico que consiste em um ponto central e vários pontos médios localizados nas bordas de um cubo sobreposto à uma esfera (Figura 6 (a)), no entanto, também pode ser visto como consistindo em três fatoriais 2^3 interligados a um ponto central (Figura 6 (b)). O número de tratamentos dá-se pela combinação dos níveis da parte cúbica e do ponto central, impedindo assim a utilização de

pontos de vértices, ou seja, quando todos os níveis dos fatores estão em um extremo, Figura 6 [39-42].

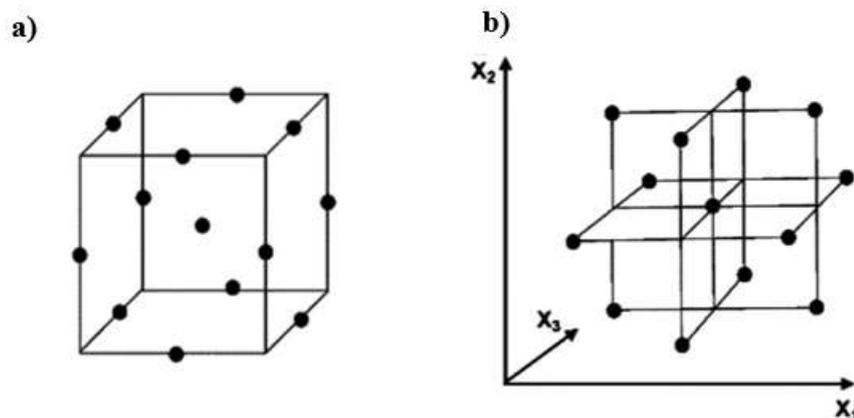


Figura 6. Planejamento Box-Behnken. (a) Representação geométrica, como derivado de um cubo. (b) Representação como planejamentos fatoriais 2^3 entrelaçados.

Fonte: Turkish coals N. Aslan, Y. Cebec, 2006

Para realizar o estudo, um experimento com três níveis e três fatores, um total de 15 execuções experimentais serão necessárias. A matriz de experimentos para esse caso é apresentada pela Tabela 2 [43-44].

Tabela 2. Matriz de experimento Box-Behnken

Experimento	Fator 1	Fator 2	Fator 3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

O modelo segue a Equação (2):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (2)$$

Onde y é a resposta prevista; β_0 é a constante do modelo; x_1 , x_2 e x_3 são variáveis independentes; β_1 , β_2 e β_3 são coeficientes lineares; β_{12} , β_{13} e β_{23} são coeficientes de produto vetorial e β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos. Os coeficientes são estimados a partir dos resultados experimentais, normalmente, com auxílio de softwares [41].

3.2. Testes paramétricos e não-paramétricos

A principal diferença entre os testes paramétricos e não paramétricos está na distribuição da variável de estudo. Quando é possível assumir a normalidade de distribuição da variável, ou seja, uma distribuição Gaussiana, se utiliza a média e o desvio-padrão, como testes paramétricos, para expressar as medidas de posição e dispersão, respectivamente. Caso contrário, deve-se utilizar os testes não-paramétricos, onde as medidas de posição e dispersão são expressas como mediana e quartis, respectivamente. Para avaliar a normalidade da distribuição (para $n \leq 50$), se utiliza o teste de Shapiro-Wilk.

A escolha adequada do teste a ser utilizado é de fundamental importância, pois conclusões erradas podem ser obtidas caso se escolha o teste inapropriado. Para a escolha do teste, além da distribuição, a quantidade de grupos a serem comparados e o tipo de amostras, dependentes ou independentes, também devem ser analisadas. Consideramos uma amostra como dependente quando há relação entre os sujeitos, ou sejam, eles estão relacionados de alguma maneira, caso não, consideramos as amostras como independentes. De forma resumida, para escolhermos qual teste devemos utilizar, precisamos analisar o tipo de amostra, a quantidade de grupos que serão comparados e a distribuição da amostra, Figura 7 [45-47].

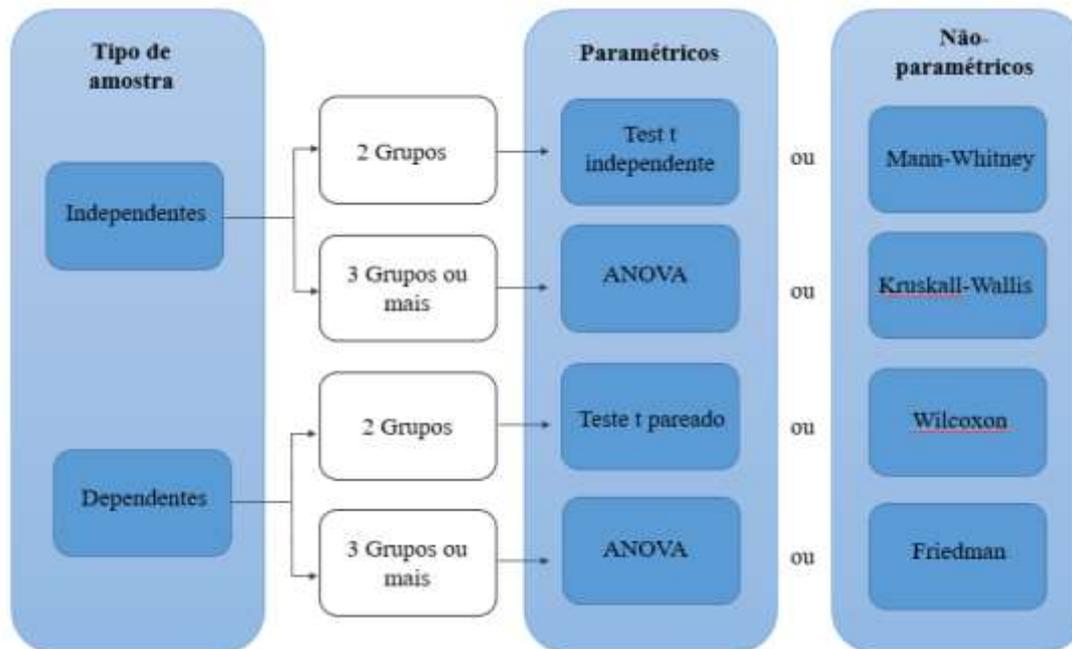


Figura 7. Esquema de escolhas para testes paramétricos e não-paramétricos

Fonte (adaptado):

<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/213509/001117624.pdf?sequence=1>

3.2.1. Shapiro-Wilk

O teste de Shapiro-Wilk tem como finalidade calcular a estatística do teste W e analisar se uma determinada amostra aleatória segue, ou não, uma distribuição normal ou Gaussiana. Essa análise é necessária pois muitos testes estatísticos são baseados na hipótese de que a amostra segue uma distribuição Gaussiana, no entanto, nem sempre isso acontece. Por isso é necessário estar seguro de que os dados estão normalmente distribuídos. Para poder utilizar esse teste, número de dados da amostra (n) deve estar entre $3 > n \geq 50$. Para aplicar o teste, segue-se os seguintes passos [48-50]:

- O primeiro passo é rearranjar os dados da amostra em ordem crescente;
- As subtrações são formadas: $(X_{(n+1)-i} - X_i)$;
- O índice i varia de 1 a $n/2$ ou de 1 a $\frac{(n+1)}{2}$, conforme n seja par ou ímpar, respectivamente;
- Os produtos são formados: $a_i(X_{(n+1)-i} - X_i)$;

- Os coeficientes a_i são tabelados;
- A soma é calculada: $SW = \sum a_i(X_{(n+1)-i} - X_i)$;
- A soma quadrática é calculada: $SQT = \sum (X_i - \bar{X})^2$, ou $(n-1)S^2$, onde o valor de \bar{X} é a média aritmética dos valores;
- A razão é formada: $W_{calculado} = \frac{SW^2}{SQT}$;
- Compara-se o valor de $W_{calculado}$ com o $W_{tabelado}$. Quando $W_{calculado} > W_{tabelado}$, aceita-se que os valores estão distribuídos de acordo com certa função de distribuição normal [49].

3.2.2.

Testes paramétricos

Após definir a normalidade da distribuição, aplica-se os testes paramétricos, sendo o primeiro deles o teste de detecção de *outliers*, seguindo pelos demais testes de hipóteses.

3.2.2.1.

Teste de Grubbs

O teste de Grubbs é um teste para detecção de um valor aberrante ou discrepante, um *outlier*, nas extremidades de uma distribuição Gaussiana. Se após o teste for detectado um ou dois *outliers*, ele(s) deve(m) ser retirado(s) do conjunto de dados e um novo teste para verificar a existência de outro(s) *outlier(s)* deve ser realizado e assim sucessivamente, até que nenhum valor extremo seja detectado na amostra. Caso na segunda análise os dois resultados de uma das extremidades sejam considerados como *outliers*, eles devem ser retirados do conjunto e um novo teste deve ser realizado, agora verificando a existência de dois *outliers* em cada extremidade do conjunto. Isso se repete até que ambos os valores sejam aceitos na distribuição [49-51].

3.2.2.1.1.

Teste de Grubbs para um valor discrepante observado

Para esse teste, é utilizada a seguinte estatística, Equação (3):

$$G = \frac{|g_i - \bar{g}|}{s} \quad (3)$$

Em que g_i : é uma observação da amostra, o valor suspeito; \bar{g} : a média amostral; e s : o desvio-padrão amostral, Equação (4).

$$s = \sqrt{\sum_{i=1}^p (g_i - \bar{g})^2 / (p - 1)} \quad (4)$$

Sendo p o número de dados da amostra. O valor de $G_{\text{calculado}}$ é comparado com o valor de $G_{\text{crítico}}$, para um nível de significância escolhido. Se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}}$ o valor suspeito é determinado como *outlier* [50, 51].

3.2.2.1.2.

Teste de Grubbs para dois valores discrepantes observados

- Dupla alta

Para avaliar se os dois maiores valores são *outliers*, deve-se calcular a relação entre as diferenças quadráticas (G), Equação (5).

$$G_{\text{alta}} = \frac{S_{p-1,p}^2}{S_0^2} \quad (5)$$

Onde:

- $S_0^2 = \sum_{i=1}^p (g_i - \bar{g})^2$ é a diferença quadrática no conjunto com todos os valores;
- $S_{p-1,p}^2 = \sum_{i=1}^{p-2} (g_i - \bar{g}_{p-1,p})^2$ é a diferença quadrática no conjunto, sem os dois maiores valores;
- $\bar{g}_{p-1,p} = \sum_{i=1}^{p-2} \frac{g_i}{(p-2)}$ é a média do conjunto, sem os dois maiores valores.

E então, novamente o valor de $G_{\text{calculado}}$ é comparado com o valor de $G_{\text{crítico}}$, para um nível de significância escolhido. Se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{crítico}}$ os valores suspeitos são determinados como *outliers* [51].

- Dupla baixa

Para avaliar se os dois menores valores são *outliers*, deve-se calcular a relação entre as diferenças quadráticas (G), Equação (6).

$$G_{baixa} = \frac{S_{1,2}^2}{S_0^2} \quad (6)$$

Onde:

- $S_0^2 = \sum_{i=1}^p (g_1 - \bar{g})^2$ é a diferença quadrática no conjunto com todos os valores;
- $S_{1,2}^2 = \sum_{i=3}^p (g_1 - \bar{g}_{1,2})^2$ é a diferença quadrática no conjunto, sem os dois menores valores.

O valor de $G_{calculado}$ é comparado com o valor de $G_{crítico}$, para um nível de significância escolhido. Se $G_{calculado} > G_{crítico}$ os valores suspeitos são determinados como *outliers* [49,51].

3.2.2.2.

Teste-F: Duas amostras para variância

O teste F é utilizado para analisar a variância entre dois conjuntos de dados diferentes e compará-los utilizando o teste de hipóteses. A variância é dada pelo desvio-padrão (s), Equação (4), elevado ao quadrado. O Teste-F considera a razão entre as variâncias das duas amostras, ou seja, a razão do quadrado dos desvio-padrões, Equação (7).

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (7)$$

Sendo sempre utilizado o conjunto de dados com a maior variância no numerador e, conseqüentemente, o de menor variância no denominador. O valor de F encontrado é então comparado ao valor de F crítico, valor derivado de tabelas da distribuição F o qual dependerá do tamanho das amostras e do nível de significância utilizado. Deve-se aceitar H_0 , quando o valor de F encontrado for menor do que o valor de F crítico, nesse caso assume-se que há igualdade entre as variâncias. Caso não, deve-se rejeitar H_0 [51,52].

3.2.2.3.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

O teste t-Student, ou simplesmente teste t é o método mais utilizado para se avaliar as diferenças entre as médias entre dois grupos. Averigua se a média da amostra é diferente de um valor de referência ou da média da população. Neste caso, é estabelecida a seguinte hipótese: Aceita-se H_0 quando há igualdade entre as amostras analisadas, isso ocorrerá quando o valor de t calculado for menor que o valor de t crítico, caso contrário, deve-se rejeitar H_0 . Para se testar a hipótese é calculado a estatística t, Equação (8).

$$t = \bar{x}\sqrt{n}/s_d \quad (8)$$

Onde \bar{x} e Sd são a média e o desvio-padrão, respectivamente, da diferença entre os valores emparelhados; e o número de graus de liberdade de t é $n - 1$ [51].

3.2.3.

Testes não-paramétricos

3.2.3.1.

Intervalo interquartilício

Quando o comportamento do conjunto de dados se afasta da normalidade, a medida de dispersão desvio-padrão deixa de ser a mais adequada, podendo ser substituída pelo intervalo interquartilício (IQR). Nessa abordagem, leva-se em consideração o uso dos quartis, que são encontrados a partir da mediana. A mediana divide a amostra em duas partes iguais, se cada uma dessa metade for dividida novamente os pontos de divisão são chamados de primeiro e terceiro quartil, sendo a mediana o segundo quartil. Para utilizar a regra dos quartis, considera-se como pontos fora da curva (*outliers*) aqueles valores menores ou maiores que 1,5 vezes a faixa interquartilícia (diferença entre o terceiro e primeiro quartil) a partir do primeiro e terceiro quartis, respectivamente [49,51].

A estatística do teste é realizada a partir do seguinte procedimento:

- Primeiramente ordene os valores de forma crescente;
- Obtenha a mediana, que representa o segundo quartil (Q_2);

- Obtenha o primeiro e terceiro quartil (Q_1 e Q_3), procedendo como se fosse calcular a mediana da primeira e segunda metade dividida, respectivamente;
- Os valores discrepantes são aqueles maiores do que $Q_3 + 1,5 \times (Q_3 - Q_1)$ e menores do que $Q_1 - 1,5 \times (Q_3 - Q_1)$;

A partir dos valores calculados é possível ilustrar um boxplot, Figura 7:

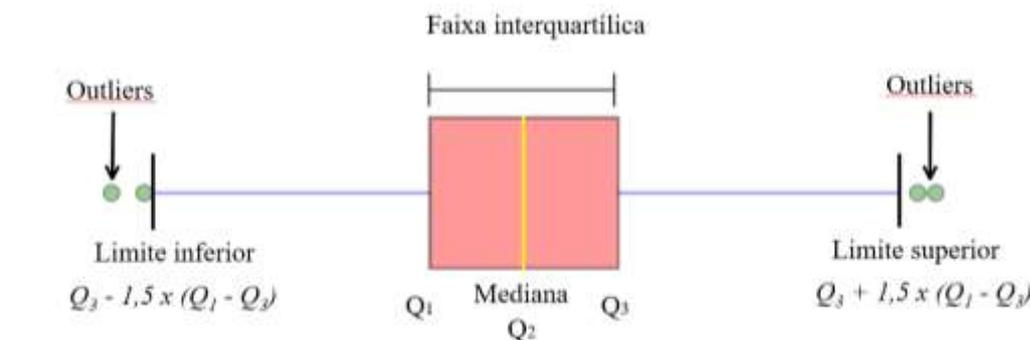


Figura 8. Representação esquemática do boxplot (horizontal)

Fonte (Adaptado): <https://towardsdatascience.com/understanding-boxplots-5e2df7bcbd51>

3.2.3.2.

Teste de Wilcoxon

Os testes de comparação de média e variância descritos até agora são testes paramétricos, ou seja, devem ser utilizados quando a distribuição dos dados possui normalidade. Como mencionado no item 3.2, para a escolha do teste estatístico, deve-se levar em consideração o tipo de amostra, o número de grupos e o tipo da distribuição. O teste de Wilcoxon deve ser utilizado quando as amostras possuem apenas dois grupos, possuem distribuição não Gaussiana e são dependentes, Figura 7. O teste de Wilcoxon é a alternativa não-paramétrica para o teste t-pareado. Para esse teste, é necessário seguir os seguintes passos:

- Para cada par das distribuições, determinar a diferença (d).
- Ignore os sinais das diferenças e ordene-as da menor para a maior e as substitua pelo valor do posto correspondente. Quando as diferenças tiverem o mesmo valor numérico, associe a elas a média dos postos envolvidos no empate.
- Atribua a cada posto o sinal ignorado anteriormente, ou seja, que foi originado pela diferença.

- Obter o valor T que representa a menor das somas de postos de mesmo sinal.
- Determinar N que representa o número de pares de dados para quais a diferença $d \neq 0$.

Para encontrar o valor de z calculado é aplicado a seguinte estatística, Equação (9):

$$z = \frac{T - \mu_T}{\sigma_T} \quad (9)$$

Sendo:

$$\mu_T = \frac{N \cdot (N + 1)}{4} \quad (10)$$

e

$$\sigma_T = \sqrt{\frac{N \cdot (N + 1) \cdot (2 \cdot N + 1)}{24}} \quad (11)$$

Por fim, o valor de z calculado é comparado ao valor de z tabelado, se z calculado for menor do que o z tabelado devemos rejeitar H_0 , ou seja, há diferença entre as amostras, caso contrário deve-se aceitar H_0 [51, 53].

3.2.3.3.

Teste de Friedman

Considerado uma extensão do teste de Wilcoxon, o Teste de Friedman é utilizado para comparação de três ou mais distribuições que não possuem normalidade, por isso também se utiliza os postos das observações. O teste de Friedman é considerado também uma alternativa não paramétrica para a ANOVA com blocos casualizados. O teste utiliza a seguinte estatística, Equação (12):

$$X^2 = \frac{12R}{nk(k+1)} - 3n(k+1) \quad (12)$$

Onde k representa o número de tratamentos, n o número de blocos e R a soma das ordens atribuídas aos dados do tratamento, os números 12 e 3 são constantes que independem do número da amostra e condições experimentais. O valor de X^2 calculado é comparado com um valor de X^2 tabelado, onde é testado a estatística H_0 . Se o valor de X^2 calculado foi menor do que o valor de X^2 tabelado, deve-se aceitar H_0 , ou seja, não há diferença estatística entre as amostras, caso contrário,

deve-se rejeitar H_0 , assumindo que as amostras são estatisticamente diferentes [51, 54].

4. Parte Experimental

Neste capítulo é descrito como foi realizada a etapa experimental do presente trabalho que foi dividido em três partes. A primeira parte retrata a determinação do pKa e faixa de viragem dos indicadores de pH em meio etanólico. A segunda parte apresenta o desenvolvimento de todo o planejamento de experimentos “Box-Behnken Design” (BBD), utilizado para otimizar a nova arquitetura proposta para o eletrodo de vidro combinado. Por fim, a terceira parte retrata os resultados dos estudos realizados com o eletrodo otimizado pelo DoE comparando-os com os obtidos a partir dos eletrodos: (i) proposto pela ABNT, preenchido com solução etanólica de LiCl; (ii) eletrodo de vidro combinado, convencional, preenchido com solução aquosa de KCl e; (iii) com os intervalos de pH encontrados utilizando os diferentes indicadores ácido-base, determinados em etanol.

4.1. Determinação do pKa em meio etanólico

Para avaliar se os indicadores ácido-base possuem comportamentos distintos com a variação do meio aquoso ou etanólico, foram realizados experimentos para a determinação dos valores de pKa para diferentes indicadores em meio etanólico, cujo procedimento é descrito a seguir:

- Preparou-se uma solução de etanol hidratado, 93,5 % (m/m), e foi colocado 100 mL em um béquer, onde o mesmo foi mantido sob agitação em um agitador magnético a temperatura de (22 ± 2) °C.
- Para a realização dos experimentos foram adicionados 200 µL do indicador ao volume inicial de etanol.
- Na sequência, foram adicionados à solução, contendo o indicador, volumes crescentes (10 µL) de ácido e, ou base (HCl e, ou NaOH 1,0 mol L⁻¹) para o ajuste inicial do pH, em função do indicador utilizado; a adição dos micro volumes permitia obter-se a curva de titulação do indicador em seu intervalo de viragem.

- No desenvolver dos experimentos, o pH da solução era obtido utilizando o eletrodo de vidro convencional, com o eletrodo externo preenchido com solução saturada de KCl em água. Para este eletrodo o potencial de junção líquida foi determinado experimentalmente (E_{jl}) e, posteriormente, corrigido, de modo a se obter o valor do pH em solução etanólica; conforme demonstrado mais adiante neste texto.
- A partir da variação da coloração do corante, observada atentamente pelo analista, com a adição da solução do ácido ou da base, algumas alíquotas foram retiradas e tiveram seus espectros de absorção obtidos no intervalo de comprimentos de onda: ($350 \leq \lambda \leq 600$) nm. A partir destes foram obtidos os valores de absorvância (A) para os comprimentos de onda de máximo de absorção ($\lambda_{m\acute{a}x.}$) dos picos, que representam as formas ácidas e básicas do corante.
- O experimento foi aplicado para todos os indicadores utilizados, sendo eles: verde de bromocresol, vermelho de metila, alaranjado de xilenol e azul de bromofenol.

Como mencionado anteriormente no Capítulo 2, um dos problemas de se utilizar o eletrodo convencional para medir pH em meio etanólico é a presença do potencial de junção líquida (E_{jl}) desenvolvido na região do diafragma. Considerando este fato, o valor médio do E_{jl} foi determinado experimentalmente. Tal determinação foi conduzida utilizando um par de eletrodos de prata cloreto de prata, previamente testados para a diferença de potencial ($0,000 \pm 0,002$) mV, para $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$:

1. O eletrodo externo ao eletrodo de vidro combinado (composição: solução aquosa saturada com KCl);
2. Um eletrodo de referência preenchido com solução etanólica de cloreto de lítio (LiCl) $3,0 \text{ mol L}^{-1}$, imersos em uma solução de EHC.

Um multímetro digital foi utilizado para as medições do E_{jl} . A medição foi realizada ao longo de 5 dias e o valor médio obtido foi de $E_{jl} = 24,58 \text{ mV}$. Para a conversão deste valor de E_{jl} em pH aplicou-se a Equação (13) [55]:

$$\alpha = \frac{\Delta U}{\Delta pH} \quad (13)$$

Sendo α o coeficiente angular, ΔU o valor da variação de potencial medido, e ΔpH o intervalo de pH correspondente ao ΔU . Dividindo o valor de potencial pelo coeficiente angular, obtido a partir da calibração do medidor de pH, pHmetro, Figura 9, o resultado do cociente encontrado é o valor de ΔpH . Este valor deverá ser descontado do valor dos pH obtidos durante a realização dos experimentos [24, 55,56].

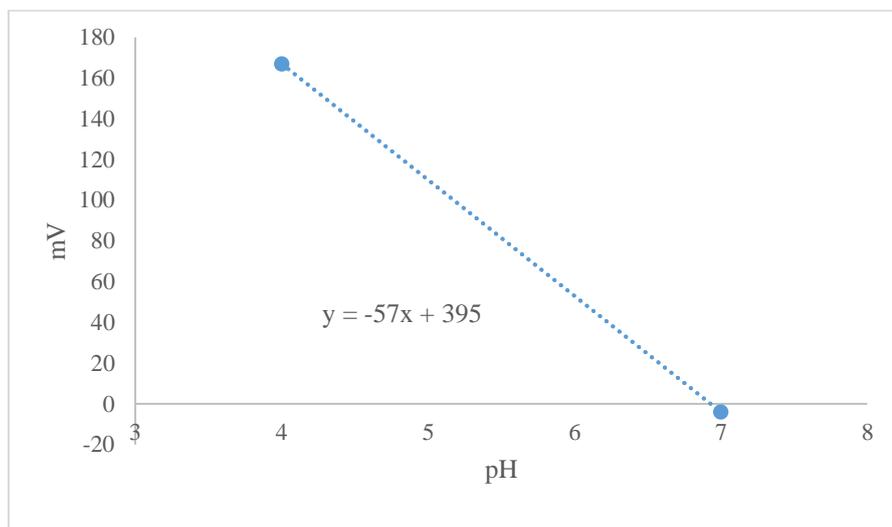


Figura 9. Valor pH *versus* mV obtidos pelo sistema de calibração do medidor de pH

Preparação das soluções dos indicadores, procedimento:

- Vermelho de metila: Dissolve-se 0,2 g de vermelho de metila em 60 mL de etanol anidro e dilui-se para 100 mL de água.
- Verde de bromocresol: Dissolve-se 0,1 g de verde de bromocresol em 60 mL de etanol anidro e dilui-se para 100 mL de água.
- Alaranjado de xilenol: Dissolve-se 0,1 g de alaranjado de xilenol em 60 mL de etanol anidro a quente e dilui-se para 100 mL de água.
- Azul de bromofenol: Dissolve-se 0,1 g de azul de bromofenol em 60 mL de etanol anidro e dilui-se com água até 100 mL.

Todas as soluções foram preparadas em balão volumétrico, as soluções que sofreram aquecimento foram resfriadas antes da transferência para o balão.

4.2.

Construção da proposta da nova arquitetura para o eletrodo de vidro

O preparo da nova arquitetura para o eletrodo de vidro combinado teve como objetivo principal minimizar os possíveis potenciais de junção líquidas durante o procedimento de medição, focando na obtenção de resultados de medição mais confiáveis de pH de EHC. Para isto, a nova arquitetura para o eletrodo teve como princípio o emprego de um único solvente, para o eletrodo de vidro e para o eletrodo de referência externo: o etanol hidratado combustível, efetivando, assim, uma quebra de paradigma na medição de pH, utilizando-se de um sistema de medição na ausência de água como solvente.

4.2.1.

Variáveis escolhidas

Para o presente estudo foram escolhidas três variáveis, sendo elas:

- Solução tamponante

Como mencionado, no Capítulo 2, o eletrodo interno ao bulbo de vidro necessita ser preenchido com uma solução de pH estável ao longo do tempo. Para isso, foram preparadas soluções tamponantes de acetato de lítio, $C_2H_3O_2Li$ e ácido acético, $C_2H_3O_2H$, em meio de etanol hidratado combustível em 3 diferentes níveis de concentrações equimolares (0,001 molal; 0,05 molal; 0,1 molal), que são os 3 níveis dessa primeira variável que foram estudados. Tais níveis foram obtidos a partir de estudos anteriores empregando soluções de diferentes concentrações equimolares para a determinação dos parâmetros estabilidade e homogeneidade [57].

- Força iônica LiCl em etanol

A segunda variável é a força iônica da solução de cloreto de lítio em etanol que preenche o eletrodo de referência. O primeiro nível foi escolhido com base no eletrodo de vidro proposto pela ABNT, o qual é preenchido com uma solução de LiCl em etanol 3 mol L^{-1} . Foi escolhido então, esse valor para ser o nível superior e como os valores dos níveis inferiores precisam ser equidistantes para poder ser utilizado o BBD, foram escolhidos os níveis 0,1 molal, 1,6 molal e 3,1 molal.

- Temperatura da solução a se medir o pH

A temperatura está diretamente relacionada à determinação do potencial, e consequentemente, do pH; por isso, ela foi a terceira variável estudada. Foram escolhidos os níveis que mais se assemelham às condições reais de um laboratório, sendo 20 °C, 25 °C e 30 °C.

A partir das escolhas das variáveis e dos seus respectivos níveis, o planejamento Box-Behnken foi o escolhido para estudar a contribuição da força iônica, da concentração da solução tamponante e da temperatura para a construção de um novo eletrodo de vidro para medição de pH em etanol hidratado combustível, Tabela 3.

Tabela 3. Níveis das variáveis escolhidas para o planejamento Box-Behnken

Variáveis	Símbolo	Nível de variável codificada		
		Baixo	Central	Alto
		-1	0	+1
Solução tamponante (molal)	X ₁	0,001	0,050	0,100
Força iônica (molal)	X ₂	0,1	1,6	3,1
Temperatura (°C)	X ₃	20	25	30

4.2.1.1.

Preparo da solução tamponante em meio etanólico

O modo de preparo das soluções tamponantes será descrito a seguir.

A molalidade da solução de acetato de lítio e ácido acético foi calculada com base na concentração escolhida para cada solução, seguindo o seguinte cálculo, Equação (14):

$$w = \frac{m_1}{MM \cdot m_2} \quad (14)$$

De modo que, W é a concentração da solução (molal), m_1 a massa de sal necessária (g), MM a massa molar (g mol^{-1}) e m_2 a massa do solvente (kg). As massas calculadas de cada reagente para as 3 concentrações são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Massas de ácido acético e acetato de lítio calculadas para $m_2 = 4,00$ kg

Reagentes	Concentrações (molal)		
	0,001	0,050	0,100
Ácido acético (g)	0,2402	12,1305	24,0208
Acetato de lítio (g)	0,2639	13,3299	26,3960

Para o preparo, foi tomada a massa do solvente e a partir desta massa foram refeitos os cálculos para encontrar as quantidades de massa de ácido acético e massa de acetato de lítio para o preparo da solução. Na Figura 10a é mostrada a imagem do béquer de preparação, em que foi feita a mistura, a partir da qual é possível observar a presença de corpo de fundo; o béquer foi mantido vedado com plástico filme (filmito) para minimizar a evaporação do solvente, e a solução foi mantida sob agitação por 7 dias de modo a favorecer os processos de equilíbrios que se estabelecem após a mistura dos reagentes. Após o período de 7 dias sob agitação mecânica, empregando agitador magnético, constante e ininterrupta a solução se apresentou menos turva e sem a presença do corpo de fundo, Figura 10b.

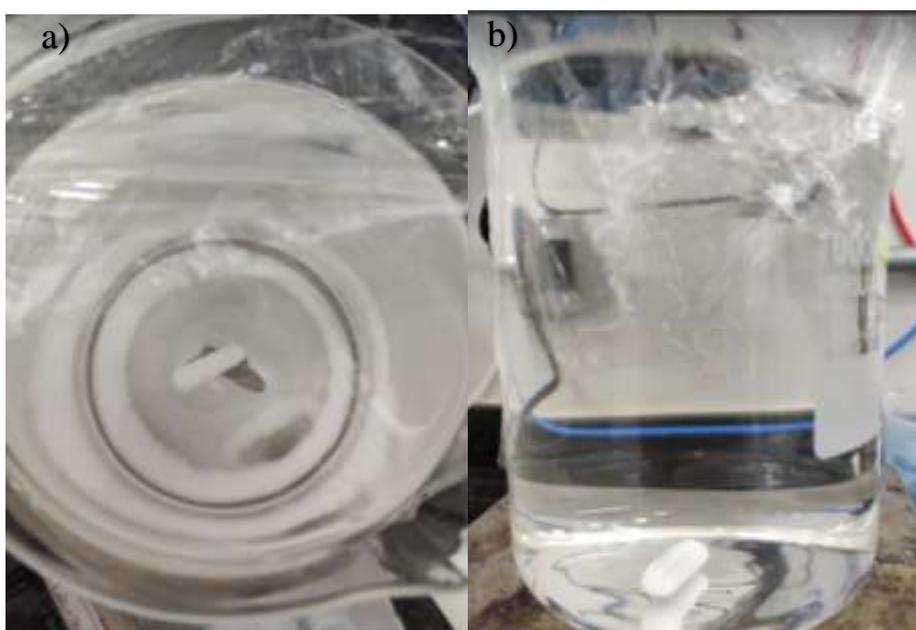


Figura 10. a) Corpo de fundo depositado no fundo do béquer logo após a adição do acetato de lítio e ácido acético. b) Solução tamponante em meio etanólico após 7 dias de agitação constante e ininterrupta.

Fonte: Autor

4.2.1.2.

Solução de cloreto de lítio em meio etanólico

Para o preparo, a massa do sal foi calculada utilizando novamente a Equação (14) e o resultados obtidos estão presentes na Tabela 5.

Tabela 5. Massas de cloreto de lítio calculadas para $m_2 = 0,100$ kg

	Concentrações (molal)		
	0,1	1,6	3,1
LiCl (g)	0,4239	6,7830	13,1421

4.2.2.

Construção do eletrodo de vidro modificado

A nova arquitetura foi preparada a partir de um eletrodo de vidro combinado universal da marca Sensoglass, modelo SC09. Deve ser observado que em todo o tempo do procedimento de preparo o bulbo de vidro foi mantido em contato com a solução interna e externa adequadas, de modo a evitar o seu ressecamento.

4.2.2.1.

Preparação do eletrodo de referência interno

Para realizar a construção da nova arquitetura do eletrodo foram seguidos os seguintes passos:

- Com o auxílio de um cortador de vidro (diamante) foram realizados cortes no corpo externo do eletrodo de vidro combinado, Figura 11a. Primeiramente foram feitos os cortes transversais, representados pelas letras A e B, para a remoção da parte externa do eletrodo (compartimento do eletrodo de referência externo); etapa que requer cuidado, e que permite a remoção do eletrodo de referência (fio de Ag/AgCl para ser reutilizado; mantendo a configuração original). Removido o corpo do eletrodo externo, foi feito outro corte transversal, agora no corpo de vidro do eletrodo interno, conforme sinalizado pela letra C, para permitir o acesso ao eletrodo interno e a sua solução. A solução interna foi removida e substituída por água pura.

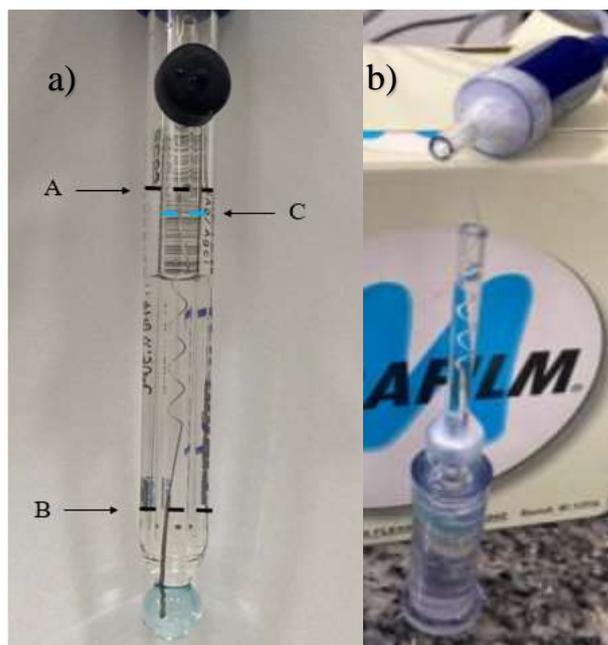


Figura 11: a) Eletrodo de vidro combinado com as marcações do local de “cortes”. b) Parte interna do eletrodo após o corte “C”

Fonte: Autor

- Após a realização dos cortes necessários, apenas o eletrodo interno foi mantido, Figura 11b. O eletrodo interno foi preenchido com solução tamponante etanólica, com a força iônica ajustada com a solução de cloreto de lítio em etanol.
- A preparação do eletrodo interno, posterior à troca da solução, foi reutilizado de modo a manter a configuração original do sistema de eletrodos de Ag/AgCl. Algumas vezes o fio de prata se rompeu e, então, foi necessário refazer a solda da parte que continha a deposição do cloreto de prata sobre a prata, Ag/AgCl, Figura 12. Para resolver esse problema, o eletrodo de Ag/AgCl foi soldado ao fio de cobre (interno) do cabo coaxial de 50 ohms. A solda com o PbSn era utilizada também para garantir a rigidez no contato elétrico formado. Esta é uma etapa que deve ser conduzida, também, com cuidado para evitar o aquecimento da região contendo o depósito do AgCl sólido sobre o fio de prata. Esta região foi então protegida com parafilme, para evitar o contato da região da solda com a solução interna do eletrodo de vidro e da rigidez mecânica à região, Figura 12a (veja seta). A Figura 12c mostra o sistema finalizado, pronto para o uso.

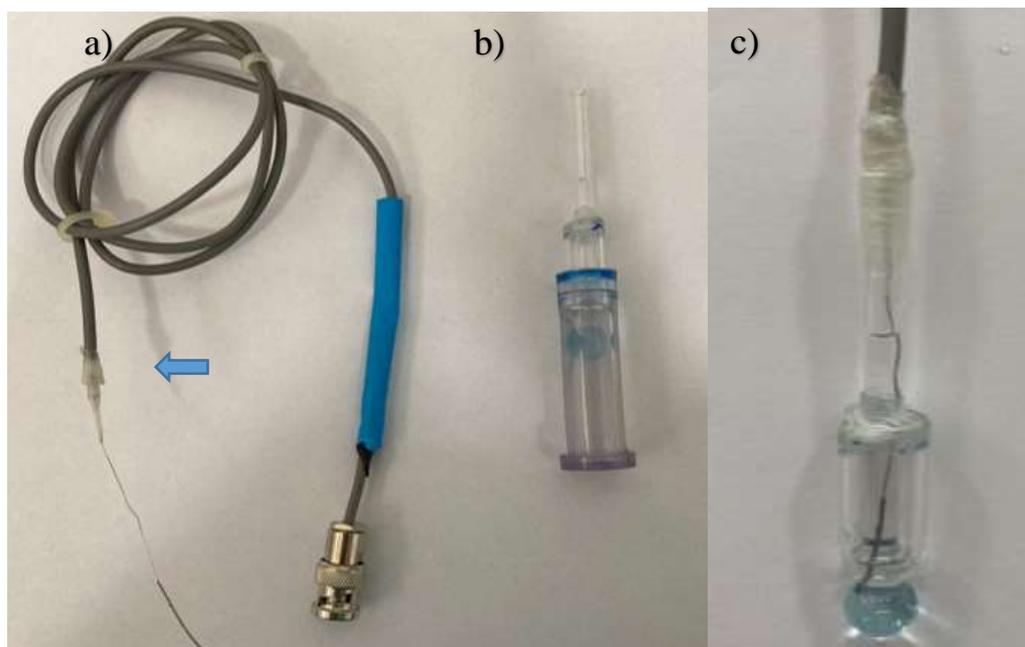


Figura 12. a) Modificação em andamento do eletrodo interno: região de solda do fio de cobre/fio de prata, isolado com parafilme; b) Modificação na vidraria; c) Eletrodo interno finalizado.
Fonte: Autor

4.2.2.2. Preparação do eletrodo de referência externo

A construção do eletrodo de referência foi realizada a partir da utilização do eletrodo de Ag/AgCl removido previamente do eletrodo de vidro (eletrodo externo), conforme mostrado anteriormente. Foi utilizado o mesmo eletrodo de Ag/AgCl de modo a manter o par original dos eletrodos do eletrodo de vidro combinado. O procedimento de solda do eletrodo, fio de Ag contendo em sua extremidade o depósito de AgCl, foi feito em acordo com o apresentado anteriormente. O eletrodo uma vez preparado foi inserido em uma ponteira de micropipeta e selado com parafilme de modo a evitar o escoamento da solução interna de eletrólito de suporte, LiCl em etanol (EHC). As Figuras 13a e 13b apresentam as etapas de preparação e o eletrodo externo finalizado de Ag/AgCl, LiCl em EHC. Deve ser observado que estes eletrodos não possuem diafragmas, justamente para a minimização da presença do potencial de junção líquida. A ponteira foi preenchida com a solução de cloreto de lítio em etanol (EHC) de modo a se obter eletrodos com diferentes valores de força iônica; sendo esta, a segunda variável estudada pelo DoE. As características físico-químicas são apresentadas pela Tabela 6.

Tabela 6. Características físico-químicas disponibilizadas pela usina parceira que realizou a doação do etanol hidratado combustível

Parâmetros	Valores
pH	6,10
Condutividade (μS)	109
Massa alcoólica (%)	93,2
Massa específica (Kg m^{-3})	809,3

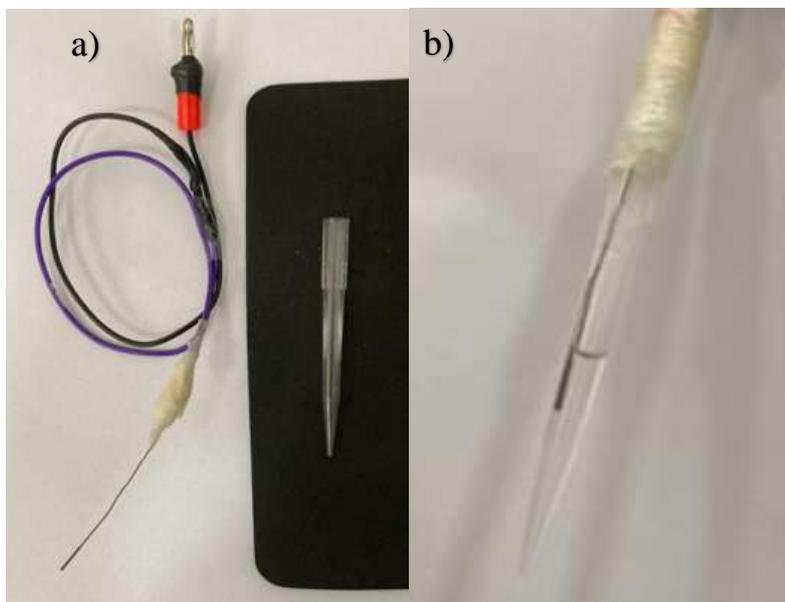


Figura 13. Modificação em andamento do eletrodo externo (referência): a) Eletrodo montado evidenciando a região da solda e ponteira de micropipeta utilizada como corpo para o eletrodo de referência externo; b) Eletrodo finalizado e preenchido com solução de concentração adequada de LiCl.

Fonte: Autor

O eletrodo de vidro modificado internamente e o de referência foram conectados ao medidor de pH, pHmetro, e inseridos na solução que se deseja medir o pH, juntamente com o termômetro que irá controlar a terceira variável utilizada pelo DoE, Figura 14. Como mencionado anteriormente, o pHmetro não mede pH diretamente, mas sim a diferença de potencial encontrada e o foco do trabalho é construir uma nova arquitetura na qual o potencial medido seja o potencial gerado entre as interfaces interna e externa do eletrodo de vidro. Para assegurar que o potencial a ser medido seja, efetivamente, aquele desenvolvido entre as regiões de interfaces interna e externa ao bulbo de vidro, o eletrodo modificado foi testado medindo o pH da mesma solução tamponante que foi utilizada para preencher o eletrodo interno, para assim, garantir que as atividades do íon H^+ , interna e externa

ao bulbo, sejam as mesmas e que, portanto, o potencial a ser desenvolvido tenda a 0 V.

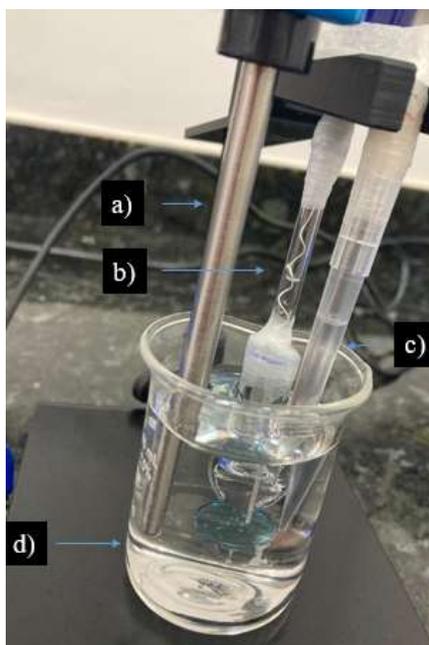


Figura 14. Célula de medição utilizando o eletrodo modificado. a) Termômetro bimetalico (Pt/Pt-Rh 13 %). b) Eletrodo de vidro modificado internamente; c) Eletrodo de referência; d) Solução tamponante preparada em EHC.

Fonte: Autor

4.2.3. Planejamento de experimentos

O procedimento para a modificação do eletrodo foi conduzido de forma aleatória, a fim de que todas as possíveis combinações a partir dos diferentes níveis das variáveis que o BBD sugere. Na Tabela 7, são apresentadas cada uma das variáveis utilizadas nos experimentos.

Tabela 7. Matriz de experimentos Box-Behnken

Experimento	Variável 1 (molal)	Variável 2 (molal)	Variável 3 (°C)
1	0,001	0,1	25
2	0,001	3,1	25
3	0,100	0,1	25
4	0,100	3,1	25
5	0,001	1,6	20
6	0,001	1,6	30
7	0,100	1,6	20
8	0,100	1,6	30
9	0,050	0,1	20
10	0,050	0,1	30
11	0,050	3,1	20
12	0,050	3,1	30
13	0,050	1,6	25
14	0,050	1,6	25
15	0,050	1,6	25

4.3.

Estudos realizados com o eletrodo otimizado

Para comparar o desempenho do eletrodo otimizado foi utilizada a solução tamponante 0,050 molal. Foram medidos o pH e o potencial em mV, da solução tamponante utilizando o eletrodo convencional preenchido com KCl saturado em água (eletrodo A), o eletrodo sugerido pela ABNT (eletrodo B) e o eletrodo otimizado pelo DoE (eletrodo C), para assim comparar os valores das medidas de pH obtidos a partir deles.

Outra comparação realizada foi com os indicadores, considerados como referência, a partir de suas faixas de viragem obtidas, previamente, em EHC. As faixas de viragem dos indicadores foram obtidas por extrapolação gráfica, que foi determinada no Capítulo 5, após a determinação experimental dos valores de pKa em EHC.

4.3.1. Medições utilizando os três eletrodos

Amostras independentes da solução tamponante em meio etanólico (0,050 molal) foram submetidas à medição do pH ao longo de 10 semanas. As leituras de pH foram obtidas todas às terças-feiras, no mesmo intervalo de tempo, período matutino, tendo sido realizadas três repetições ($n = 3$, amostras independentes). Os valores das medidas, obtidas para os três diferentes eletrodos, estão representados nas Tabelas 8-10 juntamente com os respectivos valores de potencial fornecidos, entre parênteses, simultaneamente aos valores de pH, pelo pHmetro.

Tabela 8. Resultados obtidos pelo eletrodo A (ASTM)

Semana	pH (mV)		
1	6,82 (9)	6,93 (3)	6,96 (1)
2	6,89 (5)	6,91 (4)	6,87 (5)
3	6,80 (9)	6,86 (6)	6,84 (7)
4	6,89 (4)	6,91 (3)	6,93 (2)
5	6,94 (1)	6,96 (0)	6,94 (1)
6	6,84 (7)	6,93 (2)	6,89 (4)
7	6,92 (2)	6,86 (6)	6,81 (9)
8	6,84 (7)	6,87 (5)	6,96 (0)
9	6,94 (1)	6,96 (0)	6,94 (1)
10	7,03 (-4)	7,03 (-4)	6,98 (-1)

Tabela 9. Resultados obtidos pelo eletrodo B (ABNT)

Semana	pH (mV)		
1	6,49 (40)	6,42 (43)	6,40 (44)
2	6,63 (31)	6,63 (31)	6,63 (31)
3	6,41 (43)	6,47 (40)	6,50 (39)
4	6,68 (28)	6,67 (29)	6,71 (27)
5	6,40 (45)	6,35 (47)	6,35 (47)
6	6,57 (34)	6,61 (32)	6,60 (33)
7	6,54 (36)	6,56 (35)	6,57 (34)
8	6,88 (17)	6,87 (18)	6,88 (17)
9	6,76 (24)	6,78 (23)	6,78 (23)
10	6,56 (36)	6,57 (34)	6,56 (35)

Tabela 20. Resultados obtidos pelo eletrodo C (Modificado)

Semana	pH (mV)		
1	6,67 (-2)	6,69 (-4)	6,71 (-5)
2	6,71(-5)	6,72 (-6)	6,71 (-5)
3	6,74 (-7)	6,72 (-6)	6,72 (-6)
4	6,63 (0)	6,63 (0)	6,64 (-1)
5	6,67 (-2)	6,65 (-1)	6,67 (-2)
6	6,66 (-2)	6,70 (-4)	6,67 (-3)
7	6,72 (-5)	6,71 (-4)	6,72 (-5)
8	6,73 (-7)	6,75 (-8)	6,72 (-5)
9	6,72 (-5)	6,70 (-4)	6,70 (-4)
10	6,73 (-6)	6,72 (-6)	6,72 (-5)

4.3.2.

Determinação do pH por indicadores de pH

Para avaliar o comportamento dos indicadores em meio etanólico, foram utilizadas soluções de EHC e a cada solução foi adicionado 200 μL do indicador vermelho de metila. Após a adição do indicador, foram adicionados micro volumes de soluções de concentrações conhecida de ácido e base; as adições foram realizadas em dois experimentos independentes: (i) Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹, para avaliar o comportamento espectrofotométrico do indicador quando há a presença da espécie ácida; e (ii) o mesmo procedimento foi aplicado para avaliar a espécie básica do indicador, utilizando a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹. A avaliação do comportamento espectrofotométrico de cada espécie, ácida ou básica, foi feita observando-se os pontos de pico máximo de absorvância ($\lambda_{\text{máx}}$) para cada uma das soluções.

4.3.3.

Comportamento do eletrodo otimizado em uma suposta curva de calibração

Por fim, foram retiradas duas alíquotas da solução tamponante (ST), onde uma alíquota foi acidificada com adição de HCl 1,0 mol L⁻¹, H⁺, e a outra alíquota foi basificada com a adição de NaOH 1 mol L⁻¹, OH⁻, fazendo com que a ST perdesse sua capacidade tamponante propositalmente, para que assim fosse possível

realizar a leitura utilizando o eletrodo C em diferentes pHs e avaliar seu comportamento a 25 °C. Esse estudo foi realizado para avaliar o comportamento do eletrodo em uma suposta curva de calibração, vislumbrando a elaboração de um material de referência para calibração do sistema otimizado. Os valores encontrados estão presentes na Tabela 11.

Tabela 11: Valores obtidos pela leitura da solução tamponante e das soluções acidificada e basicada utilizando o eletrodo C.

	Soluções		
	H ⁺	ST	OH ⁻
Mv	88,43	-5	-133
pH	5,05	6,71	8,79

5. Resultados e discussão

O capítulo 5 também foi dividido em três partes, as quais são referentes à determinação do pKa e intervalos de viragem dos indicadores em meio etanólico, ao planejamento de experimentos e ao estudo comparativo feito com o eletrodo otimizado pelo DOE, respectivamente.

5.1. Determinação do pKa em meio etanólico

Após a realização do experimento utilizando o indicador vermelho de metila, os valores de pH de cada alíquota retirada foram corrigidos aplicando a Equação 13, obtêm-se os resultados apresentados na Equação (15).

$$-57,0 = \frac{24,58}{\Delta pH} \quad (15)$$

Encontramos um valor de ΔpH igual a -0,43, valor próximo ao apresentado por Battes para a mistura de etanol e água 90 %, o qual ele determina como -0,40. Ou seja, para cada valor de pH medido pelo eletrodo de vidro convencional deverá ser descontado 0,43, para assim obter o valor de pH corrigido do efeito do potencial de junção líquida, Tabela 12 [24].

Tabela 12. Valores de pH obtidos para cada uma das alíquotas, utilizando o indicador vermelho de metila, e seus valores corrigidos.

Alíquota	pH lido	pH corrigido
1	6,40	5,97
2	6,80	6,37
3	7,15	6,72
4	7,40	6,97
5	7,64	7,21
6	7,87	7,44
7	8,12	7,69
8	8,31	7,88
9	8,54	8,11
10	8,92	8,49

Como mencionado no Capítulo 4, para cada alíquota da solução etanólica contendo o indicador foi realizada a leitura no espectrofotômetro, Figura 15.

Na referida figura, pode ser observado os picos de absorvância ($A_{\text{máximo}}$) presentes no $\lambda = 413 \text{ nm}$, referentes à espécie básica do indicador, a qual possui coloração amarela, e os picos presentes no $\lambda = 510 \text{ nm}$, referentes à espécie ácida do indicador, cuja coloração é vermelha. Outro aspecto importante é a presença do ponto isoabsortivo (isosbético); isto é, o comprimento de onda no qual todas as espécies absorventes têm a mesma absorvância, de modo que a lei de Beer não é afetada pelo equilíbrio, em $\lambda = 438 \text{ nm}$, evidenciando a presença de duas espécies em equilíbrio.

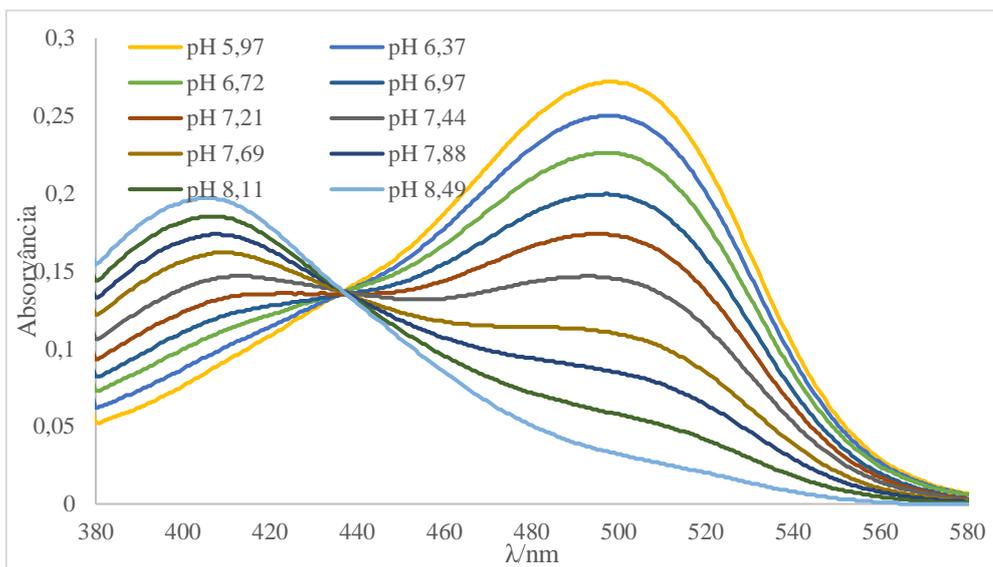


Figura 15. Espectros obtidos para cada uma das alíquotas utilizando o indicador vermelho de metila

Para encontrar o valor de pK_a foram aplicados os princípios espectrofotométricos apresentados no Capítulo 2. A partir dos valores de absorvância coletados e dos comprimentos de onda de máxima absorção, para as formas ácidas e básicas do indicador, foi possível aplicar a expressão matemática apresentada na equação 16 (equação de Henderson-Hasselbalch) [21] e sua representação gráfica da relação $\log [A_{\text{ind}^-} / A_{\text{Hind}}]$ como função de $\text{pH}_{\text{corrigido}}$, Figura 16 [24, 58].

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Ind}^-]}{[\text{Hind}]} \quad (16)$$

Partindo da Equação 16 e representando graficamente os valores de pH corrigidos como função dos valores de $\log \frac{[\text{Ind}^-]}{[\text{Hind}]}$, Figura 16, é possível encontrar o

valor de pKa a partir do intercepto da curva com o eixo Y, situação em que $\text{pH} = \text{pKa}$, o qual para o indicador vermelho de metila é igual a 6,98.

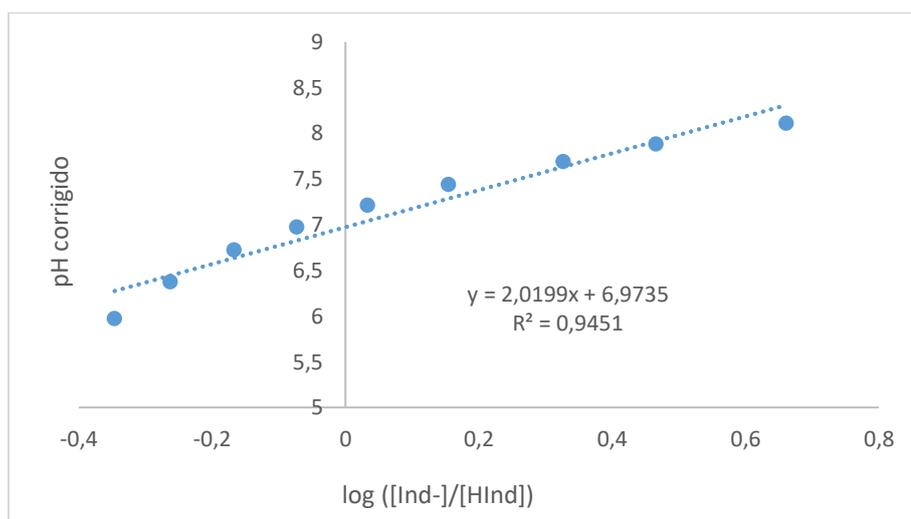


Figura 16. Representação gráfica dos valores de pH como função do valor de $\log ([\text{Ind}^-]/[\text{HInd}])$.

Para a determinação do intervalo de viragem, além da observação atenta do operador para a evidenciação do intervalo, foi também acompanhado pela obtenção gráfica dos valores de início e final do processo de viragem do indicador, como exemplificado no Capítulo 2, item 2.2.1.1. Na Figura 17, são apresentados os valores de absorvância normalizados para o indicador em função do pH corrigido. A extrapolação obtida a partir da curva pontilhada fornece os limites de pH inferior e superior para a viragem do indicador, os pontos em amarelo foram os que obtiveram a melhor correlação, 99,93 %. Conseqüentemente, esses serão os pontos utilizados para realizar a extrapolação da curva [24].

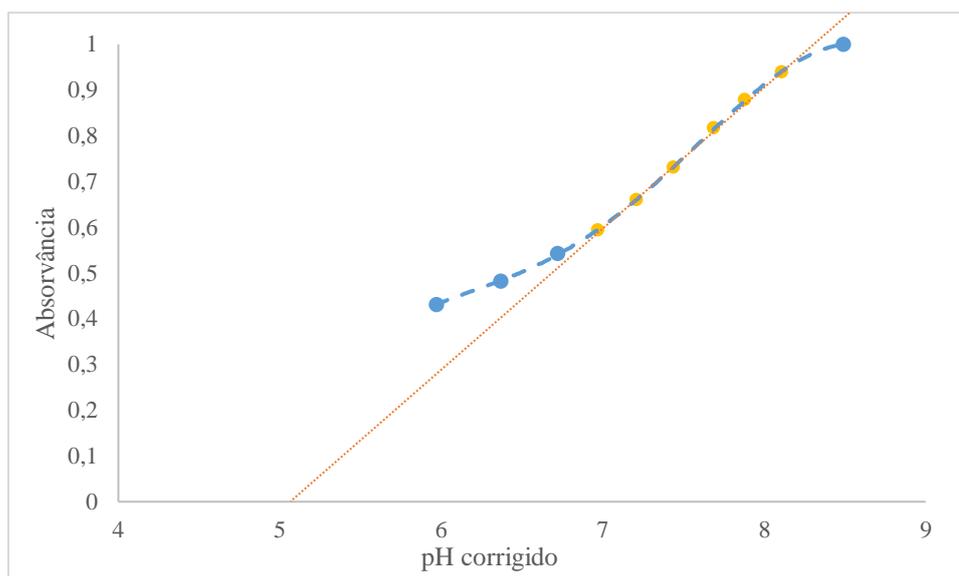


Figura 17. Representação gráfica dos valores de Absorvância x pH para a determinação dos valores da faixa de viragem do indicador vermelho de metila, em amarelo os pontos que apresentam melhor correlação e foram utilizados para realizar a extrapolação da curva.

Utilizando o Software Excel, foram encontrados o valor da intercepção (coeficiente linear), -1,5701, e o valor da inclinação da reta, 0,3099, por meio de um ajuste linear não-ponderado, Equação (17), onde y representa a absorvância e x é o pH.

$$y = \beta x + \alpha \quad (17)$$

Onde, α representa o coeficiente linear e β a inclinação, obtemos a seguinte Equação (18):

$$A = 0,3099 \cdot pH - 1,5701 \quad (18)$$

Para a determinação dos valores da extrapolação da reta, ou seja, onde ela cruza o eixo y em 0 e em 1, por se tratar de valores normalizados, como exemplificado no Capítulo 2, item 2.2.1.1. utilizando-se a Equação 18 obtém-se as Equações (19) e (20):

Para $A = 0$, tem-se:

$$0 = 0,3099 \cdot pH - 1,5701 \quad (19)$$

$$pH = 5,06$$

Para $A = 1$, tem-se:

$$1 = 0,3099 \cdot pH - 1,5701 \quad (20)$$

$$pH = 8,29$$

Com isso, é possível determinar os valores do intervalo de viragem do indicador para o meio etanólico, que no caso do vermelho de metila inicia em 5,06 e finaliza em 8,29, com o pKa de 6,98. Tal procedimento foi realizado para os demais indicadores utilizados, obtendo novos valores de pKa e pH dos seus respectivos intervalos de viragem. A equação obtida para cada um dos indicadores e os novos valores do intervalo estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Valores do intervalo de viragem e pKa encontrados para o meio etanólico 93 %(m/m)

Indicador	Faixa Ácida	pKa	Faixa Básica	Equação
Vermelho de Metila	5,06	6,98	8,29	$A = 0,3099 * pH - 1,5701$
Verde de Bromocresol	6,00	6,92	7,45	$A = 0,5439 * pH - 3,1618$
Alaranjado de Xilenol	6,96	8,60	9,31	$A = 0,4262 * pH - 2,9701$
Azul de Bromofenol	5,14	5,81	7,22	$A = 0,4810 * pH - 2,4746$

5.2.

Construção do eletrodo de vidro - planejamento de experimento – Box-Behnken

Analisando os resultados dos experimentos, Tabela 14, é perceptível que dois experimentos alcançaram valores muito próximos entre si e do valor esperado, os experimentos 9 e 10; analisando esses dois experimentos nota-se que foi alterado somente o nível da variável 3, correspondente à temperatura. O mesmo ocorre quando comparamos os experimentos 7 e 8 e os experimentos 11 e 12, evidenciando que quando se mantém o valor para as variáveis 1 e 2 e altera-se o valor da variável 3 os resultados obtidos são muito semelhantes. Este comportamento demonstra que a variável 3 não é significativa para o experimento, caso contrário os resultados dos experimentos citados apresentariam uma variação maior entre si.

Tabela 14. Matriz de experimento Box-Behnken

Experimento	Solução tamponante (molal)	Força iônica (molal)	Temperatura (°C)	Resposta (mV)
1	0,001	0,1	25	-166
2	0,001	3,1	25	-59
3	0,100	0,1	25	123
4	0,100	3,1	25	303
5	0,001	1,6	20	-155
6	0,001	1,6	30	-222
7	0,100	1,6	20	202
8	0,100	1,6	30	201
9	0,050	0,1	20	0
10	0,050	0,1	30	-3
11	0,050	3,1	20	321
12	0,050	3,1	30	330
13	0,050	1,6	25	-92
14	0,050	1,6	25	-74
15	0,050	1,6	25	-88

O mesmo não ocorre para as demais variáveis. Ao se comparar os experimentos 1 e 2, onde os níveis das variáveis 1 e 3 são mantidos, o valor da variável 2 fica alterada, diferença entre os resultados, -166 e -59 mV, respectivamente. Observação semelhante se aplica aos experimentos 3 e 4, com resultados de 123 e 303 mV; evidenciando assim, que a variável 2 tem grande relevância para o experimento. Por fim, analisou-se a variável 1, experimentos 5 e 7 e 6 e 8, os quais foram mantidos os valores das variáveis 2 e 3. É perceptível ao analisar os experimentos 5 e 7, resposta -155 e 202 mV; e os experimentos 6 e 8, -222 e 201 mV, que a variável 1 tem grande relevância para o experimento, devida a grande diferença obtida entre os resultados.

Após a avaliação dos resultados, a condição otimizada foi a utilizada no experimento 9, onde foi utilizado a solução tamponante de concentração 0,050 molal, força iônica de 0,1 molal e temperatura de 20 °C. Apesar da temperatura não se mostrar relevante para o experimento, escolheu-se manter a temperatura a 20 °C para execução dos experimentos da próxima seção.

5.3.

Estudos realizados com o eletrodo otimizado

Partindo dos resultados obtidos pelo estudo, no qual foi utilizada a ferramenta DoE, foi encontrado um sistema otimizado para a nova arquitetura a qual foi

empregada no eletrodo otimizado. A partir dela foram realizados estudos para comparar os resultados obtidos pelo eletrodo de nova arquitetura, denominado de eletrodo (C), com o eletrodo convencional, denominado de eletrodo (A) e o eletrodo proposto pela norma brasileira, denominado de eletrodo (B), além da aplicação dos indicadores de pH como sistema de referência.

5.3.1.

Comparação entre os três eletrodos

5.3.1.1.

Correção do potencial de junção líquida do eletrodo A

Como mencionado anteriormente no item 5.1, para a correção do potencial de junção líquida é necessário descontar 0,43 de cada valor de pH medido pelo eletrodo A. Esse valor foi determinado experimentalmente a partir da medição do valor do potencial de junção líquida (E_{jl}) estabelecido entre a região interna e externa do eletrodo de referência e posteriormente convertido ao respectivo valor expresso em pH, conforme tratado no capítulo 4. Os valores corrigidos para o eletrodo A estão apresentados na Tabela 15. Esses valores corrigidos são utilizados a partir de agora para o eletrodo A.

Tabela 15. Valores de pH obtidos para o eletrodo A corrigidos

Semana	pH		
1	6,39	6,50	6,53
2	6,46	6,48	6,44
3	6,37	6,43	6,41
4	6,46	6,48	6,50
5	6,51	6,53	6,51
6	6,41	6,50	6,46
7	6,49	6,43	6,38
8	6,41	6,44	6,53
9	6,51	6,53	6,51
10	6,60	6,60	6,55

5.3.1.2. Teste de normalidade

De posse dos valores de pH do eletrodo A já corrigidos, foi realizado o teste de Shapiro Wilk nas três amostras, Tabelas 10, 11 e 16, o resultado do Teste W, estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados do teste de Shapiro Wilk para avaliação da normalidade dos dados.

	Eletrodo		
	A	B	C
W calculado	0,9660	0,9531	0,8942
W crítico	0,9270	0,9270	0,9270

A partir dos resultados da Tabela 16, para um nível de significância de 0,05, foi possível constatar que o valor de W calculado para a distribuição correspondente ao eletrodo A e B, valores 0,9660 e 0,9531, respectivamente, são valores superiores quando comparados ao valor de W crítico, 0,9270. O fato desses valores serem superiores ao valor de W crítico permitem inferir que as distribuições se apresentam conforme esperado para uma distribuição Gaussiana. No entanto, a distribuição obtida para o eletrodo C apresenta um valor para W calculado igual a 0,8942, valor esse, menor quando comparado ao W crítico, evidenciando assim, uma distribuição que não atende ao esperado, para uma distribuição Gaussiana.

5.3.1.3. Testes paramétricos

5.3.1.3.1. Teste de Grubbs

O teste de Grubbs é um teste de detecção de *outliers* para distribuições que possuem normalidade, o que se aplica para as distribuições dos eletrodos A e B, como mencionado anteriormente. O teste foi aplicado e os valores de $G_{\text{calculado}}$ para cada um dos valores suspeitos foi encontrado, Tabela 17.

Tabela 17. Resultados do teste de Grubbs.

	Eletrodo A		Eletrodo B	
Valores suspeitos	6,37	6,63	6,35	6,88
G calculado	2,21	2,50	2,04	2,39
G crítico ($\alpha = 0,05$)	2,75		2,75	

Os valores de $G_{\text{calculado}}$ para ambas as distribuições são inferiores quando comparados com o valor de $G_{\text{crítico}}$, 2,75, mostrando que não há a presença de outliers nas distribuições de ambos os eletrodos.

5.3.1.3.2.

Teste F: Duas amostras para variância

Foi realizado o teste F para analisar a variância entre os dois conjuntos de dados, adquiridos pelo eletrodo A e pelo eletrodo B. Como o conjunto de dados obtidos pelo eletrodo B possui uma variância maior, ele deve ser utilizado como numerador.

Tabela 18: Resultado do teste F

	Eletrodo B	Eletrodo A
Média	6,5944	6,4784
Variância	0,0230	0,0035
Observações	30	30
gl	29	29
F	6,5061	
F crítico uni-caudal	1,8608	

O valor de F encontrado, Tabela 18, correspondente a 6,5061 é maior quando comparado ao valor de F crítico, 1,8608. Desse modo, deve-se rejeitar H_0 , sendo assim, não há igualdade entre as variâncias.

5.3.1.3.3.

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes

O teste-t é utilizado para avaliar a igualdade entre a média de dois grupos, nesta etapa do trabalho ele foi utilizado para averiguar se há igualdade entre as distribuições obtidas pelos eletrodos A e B, Tabela 19.

Tabela 19: Resultados obtidos para a estatística do Teste-t

	Eletrodo B	Eletrodo A
Média	6,5944	6,4784
Variância	0,0230	0,0035
Observações	30	30
Hipótese da diferença de média	0	
gl	38	
Stat t	3,8948	
P($T \leq t$) uni-caudal	0,0001	
t crítico uni-caudal	1,6859	
P($T \leq t$) bi-caudal	0,0003	
t crítico bi-caudal	2,0243	

É possível observar que a estatística calculada obteve um valor de $t_{\text{calculado}}$ correspondente a 3,8948, valor esse superior quando comparado ao valor de $t_{\text{crítico}}$ bi-caudal, 2,0243, evidenciando assim que os valores obtidos pelos eletrodos A e B são estatisticamente diferentes.

5.3.1.4. Testes não-paramétricos

5.3.1.4.1. Intervalo interquartilício

Como a distribuição do eletrodo C não apresentou normalidade, para verificar se há a presença de *outliers* foi utilizado o intervalo interquartilício. O primeiro passo foi encontrar o primeiro e o terceiro quartil da distribuição, 6,67 e 6,72, respectivamente, a partir disso, deve-se aplicá-los nas Equações (21) e (22):

- Para encontrar o limite inferior:

$$LI = 6,67 - 1,5 * (6,72 - 6,67) \quad (21)$$

Deste modo, encontra-se um limite inferior igual a 6,59.

- Para encontrar o limite superior:

$$LS = 6,72 + 1,5 * (6,72 - 6,67) \quad (22)$$

Deste modo, encontra-se um limite superior igual a 6,80.

Analisando os valores da distribuição não é encontrado nenhum valor acima do limite superior, 6,80, e nenhum valor abaixo do limite inferior, 6,59, evidenciando que não há a presença de *outliers* na amostra estudada.

5.3.1.4.2. Teste de Wilcoxon

Como a distribuição obtida pelo eletrodo C se distancia da normalidade, o teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar se há igualdade quando comparamos com a distribuição do eletrodo A e C. Inicialmente, foi realizado o teste para comparação entre os eletrodos A e C, para isso, foi utilizado o software BioEstat, Tabela 20.

Tabela 20: Teste de Wilcoxon aplicado para os eletrodos A e C

Número de pares =	30
Z =	4,7821
Z crítico uni-caudal =	100
Z crítico bi-caudal =	89
p-valor (unilateral) =	<0,0001

O valor de Z calculado encontrado, correspondente a 4,7821, é inferior quando comparado ao valor de Z crítico bi-caudal, 89; nesse caso, deve-se rejeitar a hipótese H_0 , sendo assim não há igualdade entre as distribuições. O mesmo acontece quando o teste é realizado para as distribuições dos eletrodos B e C, o valor Z encontrado agora é equivalente a 3,6509, Tabela 21, valor inferior ao valor de Z crítico, mostrando que também devemos rejeitar a hipótese H_0 quando comparamos as distribuições dos eletrodos B e C.

Tabela 21: Teste de Wilcoxon aplicado para os eletrodos B e C

Número de pares =	30
Z =	3,6509
Z crítico uni-caudal =	100
Z crítico bi-caudal =	89
p-valor (unilateral) =	<0,0001

5.3.1.4.3. Teste de Friedman

Por fim, realizou-se o teste de Friedman para analisar a comparação entre as três distribuições simultaneamente, Tabela 22. O nível de significância utilizado foi de $\alpha = 0,05$; valor superior quando comparado com p-valor obtido pelo teste, p-valor < 0,0001, pode-se afirmar novamente que as distribuições obtidas pelos três eletrodos são estatisticamente diferentes entre si.

Tabela 22: Resultado do teste de Friedman

	Eletrodo A	Eletrodo B	Eletrodo C
Soma dos Ranks =	36	60	84
Mediana =	6,49	6,57	6,71
Média dos Ranks =	1,2	2,0	2,8
Média dos valores =	6,4783	6,5943	6,6983
Desvio padrão =	0,0595	0,1519	0,0327
Friedman (Fr) =	42,8167		
Graus de liberdade =	2		
(p) =	< 0,0001		

5.3.2. Determinação do pH por indicadores de pH

Para determinar o valor de pH a partir dos indicadores, foram utilizados os valores de pH das faixas de viragem determinadas para EHC demonstrados no item 5.1, Tabela 13. A Figura 18a apresenta o espectro obtido pelo indicador vermelho de metila para uma solução de EHC acidificada, em azul, uma solução de EHC basificada, em preto, e para a solução tamponante a qual objetiva-se determinar o pH, em vermelho.

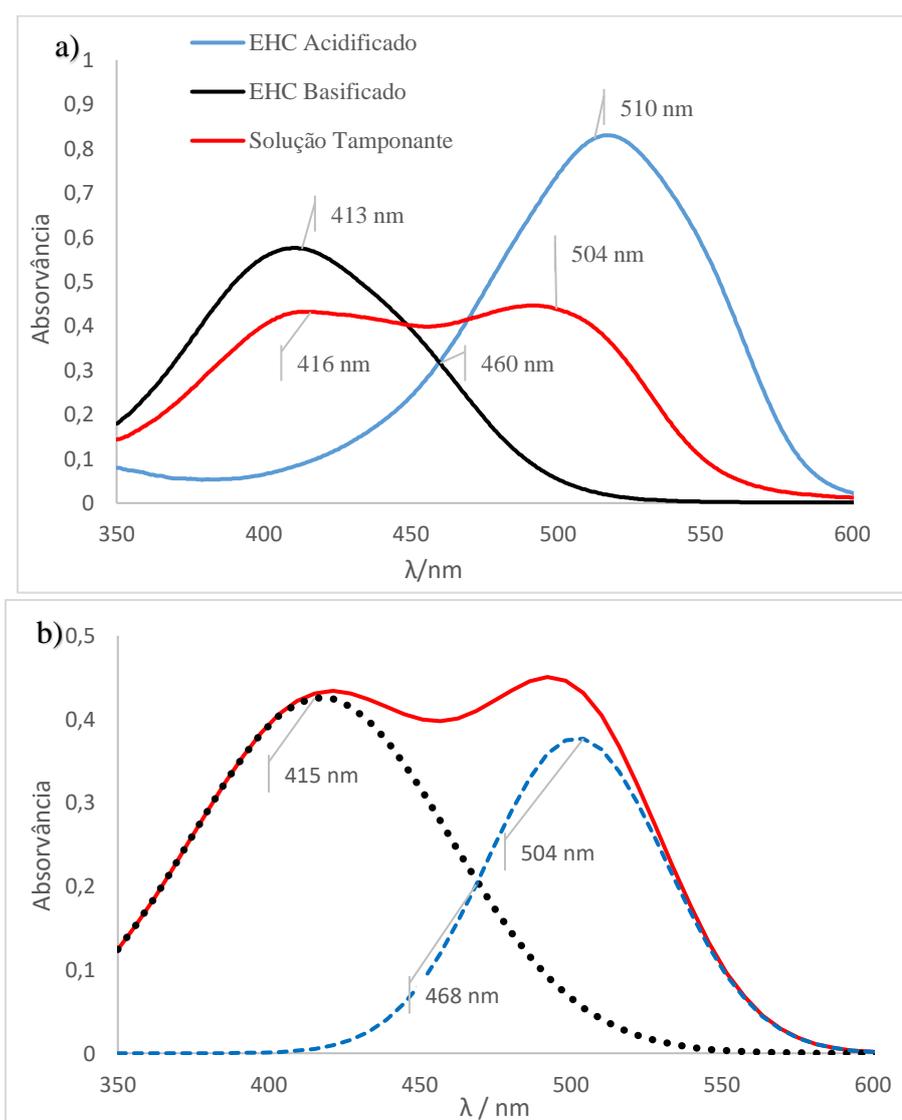


Figura 18. a) Espectro do indicador vermelho de metila. Azul: solução de EHC acidificada. Preto: solução de EHC basificada. Vermelho: solução tamponante b) Deconvolução da curva solução tamponante

A análise do comportamento espectral baseou-se na observação dos valores de λ máximo de absorvância nas bandas de cada solução, Figura 18a. A solução acidificada, curva azul, possui um pico máximo de absorvância em $\lambda = 510$ nm, comprimento de onda que representa a presença da espécie ácida do indicador. A solução basificada, curva preta, apresenta um λ máximo de absorvância em 413 nm, indicativo da presença da espécie básica. Quando se observa o comportamento espectral obtido para a solução tamponante, é perceptível a presença de duas bandas, sendo uma com $\lambda = 416$ nm e a outra em 504 nm, indicando que há a presença de ambas as espécies ácida e básica, do indicador na solução, evidenciando que o pH da solução está entre a faixa de viragem do mesmo, que nesse caso é de 5,06 a 8,29, Tabela 13, com valor médio de pH próximo à 6,67.

Deve-se observar que o comportamento espectral da solução tamponante difere dos demais indicadores em relação ao ponto isoabsortivo, a absorvância medida no $\lambda = 460$ nm é maior do que o esperado. Tal fato deve-se à propriedade aditiva das absorvâncias, gerada pelo fato dos picos, $\lambda = 416$ nm e $\lambda = 510$ nm, serem próximos e possuírem absorvâncias equivalentes, gerando uma soma das mesmas [59,60].

Para a elucidação deste comportamento, foi realizada a deconvolução da curva, obtida em solução tamponante, curva vermelha, Fig. 18a, utilizando o Software Origin 7.0, onde fica evidente no modelo a presença de duas bandas, referentes às espécies básica e ácida, Figura 18b.

Por meio da análise das curvas apresentadas pela deconvolução, demonstra-se claramente a presença das espécies básica e ácida, respectivamente com λ em 415 nm e 504 nm. O ponto isoabsortivo é visualizado em $\lambda = 468$ nm, próximo ao obtido pela sobreposição das curvas na Figura 18a, corroborando a indicação da presença equivalente das espécies ácidas e básica do indicador, sugerindo o pH médio de 6,67 (meio da faixa), em concordância ao mencionado anteriormente.

A Figura 19 apresenta os resultados visuais do experimento que foi realizado simultaneamente, onde se fez uma observação das cores desenvolvidas pelos corantes (indicadores de pH) para iguais condições experimentais, porém agora em tubo de ensaios, para comparação visual. Na Figura 19, 3 tubos Falcon podem ser visualizados da esquerda para direita, respectivamente: a solução de EHC

acidificada, a solução tamponante que se deseja determinar o pH e a solução de EHC basificada. É perceptível que a coloração do tubo que contém a amostra de solução tamponante apresenta uma coloração alaranjada, resultado da mistura da cor amarela, espécie básica, com vermelha, espécie ácida, evidenciando assim, a presença das duas espécies do indicador, ou seja, o pH da amostra está próximo do valor médio da faixa do indicador utilizado, que é 6,67, o que corrobora com o comportamento espectral discutido anteriormente.

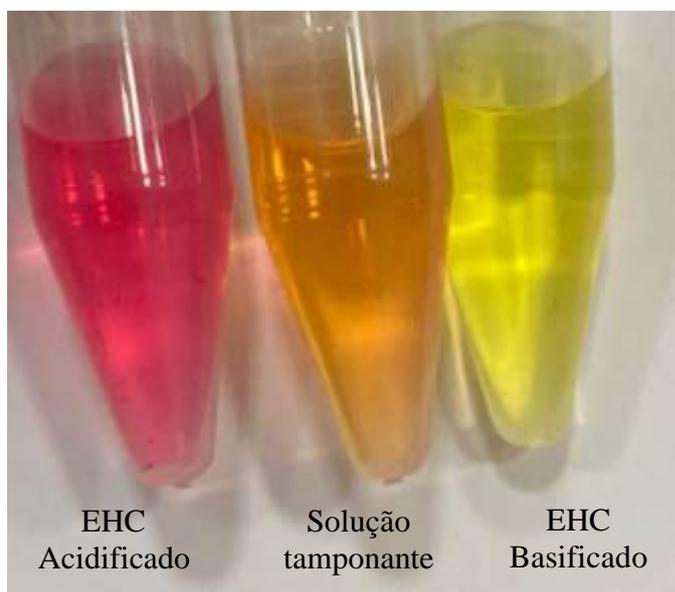


Figura 19. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador vermelho de metila

A Figura 20 apresenta os espectros obtidos para o indicador alaranjado de xilenol, onde é perceptível a presença da espécie ácida, em azul, com um máximo em $\lambda = 433$ nm; e a presença da espécie básica, em preto, com um máximo em 588 nm. Quando se analisa o comportamento da solução tamponante, em vermelho, é notória sua semelhança de comportamento com a espécie ácida. Em certo ponto, eles se sobrepõem, indicando assim, que o pH da solução tamponante está abaixo da faixa de viragem ácida do indicador utilizado, Tabela 13, ou seja, o pH da solução é inferior a 6,96.

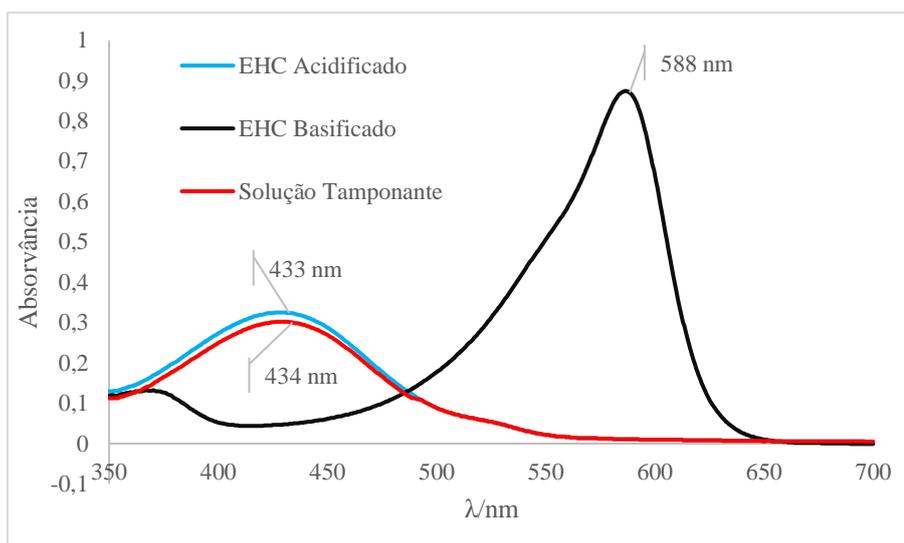


Figura 20. Espectro obtido para o indicador alaranjado de xilenol

A Figura 21 apresenta o mesmo experimento realizado simultaneamente para a percepção visual. O tubo Falcon com solução acidificada apresenta coloração amarela e o tubo com solução basificada apresenta coloração roxa, em concordância com o resultado obtido pelo espectro. A solução tamponante apresenta um comportamento muito parecido com a solução acidificada, apresentando também uma coloração amarela, assumindo assim, em concordância com o resultado espectral, um $\text{pH} \leq 6,96$.

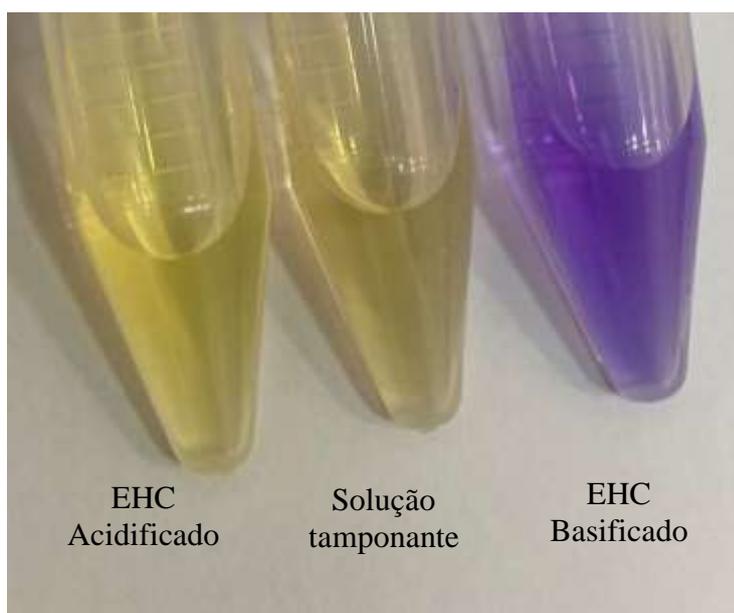


Figura 21. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador alaranjado de xilenol.

O espectro obtido para o indicador azul de bromofenol é apresentado pela Figura 22, na qual a espécie ácida do indicador apresenta uma banda com máximo em $\lambda = 434 \text{ nm}$ e a básica em $\lambda = 599 \text{ nm}$. Quando se observa o espectro obtido para

a solução tamponante, em vermelho, visualiza-se a presença de duas bandas muito próximas dos picos das espécies ácida e básica, 434 e 602 nm, respectivamente. Isso evidencia a presença das duas espécies na solução. No entanto, o pico em 602 nm é visivelmente maior, ou seja, possui uma maior absorvância. Tal fato, somado ao experimento visual realizado simultaneamente, Figura 23, onde a coloração obtida para a solução tamponante resulta em um verde azulado, evidencia que há a presença das duas espécies, no entanto há uma contribuição maior da espécie básica (maior absorvância), que possui tonalidade azul, do que da espécie ácida, que possui coloração amarela. A partir desses resultados é possível inferir que o pH da solução deve estar acima do meio da faixa, 6,18, e abaixo da faixa básica, 7,22.

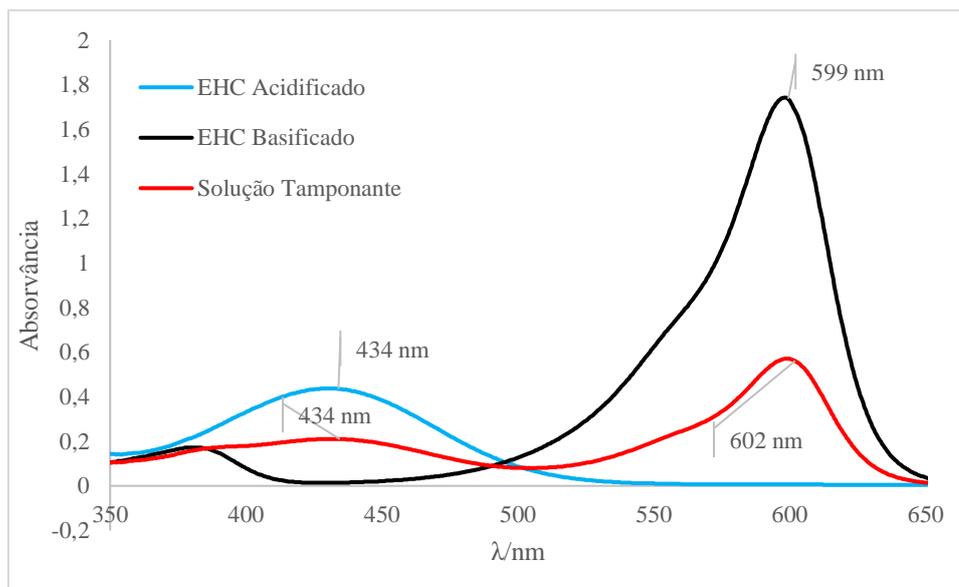


Figura 22. Espectro obtido para o indicador azul de bromofenol

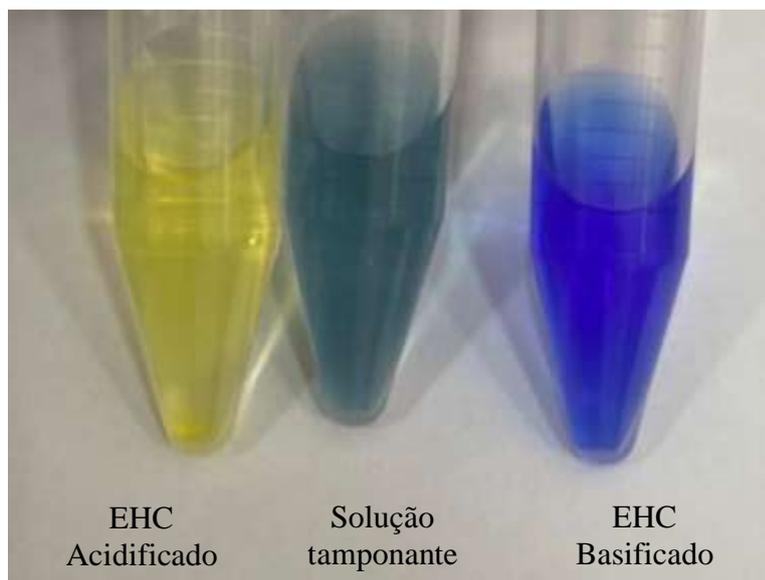


Figura 23. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador azul de bromofenol

O último espectro obtido foi o do indicador verde de bromocresol, Figura 24, o qual a espécie ácida apresenta um comprimento de onda máximo em $\lambda = 432$ nm e a espécie básica em $\lambda = 623$ nm. Analisando o espectro obtido para a solução tamponante, é visível a presença de duas bandas, com λ máximo em 422 nm e 624 nm, indicando a presença da espécie ácida e básica respectivamente. Com isso, considerando a equivalência das absorvâncias das espécies ácida e básica, o pH da solução deve estar próximo ao meio da faixa, Tabela 13, pH = 6,72, valor muito próximo do encontrado pelo indicador vermelho de metila (6,67).

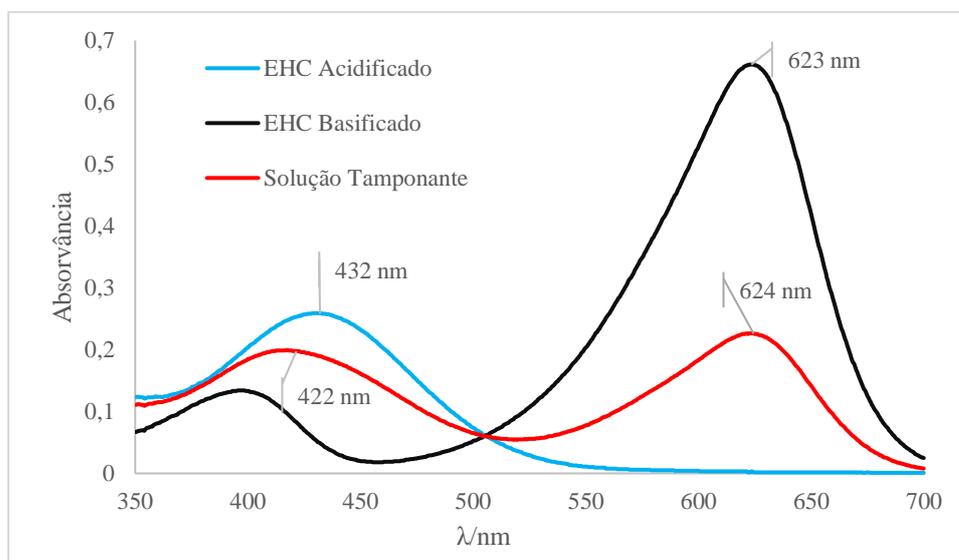


Figura 24. Espectro obtido para o indicador verde de bromocresol

O mesmo resultado é obtido pelo experimento pela avaliação visual, Figura 25, onde a coloração da solução tamponante apresenta um tom de verde (tubo do meio), evidenciando a mistura da coloração azul e amarela, corroborando ao comportamento espectrofotométrico.

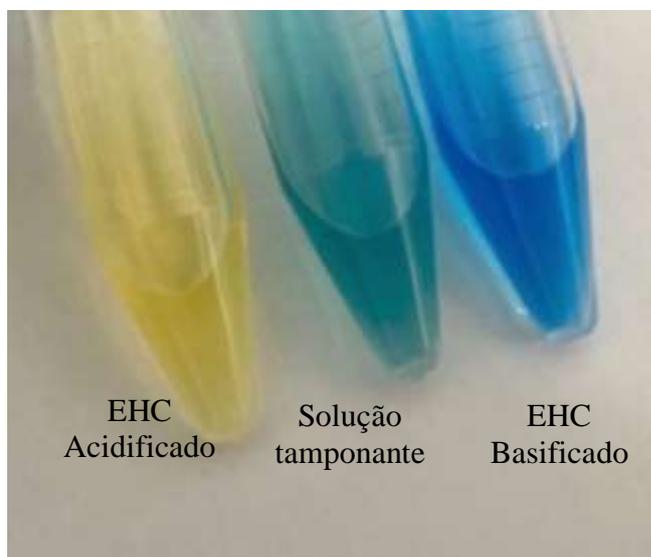


Figura 25. Resultado do experimento para percepção visual utilizando o indicador verde de bromocresol

Os resultados de pH obtidos pelos indicadores, considerando o estudo espectral e avaliação visual foram agrupados e apresentados na Tabela 23. Os resultados considerados mais relevantes foram os obtidos pelos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol, pois ambos revelam o pH no meio de suas faixas e os valores são muito semelhantes. A partir desses resultados é possível estreitar a faixa de pH da solução tamponante, indicando que o pH da solução está muito próximo ao intervalo de 6,67 a 6,72.

Tabela 23: Resultados dos valores de pH da solução tamponante utilizando os indicadores.

Indicador	pH
Vermelho de metila	$\approx 6,67$
Alaranjado de xilenol	$< 6,96$
Azul de bromofenol	$6,18 < \text{pH} < 7,22$
Verde de bromocresol	$\approx 6,72$

Por meio do intervalo de pH determinado utilizando os indicadores de pH, é possível realizar a comparação com os resultados obtidos pelos três diferentes eletrodos, A, B e C. Como já mencionado anteriormente, as distribuições dos eletrodos A e B são Gaussianas, por isso será utilizado o valor da média para

comparação. Como o mesmo não se aplica para a distribuição do eletrodo C, para esse caso será utilizada sua mediana, Tabela 24.

Tabela 24: Valores das médias e mediana das distribuições obtidas pelos eletrodos A, B e C.

	Eletrodo		
	A	B	C
Média	6,48	6,59	-
Mediana	-	-	6,71

Comparando os valores médios e da mediana, Tabela 24, com os valores dos intervalos de pH encontrado pelos indicadores, é perceptível que o que mais se aproxima é o valor obtido pela mediana da distribuição do eletrodo C. Sendo, inclusive, muito próximo aos valores encontrados pelos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol, demonstrando assim, eficiência na medição realizada utilizando o eletrodo otimizado.

A partir do estudo utilizando os indicadores de pH, foi encontrado um pH para a solução tamponante, próximo do intervalo de 6,67 a 6,72. Quando se compara os valores médios obtidos para os eletrodos A e B, 6,48 e 6,59, respectivamente, e o valor da mediana para o eletrodo C, 6,71, foi evidente que o resultado que melhor se adequa aos indicadores é o resultado obtido pelo eletrodo C (desenvolvido no presente estudo).

5.3.3.

Comportamento do eletrodo otimizado em uma suposta curva de calibração

Por fim, foi registrado graficamente os valores encontrados e apresentados pela Tabela 11, Figura 26. Visto que, o coeficiente angular da regressão é de 59,48, valor referente a 100,5 % da resposta ideal de Nernst, 59,16 a 25 °C, se tem um indicativo de uma sensibilidade adequada do eletrodo otimizado [24].

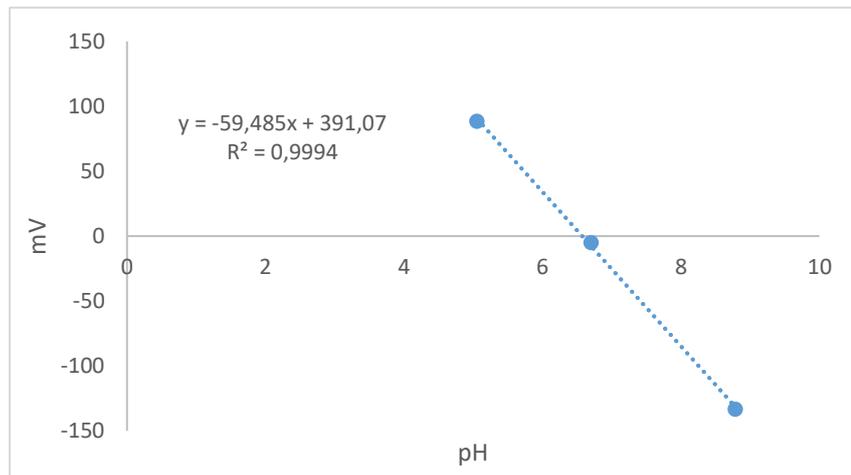


Figura 26. Valores de pH *versus* mV obtidos para as diferentes soluções a partir do eletrodo C.

6. Conclusões e trabalhos futuros

Alinhado com os objetivos descritos na seção introdutória deste trabalho, este capítulo concentra-se nas suas conclusões e encaminha recomendações para desdobramentos futuros da pesquisa desenvolvida.

O presente estudo avaliou os sistemas de medição de pH utilizados pelos referenciais normativos e por meio do planejamento de experimentos Box-Behnken foi possível estudar o comportamento de diferentes arquiteturas para o eletrodo de vidro e identificar a condição otimizada esperada.

Conforme foi proposto nos objetivos específicos, os resultados permitem as seguintes considerações:

Sobre a análise de referenciais normativos e diferentes abordagens para medição de pH em etanol, foi identificada, conforme citado na fundamentação teórica, a relevância do tema para a indústria de combustíveis, evidenciando os possíveis problemas que o EHC com o pH em desacordo com o critério de aceitação pode causar ao motor do veículo, aliado a problemática de se medir pH em um meio que não é considerado aquoso, e, ainda a falta de um material de referência em meio etanólico para calibração do sistema de medição de pH.

O segundo objetivo específico foi atendido pelo estudo e determinação da faixa de viragem dos indicadores em meio etanólico a partir de experimentos utilizando a técnica espectrofotométrica. Os indicadores utilizados foram o vermelho de metila, alaranjado de xilenol, azul de bromofenol e o verde de bromocresol, e a partir da faixa de viragem determinada de cada indicador foi possível determinar o valor de pH da solução tamponante utilizada posteriormente no estudo.

Com relação à construção de um novo sistema para medição de pH do etanol, terceiro objetivo, foi realizada a modificação de um eletrodo de vidro comercial utilizando o etanol hidratado combustível como solvente. A partir das três variáveis estudadas, força iônica, concentração da solução tamponante e temperatura, cada uma em três níveis diferentes, foi possível determinar a condição otimizada.

O quarto objetivo específico visou a comparação das medições realizadas pelos referenciais normativos definidos para o presente estudo, ASTM D 6423 e ABNT 10981, com os resultados obtidos pelo eletrodo otimizado. A comparação foi realizada por meio de testes estatísticos e evidenciaram que os resultados das três abordagens são estatisticamente diferentes entre si.

Ao se considerar os indicadores de pH como referência, os resultados de pH do EHC oriundos do novo eletrodo C se mostra mais adequado do que os resultados provenientes dos eletrodos A e B.

Com relação ao sexto objetivo específico, os resultados evidenciaram que o eletrodo otimizado apresentou sensibilidade de resposta adequada à equação de Nernst, tendo um comportamento operacional adequado ao novo sistema de medição proposto pelo presente estudo.

Para trabalhos futuros, fruto do desdobramento do presente estudo com base na experiência adquirida no seu desenvolvimento e com o propósito de expandir o conhecimento na área, recomenda-se:

Dar continuidade ao estudo do eletrodo otimizado para avaliar o seu funcionamento ao decorrer do tempo de uso, estabilidade, sensibilidade e robustez, junto com as possíveis formas de armazenamento, a fim de prolongar sua vida útil e garantir a qualidade das medições.

Elaborar e aprofundar o estudo em um possível candidato à material de referência certificado de pH em meio etanólico para a aplicação na calibração do sistema de medição utilizando o eletrodo otimizado para medição de pH de etanol combustível.

Vale a pena ressaltar que, o aprimoramento do eletrodo otimizado e o desenvolvimento de um candidato a MRC configuram-se uma proposta de projeto PIPE-FAPESP (Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas) em parceria com a Empresa SPR Soluções Metrológicas LTDA, com viabilidade de criação de possível *spin-off* para esta linha de produtos em específico.

Referências bibliográficas

1. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Balanço Energético Nacional (BEN) 2022: Ano base 2021, 2022. Disponível em <<https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2022>>. Acesso em 10/08/2022
2. Em dez anos, derivados de petróleo devem perder espaço no consumo final de energia. Nova Cana. Disponível em <<https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/gasolina/dez-anos-derivados-de-petroleo-perder-espaco-consumo-final-energia-180220>> Acesso em 30/11/2020
3. GONÇALVES, M. A. et al. Avaliação de laboratórios brasileiros na determinação de alguns parâmetros de qualidade de biocombustíveis. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 393-399, 2013.
4. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Relatório final da comparação interlaboratorial para avaliação do desempenho de eletrodos na medição de pHe em etanol combustível**. Rio de Janeiro: Inmetro, 2010.
5. ASTM. D6423-20. **Standard Test Method for determination of pHe of Denatured Fuel Ethanol, and Fuel Ethanol**. United States, 2020.
6. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10891: **Etanol hidratado combustível – Determinação do pH – Método potenciométrico**. Brasil: ABNT, 2018.
7. SPITZER, P.; FISICARO, P.; SEITZ, S.; CHAMPION, R. pH and electrolytic conductivity as parameters to characterize bioethanol. **Accreditation and quality assurance**, v. 14, n. 12, p. 671, 2009.
8. Nova Cana. **Volume exportado de etanol em agosto atinge o maior patamar em sete anos**. Disponível em <<https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/exportacao/volume-exportado-etanol-agosto-atinge-maior-patamar-sete-anos-090920>>. Acesso em 25/11/2020.
9. GALSTER, H. **pH Measurement: fundamentals, methods, applications, instrumentation**. Weinheim: VCH, 1991.
10. LEITE, R. C; CORTEZ, L. A. B. O etanol combustível no Brasil. **Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas, Ministério das Relações Exteriores**, 2008.
11. GIMENEZ, A. et al. O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol brasileiro: uma história de sucesso. **Research, Society and Development**. v. 7, n. 2, p. e1472195-e1472195, 2018.
12. LIMA, P.C.R. Os carros flex fuel no Brasil. Nota Técnica, Brasília, Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados, 2009.
13. KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, 24, 223-252, 2010.
14. TradeMap From ITC. **List of exporters for the selected product in 2021**. Banco de dados. Disponível em <https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry.aspx?nvpm=1%7c528%7c%7c%7c%7c2207%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1%7c1>. Acesso em 09/08/2022.

15. Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar. Acompanhamento da Safra brasileira. Brasília, V.6, n.4. 2020.
16. Etanol Energia Sustentável. ÚNICA. Disponível em: <<https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/etanol/>>. Acesso em 30/08/2021.
17. Etanol hidratado e anidro: entenda as diferenças. COPERSUCAR. Disponível em: <<https://www.copersucar.com.br/noticias/etanol-hidratado-e-anidro-diferencas/>>. Acesso em 30/08/2021.
18. Com 2,67 bilhões de litros, Brasil exportou maior volume de etanol em sete anos. NovaCana. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/exportacao/2-67-bilhoes-litros-brasil-exportou-maior-volume-etanol-sete-anos-120121>>. Acesso em: 30/08/2021.
19. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Anuário Estatístico 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2022#Secao4>>. Acesso em: 08/08/2022.
20. BRASIL. **Resolução N° 764, de 20 de dezembro de 2018**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Ed. 245. Seção 1. Pg. 841. 2018
21. BROWN, LEMAY & BURSTEN, **QUÍMICA A CIÊNCIA CENTRAL** - 9.ed. Pearson Prentice Hall ed. 2005.
22. VOGEL, A. - **Química Analítica Qualitativa**, Ed. 5. Ed. Mestre Jou, São Paulo, 1981.
23. SKOOG, A. D., WEST, M. D., HOLLER J. F. et al. **Fundamentos de química analítica**. 9ª ed. Cengage Learning. 2015.
24. BATES, G. R. **Determination of pH theory and practice**. 1ª ed. John Wiley & Sons. 1964
25. GAMA, M. S; AFONSO, J. C. De Svante Arrhenius ao peagâmetro digital: 100 anos de medida de acidez. Química Nova, v. 30, n. 1, p. 231-239, 2007.
26. SENANAYKE, G; MUIR, D.M. Studies on the liquid junction potential corrections of electrolytes at aqueous + mixed solvent boundaries. J. Electroanal. Chem. 237, p. 149-162, 1987.
27. DICKINSON, E. J. F.; FREITAG, L.; COMPTON, R. G. Dynamic Theory of Liquid Junction Potentials. p. 187–197, 2010.
28. ARUMUGAM, B. et al. Ultrasonication-aided synthesis of nanoplates-like iron molybdate: Fabricated over glassy carbon electrode as an modified electrode for the selective determination of first generation antihistamine drug promethazine hydrochloride. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 66, p. 104977, 2020.
29. KLEINIKOVA, S. A. et al. Selective electrooxidation of acetaldehyde in aqueous ethanol alkaline solutions on silver-containing electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 377, p. 138076, 2021.
30. AMINI, N; MALEKI, A. Electrochemical behavior of ticlopidine and detection of ethanol based on Hemoglobin/Ticlopidine/Titanium oxide NPs nanobiocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 877, p. 114463, 2020.
31. SANTANA, E. R.; MARTINS, E. C.; SPINELLI, Almir. Electrode modified with nitrogen-doped graphene quantum dots supported in chitosan for triclocarban monitoring. **Microchemical Journal**, v. 167, p. 106297, 2021.

32. JOHN, N.; ABRAHAM, K. E. Detection of Selenium and Nickel Metal Ion in Water Using Mn_3O_4 -Cn-Modified Electrode. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2021, 2021.
33. MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Arizona: JOHN WILEY & SONS, INC. 5ª Ed. 2001.
34. MARINHO, M. R., & CASTRO, W. B. PLANEJAMENTO FATORIAL: UMA FERRAMENTA PODEROSA PARA OS PESQUISADORES. XXXIII Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia. Campinas Grande, PB: COBENGE. 2005.
35. OLIVEIRA, E. C. Otimização do critério de aceitação na calibração de instrumentos para medição de transferência de custódia de gás natural. São Paulo, SP: REMESP. ENQUALAB. 2006.
36. GUERRA, M. J. P. et al. Design of experiments for optimising acceptance calibration criteria for pressure and temperature transmitters of gas flowmeters. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 58, n. June, p. 26–33, 2018.
37. DE ALMEIDA, F. C.; DE OLIVEIRA, E. C.; BARBOSA, C. R. H. Design of experiments to analyze the influence of water content and meter factor on the uncertainty of oil flow measurement with ultrasonic meters. **Flow Measurement and Instrumentation**, v. 70, n. September, p. 101627, 2019.
38. CARPINETTI, L. C. R. **Planejamento e Análise de Experimentos**. São Carlos, 2009. 222p. Escola de Engenharia de São Carlos (Departamento de Engenharia de Produção) – Universidade de São Paulo (USP)
39. NAGARAJAN, G., NATARAJAN, K. The use of Box-Behnken design of experiments to study in vitro salt tolerance by *Pisolithus tinctorius*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 197–203 (1999)
40. Electromechanical Admittance – Based Damage Identification Using Box-Behnken Design of Experiments C.P. Providakis and M.E. Voutetaki
41. ASLAN, N.; CEBECI, Y. Application of Box – Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. v. 86, p. 90–97, 2007.
42. LI, H. et al. Talanta Optimization of on-chip bacterial culture conditions using the Box-Behnken design response surface methodology for faster drug susceptibility screening. **Talanta**, v. 194, n. July 2018, p. 627–633, 2019.
43. MARTINS, J. E. C. A. et al. Delineamento Box-Behnken para remoção de DQO de efluente têxtil utilizando eletrocoagulação com corrente contínua pulsada. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 22, n. 6, p. 1055–1064, 2017.
44. OLAWALE, O. Bamboo leaves as an alternative source for silica in ceramics using Box Behnken design. *Scientific African*, v. 8, p. e00418, 2020.
45. KAUR, A.; KUMAR, R. Comparative Analysis of Parametric and Non-Parametric Tests. **Journal of Computer and Mathematical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 336–342, 2015.
46. FIELD, A. *Descobrimos a estatística usando o SPSS*. Tradução: Lorí Viali. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
47. CURTIS, Michael J. et al. Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British journal of pharmacology*, v. 175, n. 7, p. 987-993, 2018.
48. MENDES, M.; PALA, A. Type I Error Rate and Power of Three Normality Tests. n. February 2003, 2014.

49. DE OLIVEIRA, E. C. et al. Comparison of different approaches for detection and treatment of outliers in meter proving factors determination. **Flow Measurement and Instrumentation**, v. 48, p. 29–35, 2016.
50. ROYSTON, P. Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality. **Statistics and Computing**, v. 2, n. 3, p. 117–119, 1992.
51. MILLER, J.C. and MILLER, J.N. **Statistics for analytical chemistry**. 3th ed. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, New York, 1994.
52. BETTENCOURT DA SILVA, R. J. N. Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations: A tutorial. **Talanta**, v. 148, p. 177–190, 2016
53. ALEXANDRE, A.; NETO, H.; STEIN, C. E. Uma abordagem dos testes não-paramétricos com utilização do excel. n. 1975, 2003.
54. SHELDON, M. R.; FILLYAW, M. J.; THOMPSON, W. D. The use and interpretation of the Friedman test in the analysis of ordinal-scale data in repeated measures designs. *Physiotherapy research international: the journal for researchers and clinicians in physical therapy*, v. 1, n. 4, p. 221–228, 1996.
55. GALSTER, H. **pH Measurement Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation**. VCH. Nova York, 1991.
56. OHLWEILER, O.A. Fundamentos de análise instrumental. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1981.
57. ATILIO, N. C; FERTONANI, F. L; DADAMOS, T. R. L. Solução Tamponante, MR (LiAc/HAc/EtOH) Para Medições de pHe com Eletrodos Modificados. São Paulo, SP: REMESP. ENQUALAB. 2019.
58. ABBOTT, A. P. et al. Brønsted acidity in deep eutectic solvents and ionic liquids. *Faraday Discussions*, v. 206, p. 365–377, 2018.
59. SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**, LTC, Rio de Janeiro, 7ª edição, 2007.
60. PAVIA, D.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. Fourth Edition, Cengage Learning, Belmont, 2009.