

César Reis

Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Química - 36570-000 - Viçosa - MG

João Carlos de Andrade*

Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química - CP 6254 - 13083-970 - Campinas - SP

Recebido em 8/5/95; aceito em 16/2/96

EXPERIMENTAL DESIGN FOR MIXTURES USING PAPER CHROMATOGRAPHY. The present paper presents the theoretical aspects of experimental designs for mixtures and illustrates its application to determine the best mobile phase composition of the paper chromatographic separation of two dyes. The statistical treatment of the data requires a basic knowledge of the subject and a microcomputer with a MATLAB (or similar) computational package.

Keywords: experimental designs; chemometrics; chromatography.

INTRODUÇÃO

Mistura é um termo usado para definir uma formulação ou uma composição de determinadas substâncias. Um experimento com misturas¹⁻³ é aquele no qual dois ou mais componentes são misturados, em quaisquer proporções, e uma resposta é obtida para cada conjunto de componentes. Assume-se geralmente que esta resposta é função somente das proporções (massa, volume, etc.) dos componentes presentes na mistura e não da quantidade total da mistura.

O propósito geral em um experimento com misturas é tornar possível, por meio de superfícies de respostas³, a estimativa das propriedades de um sistema multicomponente, a partir de um número limitado de observações. Essas observações são obtidas de combinações pré-selecionadas dos componentes na tentativa de se determinar quais delas, de alguma maneira, otimizam a resposta.

Ao contrário dos experimentos com fatorial⁴, onde as variáveis (concentração, pH, temperatura, etc.) são independentes, no problema de misturas os componentes representam proporções e, neste caso, não são independentes. Estas proporções não podem ser negativas e, se expressas como frações da mistura, devem somar a unidade. Tais condições reduzem a representação espacial das misturas, denominada de "simplex"³, para dimensões iguais a $(q - 1)$, onde q é igual ao número de componentes. Portanto, para $(q = 2)$ tem-se uma reta, para $(q = 3)$, um triângulo equilátero, para $(q = 4)$, um tetraedro e, para $(q > 4)$ torna-se impossível representar a figura no espaço tridimensional.

Nestes "simplex" são montados planejamentos experimentais os quais permitem a estimativa de modelos matemáticos que irão representar o comportamento do sistema de misturas, em todo o espaço experimental.

Um planejamento experimental simples, contendo os componentes, água, acetona e metanol, com o objetivo de maximizar a separação de dois corantes por cromatografia em papel é utilizado para demonstrar uma aplicação do método. Tais procedimentos foram elaborados para permitir uma fácil introdução destes conceitos.

CONCEITOS BÁSICOS

Em experimentação com misturas, o espaço experimental, denominado de "simplex", terá dimensão de uma unidade a menos do que o número de componentes (q) usado na formulação, ou seja, igual a $(q - 1)$. Esta restrição é consequência da

interdependência dos componentes (x_i) da mistura dada pela equação (1).

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (1)$$

Portanto a representação geométrica do espaço experimental para " q " componentes consiste de todos os pontos (vértices, arestas, faces, etc.) de uma figura regular de dimensão $(q - 1)$.

Em uma mistura binária, a equação (1) é representada por uma reta ($x_1 + x_2 = 1$) e cada ponto desta reta corresponde a uma mistura diferente. Embora todo o espaço dentro do quadrado, (Fig. 1a), possa ser estudado em experimentos nos quais as variáveis são independentes, em experimentação com misturas o espaço fica restrito aos pontos da reta. As variações nas respostas das propriedades das misturas em função das proporções dos componentes podem ser representadas por curvas traçadas acima desta reta.

Para misturas de três componentes, ($q = 3$), o "simplex" é um triângulo equilátero, formado por um plano diagonal contido em um cubo, onde a soma das proporções de x_1 , x_2 e x_3 em qualquer ponto do triângulo também é igual a um. Sistemas em que x_1 , x_2 e x_3 são independentes, (ex. $x_1 =$ concentração, $x_2 =$ temperatura e $x_3 =$ pH), todos os pontos do cubo podem ser utilizados no experimento, (Fig. 1b). Os pontos situados sobre os vértices do triângulo correspondem aos componentes puros e sobre os lados à misturas binárias. Os pontos contidos no interior do triângulo correspondem à possíveis misturas ternárias. As respostas provenientes das propriedades das misturas, podem ser representadas por uma superfície acima do triângulo^{1,2}, que é mais facilmente analisada fazendo-se sua projeção no plano e mostrando-se as linhas de contorno.

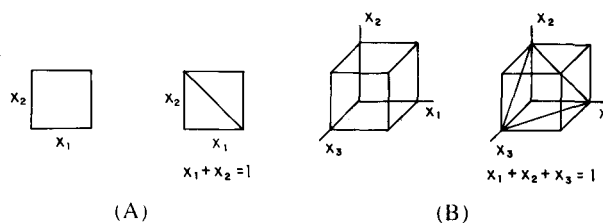


Figura 1. Representação do espaço experimental, "simplex", para variáveis independentes e misturas: (a) duas variáveis, (b) três variáveis.

Se o número de componentes na mistura for igual a quatro, ($q = 4$), o "simplex" é um tetraedro e as mesmas inferências podem ser feitas para esta figura. Com o aumento do número de componentes (q), a dimensão do "simplex" aumenta, mas as mesmas regras continuam sendo aplicáveis.

Para ajustar modelos matemáticos, alguns conjuntos de pontos pré-selecionados são escolhidos. A esses conjuntos de pontos, que são combinações das proporções dos componentes da mistura, denominam-se planejamento experimental. Como as propriedades dos modelos usados para estimar a função resposta depende do planejamento experimental, este deve cobrir toda a região de interesse, permitir uma estimativa do erro experimental e testar o modelo quanto ao ajuste. Um delineamento com essas características pode ser aquele no qual os pontos estão posicionados uniformemente sobre o "simplex". Tal planejamento é chamado de "Simplex-Lattice" e foi desenvolvido por Scheffé⁵. Consiste de um arranjo simétrico de pontos que são referidos como $\{q, m\}$, onde (q) é o número de componentes na mistura e (m) é o grau do polinômio a ser ajustado. As proporções assumidas por cada componente dá um número de pontos igual a $(m + 1)$ simetricamente espaçados de 0 até 1.

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1 \text{ onde } i = 1, 2, \dots, q \quad (2)$$

Então, todas as possíveis combinações (misturas) dos componentes podem ser consideradas, utilizando-se as proporções da equação (2) para cada componente. Por exemplo, para um sistema com três componentes, ($q = 3$), a figura geométrica para todas as possíveis misturas é um triângulo equilátero. Suponha que cada componente possa assumir os valores 0, 1/3, 2/3 e 1, onde ($m = 3$), sendo $i = 1, 2$ e 3. Pela equação (2) calcula-se que o "Simplex-Lattice" consiste de um arranjo de dez pontos nos vértices, lados e centro do triângulo, (Fig. 2a). Estes pontos podem ser representados por:

$$(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0); (0, 1, 0); (0, 0, 1); (1/3, 2/3, 0); (1/3, 0, 2/3); (0, 1/3, 2/3); (2/3, 1/3, 0); (2/3, 0, 1/3); (0, 2/3, 1/3); (1/3, 1/3, 1/3)$$

Os três pontos (1, 0, 0), (0, 1, 0) e (0, 0, 1) representam os componentes puros e estão situados nos vértices do triângulo. Os pontos (1/3, 2/3, 0), (1/3, 0, 2/3), (0, 1/3, 2/3), (2/3, 1/3, 0), (2/3, 0, 1/3), (0, 2/3, 1/3) representam as misturas binárias dos componentes e localizam-se nos lados do triângulo e o ponto (1/3, 1/3, 1/3), situado no centro do triângulo, representa a mistura dos três componentes.

O total de ensaios no "Simplex-Lattice" é definido pelo número de componentes (q) e pelo grau do polinômio (m), e podem ser facilmente determinados por meio da seguinte expressão:

$$C_{q+m+1}^m = \frac{(q+m-1)!}{m!(q-1)!} \quad (3)$$

Um outro delineamento experimental, denominado "Simplex-Centroid"⁶, (Fig. 2b), envolve observações consistindo de todos os subconjuntos dos (q) componentes, mas somente nas

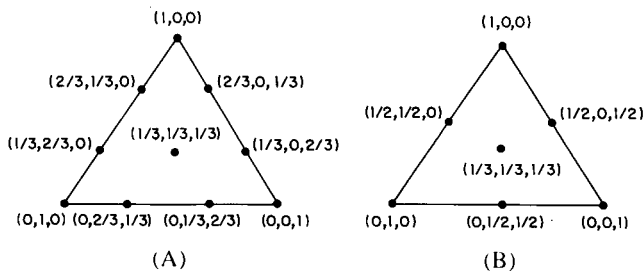


Figura 2. Planejamentos experimentais: (a) "Simplex-Lattice", (b) "Simplex-Centroid".

misturas onde esses componentes aparecem em iguais proporções. No "Simplex-Centroid" um número de $(2^q - 1)$ observações são utilizadas, o que reduz o número de experimentos e ainda permite ajustar um modelo denominado cúbico especial.

Com o objetivo de obter equações de regressão, modelos matemáticos devem ser ajustados aos dados obtidos do planejamento experimental. Em procedimentos com superfícies de resposta envolvendo variáveis independentes⁴, experiências têm demonstrado que Y pode ser estimado utilizando um polinômio derivado de uma série de Taylor. Então para duas variáveis x_1 e x_2 , um modelo quadrático poderia ser:

$$Y(x_1, x_2) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (4)$$

Entretanto, quando a condição para misturas é aplicada ao modelo polinomial, a equação (4) se torna:

$$Y(x_1, x_2) = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_{12}^*x_1x_2 \quad (5)$$

onde:

$$\begin{aligned} b_1^* &= b_0 + b_1 + b_{11} \\ b_2^* &= b_0 + b_2 + b_{22} \\ b_{12}^* &= b_{12} - b_{11} - b_{22} \end{aligned}$$

Desta forma os modelos para mistura têm menos coeficientes a serem estimados do que os polinômios comumente utilizados em análise de superfícies de resposta. Em particular, o termo constante b_0 foi removido do modelo. De uma maneira geral, Scheffé⁵ sugere as seguintes formas polinomiais para misturas, omitindo os asteriscos:

Linear

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q$$

Quadrático

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1,q}x_{q-1}x_q$$

Cúbico Especial

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1,q}x_{q-1}x_q + b_{12\dots q}x_1x_2\dots x_q$$

Cúbico Completo

$$Y(x_1, x_2, \dots, x_q) = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_qx_q + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + \dots + b_{q-1,q}x_{q-1}x_q + c_{12}x_1x_2(x_1 - x_2) + c_{13}x_1x_3(x_1 - x_3) + \dots + c_{q-1,q}x_{q-1}x_q(x_{q-1} - x_q) + b_{12\dots q}x_1x_2\dots x_q$$

Quando os valores da resposta são obtidos dos pontos do planejamento experimental, os coeficientes "b" dos modelos podem ser estimados utilizando o método dos mínimos quadrados, por meio da equação matricial,

$$\mathbf{B} = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{Y} \quad (6)$$

onde \mathbf{Y} é um vetor coluna de dimensão ($N \times 1$) contendo os valores da resposta para cada mistura. Cada linha da matriz \mathbf{X} , de dimensão ($N \times p$), corresponde a uma mistura e contém a mesma ordem vertical no vetor \mathbf{Y} , enquanto que \mathbf{B} é um vetor coluna de dimensão ($p \times 1$) formado pelos coeficientes do modelo, sendo p o número de parâmetros no modelo.

Na estimativa dos coeficientes estão envolvidos erros que devem ser determinados, para que se calcule o nível de significância estatística destes coeficientes. Assumindo-se que os erros são independentes entre si e uniformemente distribuídos, a estimativa das variâncias dos coeficientes podem ser dadas pela diagonal principal da matriz de variância e covariância dos elementos de \mathbf{B} , de dimensão ($p \times p$).

$$\text{var}(\mathbf{B}) = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} S_p^2 \quad (7)$$

e,

$$S_p^2 = \frac{\sum_{l=1}^n \sum_{i=1}^r (y_{li} - y_l)^2}{\sum_{l=1}^n (r_l - 1)} \quad (8)$$

n = número de conjuntos experimentais.

r = repetições

t = número de repetições dentro de cada conjunto experimental.

S_p^2 = variância global

Em um dado experimento, pode-se obter, por exemplo, os modelos quadrático e cúbico especial para explicar as propriedades do seu sistema de misturas. Para escolher um dentre os modelos propostos, a significância estatística é um dos critérios mais usados, a qual pode ser avaliada fazendo-se uma análise de variância para cada modelo. A análise de variância dá informações separadas para cada fonte de variação⁷. A variação total no conjunto de dados é chamada de "soma dos quadrados total", SQT, dada por

$$SQT = \sum_{u=1}^N (y_u - \bar{y})^2 \quad (9)$$

estando associada a (N - 1) graus de liberdade, enquanto que a "soma dos quadrados dos desvios" dos valores observados, (y_u), em relação aos valores estimados, (\hat{y}_u), é:

$$SQD = \sum_{u=1}^N (y_u - \hat{y}_u)^2 \quad (10)$$

com (N - p) graus de liberdade e a diferença entre as somas de quadrados é a "soma dos quadrados da regressão" SQR, que pode ser escrita como

$$SQR = SQT - SQD = \sum_{u=1}^N (\hat{y}_u - \bar{y})^2 \quad (11)$$

com (p - 1) graus de liberdade.

A SQR representa a porção da SQT atribuída a equação de regressão ajustada. Em notação matricial estas fórmulas são descritas por:

$$SQT = \mathbf{Y}^t \mathbf{Y} - \frac{(\mathbf{UY})^2}{N} \quad (12)$$

$$SQD = \mathbf{Y}^t \mathbf{Y} - \mathbf{B}^t \mathbf{X}^t \mathbf{Y} \quad (13)$$

$$SQR = \mathbf{B}^t \mathbf{X}^t \mathbf{Y} - \frac{(\mathbf{UY})^2}{N} \quad (14)$$

onde U é um vetor de dimensão (1xN) com todos os elementos iguais a um. Os resultados da análise de variância são geralmente mostrados em forma de tabela, assumindo-se que o modelo ajustado contém p termos, (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela de Análise de Variância.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio
Regressão	p - 1	$SQR = \sum_{u=1}^N (\hat{y}_u - \bar{y})^2$	$\frac{SQR}{(p-1)}$
Desvio	N - p	$SQD = \sum_{u=1}^N (y_u - \hat{y}_u)^2$	$\frac{SQD}{(N-p)}$
Total	N - 1	$SQT = \sum_{u=1}^N (y_u - \bar{y})^2$	

O quociente $[SQR/(p - 1)]/[SQD/(N - p)]$ tem distribuição F com (p - 1) e (N - p) graus de liberdade. Então, o valor de F_{calc} , assim obtido é comparado com o $F_{tab.} = F_{(p-1, N-p, \alpha)}$ para testar a

significância da regressão sobre x_1, x_2, \dots, x_q ao nível α de probabilidade. Se o teste F para a regressão for significativo, isto significa que pelo menos uma das p variáveis está influenciando significativamente a resposta ao nível α de probabilidade. Mas este teste não indica explicitamente quais os parâmetros significativos, exceto quando $p = 1$. O teste t de STUDENT, neste caso, é utilizado para testar cada parâmetro. A expressão para o teste t é definida por:

$$t_{calc.} = \frac{\hat{b}}{\sqrt{\text{var}(\hat{b})}} \quad (15)$$

associado a $\sum_{l=1}^n (n-1)$ graus de liberdade, $\text{var}(\hat{b})$ é obtido de $\text{var}(\mathbf{B}) = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} S_p^2$ e S_p^2 da equação (8). Desta maneira eliminam-se os parâmetros que não forem significativos.

Voltando ao teste F para a regressão, suponha-se que ambos os modelos obtidos sejam significativos no nível α de probabilidade. Então outros critérios de avaliação deverão ser levados em consideração. Na comparação entre modelos, é preciso fazer um outro teste F, comparando a redução na soma quadrática do desvio por unidade de parâmetros adicionada, com a própria média quadrática do modelo contendo um maior número de parâmetros. Por exemplo, quando são comparados os modelos cúbico especial e quadrático, testa-se a seguinte hipótese: $H_0: \beta_{123} = 0$, ou seja, verifica-se se o termo cúbico b_{123} é igual a zero. A equação (16) é usada para testar a hipótese de nulidade para a escolha do modelo.

$$F_{calc.} = \frac{[(SQD_{red.} - SQD_{comp.})/d]}{[SQD_{comp.}/(N-p)]} \quad (16)$$

p = número de parâmetros no modelo completo.

d = diferença entre p e número de parâmetros no modelo reduzido.

N = número total de ensaios.

$SQD_{red.}$ = soma dos quadrados do desvio no modelo reduzido.

$SQD_{compl.}$ = soma dos quadrados do desvio no modelo completo.

A hipótese nula, H_0 , é rejeitada sempre que o valor $F_{calc.}$ exceda o valor $F_{tab.}$, com (d e N - p) graus de liberdade. No caso de rejeição da hipótese, para o nosso exemplo o modelo cúbico especial é escolhido.

Uma maneira mais segura de avaliar a qualidade do ajuste dos modelos, é fazer o teste da falta de ajuste. Alguns ensaios a mais do que aqueles necessários para estimar o modelo são planejados e servirão para testar o ajuste. Estes ensaios são chamados pontos de verificação, como por exemplo os ensaios 8, 9 e 10 da figura 5. Desta maneira, o número total de conjuntos experimentais (n) é maior do que o número de parâmetros (p) no modelo, de modo que a soma dos quadrados do desvio é composta da soma dos quadrados da falta de ajuste e da soma dos quadrados devido as replicatas. A soma dos quadrados devido às observações em replicatas (chamada de SQ Erro Puro) pode ser calculada a partir das replicatas e então subtraída da soma dos quadrados do desvio para obter a soma dos quadrados da falta de ajuste (SQ Falta Ajuste.). Em outras palavras, se denotarmos a u-ésima observação da l-ésima mistura por y_{lu} , onde $u = 1, 2, \dots, r$, sendo r = número de replicatas, e $l = 1, 2, \dots, n$, então:

$$SQ \text{ Erro Puro} = \sum_{l=1}^n \sum_{u=1}^r (y_{lu} - y_l)^2 \text{ com } (N-n) \text{ graus de liberdade} \quad (17)$$

e

SQ Falta Ajuste = SQD - SQ Erro Puro, com (n - p) graus de liberdade (18)

O teste da Falta de Ajuste é:

$$F_{\text{calc.}} = \frac{(\text{SQFaltaAjuste})(N-n)}{(\text{SQErroPuro})(n-p)} \quad (19)$$

A hipótese da falta de ajuste é aceita, a um nível α de significância, quando o valor do $F_{\text{calc.}}$ é maior do que o valor do $F_{\text{tab.}} = F_{(n-p, N-n, \alpha)}$. Neste caso o modelo não é adequado para representar o comportamento do sistema.

Os coeficientes do modelo obtido após os testes de avaliação, devem ser interpretados. Para facilitar será usada como exemplo uma mistura de dois componentes. Se a resposta varia linearmente com a composição da mistura, os componentes agem aditivamente tal que esta resposta seja representada por uma reta, e nos dois extremos da reta tem-se as contribuições dos componentes puros.

Quando a resposta é melhor representada por um modelo quadrático, ou seja, existe uma relação não linear entre os componentes, temos dois casos a considerar: (i) se a resposta é maior do que a esperada de um modelo linear, isto é, $b_{12} > 0$, esta relação não linear é denominada de sinergismo. E na maioria das vezes este é o caso preferido, como no trabalho de Jacques⁸, em otimização de misturas de solventes para cromatografia. (ii) Se $b_{12} < 0$, então a resposta é menor do que a esperada em um modelo linear e este tipo de relação entre as variáveis x_1 e x_2 é chamada de antagonismo. A figura 3 mostra a interpretação gráfica para os modelos linear e quadrático com dois componentes. O segmento reto representa o modelo linear e os segmentos curvos, o modelo quadrático. O valor de y_1 representa a contribuição do componente 1 (um), dada pelo coeficiente b_1 e y_2 representa a contribuição do componente 2 dada pelo coeficiente b_2 . O valor médio $(y_1 + y_2)/2$ representa as contribuições dos dois componentes na resposta, quando estes entram com proporções iguais no modelo linear. Para o modelo quadrático este valor é acrescido de $b_{12}/4$.

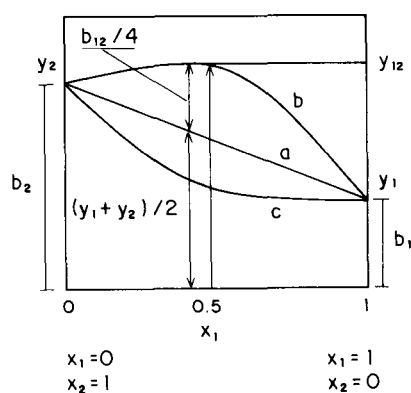


Figura 3. Representação gráfica de modelos com dois componentes: (a) linear, (b) e (c) quadráticos mostrando efeitos sinérgicos e antagonísticos, respectivamente.

Interpretações similares são feitas quando se tem mais de dois componentes, não sendo possível, porém, esboçar as superfícies de contorno do polinômio, para modelos com mais de quatro componentes.

É muito comum comparar os coeficientes para determinar quais são mais importantes. A importância de um coeficiente depende, em parte, da ordem do termo com o qual ele está associado. A tabela 2 mostra que valores elevados dos coeficientes quadráticos

Tabela 2. Importância relativa dos coeficientes.

Termo	Valor Máximo da Variável	Efeito Máximo do Termo
$b_i x_i$	$x_i = 1$	$b_i x_i = 1 b_i$
$b_{ij} x_i x_j$	$x_i x_j = (1/2).(1/2) = 1/4$	$b_{ij} x_i x_j = (1/4).b_{ij}$
$b_{ijk} x_i x_j x_k$	$x_i x_j x_k = (1/3).(1/3).(1/3) = 1/27$	$b_{ijk} x_i x_j x_k = (1/27).b_{ijk}$

e cúbicos não implicam necessariamente em grandes efeitos quando comparados com o coeficiente linear. Um coeficiente cúbico poderia ter 27 vezes o valor do coeficiente linear e ainda assim estaria descrevendo o mesmo efeito.

Pseudocomponentes

Na prática, muitas vezes não é possível trabalhar com otimização de misturas usando os pontos do "simplex" correspondentes aos componentes puros. Esta restrição pode ser observada quando trabalha-se com misturas de água, etanol e metil-isobutilcetona e somente a região de fase única interessa. Neste caso trabalha-se com pseudocomponentes, que não são componentes puros, mas uma mistura fixa dos vários componentes⁹. Com isto o experimento fica limitado a uma sub-região do "simplex", pois as variáveis devem obedecer à desigualdade:

$$0 \leq I_i \leq x_i \leq S_i \leq 1$$

I = limite inferior, S = limite superior, $i = 1, 2, \dots, q$

Os pseudocomponentes (representados por x'_i) são gerados a partir dos componentes originais, e definidos como se segue:

$$x'_i = \frac{x_i - I_i}{1 - L}, \quad L = \sum_{i=1}^q I_i < 1 \quad (22)$$

Por exemplo, se: $0,35 \leq x_1 \leq 0,73$; $0,20 \leq x_2 \leq 0,50$ e $0,15 \leq x_3 \leq 0,45$. Então $L = 0,70$ e

$$x'_1 = \frac{x_1 - 0,35}{0,30}, \quad x'_2 = \frac{x_2 - 0,20}{0,30}, \quad x'_3 = \frac{x_3 - 0,15}{0,30}$$

A figura 4 ilustra este exemplo, mostrando o "simplex" com os componentes e os pseudocomponentes. Os modelos podem ser obtidos em função dos pseudocomponentes e as interpretações são similares àquelas com componentes originais.

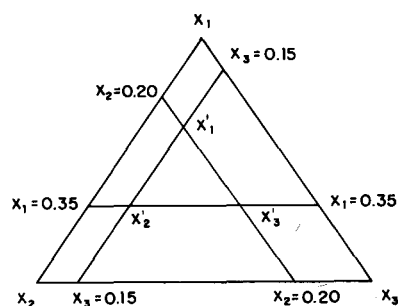


Figura 4. Sub-região do simplex original redefinida como "simplex" nos pseudocomponentes x'_i , $i = 1, 2, 3$.

EXPERIMENTAL

Os experimentos foram efetuados empregando-se água deionizada e reagentes de grau analítico. As soluções de Rodamina-B, (Rod-B), e de Rodamina-6G, (Rod-6G), 0,1% m/v foram preparadas dissolvendo-se quantidades adequadas destes compostos em metanol.

Os cromatogramas foram corridos em tiras de papel cromatográfico, que pode ser substituído por papel de filtro quantitativo tipo Whatman 41 ou equivalente. Obviamente os valores das respostas poderão variar de acordo com a qualidade do papel empregado¹⁰.

Os eluentes são misturas de água, acetona e metanol com composição variável em meio básico, neutro ou ácido, de acordo com os planejamentos experimentais. Os meios ácido ou básico foram obtidos adicionando-se ácido clorídrico ou amônia à mistura, de modo a se obter uma concentração final de 1% m/v de ácido ou base respectivamente. Os detalhes de cada etapa são dados a seguir.

Planejamento

As proporções entre os componentes das misturas que compõem as fases móveis obedecem ao planejamento experimental tipo "Simplex-Centroid". Neste estudo, somente a água entra como componente puro, o metanol e a acetona têm seus limites superiores iguais a 60%. Os ensaios 8, 9 e 10 serão utilizados para testar o ajuste, (Figura 5). O ácido ou base, quando necessários, entrarão como componente água.

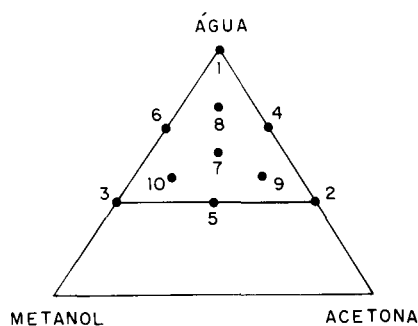


Figura 5. Ilustração do delineamento experimental tipo "Simplex-Centroid". Os ensaios 8, 9 e 10 são utilizados para testar o ajuste dos modelos.

Procedimento

Dez frascos de vidro, de cerca de 9 cm de diâmetro, do tipo usado para conserva de alimentos, foram cortados a uma altura de 10 cm paralelamente às suas bases. Na borda de cada frasco foram feitos três sulcos equidistantes para apoiar o suporte para o papel cromatográfico, preparado soldando-se três fios de cobre uns aos outros pela extremidade, formando ângulo de 120°. Dez quadrados com 10 cm de lado foram obtidos a partir de vidro plano, para serem usados como tampas das cubas. Todas as bordas dos vidros foram esmerilhadas, (Figura 6a).

O papel cromatográfico foi cortado em tiras de 2,5 cm de largura por 10 cm de comprimento, perfazendo um total de trinta tiras para cada experimento completo. Depois recortaram-se as pontas das tiras e marcaram-se com um lápis o local de aplicação das amostras e o local de chegada do solvente de acordo com a figura 6b. Além das tiras, dez pedaços retangulares de papel de dimensão 8cm x 10cm foram cortados, para serem usados dentro das cubas, auxiliando na saturação destas com o eluente. Outros detalhes experimentais para cromatografia em papel podem ser encontrados na literatura¹⁰.

As amostras de Rodamina-B e Rodamina-6G foram aplicadas sobre a marca inferior do papel, lado-a-lado com o auxílio de um tubo capilar. O experimento foi conduzido em triplicata para cada ponto do delineamento. Depois de aplicadas as amostras, os papéis foram secos antes de serem submetidos ao processo de separação cromatográfica.

As fases móveis constituem-se de várias misturas de acetona, metanol e água, todas as misturas contendo a mesma concentração de hidróxido de amônio, (meio básico), ou ácido clorídrico, (meio ácido), ou meio neutro. As proporções entre os componentes foram determinadas pelo planejamento experimental. Para obter todos os pontos do planejamento no meio básico procedeu-se da maneira como se segue. Para os meios

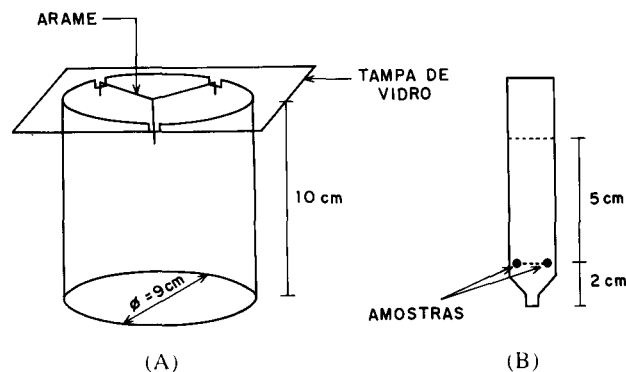


Figura 6. Detalhes do equipamento utilizado: (a) Cuba cromatográfica com suporte para os papéis, (b) forma e dimensões do papel.

ácido e neutro o procedimento é o mesmo substituindo-se o hidróxido de amônio por ácido clorídrico para o meio ácido e pelos solventes puros para o meio neutro.

Solução 1, NH₃ 1% m/v;

Solução 2, NH₃ 1% m/v em uma mistura de água e acetona na proporção de 2:3 v/v;

Solução 3, NH₃ 1% m/v em uma mistura de água e metanol na proporção de 2:3 v/v.

Os pontos 1, 2 e 3 do planejamento foram obtidos pelas soluções 1, 2 e 3, respectivamente. Os pontos 4, 5 e 6 foram obtidos das misturas em volumes iguais das soluções 1 e 2, 2 e 3, e 1 e 3 respectivamente. O ponto 7, que é o ponto central do experimento, pela mistura de volumes iguais das soluções 1, 2 e 3. Os pontos 8, 9 e 10, utilizados para verificar o ajuste do modelo, foram obtidos da mistura das soluções 1, 2 e 3 nas proporções de 4:1:1, 1:4:1 e 1:1:4, respectivamente. Este procedimento é esquematizado na figura 7.

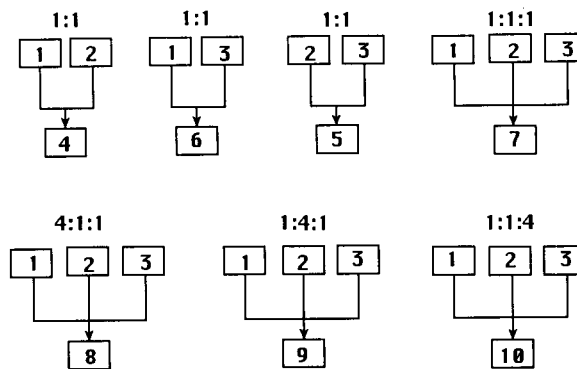


Figura 7. Obtenção das misturas 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 a partir das soluções 1, 2 e 3.

Um pedaço do papel retangular foi colocado dentro de cada cuba, encostado na parede desta. Ele proporciona uma saturação mais rápida do ambiente interno da cuba com a fase móvel. Os fios de cobre foram adaptados em cada cuba e, sobre eles colocadas três tiras de papel já com a amostra, de modo que as extremidades afiladas das tiras tocassem o fundo. Adicionaram-se então, as misturas dos solventes já preparadas em cada cuba, correspondente a cada ponto do delineamento. Os cromatogramas foram retirados assim que a frente da fase móvel atingiu a marca superior do papel. Ainda que em uma mesma cuba alguma replicata não tenha atingido a marca, é importante que as três replicatas sejam retiradas ao mesmo tempo. O excesso de solvente foi eliminado com um papel absorvente. A frente do solvente foi marcada com um lápis

macio e as manchas das amostras foram contornadas para posteriores medidas dos Fatores de Retenção, R_F .

O Fator de Retenção é definido por $R_F = d_r/d_m$ onde d_r é a distância de retenção do corante que é medida entre a linha de aplicação e o centro da mancha, e d_m é a distância de migração da fase móvel que é medida entre a linha de aplicação e a frente da fase móvel¹⁰. O valor do R_F está compreendido entre zero e um.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das diferenças entre os fatores de retenção (R_F) para Rod-B e Rod-6G são mostrados na tabela 3. Esta resposta foi utilizada para estudar a separação dos pigmentos nos meios ácido, básico e neutro. Desta maneira, para se obter misturas de solventes que dão melhores separações, buscou-se maximizar a diferença entre os valores de R_F .

Tabela 3. Respostas utilizadas nos ajustes dos modelos.

Ensaio	$R_F(\text{Rod-B}) - R_F(\text{Rod-6G})$		
	Ácido	Básico	Neutro
1	0.01	0.14	0.26
2	0.01	0.17	0.23
3	0.04	0.16	0.21
4	0.01	0.03	0.04
5	0.00	0.04	0.09
6	0.00	0.01	0.02
7	0.04	0.06	0.04
8	0.01	0.01	0.04
9	0.00	0.11	0.03
10	0.06	0.28	0.43
11	0.08	0.29	0.33
12	0.05	0.27	0.27
13	0.02	0.03	0.13
14	0.03	0.00	0.03
15	0.01	0.02	0.04
16	0.14	0.43	0.38
17	0.04	0.31	0.40
18	0.11	0.30	0.43
19	0.09	0.18	0.31
20	0.03	0.16	0.26
21	0.07	0.14	0.20
22	0.06	0.31	0.45
23	0.05	0.35	0.43
24	0.07	0.28	0.35
25	0.00	0.11	0.07
26	0.04	0.09	0.11
27	0.01	0.10	0.17
28	0.03	0.08	0.17
29	0.03	0.12	0.17
30	0.03	0.14	0.19

Modelos lineares, quadráticos e cúbico especiais foram ajustados apenas aos dados obtidos dos meios básico e neutro, já que em meio ácido não houve separação dos pigmentos. Estes ajustes foram feitos usando-se o pacote computacional

Tabela 4. Testes estatísticos dos modelos ajustados.

Meio	Modelo	Teste F para regressão	Coefficiente de correlação	Teste F para falta de ajuste
Neutro	Linear	14,11	0,47	17,20
	Quadrático	26,38	0,81	6,05
	Cúbico Especial	22,94	0,79	20,54
Básico	Linear	11,25	0,41	25,97
	Quadrático	24,94	0,80	9,93
	Cúbico Especial	26,83	0,84	8,75

MATLAB, mas qualquer outro programa que faça cálculos matriciais pode ser usado para tais fins. Para todos os modelos ajustados, o teste F para a regressão foi significativo ao nível α de 0,05, ou seja, pelo menos uma das variáveis ou das relações não lineares entre elas, está influenciando significativamente na separação, naquele nível de confiança, tabela 4. Observa-se também que os valores dos F_{calc} e dos coeficientes de correlação múltipla (R^2) são maiores para os modelos quadrático e cúbico especial, nos meios neutro e básico respectivamente, e que os menores valores para o teste F_{calc} da falta de ajuste verifica-se também para estes modelos. A tabela 5 mostra o resultado do teste para a escolha entre modelos. Este resultado sugere que o modelo cúbico especial para o meio básico e quadrático para o meio neutro são os mais apropriados, demonstrando a coerência dos testes estatísticos.

Embora o teste F para a regressão indique que exista pelo menos um parâmetro influenciando significativamente na resposta, ele não mostra explicitamente qual ou quais destes parâmetros são significativos. Então foram feitos testes t de STUDENT para cada coeficiente a um nível α de 0,05 obtendo, finalmente as formas dos modelos, (equações 24 e 25).

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 0,277X_1 + 0,459X_1X_2 + 0,958X_1X_3 \quad (24)$$

(±0,035) (±0,139) (±0,164)

para o meio neutro e,

$$Y(X_1, X_2, X_3) = 0,191X_1 + 0,545X_1X_2 + 0,900X_1X_3 - 2,180X_1X_2X_3 \quad (25)$$

(±0,024) (±0,109) (±0,128) (±0,844)

para o meio básico. Os números entre parênteses foram obtidos a partir da matriz de variâncias e covariâncias, e representam o erro envolvido nas estimativas de cada coeficiente.

Os modelos expressos pelas equações (24) e (25) foram aceitos mesmo sabendo-se que o teste para a falta de ajuste para ambos foi significativo ao nível α de 0,05 (Tabela 4), visto que o objetivo deste estudo é apenas encontrar a região do "simplex" que dá maior separação dos pigmentos, não havendo pois necessidade de um ajuste mais rigoroso. Esta falta de ajuste pode ser devido ao fato de não terem sido consideradas as densidades de cada componente quando da elaboração do planejamento.

Tanto para o meio básico como para o neutro, a água, (componente 1), influencia significativamente o comportamento do sistema quanto à separação dos pigmentos. Interpretação similar pode ser dada aos efeitos de interação dos componentes água-metanol e água-acetona. Como esses efeitos são positivos conclui-se que houve sinergismo entre aquelas variáveis.

No meio básico existe influência significativa do efeito causado pela relação não linear de terceira ordem entre os componentes água, metanol e acetona, e este efeito contribui para diminuir a separação dos pigmentos.

Os modelos de equação sugerem que melhores separações dos pigmentos podem ser feitas nas regiões do "simplex" delimitadas pelos vértices (78% água, 22% metanol); (64% água, 7% acetona, 29% metanol) e (51% água, 49% metanol) para o meio neutro e (74% água, 26% metanol); (46% água, 54% metanol) e (60% água, 37% metanol, 3% acetona) para o meio básico. Estas regiões, aqui aproximadas como triângulos, são

Tabela 5. Teste para a escolha entre modelos.

Meios	Linear X Quadrático	Quadrático X Cúbico Especial
Neutro	$F_{\text{calc.}} = 17,41$, $F_{\text{tab.}} = F_{3, 24, 0,05} = 3,01$	$F_{\text{calc.}} = 1,73$, $F_{\text{tab.}} = F_{1, 23, 0,05} = 4,28$
Básico	$F_{\text{calc.}} = 19,04$, $F_{\text{tab.}} = F_{3, 24, 0,05} = 3,01$	$F_{\text{calc.}} = 6,69$, $F_{\text{tab.}} = F_{1, 23, 0,05} = 4,28$

representadas pelas partes hachuradas da figura-8. Desta maneira, observa-se que na prática não há diferença das composições dos solventes que maximizam a resposta nos meios neutro e básico. Em meio ácido, o sistema de solventes comporta-se de maneira similar para os dois pigmentos, em todas as misturas estudadas, de modo que não ocorre a separação, (valores de R_F muito próximos).

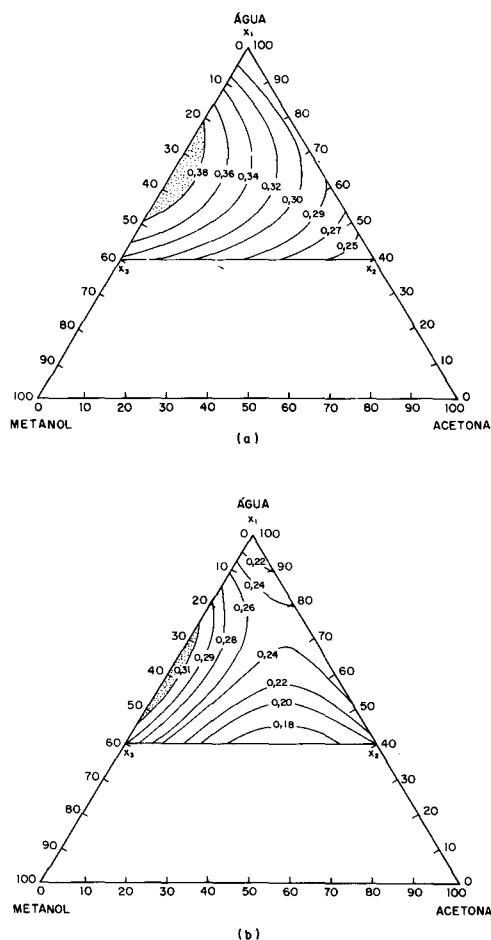


Figura 8. Projeções das superfícies de resposta sobre a região de experimentação: (a) no meio neutro, (b) no meio básico.

CONCLUSÕES

Os modelos de equação utilizados explicam, dentro das limitações experimentais, o comportamento do sistema com respeito

a separação dos pigmentos Rod-B e Rod-6G por cromatografia em papel. Estes pigmentos são melhores separados nos meios básico e neutro, onde praticamente não há diferença entre as regiões do "simplex", formadas pelas misturas de solventes que dão melhores respostas nestes meios.

O experimento é simples e rápido, e pode ser facilmente executado em aulas de laboratório, já que não necessitam de equipamentos especiais e as cubas cromatográficas podem ser facilmente confeccionadas. Material adicional sobre estes e outros conceitos quimiométricos são discutidos de uma maneira bastante didática em um livro texto em português, recentemente lançado pela Editora da Unicamp¹¹.

Outros experimentos similares podem ser também planejados usando-se, a separação de íons metálicos tais como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , etc¹²⁻¹⁴.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Cláudia Salgado Funchal e a Camile Florido pelo auxílio na execução dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- Cornell, J. A.; *Experiments With Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixtures Data*; John Wiley & Sons; New York, 1981.
- Cornell, J. A.; *How to Run Mixture Experiments for Products Quality*; American Society for Quality Control; New York, 1990.
- Gregory, F. P. e Cornell, J. A.; *J. Qual. Technol.* **1994**, *26*, 177.
- Box, G. E.; Hunter, W. G. e Hunter, J. S.; *Statistics for Experimenters*; John Wiley & Sons; New York, 1978; p 10.
- Scheffé, H.; *J. Royal Stat. Soc.* **1958**, *B20*, 344.
- Scheffé, H.; *J. Royal Stat. Soc.* **1963**, *B25*, 235.
- Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y. e Kaufman, L.; *Chemometrics: a textbook*; Elsevier Science Publishing Company Inc.; New York, 1990.
- Jacques, P.; *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 347.
- Crosier, R. B.; *Technometrics* **1984**, *26*, 209.
- Collins, C. H.; Braga, G. L. e Bonato, P. S.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*; Editora da Unicamp; Campinas, 1990.
- Barros Neto, B.; Scarmínio, I. S. e Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*; Editora da Unicamp; Campinas, 1995.
- Ritchie, A. S.; *J. Chem. Educ.* **1961**, *38*, 400.
- Mccullough, T. e Curlee, M.; *J. Chem. Educ.* **1993**, *70*, 339.
- Fitzgerald, J.W.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1969**, *52*, 1119.

Publicação financiada pela FAPESP