

EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FERRO II COM *o*-FENANTROLINA. UM TUTORIAL, PARTE III**Márcia Cristina Breitreit, André Marcelo de Souza* e Ronei Jesus Poppi***

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 03/07/2013; aceito em 17/10/2013; publicado na web em 03/12/2013

A DIDACTIC CHEMOMETRICS EXPERIMENT FOR DESIGN OF EXPERIMENTS (DOE): EVALUATION OF EXPERIMENTAL CONDITIONS IN THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON II WITH *o*-PHENANTHROLINE. A TUTORIAL, PART III. The objective of this manuscript is to describe a practical experiment that can be employed for teaching concepts related to design of experiments using Matlab or Octave computing environment to beginners, undergraduate and graduate students. The classical experiment for determination of Fe (II) using *o*-phenanthroline was selected because it is easy to understand, and all the required materials are readily available in most analytical laboratories. The approach used in this tutorial is divided in two steps: first, the students are introduced to the concept of multivariate effects, how to calculate and interpret them, and the construction and evaluation of a linear model to describe the experimental domain by using a 2³ factorial design. Second, an extension of the factorial design by adding axial points is described, thereby, providing a central composite design. The quadratic model is then introduced and used to build the response surface.

Keywords: design of experiments; multivariate optimization; teaching experiment.

INTRODUÇÃO

Este trabalho é uma continuação da série de tutoriais publicados com o intuito de divulgar experimentos didáticos de Quimiometria para serem utilizados em disciplinas de Química, que sejam de fácil execução e que possam ser utilizados em nível de graduação ou pós-graduação. Nos artigos anteriores, dois experimentos didáticos foram apresentados abordando dois importantes métodos muito empregados em reconhecimento de padrões e em calibração multivariada: a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e a regressão por mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares*, PLS), respectivamente. Para isso, no primeiro tutorial¹ foi abordado o uso da PCA para a análise exploratória de espectros no infravermelho médio (*Mid Infrared Spectroscopy*, MIR) de óleos vegetais comestíveis. No segundo,² o PLS foi empregado para a determinação da concentração do fármaco paracetamol em comprimidos comerciais empregando espectroscopia no infravermelho próximo (*Near Infrared Spectroscopy*, NIR). Assim, dando continuidade a série de publicações, outro importante tópico da Quimiometria, planejamento e otimização de experimentos (design of experiments, DOE), será o foco do presente artigo.

A introdução de conceitos de planejamento e otimização de experimentos é importante a alunos de graduação e pós-graduação uma vez que esta metodologia está se tornando cada vez mais importante na pesquisa e indústria em diversas áreas. Para a introdução dos conceitos de planejamento e otimização multivariada foi selecionado o experimento clássico da determinação de Ferro (II) com *o*-fenantrolina empregando espectroscopia na região do visível³ foi selecionado. Isto se deveu ao fato deste experimento ser muito comum em cursos de Química Analítica Instrumental, ser de rápida execução,

fácil obtenção dos reagentes e entendimento por parte dos alunos.

Em qualquer área de pesquisa, sempre é interessante conhecer quais são as variáveis (ou fatores) que afetam o sistema em estudo e a extensão desta influência, a fim de melhorar o processo de uma maneira geral, com o objetivo de reduzir tempo e custos. Basicamente, o método multivariado consiste em estabelecer e conduzir o menor número de experimentos necessários para extrair o máximo de informação dos dados coletados de modo a avaliar e/ou otimizar um produto ou processo. Para isto, todos os fatores relevantes são alterados simultaneamente em um conjunto de experimentos pré-determinados e os resultados são utilizados para a construção de modelos matemáticos que descrevem o comportamento do sistema dentro do domínio experimental investigado. Este procedimento apresenta diversas vantagens em relação ao método univariado, dentre as quais se podem citar:

- Interações entre variáveis somente podem ser identificadas empregando métodos multivariados: no método univariado cada fator é otimizado de forma independente. Os experimentos são realizados mantendo-se todos os fatores constantes em determinados valores (níveis), variando-se apenas o nível de um determinado fator. Seguindo o mesmo procedimento, os níveis dos outros fatores são variados um de cada vez, até que o melhor resultado seja encontrado. O problema com este procedimento é que o valor ótimo de um fator pode depender dos níveis dos demais, ou seja, podem existir interações entre eles e, por este motivo, a ordem dos fatores pode alterar o resultado final. As interações somente serão visualizadas empregando métodos multivariados, nos quais a ordem dos experimentos não afeta a resposta, uma vez que todas as variáveis são estudadas simultaneamente.
- Os modelos de regressão construídos a partir dos resultados de um planejamento multivariado permitem construir uma superfície descrevendo como a propriedade de interesse (resposta) varia em função da variação dos níveis dos fatores (superfície de resposta), permitindo prever o que acontece com a mesma dentro de todo o domínio experimental, não apenas nos pontos onde os experimen-

*e-mail: ronei@iqm.unicamp.br

*Endereço atual: Embrapa Solos, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Rua Jardim Botânico, 1.024 - Jardim Botânico - CEP 22460-000 - Rio de Janeiro- RJ - Brasil.

tos foram realizados. Experimentos univariados são guiados pelo último resultado obtido e não possuem a combinação necessária de níveis para a construção de uma superfície de resposta e assim, fornecem apenas informações nos pontos onde os experimentos foram de fato realizados. Além de fornecer informações mais ricas sobre o sistema em estudo, a metodologia multivariada permite a localização das condições ótimas do sistema com um número reduzido de experimentos, gerando assim a economia de tempo, custos e geração de resíduos.

- Otimizações multivariadas permitem ao pesquisador sistematizar seu trabalho de forma mais objetiva e tratar todas as variáveis com igual importância, eliminando possíveis pré-julgamentos, os quais nem sempre estão corretos.

Planejamentos fatoriais são utilizados para o estudo de variáveis estatisticamente independentes, ou seja, aquelas que podem ter seus valores alterados e controlados de forma independente umas das outras. A seleção do tipo de planejamento fatorial a ser utilizado depende do objetivo do pesquisador e da etapa na qual o projeto se encontra. Para um estudo inicial com o objetivo de triagem de variáveis e identificação daquelas que possuem maior influência na resposta, deve-se empregar planejamentos fracionários ou saturados.^{4,6} Após esta etapa, para a quantificação da influência de cada fator na resposta, planejamentos fatoriais completos em dois níveis (2^k para k fatores estudados) são indicados. Este tipo de planejamento permite a construção de modelos lineares nos fatores através do método dos Mínimos Quadrados, os quais descrevem superfícies de resposta planas.^{4,5} No entanto, muitas vezes a superfície de resposta possui curvatura, sendo necessária a construção de modelos quadráticos. Para isto, devem ser adicionados novos níveis ao planejamento fatorial, permitindo o cálculo dos coeficientes quadráticos. Dentre os planejamentos que podem ser empregados nestes casos pode-se citar: Fatorial em três níveis, Composto central (*Central Composite Design CCD*), Box-Benken^{4,5} e planejamento Doehlert.⁷ Uma descrição detalhada da metodologia de superfície de resposta é fornecida por Myers e Montgomery⁸ e Box e Draper.⁹ Também uma descrição bastante abrangente dos métodos de planejamento a serem empregados em cada uma das etapas mencionadas foi descrito em um tutorial por Lundstedt e co-autores.¹⁰

O planejamento Composto Central é uma opção interessante para a geração de modelos quadráticos devido ao fato de ser uma ampliação natural do planejamento fatorial com ponto central, o qual pode ser realizado em uma primeira etapa. A este planejamento inicial, são adicionados pontos axiais (planejamento em estrela) que fornecem os níveis adicionais para o cálculo dos coeficientes do modelo quadrático. A distância dos pontos axiais ao centro do planejamento é $\pm \alpha$, sendo que α pode variar de 1 até \sqrt{k} , onde k é o número de fatores. O valor de α depende de certas propriedades desejáveis para o planejamento e da possibilidade de realização de experimentos ao longo do domínio experimental.⁸ Quando $\alpha = 1$, os pontos axiais estarão localizados sobre as arestas do quadrado para um planejamento fatorial 2^2 e sobre as arestas de um cubo para um planejamento 2^3 e é chamado planejamento composto central de face centrada.

Uma etapa muito importante é a avaliação dos modelos construídos, ou seja, sua adequação às respostas obtidas experimentalmente, a qual ditará sua capacidade de previsão. Este diagnóstico pode ser realizado de diversas maneiras, sendo as mais comuns a Análise da Variância (ANOVA), a avaliação do gráfico de resíduos (diferenças entre os valores obtidos experimentalmente e aqueles previstos pelo modelo) e gráfico de valores experimentais vs valores previstos pelo modelo. Enquanto o gráfico de resíduos deve apresentar um padrão aleatório, o gráfico de valores experimentais vs valores previstos deve conter os pontos próximos a uma reta com inclinação de 45° e intercepto próximo a zero. Para modelos lineares, uma maneira

simples de avaliar se existe falta de ajuste, ou seja, se a curvatura na superfície de resposta é significativa, é adicionar um ponto no centro do planejamento fatorial (ponto central), realizar a medida da resposta neste ponto e comparar com o valor previsto pelo modelo linear. Caso exista curvatura, o valor previsto será estatisticamente diferente daquele medido experimentalmente. Excelentes livros sobre a análise da regressão são fornecidos por Draper e Smith¹¹ e Christensen.¹²

Artigos envolvendo o ensino de planejamento foram descritos por Boulzidi e Gozzi¹³ para a otimização de uma reação de Grignard e por van Ryswyk e van Hecke¹⁴ para otimização da reação de produção do acetilferroceno. Neste último, os autores ressaltam a importância da introdução de métodos multivariados de planejamento experimental aos alunos já durante a graduação, qualificando-os, assim, para a atividade profissional. Um experimento simples utilizando chocolates multi-coloridos (M&M's[®]) que pode ser realizado em sala de aula para demonstrar conceitos básicos relacionados aos efeitos das variáveis e vantagens do método multivariado foi apresentado por Pereira-Filho e co-autores.¹⁵

O objetivo deste trabalho é fornecer uma opção de experimento didático para o ensino de planejamento e otimização de experimentos a professores de Química Analítica dentro de uma disciplina específica de Quimiometria ou de Química Analítica Instrumental. O foco principal é introduzir de forma direta e prática os comandos básicos para a realização de todos os cálculos empregando Matlab ou Octave. Ao utilizar estes ambientes computacionais inserindo os comandos, o aluno entende de fato como os cálculos são realizados, ao contrário da utilização de programas comerciais fechados. Neste tutorial os cálculos serão descritos passo a passo, com uma breve descrição da teoria envolvida quando pertinente e acompanhados dos comandos em Matlab necessários para sua execução. Uma descrição mais detalhada da teoria envolvida não será realizada, pois não é o enfoque deste trabalho. Para um maior aprofundamento teórico, livros^{4,5,8,9,11,12} e artigos específicos¹⁰ sobre planejamento e otimização são indicados ao longo do tutorial e, na literatura brasileira, existem pelo menos dois trabalhos que descrevem a teoria envolvida de forma ampla,^{4,16} os quais podem ser consultados pelos interessados.

PARTE EXPERIMENTAL

Os fatores estudados e seus níveis foram: Fator 1: concentração de ácido ascórbico: nível (-) = $3,0 \times 10^{-4}$ % (% m/v), nível (0) = 2,65 $\times 10^{-3}$ % (% m/v) e nível (+) = $5,0 \times 10^{-3}$ % (% m/v); Fator 2: pH da solução: nível (-) = 1,9, nível (0) = 3,3 e nível (+) = 4,7; Fator 3: tempo da reação: nível (-) = 0 min, nível (0) = 7,5 min e nível (+) = 15 min. A resposta medida foi a absorbância no comprimento de onda 506 nm, o qual corresponde ao máximo de absorção do complexo formado.

Reagentes e materiais

Para a execução do experimento foi utilizado o sal de Fe (III) dodecahidratado ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Vetec), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, Vetec), *o*-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2$, Vetec), acetato de sódio (CH_3COONa , Vetec), biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, Vetec), cloreto de potássio (KCl, Synth), ácido acético glacial (H_3CCOOH , Synth), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , Synth), ácido clorídrico (HCl, Synth) e acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, Synth).

Preparo das soluções-estoque

Solução estoque do analito (50 mg L⁻¹ Fe (III) em H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹)

Foi pesada uma massa de 107,5 mg do sal $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ e

transferida para um balão de 250 mL, no qual adicionou-se aproximadamente 150 mL de água destilada e 130 μL de H_2SO_4 concentrado. A solução foi agitada até completa solubilização do sal e desaparecimento da coloração amarelada. A concentração de H_2SO_4 nesta solução é de 0,01 mol L^{-1} (pH próximo a 2). Esta solução deve ser ácida para evitar a precipitação do hidróxido de Fe (III) que confere a coloração amarelada à solução. O sulfato de ferroso amoniacal não é um padrão primário e para medidas analíticas é necessário padronizá-lo.

Solução estoque de ácido ascórbico 0,5 % (m/v)

Foi pesada uma massa de 0,25 g de ácido ascórbico e transferida para um balão de 50 mL. Foi adicionado aproximadamente 30 mL de água destilada e a solução foi agitada até a completa solubilização e o volume do balão foi aferido.

Solução de orto-fenantrolina 0,25 % (m/v)

Foi pesada uma massa de 0,125 g de *o*-fenantrolina em um béquer de 50 mL e adicionou-se 5 mL de acetona para a solubilização completa da *o*-fenantrolina. A solução foi transferida quantitativamente para um balão de 50 mL, cujo volume foi aferido com água destilada.

Tampão Acetato/Ácido acético (pH 4,7)

Adicionou-se 10,125 g de acetato de sódio em um balão de 250 mL e aproximadamente 150 mL de água destilada com agitação até completa solubilização do sal. Foram adicionados 7,0 mL de ácido acético concentrado, a solução foi homogeneizada e o volume do balão foi aferido.

Tampão Biftalato/HCl (pH 3,4)

Foram misturados 250 mL de uma solução de biftalato ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) 0,1 mol L^{-1} e 49,5 mL de uma solução de HCl 0,1 mol L^{-1} em um balão de 500 mL e o volume foi aferido com água destilada.

Tampão HCl/KCl (pH 1,9)

Foram misturados 62,5 mL de uma solução 0,2 mol L^{-1} de KCl e 20,25 mL de uma solução 0,2 mol L^{-1} de HCl em um balão de 250 mL e o volume foi aferido com água destilada.

Preparo das amostras e leitura de absorvância

As amostras referentes aos pontos do planejamento foram preparadas em balões de 50 mL, e as concentrações de ácido ascórbico, valores de pH e tempo foram calculados de acordo com a combinação dos níveis de um planejamento composto central de face centrada (pontos axiais com $\alpha = 1$) para três fatores. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Os balões tiveram os volumes aferidos com os tampões correspondentes aos níveis do planejamento. Para obter as concentrações correspondentes aos níveis (-), 0 e (+) de ácido ascórbico, foram adicionados aos balões os seguintes volumes da solução estoque de ácido ascórbico: 30, 265, 500 μL , respectivamente. Além do ácido ascórbico, foram adicionados 2 mL de *o*-fenantrolina (fixo para todas as amostras) e 5 mL da solução estoque da amostra (também fixo), a qual deve ser adicionada por último, imediatamente antes de completar o volume do balão com o tampão. Este cuidado é importante especialmente nas amostras que devem ter valores de absorvância medidos no tempo zero (imediatamente após a mistura dos reagentes).

O espectrofotômetro utilizado foi da marca Femto (700 Plus), com 100 % de transmitância ajustado com o branco (solução contendo todos os reagentes menos o analito). Para algumas amostras a absorvância aumentará com o tempo. Deve-se anotar o primeiro valor mostrado pelo equipamento como sendo o resultado correspondente ao tempo zero. Foi verificado experimentalmente que o tempo

necessário para a homogeneização não variou significativamente e foi suficiente para que a reação se iniciasse.

Tratamento dos dados

Os algoritmos foram executados em ambiente Matlab 7.8 (The MathWorks, Natick, MA) e podem também ser executados no software gratuito Octave, uma vez que não dependem de algoritmos auxiliares ou Toolboxes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Classicamente, neste experimento, o Fe (III) é reduzido a Fe (II) empregando ácido ascórbico e o Fe (II) é determinado através da sua complexação com a *o*-fenantrolina, um reagente bastante seletivo, em pH tamponado em 4,7. Os fatores incluídos no planejamento foram a concentração de ácido ascórbico, o pH e o tempo de reação. O complexo de cor vermelho-alaranjado formado pelo Fe (II) com a *o*-fenantrolina apresenta uma composição de 3 ligantes para 1 centro metálico, conforme mostrado na Figura 1. O pH da reação é importante uma vez que, em valores de pH muito baixos, a espécie desprotonada da *o*-fenantrolina pode não estar presente na concentração necessária para a formação quantitativa do complexo com o Fe (II). O tempo de reação foi incluído para avaliar a cinética da reação em função dos outros dois fatores. Neste experimento desejou-se maximizar a resposta (a absorvância do complexo formado), que está diretamente relacionada à concentração do complexo. Neste experimento, a água pura e o branco são equivalentes para ajustar o 100 % de transmitância.

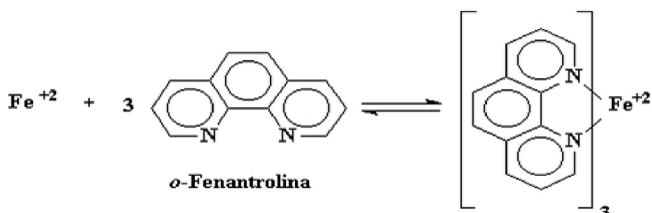


Figura 1. Ilustração da formação do complexo de Fe^{2+} com a *o*-fenantrolina

A combinação dos níveis dos fatores para a parte fatorial e planejamento composto central são mostrados na Tabela 1, juntamente com as respostas medidas. Os resultados serão mostrados em duas partes. Na parte I, será apresentado o cálculo dos efeitos dos fatores e suas interações para o planejamento fatorial com ponto central. Esta parte tem por objetivo introduzir ao aluno o conceito multivariado de efeitos principais e efeitos de interação, como calculá-los e interpretá-los. Nesta etapa o ponto central tem duas funções: 1) ser um nível adicional ao planejamento fatorial, permitindo a avaliação do ajuste do modelo linear aos dados e 2) as replicatas neste ponto são utilizadas para estimar a variância experimental que é utilizada no cálculo dos erros dos efeitos, permitindo avaliar quais são significativos. Na parte II, o planejamento fatorial será ampliado com pontos axiais ($\alpha = 1$), gerando um planejamento composto central de face centrada e permitindo a construção de um modelo quadrático para descrever a superfície de resposta. Esta sequência também pode ser adotada como estratégia didática nas aulas ministradas utilizando este experimento.

Parte I: Resultados do planejamento fatorial

Cálculos e interpretação dos efeitos

Os efeitos são sempre calculados como diferenças entre os resultados médios do nível (+) e os resultados médios do nível (-) para

Tabela 1. Combinação dos níveis dos fatores estudados e respostas medidas

	Experi- mento	Fator 1 (ácido ascórbico)	Fator 2 (pH)	Fator 3 (tempo)	Respostas
Fatorial	1	-	-	-	0,053
	2	+	-	-	0,19
	3	-	+	-	0,41
	4	+	+	-	0,963
	5	-	-	+	0,346
	6	+	-	+	0,735
	7	-	+	+	0,407
	8	+	+	+	0,975
Ponto Central	9	0	0	0	0,959
	10	0	0	0	0,987
	11	0	0	0	0,999
Pontos axiais	12	-	0	0	0,403
	13	+	0	0	0,979
	14	0	-	0	0,613
	15	0	+	0	0,971
	16	0	0	-	0,975
	17	0	0	+	0,979

cada um dos fatores. Estas diferenças são chamadas de contrastes. Para a realização dos cálculos, inicialmente é necessário definir a matriz dos coeficientes de contraste acrescida da unidade, a qual será denominada Matriz **X** (Equação 1):

$$X = \begin{bmatrix} +1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 & -1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & +1 & -1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & +1 & -1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \\ +1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ +1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ +1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (1)$$

Nesta matriz, a primeira coluna contendo apenas valores +1 é adicionada para o cálculo da média global. A segunda, terceira e quarta colunas correspondem aos sinais dos fatores 1, 2 e 3, respectivamente. A quinta, sexta, sétima e oitava colunas contêm os produtos de sinais dos fatores 12, 13, 23 e 123, respectivamente. As linhas 1 a 8 correspondem aos experimentos do fatorial 2^3 e as três últimas linhas correspondem aos experimentos realizados no ponto central.

Todas as operações realizadas no Matlab® serão efetuadas na janela do editor de funções e de texto do Matlab® (*editor*).¹ As etapas envolvidas nos cálculos serão descritas agora passo a passo.

1) Montar a matriz dos coeficientes de contrastes

Após iniciado o Matlab®, no editor de funções, a matriz dos coeficientes de contrastes deverá ser montada conforme mostrado na Equação 1, utilizando espaços ou vírgulas entre os elementos de uma linha e ponto-e-vírgula entre as linhas:

```
X=[1,-1,-1,-1,1,1,1,-1;1,1,-1,-1,-1,1,1,1;1,-1,1,-1,-1,1,1,1;1,1,1,-1,-1,-1,-1,1;1,-1,-1,1,1,-1,-1,1;1,1,-1,1,-1,-1,-1,1;1,-1,1,1,-1,-1,-1,1;1,1,1,1,1,1,1,1;1,0,0,0,0,0,0,0;1,0,0,0,0,0,0,0;1,0,0,0,0,0,0,0];
```

Selecione então a matriz **X** e arraste até a janela de comandos do Matlab® (*command window*) e tecla <enter>. Outra maneira de executar os comandos digitados no editor do Matlab® é teclando no ícone verde que representa um sinal de *play* na janela do próprio editor.

2) Montar o vetor contendo as respostas

Este vetor deve conter as respostas na mesma ordem dos experimentos contidos na matriz **X**. No editor de funções, digite:

```
>> y = [0.053;0.190;0.410;0.963;0.346;0.735;0.407;0.975;0.959;0.987;0.999];
```

Ao digitar números no Matlab® deve-se ficar atento, pois neste programa utiliza-se ponto ao invés de vírgula.

3) Calcular os efeitos principais e de interação

Para calcular os efeitos principais e os efeitos de interação, inicialmente devem ser definidos os vetores a partir das colunas apropriadas da matriz **X**. Por exemplo: x_1 contém os valores da segunda coluna da matriz **X**, os quais serão utilizados para o cálculo do efeito principal do fator 1, x_2 contém os valores da terceira coluna da matriz **X**, os quais serão utilizados para o cálculo do efeito principal do fator 2 e assim por diante. Para cálculo dos efeitos, devem ser considerados apenas os resultados da parte fatorial do planejamento, sem incluir o ponto central. Por este motivo, ao definir $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{123}$, deve-se indicar que somente serão utilizadas as oito primeiras linhas da Matriz **X**, conforme segue:

```
>> x1=X(1:8,2);x2=X(1:8,3);x3=X(1:8,4);x12=X(1:8,5);x13=X(1:8,6);x23=X(1:8,7);x123=X(1:8,8);
```

Além disso, é necessário definir um vetor de respostas contendo apenas as respostas do fatorial, excluindo o ponto central. Para isto, digite no editor:

```
>> y_fatorial=y(1:8);
```

Cada efeito refere-se ao produto entre o respectivo vetor coluna de **X** e o vetor de respostas, dividindo o resultado por 2^{k-1} (Equação 2):

$$\text{Efeito fator } i = \frac{1}{2^{k-1}} * x_i^t * y_{\text{fatorial}} = \frac{1}{4} x_i^t y_{\text{fatorial}} \quad (2)$$

onde x_i^t indica o vetor apropriado para o fator *i*, definido na etapa anterior e transposto e *k* representa o número de fatores (neste caso *k* = 3).

Por exemplo, para o fator 1 temos que:

```
Efeito fator 1 = 1/4 * (-0.053+0.190-0.410+0.963-0.346+0.735-0.407+0.975);
```

Desenvolvendo a expressão e rearranjando, temos que:
Efeito fator 1=1/4*(0.190+0.963+0.735+0.975)-1/4*(-0.053-0.410-0.346-0.407)

Ou seja, é possível verificar que um efeito é calculado como a diferença entre a média de todas as respostas em nível (+) e a média de todas as respostas em nível (-) para este fator.

No editor de funções, digite:

```
>> efeito_1=1/4*x1'*y_fatorial;efeito_2=1/4*x2'*y_fatorial;  
>> efeito_3=1/4*x3'*y_fatorial; efeito_12=1/4*x12'*y_fatorial;  
>> efeito_13=1/4*x13'*y_fatorial; efeito_23=1/4*x23'*y_fatorial;  
>> efeito_123=1/4*x123'*y_fatorial;
```

Na janela de comandos, digite `efeito_1` e tecla <enter> para visualizar seu valor, repetindo esta operação para os demais efeitos. Os resultados obtidos devem ser: efeito do fator 1 = 0.4118, efeito fator 2 = 0.3577; efeito fator 3 = 0.2117; efeito de interação 12 = 0.1488; efeito de interação 13 = 0.0667; efeito de interação 23 = -0.2072 e efeito de interação 123 = -0.0592. Para fins de comparação dos resultados dos cálculos, o número de casas decimais mostrado no texto será idêntico aquele fornecido pelo Matlab®.

O cálculo da média global é realizado simplesmente digitando:
>> media_global = mean (y);

Neste caso emprega-se o vetor y e não y_{fatorial} , pois no cálculo da média global devem ser incluídas todas as respostas e não apenas aquelas referentes ao fatorial. O resultado deve ser 0.6385.

4) Calcular os intervalos de confiança para os efeitos

Para avaliar se os efeitos são estatisticamente significativos, é necessário estimar os erros associados a estes valores e construir um intervalo de confiança utilizando a distribuição *t-Student*. Para isto, inicialmente deve-se estimar a variância experimental (s_{exp}^2) a partir dos experimentos replicados no ponto central, que correspondem às linhas 9:11 da matriz X . No editor de funções, digite:

```
>> y_PC=y(9:11,:);
>> s2_exp=var(y_PC);
```

Em seguida, considerando que cada efeito é calculado como sendo a diferença entre a média das respostas em nível (R+) e a média das respostas em nível (R-), a variância dos efeitos (s_{ef}^2) deverá ser calculada por meio da Equação 3:

$$s_{\text{ef}}^2 = s^2(\bar{R}_+) + s^2(\bar{R}_-) = \frac{S_{\text{exp}}^e}{4} + \frac{S_{\text{exp}}^2}{4} = \frac{S_{\text{exp}}^2}{2} \quad (3)$$

Uma vez que as médias em nível (+) e (-) foram calculadas com quatro valores cada uma. Desta forma, no editor de funções, digite:

```
>> s2_ef = s2_exp/2;
```

O valor de variância dos efeitos obtido foi de $2,1 \times 10^{-4}$. O erro de um efeito (s_{ef}) é a raiz quadrada da sua variância. No editor de funções, digite:

```
>> s_ef = sqrt(s2_ef);
```

O valor obtido neste exemplo foi de 0.0145. Para estimar a variância associada à média global, deve-se considerar que para seu cálculo foram utilizados os 11 resultados experimentais. Assim, no editor de funções, digite:

```
>> s2_media=s2_exp/11;
```

O valor de variância da média obtido foi de $3,8 \times 10^{-5}$. O erro da média é a raiz quadrada da sua variância; no editor de funções, digite:

```
>> s_media=sqrt(s2_media);
```

sendo o valor obtido neste exemplo de 0.0062.

Com os resultados dos erros dos efeitos, é possível construir intervalos de confiança para os efeitos, empregando os valores da distribuição *t* de *Student*, com o número de graus de liberdade igual ao da estimativa da variância experimental (sendo 2 neste exemplo) e o nível de confiança desejado, para classificá-los como significativos ou não. Caso o intervalo de confiança contenha o zero, o efeito não é significativo. Normalmente o intervalo é construído empregando 95% de confiança e, neste caso, para uma distribuição bi-caudal, o valor de *t* é de 4,303.

No editor de funções, digite:

```
>> lim_inf_ic_media=media_global-(4.303*s_media);
>> lim_sup_ic_media=media_global+(4.303*s_media);
>> ic_media=[lim_inf_ic_media,lim_sup_ic_media];
>> lim_inf_ic_efeito_1=efeito_1-(4.303*s_ef);
>> lim_sup_ic_efeito_1=efeito_1+(4.303*s_ef);
>> ic_efeito_1=[lim_inf_ic_efeito_1,lim_sup_ic_efeito_1];
```

O cálculo é análogo para os demais efeitos. Os intervalos obtidos devem ser: média global: [0.6119; 0.6652]; Efeito 1=[0.3493; 0.4742]; Efeito 2=[0.2953; 0.4202]; Efeito 3=[0.1493; 0.2742]; Efeito de interação 12=[0.0863; 0.2112]; Efeito de interação 13=[0.0043; 0.1292]; Efeito de interação 23=[-0.2697; -0.1148]; Efeito de interação 123=[-0.1217; 0.0032].

É possível verificar que todos os efeitos principais e as interações binárias são significativos. O efeito principal da concentração de ácido ascórbico é positivo, portanto, a absorvância aumenta quando a concentração de ácido ascórbico aumenta. Isto acontece porque a

concentração utilizada em nível baixo não é suficiente para reduzir todo Fe (III) para Fe (II) e, por este motivo, parte do Fe (III) permanece de forma não complexada, uma vez que o mesmo não reage com a *o*-fenantrolina. O efeito do pH também é positivo, ou seja, a absorvância aumenta ao alterar o pH do nível (-) para o nível (+). Para interpretar este efeito é preciso observar na Figura 1 que os sítios de ligação do Fe (II) com a *o*-fenantrolina são os mesmos que podem ser protonados em valores de pH muito baixos. Em pH 1,9 embora a forma protonada da *o*-fenantrolina predomine (a distribuição das espécies de *o*-fenantrolina de acordo com o pH é mostrada por Teixeira et al.),¹⁷ observa-se experimentalmente que o complexo é formado, devido ao aparecimento de coloração na solução. Também é possível observar que reação se processa ao longo do tempo, pois a coloração aumenta com o tempo. Isto pode ser explicado considerando o equilíbrio aquoso das espécies protonada (HFe⁺) e desprotonada (Fe²⁺) da *o*-fenantrolina: HFe⁺ = H⁺ + Fe²⁺; conforme a espécie Fe²⁺ é retirada do meio pela formação do complexo, o equilíbrio é deslocado para a direita no sentido de formação desta espécie e assim a reação de formação do complexo se processa ao longo do tempo.

O efeito significativo e positivo do tempo indica que a absorvância aumenta conforme aumenta o tempo de reação. Isto é especialmente válido no nível (-) do pH, pois no nível (+) a concentração da espécie Fe²⁺ no tempo inicial já é suficiente para a formação quantitativa do complexo e, desta maneira, a coloração da solução não se altera com o tempo. O gráfico de interações permite a avaliação gráfica do que foi discutido acima. Para possibilitar a interpretação das interações de dois fatores, deve-se manter um dos fatores fixos. Para ilustração, a concentração de ácido ascórbico será mantida fixa no seu nível (+). O gráfico de interações para os fatores pH e tempo é mostrado na Figura 2. Para a construção deste gráfico foram utilizados os valores de resposta y_2, y_4, y_6 e y_8 :

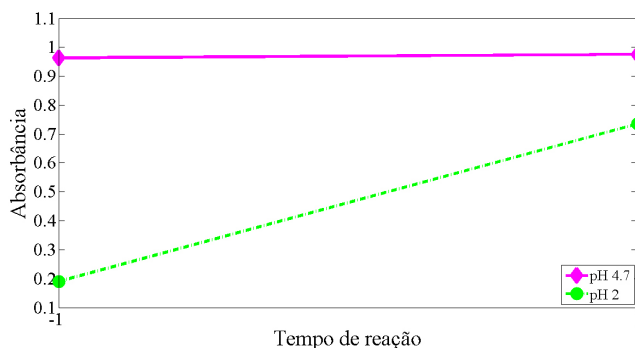


Figura 2. Gráfico de interações dos fatores tempo e pH. O fator ácido ascórbico foi mantido em seu nível (+) para geração do gráfico

Na Figura 2, é possível observar claramente que o tempo de reação tem um efeito muito pronunciado quando o experimento é realizado em pH 2, pois os valores de absorvância vão de 0,190 para 0,735. Por outro lado, o tempo não tem influência caso o experimento seja realizado em pH = 4,7, o que pode ser verificado pela reta horizontal neste valor de pH, indicando que a absorvância permanece inalterada. Como a resposta obtida ao aumentar o nível de um fator (fator tempo neste exemplo) depende do nível do outro fator (pH), diz-se que as duas variáveis interagem. Para gerar e formatar este gráfico no Matlab®, digite:

```
>> tempo=[-1;1];
>> absorvancia=[0.963;0.975];
>> absorvancia2=[0.190;0.735];
>> figure
>> plot(tempo, absorvancia, 'md', 'markerfacecolor','m', 'MarkerSize',15, 'linewidth',2)
```

```
>>hold on
>>plot(tempo,absorbancia2,'-go','markerfacecolor','g','MarkerSize',15,'linewidth',2)
>>ylabel('Absorbância','FontSize',30,'FontName','Times New Roman');
>>xlabel('Tempo de reação (min)','FontSize',30,'FontName','Times New Roman');
>>set(gca,'xlim',[0.1 1],'xtick',[0.1 1],'FontSize',24,'FontName','Times New Roman');
>>set(gca,'ylim',[0.1 1.1],'ytick',[0.1:0.1:1.1],'FontSize',24,'FontName','Times New Roman');
>>h=legend('pH 4.7','pH 2');
>>set(h,'box','on','FontSize',20,'FontName','Times New Roman','location','southeast');
```

Gráficos semelhantes podem ser construídos para a interpretação dos demais fatores de interação. Vale lembrar que neste caso, no qual as interações são significativas, o procedimento univariado de otimização não seria apropriado.

5) Construir e avaliar o modelo estatístico

É plausível assumir que a respostas dentro do domínio experimental sejam descritas por uma função que envolve os fatores experimentais. Assim, as respostas obtidas em um planejamento experimental também podem ser utilizadas para a construção de um modelo estatístico que descreve como estas variam em função da variação dos fatores. Planejamentos fatoriais em dois níveis permitem a construção de modelos lineares nos quais a resposta varia linearmente com a variação dos níveis dos fatores. Para um planejamento 2^3 , o modelo linear incluindo as interações é descrito pela Equação 4:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (4)$$

Ou de forma matricial (Equação 5):

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\mathbf{b} \quad (5)$$

Estas equações representam um plano e os coeficientes do modelo (contidos no vetor \mathbf{b}) podem ser calculados empregando uma única equação matricial, descrita na Equação 6:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y} \quad (6)$$

Na janela do editor de funções, digite:

```
>> b=inv(X'*X)*X'*y
```

Os coeficientes contidos no vetor \mathbf{b} estarão na ordem das colunas da matriz \mathbf{X} . O coeficiente b_0 representa a média global e por este motivo tem o mesmo valor encontrado no cálculo descrito na seção anterior (0.6385). Os coeficientes b_1 , b_2 e b_3 representam a variação da resposta *por unidade de cada um dos fatores* e, por este motivo, eles são a metade dos efeitos calculados anteriormente, o que também é válido para os coeficientes b_{12} , b_{13} , b_{23} e b_{123} , os quais representam as interações. Assim, os coeficientes encontrados devem ser: $b_1 = 0.2059$; $b_2 = 0.1789$; $b_3 = 0.1059$; $b_{12} = 0.0744$; $b_{13} = 0.0334$; $b_{23} = -0.1036$ e $b_{123} = -0.0296$.

A variância dos coeficientes também pode ser calculada empregando uma única equação matricial (Equação 7):

$$s_{\text{coef}}^2 = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} s_{\text{exp}}^2 \quad (7)$$

Para isto, no editor de funções, digite:

```
>> s2_coef=inv(X'*X)*s2_exp;
```

Os erros dos coeficientes (0.0073) são a raiz quadrada dos valores

da diagonal principal da matriz s_{coef}^2 , com exceção do primeiro valor (0.0062), o qual representa o erro da média global. Observe que o erro da média global é idêntico ao valor calculado na seção anterior enquanto os erros dos coeficientes são a metade dos erros dos efeitos.

O modelo estatístico tem por função permitir a construção da superfície de resposta. No entanto, para isto, o mesmo deve ser válido, ou seja, ele deve representar de forma adequada os resultados experimentais. Serão apresentadas três ferramentas para a avaliação da qualidade do ajuste do modelo linear aos dados experimentais: 1) construção de um intervalo de confiança para a diferença entre os resultados obtidos no ponto central e os resultados médios do fatorial; 2) avaliação do gráfico de resíduos; e 3) Análise da Variância (ANOVA). As equações utilizadas para o cálculo da ANOVA são apresentadas na Tabela 1S do material suplementar.

Os resíduos (e) são definidos como sendo as diferenças entre os valores experimentais e aqueles previstos pelo modelo.⁴ Para um modelo bem ajustado, estes valores devem ser pequenos e aleatoriamente distribuídos ao redor do zero, com valores positivos tão frequentes quanto os valores negativos. O gráfico de resíduos obtido pelo modelo linear (Figura 1S) não apresentou um comportamento aleatório, uma vez que todos os valores previstos foram negativos, com exceção do ponto central, o qual estava muito longe dos demais. O alto resíduo no ponto central indica que o modelo linear não é capaz de descrever satisfatoriamente este dado experimental e que, provavelmente, existe uma curvatura na superfície de resposta. A ANOVA indicou falta de ajuste do modelo linear e seus resultados são apresentados na Tabela 2S do material suplementar. Os comandos necessários para construção do gráfico de resíduos (Quadro 1S) e ANOVA (Quadro 2S) também são apresentados nos material suplementar, devido à limitação de espaço.

O intervalo de confiança para a diferença entre a média de respostas do planejamento fatorial e a médias das respostas no ponto central é uma maneira simples e didática de avaliar se existe curvatura na superfície de resposta. Caso não exista curvatura, o intervalo de confiança deve passar pelo zero, uma vez que este seria um dos valores possíveis.⁴ Para realizar este cálculo digite no editor de funções:

```
>> yF=[0.053;0.190;0.410;0.963;0.346;0.735;0.407;0.975];
```

```
>> media_yf=mean(yF);
```

```
>> yc=[0.959;0.987;0.999];
```

```
>> media_yc=mean(yc);
```

```
>> yf_yc=media_yf-media_yc;
```

```
>> s2yf_yc=1/8*s2_exp+1/3*s2_exp;
```

```
>> s_yf_yc=sqrt(s2yf_yc);
```

```
>> Limite_inferior_IC_yf_yc=-0.4718-4.303*s_yf_yc;
```

```
>> Limite_superior_IC_yf_yc=-0.4718+4.303*s_yf_yc;
```

O intervalo de confiança obtido foi: [-0.5316; -0.4120] e, como este não inclui o zero, a curvatura na superfície de resposta é significativa e, assim, o modelo linear não representa adequadamente os dados.

6) Construir a superfície de resposta

Considerando que o modelo linear apresentou falta de ajuste, deve-se esperar que ele não represente adequadamente os pontos experimentais. Para ilustrar como as medidas experimentais no ponto central estão distantes da superfície de resposta construída empregando o modelo linear, é mostrada na Figura 3 a superfície de resposta linear com os resultados experimentais do PC ao centro. É possível verificar que os mesmos encontram-se distantes da superfície, confirmando a falta de ajuste do modelo linear.

Para gerar esta superfície de resposta, inicialmente os coeficientes do modelo devem ser extraídos do vetor \mathbf{y} . Na janela do editor de funções, digite:

```
>> b0=b(1,:);b1=b(2,:);b2=b(3,:);b3=b(4,:);b12=b(5,:);b13=b(6,:);b23=b(7,:);b123=b(8,:);
```


O erro dos coeficientes encontram-se na diagonal da matriz s_coef nas posições correspondentes a estes coeficientes:

```
>> s_coef=sqrt(s2_coef);
```

É possível construir um intervalo de confiança para os coeficientes do modelo quadrático e verificar quais são significativos. Isto é feito somando e subtraindo o valor de cada coeficiente pelo valor da distribuição t multiplicada pelo erro do coeficiente, ou seja [Coeficiente $\pm t_{v,95\%} * erro$]. Realizando este cálculo utilizando $t = 4,303$ para 2 graus de liberdade e 95 % de confiança os intervalos de confiança são: $b_0 = [0,979 \pm 0,038]$; $b_1 = [0,222 \pm 0,028]$; $b_2 = [0,179 \pm 0,028]$; $b_3 = [0,085 \pm 0,028]$; $b_{11} = [-0,285 \pm 0,053]$; $b_{22} = [-0,185 \pm 0,053]$; $b_{33} = [0,001 \pm 0,053]$; $b_{12} = [0,074 \pm 0,031]$; $b_{13} = [0,033 \pm 0,031]$; $b_{23} = [-0,104 \pm 0,031]$; $b_{123} = [-0,030 \pm 0,031]$.

Conforme é possível verificar nestes intervalos de confiança, os coeficientes b_{33} , b_{13} e b_{123} não são significativos com 95 % de confiança.

5) Avaliar o modelo

Para um modelo bem ajustado, espera-se que os valores previstos pelo modelo por meio da Equação 8 sejam concordantes com os valores experimentais. Isto foi de fato observado e o gráfico de valores previstos vs valores experimentais é mostrado na Figura 4S, juntamente com os comandos necessários para sua construção (Quadro 5S). Desta maneira, o modelo quadrático parece ser adequado para descrever as respostas dentro do domínio experimental, o que será confirmado a seguir a partir das superfícies de resposta.

O gráfico de resíduos para o modelo quadrático é mostrado no material suplementar na Figura 5S e os comandos necessários para sua construção são mostrados no Quadro 6S. É possível verificar nesta Figura que os resíduos agora apresentam comportamento aleatório, sem tendências. Os resultados da ANOVA para o modelo quadrático são mostrados na Tabela 3S. A ANOVA indicou que regressão é significativa e que não há evidências de falta de ajuste. Os cálculos necessários para sua construção são mostrados no Quadro 7S. Como não existe falta de ajuste, é possível utilizar a média quadrática dos resíduos (MQ_r) como uma estimativa da variância experimental, com a vantagem de apresentar um número maior de graus de liberdade ($v = 6$) para a estimativa dos erros dos coeficientes do modelo e refazer os intervalos de confiança mostrados anteriormente. Neste caso, o valor de t deve ser correspondente ao número de graus de liberdade dos resíduos ($t = 2,447$ com 95 % confiança). Realizando este cálculo, verificou-se que os mesmos três coeficientes (b_{33} , b_{23} e b_{123}) não são considerados significativos, ou seja, as conclusões não se alteraram. Em uma situação deste tipo, existe a possibilidade de retirar estes coeficientes do modelo, transferindo 3 graus de liberdade para os resíduos e recalculando a MQ_r , os erros dos coeficientes e os intervalos de confiança. Neste experimento estes cálculos foram realizados e indicaram que os intervalos tornaram-se apenas ligeiramente mais estreitos, porém sem mudança nas conclusões sobre os coeficientes.

Para a construção das superfícies de resposta, é necessário inicialmente extrair os coeficientes do vetor \mathbf{b} , conforme descrito para o modelo linear. Para isto, digite no editor:

```
>> b0=b(1); b1=b(2); b2=b(3); b3=b(4); b11=b(5); b22=b(6); b33=b(7); b12=b(8); b13=b(9); b23=b(10); b123=b(11);
```

As superfícies de resposta são mostradas nas Figuras 4, 5 e 6 mantendo-se x_2 fixo em -1, 0 e 1, respectivamente. Os pontos experimentais são mostrados em cada caso. Os comandos necessários para construção e formatação da superfície de resposta da Figura 4 são descritos abaixo. De maneira análoga, os comandos para a construção das Figuras 5 e 6 são mostrados nos Quadros 8 e 9 do material suplementar.

Para construção e formatação da Figura 4 digite no editor de funções:

```
>>[xx1,xx3]=meshgrid(-1:0.04:1);
>>xx2=-ones(51,51);
>>yr1=b0+ b1.*xx1 + b2.*xx2 + b3.*xx3 + b11.*xx1.*xx1 +
b22.*xx2.*xx2...
+b33.*xx3.*xx3+b12.*xx1.*xx2+b13.*xx1.*xx3+b23.*xx2.*xx3
+b123.*xx1.*xx2.*xx3
>>figure
>>mesh(xx1,xx3,yr1)
>>xlabel('Fator 1','FontSize',36,'FontName','Times New Roman')
>>ylabel('Fator 3','FontSize',36,'FontName','Times New Roman')
>>zlabel('Absorbância','FontSize',36,'FontName','Times New Roman')
>>title('Substituido x2 por -1','FontSize',36,'FontName','Times New Roman')
>>set(gca,'xlim',[-1 1.0],'xtick',-1:0.5:1.0,'FontSize',30,'FontName','Times New Roman');
>>set(gca,'ylim',[-1 1.0],'ytick',-1:0.5:1.0,'FontSize',30,'FontName','Times New Roman');
>>set(gca,'zlim',[0 1.0],'ztick',0.1:0.5:1.0,'FontSize',30,'FontName','Times New Roman');
>>grid off
>>hold on
>>plot3(-1,-1,0.053,'or','MarkerFacecolor','k','MarkerSize',20)
>>plot3(1,-1,0.19,'or','MarkerFacecolor','k','MarkerSize',20)
>>plot3(-1,1,0.346,'or','MarkerFacecolor','k','MarkerSize',20)
>>plot3(1,1,0.736,'or','MarkerFacecolor','k','MarkerSize',20)
```

Comparando-se as superfícies mostradas nas Figuras 4, 5 e 6, é possível verificar as transformações que acontecem conforme o pH vai sendo alterado de 1.9 (nível -, Figura 4) para 3.3 (ponto central, Figura 5) e para 4.7 (nível +, Figura 6). É possível observar que o vértice correspondente ao nível (+1) do fator 1 e (-1) do fator 3 se “levanta” conforme o nível do pH aumenta. No pH 1.9 existe uma grande

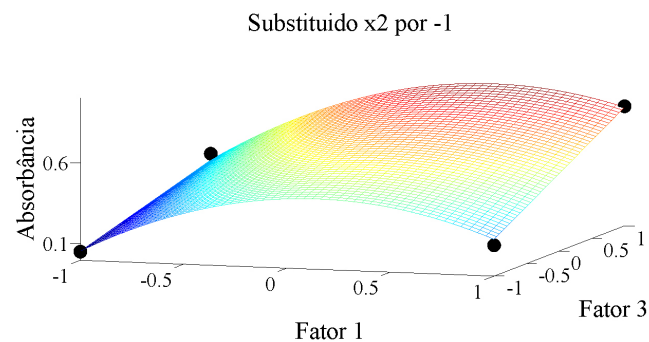


Figura 4. Superfície de resposta para o modelo quadrático em função das variáveis x_1 e x_3 , mantendo-se x_2 fixo no nível (-)

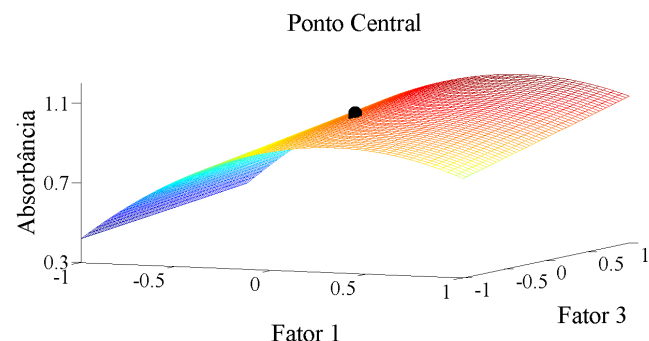


Figura 5. Superfície de resposta para o modelo quadrático em função das variáveis x_1 e x_3 , mantendo-se x_2 fixo no nível (0)

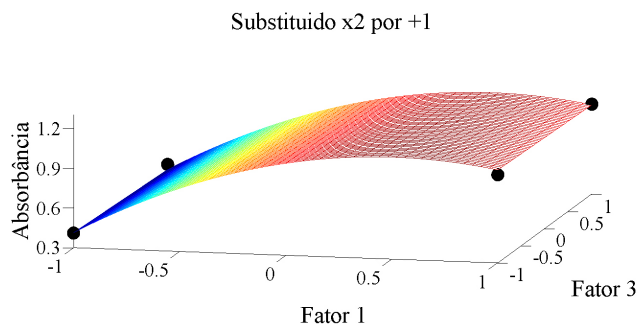


Figura 6. Superfície de resposta para o modelo quadrático em função das variáveis x_1 e x_3 , mantendo-se x_2 fixo no nível (+)

diferença no valor da absorvância quando a leitura é feita no tempo zero e quando é feita após 15 minutos. Conforme o pH é aumentado, esta diferença vai se tornando menor até se tornar insignificante para o pH 4.7 - veja que neste pH os mesmos valores de absorvância são obtidos se a leitura é feita no tempo zero ou após 15 minutos, indicando que o complexo se formou de forma quantitativa muito rapidamente. Assim, por este motivo, seria interessante trabalhar em pH 4.7. Neste pH (Figura 6) é possível verificar que existe uma região de valores máximos, a qual se inicia a partir do ponto central e apresenta uma curvatura suave em direção ao ponto correspondente ao nível (+1) do fator 1, sendo que o ponto correspondente a $x_1 = 0,5$ apresenta um valor de absorvância ligeiramente superior. Para encontrar o valor original de x_1 , concentração de ácido ascórbico neste ponto, deve-se utilizar a equação de codificação das variáveis, descrita na referência 4.⁴ Assim, $0,5 = (V_{AA} - PC) / \Delta / 2$, na qual V_{AA} representa o volume de ácido ascórbico, PC representa o volume de ácido ascórbico no ponto central e Δ representa a amplitude do intervalo para esta variável. Realizando este cálculo, temos que $V_{AA} = 383 \mu\text{L}$.

Acima foi descrito o procedimento de interpretação gráfica da superfície de resposta para encontrar a região ótima. Este procedimento pode ser realizado facilmente em alguns casos, porém o procedimento geral envolve derivar a equação do modelo em relação a cada uma das variáveis (derivadas parciais) e igualar as expressões a zero. Este procedimento gera um sistema de n equações (e n incógnitas) com n igual ao número de variáveis no modelo. Este sistema de equações pode ser resolvido por substituição ou empregando métodos de resolução de sistemas lineares, como por exemplo, o método de Cramer. Realizando este procedimento com a equação do modelo quadrático deste experimento foram encontrados os mesmos resultados da análise visual ($x_1 = 0,5$; $x_2 = +1$ e $x_3 = -1$). Estes valores foram então colocados na equação do modelo para a previsão do valor de absorvância neste ponto, fornecendo um resultado de 1,07. A realização do experimento neste ponto indicou um valor de absorvância de 0,986, deixando um resíduo de 0,084, um valor compatível com o esperado para o modelo quadrático, conforme mostrado na Figura 5S.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi descrito um experimento, juntamente com os comandos necessários para a execução dos cálculos em Matlab e Octave, para o ensino de metodologias multivariadas de planejamento e otimização para a graduação, pós-graduação ou iniciantes em Quimiometria. O experimento é simples em relação ao preparo das amostras, disponibilidade dos reagentes e obtenção das respostas e tem demonstrado ser adequado para a sua aplicação em disciplinas experimentais de Química Analítica. Os cálculos podem ser realizados no ambiente Matlab ou Octave, sem a necessidade de nenhum algoritmo ou toolbox adicional. Ao executar os cálculos por meio de comandos, o aluno tem a oportunidade de entender os princípios

da metodologia multivariada, o que muitas vezes não é possível ao empregar programas computacionais fechados.

Além do ensino da metodologia multivariada de otimização, este tutorial pode ser utilizado para demonstrar aos alunos a ineficiência da otimização univariada, a qual é falha na presença de interação entre os fatores conforme observado neste experimento. Os efeitos de interação são significativos, ou seja, os efeitos obtidos para um determinado fator dependem dos níveis dos demais fatores e, por este motivo, o procedimento de otimização multivariada deve ser aplicado.

Sugere-se que o experimento seja dividido em duas partes, conforme descrito neste tutorial: Parte I: cálculo e interpretação química dos efeitos e estimativa de seus erros, construção e avaliação do modelo linear. Parte II: expansão do planejamento, construção, avaliação do modelo quadrático e observação da superfície de resposta. De acordo com o tempo disponível e grau de aprofundamento desejado, pode-se ou não utilizar os comandos para o cálculo da Análise da Variância, descrita no Material Suplementar.

MATERIAL SUPLEMENTAR

No Quadro 1S são descritos os comandos para a geração dos resíduos e construção do gráfico de resíduos vs valores previstos para o modelo linear, mostrado na Figura 1S. Em seguida, no Quadro 2S é descrita a Análise da Variância para o modelo linear. No Quadro 3S são descritos os comandos necessários para gerar e formatar a superfície de resposta considerando o fator x_2 fixo em seu nível (-) mostrada na Figura 2S. No Quadro 4S são descritos os comandos necessários para gerar e formatar a superfície de resposta considerando o fator x_2 fixo em seu nível (+), mostrada na Figura 3S. A Figura 4S apresenta o gráfico de valores experimentais vs valores previstos pelo modelo quadrático e o Quadro 5S apresenta os comandos necessários para sua construção. A Figura 5S apresenta o gráfico de resíduos para o modelo quadrático e os comandos para sua construção são mostrados no Quadro 6S. Os comandos necessários para a construção da Análise da Variância para o modelo quadrático são mostrados no Quadro 7S. Os comandos necessários para a construção das Figuras 5 e 6 são mostrados nos Quadros 8S (substituindo x_2 por 0) e 9S (substituindo x_2 por +1), respectivamente. A Tabela 1S apresenta as equações gerais para os cálculos da ANOVA. As Tabelas 2S e 3S apresentam os resultados da ANOVA para o modelo linear e quadrático, respectivamente.

TRABALHOS FUTUROS

Dando continuidade à série de tutoriais elaborados com o intuito de divulgar experimentos didáticos de Quimiometria, o próximo tutorial estará relacionado a descrever métodos multivariados de reconhecimento de padrões supervisionados para classificação de óleos vegetais utilizando espectroscopia na região do infravermelho próximo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa Estágio Docente (PED) da Unicamp pela oportunidade de realização deste experimento junto aos alunos de graduação do curso de Química Analítica Instrumental II, aos técnicos do laboratório de ensino José Divino Barboza, Daniel Nunes Martins e Mirian Cristina de Souza pela ajuda sempre presente, ao doutorando Paulo Roberto Filgueiras pelas sugestões no uso do Matlab, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (processo nº 2009/54297-9) pela concessão de bolsa de doutorado a M.C. Breitkreitz, ao CNPq pela bolsa a R. J. Poppi e ao Prof. Dr. Roy Edward Bruns pelas valiosas discussões e esclarecimentos.

REFERÊNCIAS

1. Souza, A. M.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2012**, 35, 223.
2. Souza, A. M.; Breikreitz, M. C.; Filgueiras, P. R.; Rohwedder, J. J. R.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2013**, no prelo.
3. Mehlig, J. P.; Hulett, H. R.; *J. Ind. Eng. Chem.* **1942**, 14, 869.
4. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos*, 3rd ed., Unicamp: Campinas, 2007.
5. Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S.; *Statistics for Experimenters: Design, Innovation and Discovery*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2005.
6. Plackett, R.L.; Burman, J. P.; *Biometrika* **1946**, 33, 305.
7. Ferreira, S. L. C.; dos Santos, W. N.L.; Quintella, C. M.; Barros Neto, B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta* **2004**, 63, 1061.
8. Myers, R.; Montgomery, D. C.; *Response Surface Methodology Process and product optimization using designed experiments*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2002.
9. Box, G. E. P.; Draper, N. R.; *Empirical Model-Building and Response Surfaces*, Wiley: New York, 1987.
10. Lundstedt, T.; Seifert E.; Abramo, L.; Theilin, B.; Nystrom, A.; Petersen, J.; Bergman, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 42, 3.
11. Draper, N. R.; Smith, R.; *Applied Regression Analysis*, 3rd ed., John Wiley & Sons: New York, 1998.
12. Christensen, R.; *Analysis of variance, design and regression –applied statistical methods*, CRC: New York, 2000.
13. Bouzidi, N.; Gozzi, C.; *J. Chem. Educ.* **2008**, 85, 1544.
14. Ryswyk, H. V.; Hecke, G. R. V.; *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, 878.
15. Pereira-Filho, E. R.; Pereira, F. M. V.; Lemos, S. G.; *Chem. Educator* **2009**, 14, 200.
16. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 338.
17. Teixeira, M. F. S.; Fatibello-Filho, O.; Ramos, L. A.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 817.