

UNICAMP

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

**Otimização de Misturas Químicas
Com Flexibilidade na
Ordem de execução dos Experimentos**

Cleber Nogueira Borges
Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Bruns

Campinas, SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

B644o Borges, Cleber Nogueira.
Otimização de misturas químicas com flexibilidade na
ordem de execução dos experimentos / Cleber Nogueira
Borges. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: Roy Edward Bruns.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Otimização. 2. Planejamento de experimentos.
3. *Split-Plot*. I. Bruns, Roy Edward. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Chemical mixture optimization with flexibility in the execution order of experiments

Palavras-chaves em inglês: Optimization, Experimental designs, Split-Plot

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Roy Edward Bruns (orientador), Jarbas José Rodrigues Rohwedder (IQ-UNICAMP), João Carlos de Andrade (IQ-UNICAMP), Ieda Spacino Scarminio (IQ-UEL), Sebastião de Paula Eiras (IQ-UFU)

Data de defesa: 05/10/2007

Agradecimentos

À minha família pelo apoio que me deram durante o período do curso de doutorado.

Ao Prof. Roy E. Bruns pela orientação neste trabalho e por toda atenção dispensada.

Ao CNPq pelo financiamento a este trabalho.

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Cleber Nogueira Borges, 30 anos.

Formação Acadêmica

Bacharel e Licenciado em Química

Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 1996-2000.

Mestrado

Método de Correção de frequências e intensidades vibracionais por Fatores de Escala para Grupos Característicos

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2000-2003.

Trabalhos publicados

1 - C. N. Borges, M. C. Breitzkreitz, R. E. Bruns, L. M. C. Silva, I. S. Scarminio;

“Unreplicated Split-Plot Mixture Designs and Statistical Models for Optimizing Mobile Chromatographic Phase and Extraction Solutions for Fingerprint Searches”;

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 89 (2007) 82–89

2 - C. N. Borges, R. E. Bruns, A. A. Almeida, I. S. Scarminio;

“Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic phase and extraction solutions for *Camellia sinensis*”;

ANALYTICA CHIMICA ACTA 595 (1-2): 28-37 JUL 9 2007

3 - C.N. Borges, J.A. Bortoloti, R.E. Bruns;

”Split-plot designs and normal probability graphs for the optimization of chemical systems”;

ANALYTICA CHIMICA ACTA 544 (2005) 206-212

Trabalhos apresentados em congressos

1 - C. N. Borges, M. C. Breitzkreitz, R. E. Bruns, L. M. C. Silva, I. S. Scarminio

“Unreplicated Split-Plot Mixture Designs and Statistical Models for Optimizing Mobile Chromatographic Phase and Extraction Solutions for

Fingerprint Searches”, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry – CAC 2006, Águas de Lindóia, SP, 2006.

2 - C. N. Borges, J. A. Bortoloti, R. E. Bruns;
”Planejamento e modelagem de experimentos executados em ordem não completamente aleatória”, 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2006.

3 - C. N. Borges, J. A. Bortoloti, R. E. Bruns;
“A importância da aleatoriedade na execução de experimentos químicos”, 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 2005.

Atividade Profissional

Pesquisador-Tecnologista em Metrologia Química

Divisão de Metrologia Química – Dquim

Diretoria de Metrologia Científica e Industrial - Dimci

Instituto de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO

Resumo

Otimização de Misturas Químicas com Flexibilidade na Ordem de execução dos Experimentos

Neste trabalho é apresentado o planejamento estatístico *split-plot* onde as unidades *main-plots* e *sub-plots* são planejamentos de misturas químicas. *Main-plots* e *sub-plots* são definidos de acordo com a estrutura simplex-centróide. O planejamento foi aplicado para a otimização simultânea de solventes extratores e fases móveis utilizados na separação cromatográfica de compostos químicos de plantas. O interesse foi determinar os melhores valores das respostas (maiores números de picos) em função dos extratores e fases móveis. A vantagem da blocagem dos experimentos segundo a estrutura *split-plot* é a conveniência por minimizar (ou facilitar) o trabalho experimental ou reduzir resíduos químicos ou ambos. A desvantagem é que o tratamento estatístico de tal sistema se torna mais complexo que os planejamentos com esquemas aleatórios. Gráficos normais foram utilizados para a escolha de modelos e assim, evitando a realização de replicatas dos experimentos.

Abstract

Chemical Mixture Optimization with Flexibility in the Execution Order of Experiments

A split-plot statistical design is proposed for which the main-plots and sub-plots are both chemical mixture designs. Main-plots and sub-plots are investigated using the simplex-centroid design. The composite mixture-mixture design was applied to the simultaneous optimization of extractor solvents and mobile phases used in the chromatographic separation of chemical compounds from plant materials. The main goal was to determine the best response values, largest number of peaks, as a function of the extractor and mobile phase components. The advantages of using blocked experiments following the split-plot structure is to minimize (or facilitate) the experimental work as well as reduce the chemical residuals that must be discarded or both. The drawback is that the statistical treatment of the system becomes more complex than designs with random schemes. Normal graphs were utilized for choosing models so, the realization of replicate experiments could be avoided.

Índice

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
1 – Introdução.....	1
1.1 – Objetivo	4
2 – Análise e modelagem estatística	5
2.1 – Formulação do modelo misto (<i>mixed model</i>)	5
2.2 – Estimativas dos parâmetros do modelo misto por GLS	6
2.3 – Estimativas dos parâmetros do modelo misto por ML	7
2.4 – Coeficientes dos parâmetros do modelo <i>double-Scheffé</i>	8
2.5 – Variâncias dos parâmetros do modelo <i>double-Scheffé</i>	13
2.6 – Uso de gráfico normal na escolha de parâmetros de um modelo.	15
3 – Procedimento para a modelagem dos dados	17
4 – Parte Experimental	19
4.1 – Procedimento experimental para obtenção dos dados	19
4.2 – Dados Experimentais	22
5 – Resultados e discussão	24
5.1 – Análise dos dados da <i>B. Milleflora</i> com detector em 254nm	24
5.2 – Análise dos dados da <i>B. Milleflora</i> com detector em 210nm	31
5.3 – Análise dos dados da <i>B. Trimera</i> com detector em 254nm	38
5.4 – Análise dos dados da <i>B. Trimera</i> com detector em 210nm	45
5.5 – Análise dos dados da <i>C. Sinensis</i> com detector em 254nm	51
5.6 – Análise dos dados da <i>C. Sinensis</i> com detector em 210nm	63
5 – Conclusão	75
Apêndices	77
Apêndice A – Cromatogramas típicos.....	77
Apêndice B – Modelo saturado – <i>B. Milleflora</i> -254nm.	78
Apêndice C – Modelo saturado – <i>B. Milleflora</i> -210nm.	79
Apêndice D – Modelo saturado – <i>B. Trimera</i> -254nm.	80
Apêndice E – Modelo saturado – <i>B. Trimera</i> -210nm.	81
Apêndice F – Modelo saturado – <i>C. Sinensis</i> -254nm.	82
Apêndice G – Modelo saturado – <i>C. Sinensis</i> -210nm.	83
Referências	84

Lista de tabelas

Tabela 1 – Matriz de planejamento experimental para os solventes extratores (z) e fases móveis (x) com número de picos observados com detector em 210 e 254nm.....	23
Tabela 2 – Modelo saturado e o modelo <i>split-plot</i> com 12 termos para número de picos observados em 254nm.	26
Tabela 3 – Modelo saturado e o modelo <i>split-plot</i> com 17 termos para o número de picos observados em 210nm.	33
Tabela 4– Modelo saturado e o modelo <i>split-plot</i> com 10 termos para o número de picos observados em 254nm.	41
Tabela 5 – Modelo saturado e o modelo <i>split-plot</i> com 11 termos para o número de picos observados em 210nm.	47
Tabela 6 – Matriz de planejamento experimental para os solventes extratores (z) e fases móveis (x) com número de picos observados com detector em 254nm.....	52
Tabela 7 – Modelo saturado e o modelo <i>split-plot</i> com 22 termos para o número de picos observados em 254nm para o chá verde.....	55
Tabela 8 – Resposta prevista para o número de picos para o chá verde a 254nm pelo modelo com 49 termos e pelo modelo reduzido com 22 termos.....	59
Tabela 9 – Matriz de planejamento experimental para os solventes extratores (z) e fases móveis (x) com número de picos observados com detector em 210nm.	64
Tabela 10 – Modelo saturado e o modelo <i>split-plot</i> com 11 termos para o número de picos observados em 210nm.	67
Tabela 11 – Resposta prevista para o número de picos a 210nm pelo modelo saturado e pelo modelo reduzido com 20 termos.....	71

Tabela 12 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 254nm – <i>B.Milneflora</i>.....	78
Tabela 13 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 210nm – <i>B.Milleflora</i>.....	79
Tabela 14 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 254nm – <i>B.Trimera</i>	80
Tabela 15 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 210nm – <i>B.Trimera</i>	81
Tabela 16 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 254nm – <i>C.Sinensis</i>.....	82
Tabela 17 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 210nm – <i>C.Sinensis</i>.....	83

Lista de figuras

- Figura 1 – a) Planejamento envolvendo misturas segundo esquema *split-plot* onde os triângulos representam os *main-plots*, isto é, misturas de extração b) Representação dos *sub-plots*, isto é, as fases móveis investigadas para cada *main-plot*.....10**
- Figura 2 – Gráfico Normal típico para valores seguindo a distribuição normal padrão.16**
- Figura 3 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 254nm, a) gráfico normal para os quocientes entre os coeficientes dos modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de resposta observada (experimental) versus resposta prevista pelo modelo.25**
- Figura 4 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 12 termos.27**
- Figura 5 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 12 termos.28**
- Figura 6 – Número de picos observados com detector em 254nm. O *main-plot* representa as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.....31**
- Figura 7 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 210nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) versus respostas previstas pelo modelo.32**
- Figura 8 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 17 termos.34**

Figura 9 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os <i>sub-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 17 termos.....	35
Figura 10 – Número de picos observados com detector em 210nm onde o <i>main-plot</i> representando as misturas para extração e o <i>sub-plot</i> representando as misturas para as fases móveis.....	38
Figura 11 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 254nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) <i>versus</i> respostas previstas pelo modelo.	40
Figura 12 – Número de picos observados com detecção em 254nm. O <i>main-plot</i> representa as misturas para extração e o <i>sub-plot</i> representando as misturas para as fases móveis.....	39
Figura 13 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os <i>main-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 10 termos.....	42
Figura 14 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os <i>sub-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 10 termos.....	43
Figura 15 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 210nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) <i>versus</i> respostas previstas pelo modelo.	46
Figura 16 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os <i>main-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 11 termos.....	48

Figura 17 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os <i>sub-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 11 termos.....	49
Figura 18 – Número de picos observados com detector em 210nm. O <i>main-plot</i> representa as misturas para extração e o <i>sub-plot</i> representando as misturas para as fases móveis.....	51
Figura 19 – Número de picos observados com detector em 254nm. O <i>main-plot</i> representa as misturas para extração e o <i>sub-plot</i> representando as misturas para as fases móveis.....	53
Figura 20 – Gráficos para os dados obtidos com detector em 254nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) <i>versus</i> respostas previstas pelo modelo.	54
Figura 21 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os <i>main-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.....	57
Figura 22 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os <i>sub-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.....	58
Figura 23 – Número de picos observados com detecção em 210nm. O <i>main-plot</i> representa as misturas para extração e o <i>sub-plot</i> representando as misturas para as fases móveis.....	65
Figura 24 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 210nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) <i>versus</i> respostas previstas pelo modelo.	66
Figura 25 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os <i>main-plots</i> fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.....	69

Figura 26 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.....70

Figura 27 – Cromatogramas do extrato da *B. milleflora* preparado em mistura ternária etanol:diclorometano:hexano (1:1:1), com 7 diferentes fases móveis.77

1 – Introdução

A idéia clássica sobre o químico fazendo experimentos por misturar substâncias em tubos de ensaios é comum entre o público geral, portanto não é surpreendente que planejamento estatístico envolvendo misturas esteja sendo cada vez mais freqüentemente aplicado para resolver uma variedade de problemas de interesse químico. Os planejamentos mais comumente usados tais como: Fatorial, Composto Central, Box-Behnken e vários outros tipos de planejamentos otimizados são executados seguindo as recomendações estatísticas com a exigência de que todos os experimentos sejam executados em ordem aleatória para que uma estimativa do erro experimental possa ser apropriadamente obtida^{1,2}.

Contudo, problemas operacionais ocorrem com freqüência, tornando a realização de certos experimentos em ordem aleatória inviável. Uma solução para esse problema é executar planejamentos *split-plot*³ onde a exigência de aleatoriedade é mais flexível. Subconjuntos de experimentos então são dispostos em blocos de experimentos realizados aleatoriamente. Fatores que são fáceis de serem ajustados são variados dentro de cada bloco de forma completamente aleatória enquanto que fatores de difícil ajuste são mudados apenas de um bloco de experimentos para outro, isto é, perde a característica de ser completamente aleatório.

Embora muitos artigos já tenham sido publicados na área de agricultura e correlatas, apresentando análise de variância para o planejamento *split-plot*, poucos avaliam modelos estatísticos, relacionando as respostas experimentais com os diferentes níveis das variáveis de processo e variáveis de mistura.

Kowalski⁴ divide as variáveis de processo em *main-plot* e *sub-plot* usando a metodologia *split-plot*. O fator temperatura, que é de difícil ajuste, compõe o *main-plot* e é manipulado somente entre um bloco *main-plot* e outro. As variáveis *sub-plot*, percentagem de aditivo, velocidade de agitação e tempo de processamento, são aleatoriamente variadas dentro de todos os blocos.

Cornell⁵ estudou a textura de croquetes de peixes variando três variáveis do bloco *main-plot*: temperatura de cozimento, tempo de cozimento e tempo de fritura, e três variáveis do bloco *sub-plot*: proporções entre as quantidades de três diferentes peixes. Neste caso, vários croquetes de peixes com proporções variadas dos ingredientes da mistura puderam ser tratados simultaneamente com temperatura e tempo sendo fixos. Se as variáveis de processo forem fáceis de serem manipuladas e, se as mudanças das proporções dos ingredientes apresentarem problemas quanto à manipulação do experimento, as variáveis aqui denominadas por *main-plot* e *sub-plot* poderão ter seus papéis trocados.

Embora haja outras aplicações que envolvam experimentos seguindo a estrutura *split-plot*, com somente variáveis de processo ou com variáveis de processo e variáveis de mistura simultaneamente^{6,7,8,9,10,11,12}, não foi encontrado nenhum relato na literatura da aplicação do planejamento *split-plot* e determinação de modelo para o caso em que ambas as variáveis de *main-plot* e *sub-plot* sejam proporções de mistura. Entretanto, química é uma área onde aplicações dessa natureza podem surgir. Mesmo quando considerando o tratamento estatístico convencional, isto é, modelos com somente uma fonte de variância, sistemas envolvendo dois ou mais conjuntos de variáveis de mistura não são tão comuns¹³.

Os trabalhos encontrados na literatura relatando tais sistemas são os dados em seqüência. Lambrakis¹⁴ (1968) apresentou a descrição teórica do

modelo, denominado por ele, de *double-Scheffé*, mas sem mostrar qualquer aplicação a dados reais ou simulados. Cornell e Ramsey^{15,16} (1997, 1998) aplicaram o modelo *double-Scheffé* para descrever um sistema de mistura formado por 4 componentes (X_1 , X_2 , X_3 e X_4), restrições nesse sistema tais como $X_1 + X_2 = c_1$ e $X_3 + X_4 = c_2$ pôde fazer com que o mesmo fosse reformulado para $x_1 + x_2 = 1$ e $x_3 + x_4 = 1$, e desta forma tratado com o modelo descrito por Lambrakis. Dingstad¹⁷ *et al* (2003), estudou diversos componentes bioquímicos na produção de lingüiças considerando 2 conjuntos distintos de variáveis de mistura.

Problemas de separação de compostos químicos podem envolver somente variáveis de mistura e nesse caso é trabalhoso executar experimentos em ordem completamente aleatória. Como exemplo, mencionamos a procura por indicadores cromatográficos usados para classificar e validar espécies botânicas¹⁸ ou para controle de qualidade de ervas medicinais¹⁹. Primeiramente uma solução de extração deve ser otimizada para separar o número máximo de espécies químicas relevantes da planta e então essas espécies são analisadas, freqüentemente por cromatografia líquida, onde a solução da fase móvel deve ser otimizada com o objetivo de aumentar o número de picos para fornecer a máxima quantidade de informação sobre o material extraído.

É importante ressaltar que se o interesse for estudar p extratores com q fases móveis, para que a análise convencional seja rigorosamente válida, é necessário realizar $p \cdot q$ experimentos independentes, isto é, deve-se repetir todo o procedimento $p \cdot q$ vezes. Não é viável executar o experimento completamente aleatório desde que um único extrato obtido com um dado solvente extrator pode ser analisado usando diferentes misturas como fases móveis. Desta forma,

com o emprego do planejamento *split-plot*, trabalho experimental laborioso e resíduos químicos podem ser minimizados.

Neste ponto, vale enfatizar que é necessário o emprego dos modelos mistos (*mixed models*) para o tratamento mais rigoroso dos resultados, uma vez que o esquema experimental adotado para explorar o sistema de misturas seguiu a estrutura *split-plot*, ou seja, estrutura com mais que uma fonte de variação nos dados. Modelos mistos são assim chamados por incorporar efeitos fixos e “efeitos aleatórios” no tratamento estatístico. O que é comum os estatísticos chamarem de efeito aleatório em modelos mistos, é chamado pelos químicos de erro sistemático.

Com ou sem completa aleatoriedade, um grande número de experimentos deve ser realizado para otimizar a composição do solvente extrator e a composição de fase móvel. Dado que replicatas dos experimentos não foram realizadas, gráficos normais foram utilizados como uma ferramenta na escolha dos parâmetros dos modelos para descrever o sistema químico sob estudo.

1.1 – Objetivo

- Descrever estatisticamente sistemas químicos envolvendo mais que um tipo de mistura, visto que tais sistemas ainda são pouco explorados em modelagem de experimentos;
- Tratar o sistema sob a estrutura estatística *split-plot*, que é o modo mais rigoroso de modelagem estatística para o esquema experimental em questão;
- Evitar a realização de replicatas, usando gráficos de probabilidade como uma ferramenta alternativa na determinação de modelos.

2 – Análise e modelagem estatística

2.1 – Formulação do modelo misto (*mixed model*)

Modelos mistos (*Mixed-models*) são utilizados para a análise de dados agrupados (dispostos em blocos)²⁰. O nome “misto” provém do fato de que o modelo estatístico considera efeitos fixos e efeitos aleatórios incorporados nos dados. Vale notar que, neste caso, “efeitos aleatórios” é o nome dado pelo estatístico ao que o químico está acostumado chamar de “erros sistemáticos”. O objetivo é levar em consideração a correlação existente entre os blocos²⁰, ou seja, considerar os erros sistemáticos que possam estar presentes no sistema sob estudo.

Dado um planejamento balanceado com N experimentos ($N=n \cdot m$), seguindo a estrutura split-plot com m unidades main-plots independentes e n unidades sub-plots independentes, este pode ser representado, sob forma matricial, pelo seguinte modelo linear misto com p parâmetros:

$$y = X\beta + Z\gamma + \varepsilon \quad (1)$$

e

$$\text{Var}(y) = ZGZ^t + R \quad (2)$$

onde:

- $y_{(N,1)}$ é o vetor de N observações (respostas);
- $X_{(N,p)}$ é a matriz do modelo;
- $\beta_{(p,1)}$ é o vetor dos p coeficientes dos parâmetros (também chamados efeitos fixos);

- $\mathbf{Z}_{(N,m)}$ é a matriz de incidência dos efeitos aleatórios nos m *main-plots*. Neste caso particular onde o planejamento é balanceado, \mathbf{Z} pode ser convenientemente obtida pelo produto de Kronecker entre a matriz identidade \mathbf{I}_m e a matriz-coluna $\mathbf{1}_{(n,1)}$;
- $\boldsymbol{\gamma}_{(m,1)}$ é o vetor de efeitos aleatórios;
- $\boldsymbol{\varepsilon}_{(N,1)}$ é o vetor de erros aleatórios;
- $\mathbf{G}_{(m,m)}$ é a matriz (diagonal) de covariância dos efeitos aleatórios. \mathbf{G} é produto da matriz identidade \mathbf{I}_m pelo escalar σ_Z^2 ;
- $\mathbf{R}_{(N,N)}$ é a matriz (diagonal) de covariância dos erros aleatórios. \mathbf{R} é produto da matriz identidade \mathbf{I}_N pelo escalar σ_e^2 .

2.2 – Estimativas dos parâmetros do modelo misto por GLS

As estimativas dos efeitos fixos por mínimos quadrados generalizados (*GLS – Generalized Least Squares*)²¹, ignorando-se os efeitos aleatórios é dado por:

$$\boldsymbol{\beta} = (\mathbf{X}^t \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X})^{-} \mathbf{X}^t \mathbf{V}^{-1} \mathbf{y} \quad (3)$$

e

$$\boldsymbol{\gamma} = \mathbf{GZ}^t \mathbf{V}^{-1} (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) \quad (4)$$

$$\text{onde: } \mathbf{V}^{-1} = (\mathbf{ZGZ}^t + \mathbf{R})^{-1}$$

Nota: O sobrescrito (-) na equação (3), indica que a operação a ser efetuada é a inversa generalizada da matriz dada pelo algoritmo de Moore-Penrose²¹.

A modelagem dos experimentos pelo método GLS é recomendado somente quando o planejamento for balanceado, isto é, quando houver o mesmo número de experimentos em cada bloco^{20,21,22}. Também é rigorosamente válido somente quando o modelo final adotado for balanceado, ou seja, quando um parâmetro de determinado grau compuser o modelo, todos os parâmetros desse grau também deverão permanecer no modelo. Exemplo: se houver um parâmetro quadrático significativo, todos os demais também deverão ser incorporados no modelo adotado. Para contornar essas duas restrições que devem ser cumpridas no uso do método GLS, é necessário utilizar um método mais geral, como ML descrito a seguir^{20,21,22}.

2.3 – Estimativas dos parâmetros do modelo misto por ML

As equações de máxima verossimilhança (*ML – Maximum Likelihood*)²⁰ para o modelo misto podem ser derivadas pela maximização da função densidade de probabilidade conjunta de \mathbf{y} e $\boldsymbol{\gamma}$. A função densidade de probabilidade de \mathbf{y} , considerando que a distribuição é normal, é dada por:

$$f(\mathbf{y}, \boldsymbol{\gamma}) = \frac{1}{(2\pi)^{N/2} [\mathbf{ZGZ}^t + \mathbf{R}]} \exp\left(-\frac{1}{2} \left[(\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta})^t (\mathbf{ZGZ}^t + \mathbf{R})^{-1} (\mathbf{y} - \mathbf{X}\boldsymbol{\beta}) \right]\right) \quad (5)$$

A função densidade de probabilidade conjunta de \mathbf{y} e $\boldsymbol{\gamma}$ pode ser reescrita como o produto entre a função densidade condicional de \mathbf{y} dado $\boldsymbol{\gamma}$, e a função densidade de probabilidade de $\boldsymbol{\gamma}$.

$$f(\mathbf{y}, \boldsymbol{\gamma}) = f(\mathbf{y}|\boldsymbol{\gamma}) \cdot f(\boldsymbol{\gamma}) \quad (6)$$

Tomando-se o logaritmo da função $f(y, \gamma)$, derivando-a em relação a β e γ , e tornando-as nulas, chega-se a forma seguinte:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{X}^t \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{X}^t \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} \\ -\mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} + \mathbf{G} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta \\ \gamma \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}^t \mathbf{R}^{-1} y \\ \mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} y \end{bmatrix} \quad (7)$$

Dada a equação anterior, pode se obter as seguintes estimativas:

$$\beta = (\mathbf{X}^t \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^t \mathbf{V}^{-1} y \quad (8)$$

$$\text{onde: } \mathbf{V}^{-1} = \left(\mathbf{R}^{-1} - \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} (\mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1})^{-1} \mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} \right)^{-1}$$

e

$$\gamma = (\mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1})^{-1} \mathbf{Z}^t \mathbf{R}^{-1} (y - \mathbf{X} \beta) \quad (9)$$

2.4 – Coeficientes dos parâmetros do modelo *double-Scheffé*

Modelos matemáticos envolvendo misturas normalmente empregam o modelo polinomial de Scheffé⁹. Para um sistema com q componentes cujas proporções são dadas por z_1, z_2, \dots, z_q , onde $0 \leq z_a \leq 1$ para $a = 1, 2, \dots, q$ e $\sum z_a = 1$ esses modelos podem ter a forma cúbica-especial²³:

$$g(z_1, z_2, \dots, z_q) = \sum_{a=1}^q \beta_a z_a + \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \beta_{ab} z_a z_b + \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{c>b}^q \beta_{abc} z_a z_b z_c \quad (10)$$

Funções lineares e quadráticas podem ser suficientes para descrever os dados e nesses casos, somente o primeiro e segundo termos necessitam ser incluídos no modelo.

As variáveis dos blocos *main-plots* são representadas por z_a e as variáveis dos *sub-plots* são representadas por x_i . Podemos escrever também uma segunda função: $h(x_1, x_2, \dots, x_q)$, análoga à equação 1, para q' componentes de misturas.

Desta forma, uma função $f(z_1, z_2, \dots, z_q, x_1, x_2, \dots, x_{q'})$ geral pode ser obtida pela multiplicação dessas duas funções, e com isso gerando o modelo denominado *double-Scheffé*.

$$f(z_1, z_2, \dots, z_q, x_1, x_2, \dots, x_{q'}) = g(z_1, z_2, \dots, z_q) \cdot h(x_1, x_2, \dots, x_{q'}) \quad (11)$$

$$\begin{aligned} &= \sum_{a=1}^q \sum_{i=1}^{q'} \gamma_i^a z_a x_i + \sum_{a=1}^q \sum_{i=1}^{q'} \sum_{j>i}^{q'} \gamma_{ij}^a z_a x_i x_j + \sum_{a=1}^q \sum_{i=1}^{q'} \sum_{j>i}^{q'} \sum_{k>j}^{q'} \gamma_{ijk}^a z_a x_i x_j x_k + \\ &+ \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{i=1}^{q'} \gamma_i^{ab} z_a z_b x_i + \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{i=1}^{q'} \sum_{j>i}^{q'} \gamma_{ij}^{ab} z_a z_b x_i x_j + \\ &+ \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{i=1}^{q'} \sum_{j>i}^{q'} \sum_{k>j}^{q'} \gamma_{ijk}^{ab} z_a z_b x_i x_j x_k + \\ &+ \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{c>b}^q \sum_{i=1}^{q'} \gamma_i^{abc} z_a z_b z_c x_i + \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{c>b}^q \sum_{i=1}^{q'} \sum_{j>i}^{q'} \gamma_{ij}^{abc} z_a z_b z_c x_i x_j + \\ &+ \sum_{a=1}^q \sum_{b>a}^q \sum_{c>b}^q \sum_{i=1}^{q'} \sum_{j>i}^{q'} \sum_{k>j}^{q'} \gamma_{ijk}^{abc} z_a z_b z_c x_i x_j x_k \end{aligned} \quad (12)$$

Todos os termos envolvem variáveis dos *main-plots* e *sub-plots* e assim sendo, todos os coeficientes do modelo representam efeitos de interação. É natural considerar o solvente extrator representando o *main-plot* e a fase móvel o *sub-plot*. Os termos na equação (12) podem fornecer informação sobre efeitos de interação sinérgicos e antagônicos para os componentes de extração e de separação. Para misturas ternárias para a extração e solução da fase móvel, $q = q' = 3$, a equação (12) terá 49 termos.

A figura 1 mostra as misturas para cada *sub-plot* ($X_{...}$) em termos de um planejamento simplex-centróide e triângulos representando os *main-plots* ($Z_{...}$) são arranjados de acordo com esse planejamento. Se um planejamento simplex-centróide para três componentes for estudado para ambas as misturas, 49 diferentes experimentos devem ser executados.

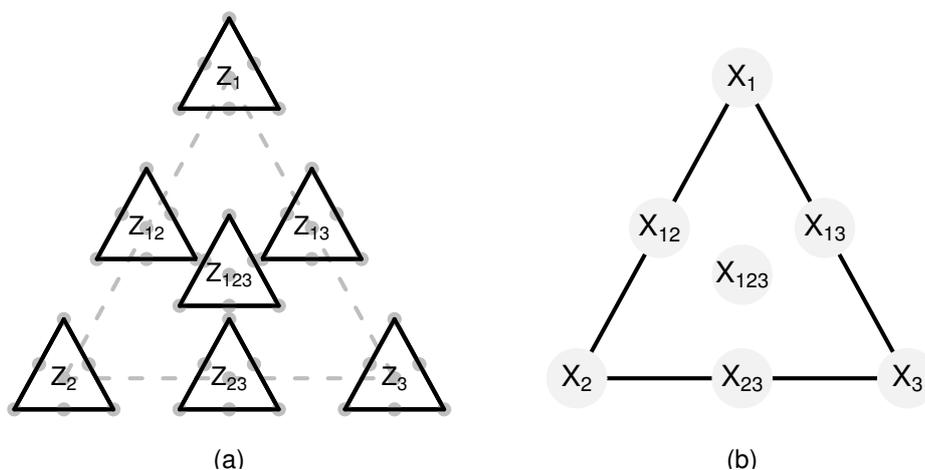


Figura 1 – a) Planejamento envolvendo misturas segundo esquema *split-plot* onde os triângulos representam os *main-plots*, isto é, misturas de extração b) Representação dos *sub-plots*, isto é, as fases móveis investigadas para cada *main-plot*.

Nos planejamentos de misturas convencionais (simplex-centróide, lattice), equações simples relacionam respostas experimentais com os parâmetros do modelo, o mesmo tipo de relação também se aplica aos parâmetros da equação (12) e as misturas representadas pelos pontos da figura 1. Nas equações de 13 a 21, a notação de Scheffé foi aplicada para as componentes da solução de extração mostrada como superíndices e componentes da fase móvel como sendo sub-índices. Os termos são identificados por seu posto hierárquico na ordem *main-plot* – *sub-plot*. O detalhamento de cada termo da equação (12) é dado a seguir.

Interação linear-linear: efeito linear do i -ésimo componente do sub-plot para o a -ésimo componente do *main-plot* ou vice-versa, a -ésimo efeito linear do *main-plot* para o i -ésimo componente *sub-plot*,

$$\gamma_i^a = y_i^a \quad (13)$$

Interação quadrática-linear: a -ésimo e b -ésimo efeito de curvatura do *main-plot* para o i -ésimo componente do *sub-plot*,

$$\gamma_i^{ab} = 4 \cdot y_i^{ab} - 2 \cdot (y_i^a + y_i^b) \quad (14)$$

Interação cúbica especial-linear: efeito cúbico-especial a -ésimo, b -ésimo e c -ésimo do *main-plot* para o i -ésimo componente *sub-plot*,

$$\gamma_i^{abc} = 27 \cdot y_i^{abc} - 12 \cdot (y_i^{ab} + y_i^{ac} + y_i^{bc}) + 3 \cdot (y_i^a + y_i^b + y_i^c) \quad (15)$$

Interação linear-quadrática: i -ésimo e j -ésimo efeito de curvatura do *sub-plot* para o a -ésimo componente do *main-plot* ou vice-versa,

$$\gamma_{ij}^a = 4 \cdot y_{ij}^a - 2 \cdot (y_i^a + y_j^a) \quad (16)$$

Interação quadrática-quadrática: a -ésimo e b -ésimo efeito de curvatura no *main-plot* para o i -ésimo e j -ésimo efeito de curvatura do *sub-plot*,

$$\begin{aligned} \gamma_{ij}^{ab} = & 4 \cdot \left[4 \cdot y_{ij}^{ab} - 2 \cdot (y_i^{ab} + y_j^{ab}) \right] - \\ & - 2 \cdot \left\{ \left[4 \cdot y_{ij}^a - 2 \cdot (y_i^a + y_j^a) \right] + \left[4 \cdot y_{ij}^b - 2 \cdot (y_i^b + y_j^b) \right] \right\} \end{aligned} \quad (17)$$

Interação cúbica especial-quadrática: a -ésimo, b -ésimo e c -ésimo efeito cúbico especial do *main-plot* para a i -ésima e j -ésima curvatura do *sub-plot* ou vice-versa,

$$\begin{aligned} \gamma_{ij}^{abc} = & 27 \cdot \left[4 \cdot y_{ij}^{abc} - 2 \cdot (y_i^{abc} + y_j^{abc}) \right] - \\ & -12 \cdot \left\{ \left[4y_{ij}^{ab} - 2 \cdot (y_i^{ab} + y_j^{ab}) \right] + \left[4y_{ij}^{ac} - 2 \cdot (y_i^{ac} + y_j^{ac}) \right] + \left[4y_{ij}^{bc} - 2 \cdot (y_i^{bc} + y_j^{bc}) \right] \right\} + \quad (18) \\ & +3 \cdot \left\{ \left[4 \cdot y_{ij}^a - 2 \cdot (y_i^a + y_j^a) \right] + \left[4 \cdot y_{ij}^b - 2 \cdot (y_i^b + y_j^b) \right] + \left[4 \cdot y_{ij}^c - 2 \cdot (y_i^c + y_j^c) \right] \right\} \end{aligned}$$

Interação linear-cúbica especial: i -ésimo, j -ésimo e k -ésimo efeito cúbico especial dos componentes *sub-plot* para o a -ésimo componente *main-plot*,

$$\gamma_{ijk}^a = 27 \cdot y_{ijk}^a - 12 \cdot (y_{ij}^a + y_{ik}^a + y_{jk}^a) + 3 \cdot (y_i^a + y_j^a + y_k^a) \quad (19)$$

Interação quadrática-cúbica especial: i -ésimo, j -ésimo e k -ésimo efeito cúbico especial do componente *sub-plot* com a curvatura do a -ésimo e b -ésimo componentes do *main-plot*,

$$\begin{aligned} \gamma_{ijk}^{ab} = & 27 \cdot \left[4 \cdot y_{ijk}^{ab} - 2 \cdot (y_{ijk}^a + y_{ijk}^b) \right] - \\ & -12 \cdot \left\{ \left[4 \cdot y_{ij}^{ab} - 2 \cdot (y_{ij}^a + y_{ij}^b) \right] + \left[4 \cdot y_{ik}^{ab} - 2 \cdot (y_{ik}^a + y_{ik}^b) \right] + \left[4 \cdot y_{jk}^{ab} - 2 \cdot (y_{jk}^a + y_{jk}^b) \right] \right\} + \quad (20) \\ & +3 \cdot \left\{ \left[4 \cdot y_i^{ab} - 2 \cdot (y_i^a + y_i^b) \right] + \left[4 \cdot y_j^{ab} - 2 \cdot (y_j^a + y_j^b) \right] + \left[4 \cdot y_k^{ab} - 2 \cdot (y_k^a + y_k^b) \right] \right\} \end{aligned}$$

Interação cúbica especial-cúbica especial: a -ésimo, b -ésimo e c -ésimo efeito cúbico especial do *main-plot* para o i -ésimo, j -ésimo e k -ésimo efeito cúbico especial do *sub-plot*,

$$\begin{aligned}
 \gamma_{ijk}^{abc} = & 27 \cdot \left[27 \cdot y_{ijk}^{abc} - 12 \cdot (y_{ij}^{abc} + y_{ik}^{abc} + y_{jk}^{abc}) + 3 \cdot (y_i^{abc} + y_j^{abc} + y_k^{abc}) \right] + \\
 & -12 \cdot \left\{ \begin{aligned} & \left[27 \cdot y_{ijk}^{ab} - 12 \cdot (y_{ij}^{ab} + y_{ik}^{ab} + y_{jk}^{ab}) + 3 \cdot (y_i^{ab} + y_j^{ab} + y_k^{ab}) \right] + \\ & + \left[27 \cdot y_{ijk}^{ac} - 12 \cdot (y_{ij}^{ac} + y_{ik}^{ac} + y_{jk}^{ac}) + 3 \cdot (y_i^{ac} + y_j^{ac} + y_k^{ac}) \right] + \\ & + \left[27 \cdot y_{ijk}^{bc} - 12 \cdot (y_{ij}^{bc} + y_{ik}^{bc} + y_{jk}^{bc}) + 3 \cdot (y_i^{bc} + y_j^{bc} + y_k^{bc}) \right] \end{aligned} \right\} + \\
 & +3 \cdot \left\{ \begin{aligned} & \left[27 \cdot y_{ijk}^a - 12 \cdot (y_{ij}^a + y_{ik}^a + y_{jk}^a) + 3 \cdot (y_i^a + y_j^a + y_k^a) \right] + \\ & + \left[27 \cdot y_{ijk}^b - 12 \cdot (y_{ij}^b + y_{ik}^b + y_{jk}^b) + 3 \cdot (y_i^b + y_j^b + y_k^b) \right] + \\ & + \left[27 \cdot y_{ijk}^c - 12 \cdot (y_{ij}^c + y_{ik}^c + y_{jk}^c) + 3 \cdot (y_i^c + y_j^c + y_k^c) \right] \end{aligned} \right\} \quad (21)
 \end{aligned}$$

2.5 – Variâncias dos parâmetros do modelo *double-Scheffé*

Equações são apresentadas para a variância de cada parâmetro, onde σ_z^2 e σ_e^2 são as variâncias dos erros *main-plot* e *sub-plot* respectivamente. Para os casos onde houver r replicações, também como blocos, aparecerá o termo σ_R^2 referente à variância do erro do mesmo.

As variâncias para cada um dos parâmetros do modelo *double-Scheffé* foram obtidas a partir da equação (2) e são:

$$Var(\gamma_i^a) = k_i^a \cdot (\sigma_R^2 + \sigma_Z^2 + \sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_i^a = 1 \quad (22)$$

$$Var(\gamma_i^{ab}) = k_i^{ab} \cdot (\sigma_Z^2 + \sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_i^{ab} = 24 \quad (23)$$

$$Var(\gamma_i^{abc}) = k_i^{abc} \cdot (\sigma_Z^2 + \sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_i^{abc} = 1.188 \quad (24)$$

$$Var(\gamma_{ij}^a) = k_{ij}^a \cdot (\sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_{ij}^a = 24 \quad (25)$$

$$Var(\gamma_{ij}^{ab}) = k_{ij}^{ab} \cdot (\sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_{ij}^{ab} = 576 \quad (26)$$

$$Var(\gamma_{ij}^{abc}) = k_{ij}^{abc} \cdot (\sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_{ij}^{abc} = 28.512 \quad (27)$$

$$Var(\gamma_{ijk}^a) = k_{ijk}^a \cdot (\sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_{ijk}^a = 1.188 \quad (28)$$

$$Var(\gamma_{ijk}^{ab}) = k_{ijk}^{ab} \cdot (\sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_{ijk}^{ab} = 28.512 \quad (29)$$

$$Var(\gamma_{ijk}^{abc}) = k_{ijk}^{abc} \cdot (\sigma_e^2) / r \quad \text{onde } k_{ijk}^{abc} = 1.411.344 \quad (30)$$

Os erros padrões dos coeficientes γ_i^a , γ_i^{ab} e γ_i^{abc} dependem não somente da variância do erro *sub-plot* mas também da variância do erro *main-plot*.

Como nenhuma replicata do experimento foi realizada nas aplicações usadas neste trabalho, gráficos normais foram empregados para identificar os coeficientes mais significativos do modelo.

As constantes k_{\dots} , apresentadas nas equações de (22) até (30), foram utilizadas da seguinte maneira:

- as razões, $(\gamma_{\dots} / \sqrt{k_{\dots}})$, entre os coeficientes do modelo (dados pelas equações de (13) até (21)) e as raízes quadradas das respectivas constantes k_{\dots} foram calculadas;
- Os valores (das razões) foram usados nos gráficos normais para escolha de parâmetros considerados significativos.

As razões entre coeficientes e erros padrões, usados para obter os valores da abscissa, seriam diferentes se os experimentos fossem realizados em ordem aleatória ou seguindo um procedimento *split-plot*, como pode ser observado pelas equações de (22) até (30). Se todos os experimentos tivessem sido realizados em ordem aleatória apenas uma fonte de erro estaria presente e a interpretação desses gráficos não deveria apresentar dificuldades.

Se a variância do *main-plot*, σ_z^2 , for muito maior que a variância do *sub-plot*, σ_e^2 , essa diferença deverá ser evidenciada por intervalos de confiança maiores para os coeficientes γ_i^a , γ_i^{ab} e γ_i^{abc} e menores para os demais.

2.6 – Uso de gráfico normal na escolha de parâmetros de um modelo.

Uma maneira para comparar a distribuição de uma amostragem com uma distribuição específica, de forma simples e de fácil visualização, é utilizando gráficos de quartis *versus* quartis (*Q-Q plot*). O exemplo mais conhecido é o gráfico normal²¹. Os valores dos dados amostrais são dispostos no eixo das abscissas e os quartis da distribuição normal padrão (*z-scores*) são dispostos no eixo das ordenadas.

A figura 2 mostra um gráfico normal típico para valores simulados (valores aleatórios com distribuição normal padrão). Quando houver desvios da distribuição normal, os mesmos poderão ser observados da seguinte maneira: se a distribuição for mais concentrada na esquerda que a distribuição normal, os pontos na parte esquerda do gráfico estarão acima da linha e os pontos da parte direita estarão abaixo da linha, caso a distribuição for mais concentrada na direita, verifica-se o oposto.

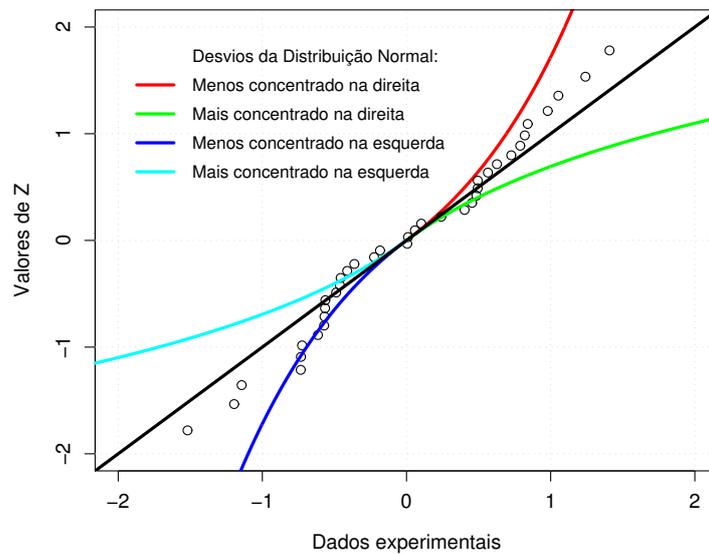


Figura 2 – Gráfico Normal típico para valores seguindo a distribuição normal padrão.

Gráficos normais também são utilizados para distinguir efeitos significativos que não pertencem à distribuição normal padrão². Quando houver a presença de efeitos significativos (e por conseqüência que não seguem a distribuição normal padrão), espera-se que os mesmos se distanciem do valor zero do eixo das abscissas.

A distinção entre efeito e ruído é feita traçando uma reta aos pontos que mais se aproximam do ponto zero do eixo das abscissas, deste modo, os pontos próximos mais concordantes com esta reta são considerados normais (ruídos) enquanto que os pontos mais discrepantes são considerados efeitos². Desta maneira podemos considerar que os gráficos normais podem servir como uma ferramenta muito útil na escolha de parâmetros significativos e que irão compor um determinado modelo que explique esses dados.

Recentemente nosso grupo mostrou que gráficos normais podem ser utilizados para a obtenção de modelos aproximados para planejamento *split-plot* não replicado²⁴. Os modelos aproximados são somente aceitos se os gráficos de resíduos não apresentarem comportamento sistemático e se os

parâmetros mais importantes do modelo puderem fornecer interpretação química. Esses modelos podem ser úteis em fornecer uma visão geral sobre sistemas químicos complexos e deste modo, facilitando o seu entendimento.

3 – Procedimento para a modelagem dos dados

O procedimento adotado para a análise e escolha de modelos mais adequados para descrever os dados é descrito abaixo.

Os cálculos iniciais foram realizados como se os experimentos tivessem sido realizados em ordem aleatória. Desta forma, um modelo estatístico com uma única fonte de erro pôde ser aplicado.

$$y_{ij} = f(z_1, z_2, \dots, z_q, x_1, x_2, \dots, x_q) + e_{ij} \quad (31)$$

Aqui j e i representam os níveis das variáveis z_q e variáveis x_q (blocos Z e X , ou ainda, blocos *main-plot* e blocos *sub-plots* como na nomenclatura *split-plot*).

Para a determinação do modelo saturado, no qual há uma correspondência um-a-um entre os pontos do planejamento e os coeficientes do modelo, ou ainda, para modelos balanceados, as equações de (13) até (21) podem ser usadas para determinar os coeficientes do modelo. Assumindo uma única fonte de erro que é representada por σ_e^2 , os valores da abscissa podem ser aproximados pelos coeficientes do modelo divididos pela raiz quadrada das constantes k_{\dots} , dadas pelas equações de (22) até (30). Não é necessário avaliar σ_e^2 , desde que este parâmetro é um fator comum em todas as equações. Os gráficos de probabilidade obtidos são analisados para verificar a presença de possíveis coeficientes significativos tanto quanto para aqueles que apresentam

valores próximos a zero na abscissa. Esses termos considerados não significativos podem ser seguramente eliminados do modelo permitindo calcular um segundo modelo com falta de ajuste (“*lack of fit*”) e desse modo, estes termos poderão ser usados para estimar as variâncias dos erros *main-plot* e *sub-plot*.

Se os experimentos são feitos segundo o esquema *split-plot*, há duas fontes de erros, o erro *main-plot* Z_j , e erro *sub-plot*, e_{ij} .

$$y_{ij} = f(z_1, z_2, \dots, z_q, x_1, x_2, \dots, x_q) + Z_j + e_{ij} \quad (32)$$

Como os experimentos não foram realizados em ordem completamente aleatória, a estrutura do erro da equação (32) é diferente daquela da equação (31). O erro *main-plot* (no procedimento *split-plot*) é negligenciado pela equação (31). Dado que replicatas do experimento não foram realizadas, os erros *main-plot* e *sub-plot* são estimados dos resíduos obtidos assumindo que somente os termos significativos do primeiro modelo determinado (como se os experimentos fossem aleatórios) e que também são significantes para o procedimento *split-plot* (segundo modelo). Os coeficientes que não apresentam significância com o procedimento *split-plot* podem ser eliminados desse modelo evitando superajuste.

A qualidade do modelo pode ser verificada por exame do gráfico de resíduos. A utilidade do modelo é avaliada pelo entendimento que ele fornece sobre o sistema em investigação, muito embora replicatas devam ser sempre feitas para aplicações rigorosas, isto raramente é praticável com grande número de variáveis.

Os cálculos para a obtenção dos modelos foram feitos usando o programa computacional R²⁵ e com o módulo (*library*) NLME²⁶.

4 – Parte Experimental

As seguintes convenções, apresentadas abaixo, serão consideradas quando conveniente com o objetivo de facilitar a análise dos dados:

- Solventes que foram usados como componentes dos extratores (*Main-plot*):

$$\begin{aligned}z_1 &= z_{(\text{Et})} = \text{Etanol}; \\z_2 &= z_{(\text{Ac})} = \text{Acetato de etila}; \\z_3 &= z_{(\text{Dc})} = \text{Diclorometano}.\end{aligned}$$

- Solventes que foram usados como componentes da fase móvel (*Sub-plot*):

$$\begin{aligned}x_1 &= x_{(\text{Met})} = \text{Metanol}; \\x_2 &= x_{(\text{ACN})} = \text{Acetonitrila}; \\x_3 &= x_{(\text{MAW})} = \text{Metanol, Acetonitrila e Água (15:15:70\%v/v)}.\end{aligned}$$

4.1 – Procedimento experimental para obtenção dos dados

O procedimento adotado na obtenção das respostas experimentais foi o seguinte:

- a) Para *B. Milleflora* e *B. Trimeria*

O trabalho experimental foi executado na Universidade Estadual de Londrina como parte do trabalho da dissertação de mestrado de Lucas Silva²⁷. A descrição do procedimento experimental realizado para a obtenção desses resultados é dada abaixo e mais detalhes são dados na referência 27.

Plantas do gênero *Baccharis Milleflora* (Less.) DC e *Baccharis Trimeria* (Less.) DC, comumente chamada de “Carqueja” e usada como chá medicinal, foram sujeitas à extração usando várias misturas de etanol (z_1), acetato de etila (z_2) e diclorometano (z_3) seguindo um planejamento simplex-centróide. Cada extrato obtido foi então submetido à análise cromatográfica usando sete diferentes fases móveis obtidas pela mistura de metanol (x_1), acetonitrila (x_2) e uma mistura de 15% de metanol, 15% acetonitrila e 70% água (MAW), 15:15:70 %v/v (x_3). Todas as fases móveis também seguem um planejamento simplex-centróide.

Cada extrato foi preparado usando 15,00g da parte área da planta. Esse material foi triturado por cinco minutos em um liquidificador. Esse material foi transferido para um recipiente onde 180mL do solvente extrator foi adicionado com finalidade de executar a extração de acordo com o planejamento. Após um repouso de 24 horas, o extrato foi filtrado e concentrado em um evaporador rotativo numa temperatura de aproximadamente $65^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Esse procedimento foi realizado três vezes. Trinta miligramas do extrato concentrado foi re-dissolvido em três mL de solvente de extração. Essa mistura permaneceu em repouso por uma hora e então foi filtrado em papel comum. Para a análise RP-HPLC, 50 μL dessa solução foi diluída em 950 μL da fase móvel tendo a devida composição correspondente ao planejamento.

Os cromatogramas foram obtidos com uso de um cromatógrafo Shimadzu. As condições de trabalho foram: coluna Metasil C18 com dimensões de 250mm x 4,6mm tamanho de partícula: 5 μm , 50 $^{\circ}\text{C}$, 20 μL de volume de injeção, vazão de 1mL por minuto e monitoramento em 210 e 254nm.

b) Para *Camellia Sinensis*

O trabalho experimental foi realizado na Universidade Estadual de Londrina como parte do trabalho da dissertação de mestrado de Aline Almeida²⁸, e detalhes adicionais pode ser consultado nesta mesma referência (ref. 28). Uma descrição concisa do procedimento adotado para a obtenção dos cromatogramas é dada a seguir.

Amostras de chá verde, marca comercial “Sencha” (*Camellia Sinensis*) e de origem chinesa, foram adquiridas em comércio local. Amostras de 5,00g foram submetidas à extração com 60,00mL de diferentes solvente. Os componentes do sistema extrator são os mesmos utilizados no item A. Após 24h de repouso, os extratos produzidos foram filtrados e concentrados em um evaporador rotativo à temperatura de aproximadamente 80°C.

Para a separação, 30,0mg do extrato concentrado foi redissolvido em 3,00mL do solvente usado na extração. Após 1h em repouso, o extrato foi filtrado em papel de filtro comum. Uma alíquota de 50µL deste extrato foi diluída em 1,00ml do solvente extrator para que 20µL desta nova solução diluída fosse injetada no cromatógrafo.

Os cromatogramas foram produzidos com um cromatógrafo Shimadzu. As condições de trabalho foram: coluna Metachem C18 com dimensões de 250mm x 4,6mm tamanho de partícula: 5 µm, 20µL de volume de injeção, vazão de 1mL·min⁻¹ e monitoramento em 210, 220, 230, 254 e 280nm. A temperatura permaneceu fixa em 35°C.

4.2 – Dados Experimentais

Um conjunto de cromatogramas pode ser visto no Apêndice A e tem o objetivo de ilustrar este procedimento experimental.

A tabela 1 mostra todos os dados experimentais (número de picos) que foram utilizados para a construção dos modelos e que serão apresentados adiante. A primeira coluna simplesmente numera as linhas. As colunas 2, 3 e 4 indicam as proporções dos componentes do sistema extrator: $z_{(Et)}$, $z_{(Ac)}$, $z_{(Dc)}$. Nas colunas 5, 6 e 7 vê-se as proporções dos componentes da fase móvel $x_{(Met)}$, $x_{(ACN)}$, $x_{(MAW)}$. A próxima coluna, com título **MP**, indica o agrupamento (bloco) aos quais pertencem os experimentos. As respostas experimentais são das três diferentes plantas: *Baccharis Milleflora*, *Baccharis Trimeria* e *Camellia Sinensis*, e nos nomes das colunas de 9 a 13, as letras **M**, **T** e **C** indicam as essas plantas utilizadas. Os números, 210 e 254, indicam os dois comprimentos de ondas utilizados no detector do cromatógrafo.

Tabela 1 – Matriz de planejamento experimental para os solventes extratores (z) e fases móveis (x) com número de picos observados com detector em 210 e 254nm.

	Z(Et)	Z(Ac)	Z(Dc)	X(Met)	X(ACN)	X(MAW)	MP	M210	M254	T210	T254	C210	C254
1	1	0	0	1	0	0	1	12	6	12	4	9	2
2	1	0	0	0	1	0	1	7	3	4	2	7	2
3	1	0	0	0	0	1	1	11	12	11	7	20	16
4	1	0	0	1/2	1/2	0	1	11	5	7	4	9	3
5	1	0	0	1/2	0	1/2	1	8	5	6	6	13	8
6	1	0	0	0	1/2	1/2	1	8	7	7	6	13	14
7	1	0	0	1/3	1/3	1/3	1	12	8	3	2	13	14
8	0	1	0	1	0	0	2	7	2	7	2	6	1
9	0	1	0	0	1	0	2	8	2	6	2	5	3
10	0	1	0	0	0	1	2	14	17	13	14	12	9
11	0	1	0	1/2	1/2	0	2	16	17	8	3	4	3
12	0	1	0	1/2	0	1/2	2	10	3	14	9	15	6
13	0	1	0	0	1/2	1/2	2	15	16	15	16	10	5
14	0	1	0	1/3	1/3	1/3	2	15	11	15	14	9	8
15	0	0	1	1	0	0	3	10	4	11	4	6	3
16	0	0	1	0	1	0	3	3	3	12	2	4	1
17	0	0	1	0	0	1	3	5	2	5	1	4	1
18	0	0	1	1/2	1/2	0	3	14	3	12	4	6	3
19	0	0	1	1/2	0	1/2	3	7	2	9	5	6	2
20	0	0	1	0	1/2	1/2	3	18	10	13	8	12	3
21	0	0	1	1/3	1/3	1/3	3	16	9	10	8	9	4
22	1/2	1/2	0	1	0	0	4	16	5	6	4	9	2
23	1/2	1/2	0	0	1	0	4	9	3	7	4	9	4
24	1/2	1/2	0	0	0	1	4	17	19	16	16	16	16
25	1/2	1/2	0	1/2	1/2	0	4	17	11	8	4	8	3
26	1/2	1/2	0	1/2	0	1/2	4	10	4	19	17	17	10
27	1/2	1/2	0	0	1/2	1/2	4	13	15	14	12	13	14
28	1/2	1/2	0	1/3	1/3	1/3	4	13	11	9	8	8	7
29	1/2	0	1/2	1	0	0	5	16	5	5	3	6	2
30	1/2	0	1/2	0	1	0	5	10	4	10	5	8	3
31	1/2	0	1/2	0	0	1	5	8	8	8	6	16	10
32	1/2	0	1/2	1/2	1/2	0	5	13	9	12	5	11	3
33	1/2	0	1/2	1/2	0	1/2	5	10	4	18	9	17	9
34	1/2	0	1/2	0	1/2	1/2	5	13	6	24	15	21	17
35	1/2	0	1/2	1/3	1/3	1/3	5	17	18	13	15	18	15
36	0	1/2	1/2	1	0	0	6	4	2	7	3	8	3
37	0	1/2	1/2	0	1	0	6	10	3	11	3	17	5
38	0	1/2	1/2	0	0	1	6	11	9	16	10	8	7
39	0	1/2	1/2	1/2	1/2	0	6	19	10	9	3	13	4
40	0	1/2	1/2	1/2	0	1/2	6	11	4	17	9	18	10
41	0	1/2	1/2	0	1/2	1/2	6	17	17	18	18	16	11
42	0	1/2	1/2	1/3	1/3	1/3	6	10	10	12	14	10	5
43	1/3	1/3	1/3	1	0	0	7	11	5	9	4	7	2
44	1/3	1/3	1/3	0	1	0	7	9	2	10	4	11	3
45	1/3	1/3	1/3	0	0	1	7	20	18	18	20	25	15
46	1/3	1/3	1/3	1/2	1/2	0	7	19	13	9	4	7	3
47	1/3	1/3	1/3	1/2	0	1/2	7	9	5	17	13	19	17
48	1/3	1/3	1/3	0	1/2	1/2	7	14	16	15	17	15	13
49	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	7	16	13	9	11	18	16

5 – Resultados e discussão

5.1 – Análise dos dados da *B. Milleflora* com detector em 254nm

O número de picos encontrados nos cromatogramas monitorados à 254nm varia entre 2 e 19 como visto na tabela 1. Dadas essas respostas, e usando o procedimento apresentado no item 3, um modelo contendo 49 termos pôde ser ajustado e o mesmo pode ser consultado no Apêndice B.

Tomando este modelo saturado como ponto de partida, fizemos uso de gráficos normais para a obtenção de um novo modelo com menor número de parâmetros, mas ainda suficiente para descrever as respostas experimentais. Os valores dos coeficientes populacionais γ são estimados pelos valores amostrais calculados e representados por g .

A figura 3a mostra o gráfico normal dos quocientes: $(g_{i...} / \sqrt{k_{i...}})$. Os coeficientes $(g_{i...})$ do modelo balanceado com 49 termos são calculados usando as equações numeradas de (13) até (21). As constantes numéricas correspondentes $(k_{i...})$ são dadas pelas equações de (22) até (30).

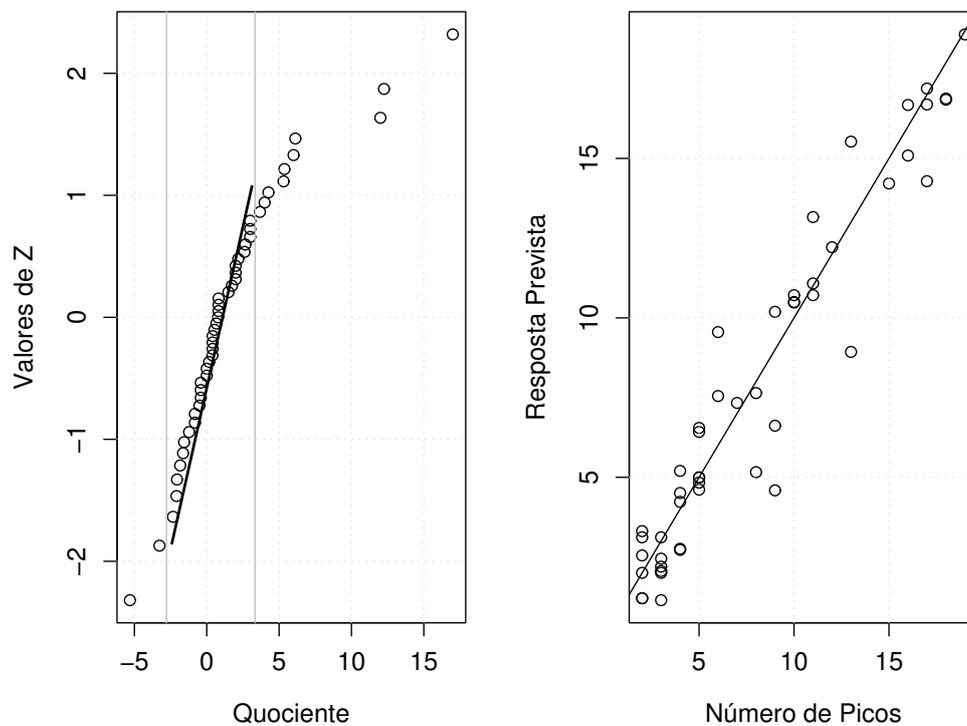


Figura 3 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 254nm, a) gráfico normal para os quocientes entre os coeficientes dos modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de resposta observada (experimental) versus resposta prevista pelo modelo.

Pela figura 3a observa-se que, os coeficientes do modelo correspondentes aos valores dos quocientes que parecem cair fora da reta centrada em zero, foram tomados como significativos. Esses coeficientes do modelo foram então reajustados somente com esses parâmetros resultando num novo modelo. O modelo reduzido (12 termos) assim obtido, está mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Modelo saturado e o modelo *split-plot* com 12 termos para número de picos observados em 254nm.

Parâmetros	Coeficientes (modelo com 49 termos)	Quocientes $(g_{...}/\sqrt{k_{...}})$	Coeficientes (modelo com 12 termos)	t calculado $(g/\sqrt{e.p.})$
x_1z_1	6,0	6,0	5,1	2,7
x_1z_3	4,0	4,0	2,2	1,3
x_3z_1	12,0	12,0	9,8	4,8
x_3z_2	17,0	17,0	16,0	8,2
$x_1x_2z_2$	60,0	12,3	61,9	9,4
$x_1x_3z_1$	-16,0	-3,3	-20,2	-2,9
$x_1x_3z_2$	-26,0	-5,3	-32,1	-4,9
$x_2x_3z_2$	26,0	5,3	29,9	4,5
$x_2x_3z_3$	30,0	6,1	34,8	5,1
$x_3z_1z_2$	18,0	3,7	15,8	1,7
$x_3z_1z_2z_3$	147,0	4,3	106,7	1,8
$x_1x_2x_3z_1z_3$	906,0	5,4	1129,4	5,5

As representações gráficas do modelo saturado e do modelo reduzido são mostradas nas figuras 4 e 5, e são úteis para inspeção e comparação visual dos modelos.

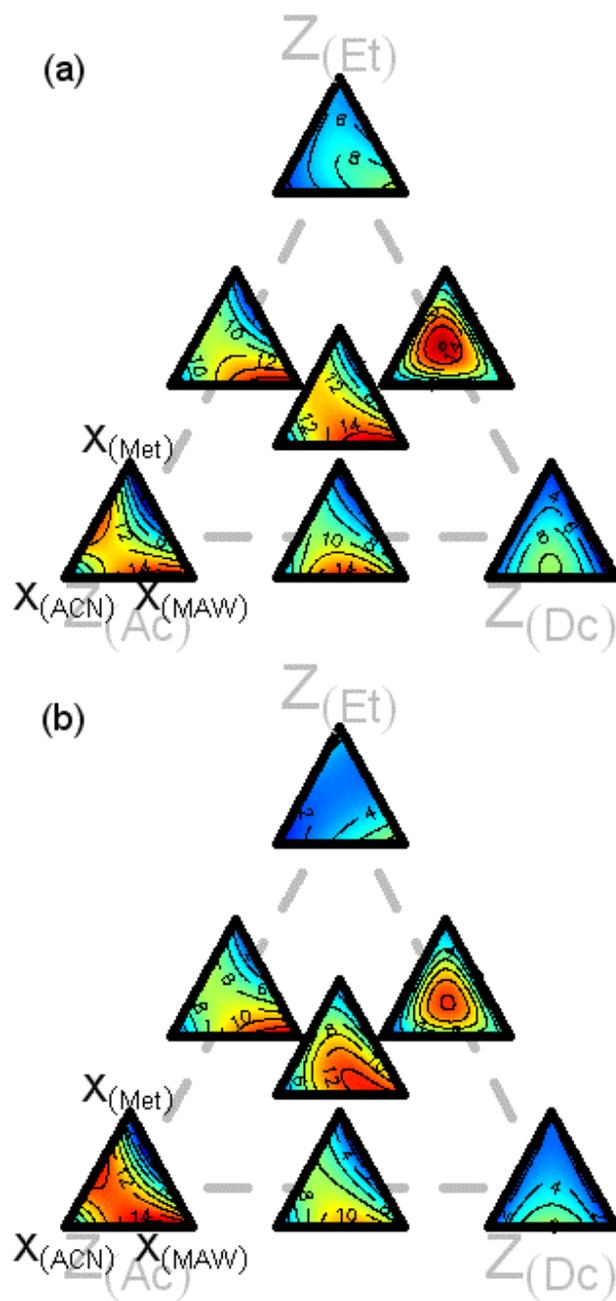


Figura 4 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 12 termos.

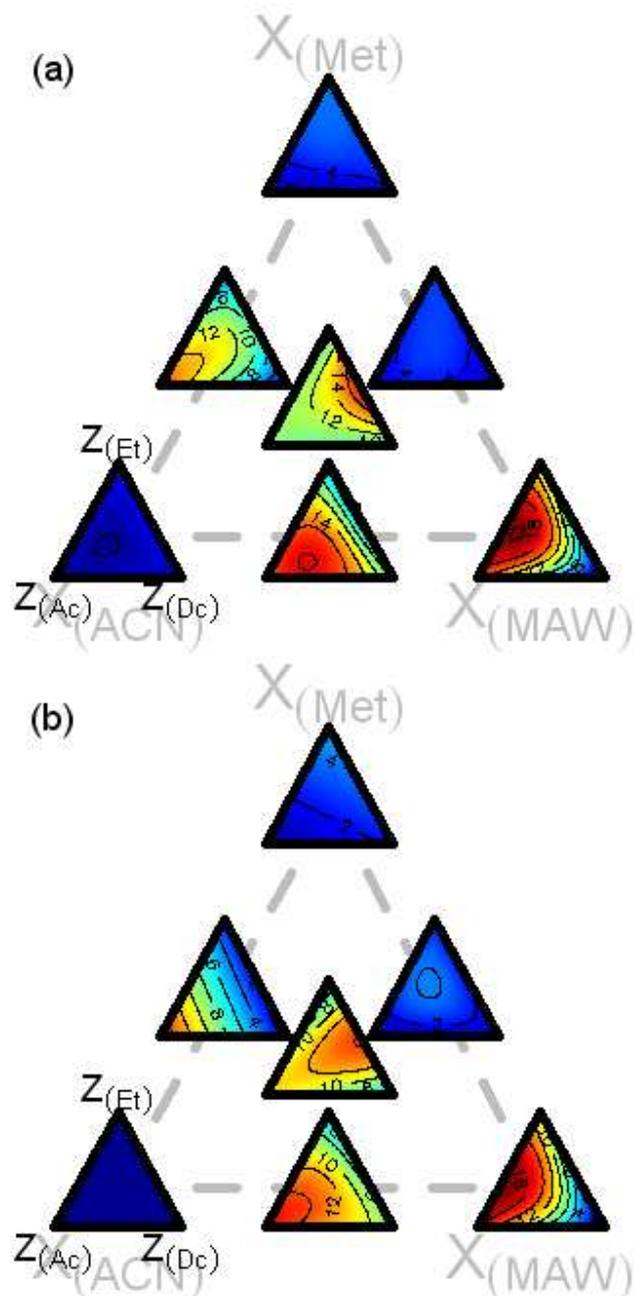


Figura 5 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 12 termos.

O modelo contendo doze termos foi reajustado aos dados usando o procedimento *split-plot*. Os coeficientes e seus valores de t calculados (valores dos coeficientes divididos pelos respectivos erros) foram mostrados na tabela 2.

Os coeficientes são pouco diferentes daqueles calculados com as equações numeradas de (13) até (21), mas há uma clara correspondência entre eles indicando que podem ser interpretados da mesma maneira. Isso é importante uma vez que os coeficientes das equações (13) até (21) têm significado físico claro.

Somente o coeficiente x_1z_3 apresentou um valor absoluto de t , muito baixo e por essa razão ele foi excluído do modelo. Um modelo final com 11 termos foi então ajustado para os dados. Esse modelo é dado por:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & +5,1 \cdot x_1z_1 + 9,8 \cdot x_3z_1 + 16,0 \cdot x_3z_2 + 61,9 \cdot x_1x_2z_2 \\ & - 20,2 \cdot x_1x_3z_1 - 32,1 \cdot x_1x_3z_2 + 29,9 \cdot x_2x_3z_2 + 34,8 \cdot x_2x_3z_3 \\ & + 15,8 \cdot x_3z_1z_2 + 106,7 \cdot x_3z_1z_2z_3 + 1129,4 \cdot x_1x_2x_3z_1z_3 \end{aligned} \quad (33)$$

A figura 3b mostra o gráfico das respostas experimentais versus respostas previstas para o número de picos pelo modelo acima. Vale notar que os pontos são aleatoriamente distribuídos sobre a linha da previsão exata. O gráfico de resíduos, não mostrado aqui, possui comportamento aleatório evidenciando que o modelo não possui falta de ajuste.

O modelo dado pela equação (33) é de fácil interpretação devido às restrições das variáveis de misturas do *main-plot* e *sub-plot*. Por exemplo, o uso da mistura MAW, (15:15:70% v/v - metanol, acetona e água) isto é, $x_3 = 1$ e $x_2 = x_1 = 0$ resulta na equação:

$$\hat{y} = +9,8 \cdot z_1 + 16,0 \cdot z_2 + 15,8 \cdot z_1z_2 + 106,7 \cdot z_1z_2z_3 \quad (34)$$

Essa equação mostra que a fase móvel MAW, $x_3 = 1$, descreve a separação de 16 picos pela extração com acetato, $z_2 = 1$, e somente 10 da extração com etanol, $z_1 = 1$. Verifica-se que, experimentalmente, a fase móvel MAW com a extração com etanol resulta em 12 picos enquanto que esta mesma

fase móvel separa 17 picos com a extração feita com acetato de etila. Isto pode ser confirmado pela tabela 1 e pela figura 6.

Os termos mais importantes da equação 33 são os binários $9,8 \cdot x_3 z_1$ e $16,0 \cdot x_3 z_2$. O termo $61,9 \cdot x_1 x_2 z_2$, de terceira ordem, indica uma forte sinergia entre metanol (x_1) e acetonitrila (x_2) para as extrações com grande proporção de acetato de etila (z_2). Isto pode ser visto claramente nos triângulos da parte esquerda da figura 6. Nesses triângulos, pode ser visto que os pontos médios das arestas esquerdas correspondem a quantidades maiores de picos que os vértices.

Os termos $29,9 \cdot x_2 x_3 z_2$ e $34,8 \cdot x_2 x_3 z_3$ indicam forte sinergia entre as componentes da fase móvel, acetonitrila e MAW com as misturas de extração com grandes proporções de acetato de etila e diclorometano. Todos os três triângulos, na parte inferior, têm maior número de picos para os pontos médios que os seus vértices correspondentes. O termo $15,8 \cdot x_3 z_1 z_2$ representa o efeito quadrático na resposta, devido à extração com a mistura de etanol e acetato de etila quando utilizada a fase móvel MAW.

Os termos $-20,2 \cdot x_1 x_3 z_1$ e $-32,2 \cdot x_1 x_3 z_2$ representam um forte efeito de antagonismo entre as componentes da fase móvel: metanol e MAW, com os solventes extratores etanol e acetato de etila. Aumentando o conteúdo de metanol da mistura MAW de 15% para cerca de 50% resulta numa queda aguda no número de picos em relação aos observados nos cromatogramas obtidos com fase móvel de puro metanol, tendo aproximadamente a mesma quantidade de picos como uma mistura 50:50 de metanol e MAW. O termo $106,7 \cdot x_3 z_1 z_2 z_3$ mostra um efeito cúbico no *main-plot* com a fase móvel MAW e ajuda a explicar o motivo pelo qual o triângulo central tem 18 picos observados nessa fase. Somente a fase móvel MAW com a extração de 50:50 etanol/acetato de

etila fornece mais picos; 19 picos. Isto pode ser previsto com a equação (33 pela seguinte substituição: $x_3 = 1$ e $z_1 = z_2 = 1/2$, que irá resultar numa estimativa de 17 picos. Resumindo, o modelo mostra que para obter uma quantidade maior de picos em 254nm, uma mistura ternária para a extração em proporções iguais ou ainda, com proporção maior em acetato de etila é recomendada com uso da fase móvel MAW.

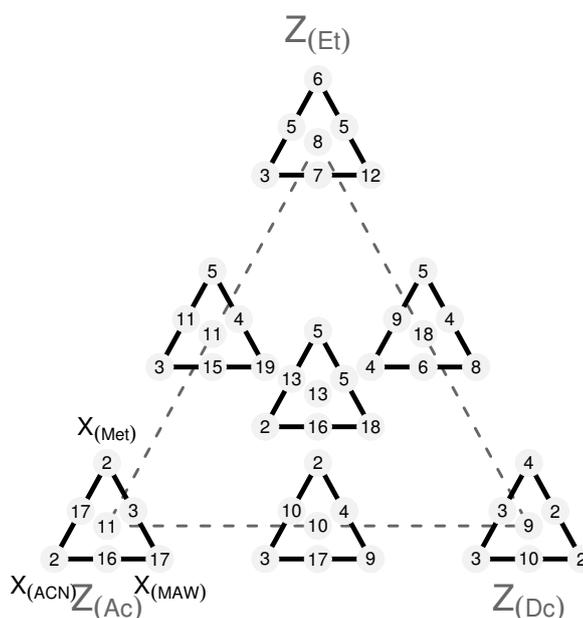


Figura 6 – Número de picos observados com detector em 254nm. O *main-plot* representa as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.

5.2 – Análise dos dados da *B. Milleflora* com detector em 210nm

O número de picos monitorados a 210nm varia de 3 a 20, quando considerados os diferentes solventes extratores e fase móveis como mostrado na tabela 1. Os valores dos coeficientes do modelo saturado, com 49 termos

ajustados, pode ser visto no Apêndice D. A partir do modelo saturado, os gráficos normais foram utilizados para a escolha de parâmetros significativos e compor um segundo modelo com menor número de parâmetros.

Foram calculadas as razões entre os coeficientes e as raízes quadradas das respectivas constantes $k_{...}$. A figura 7a mostra o gráfico normal obtido usando as razões entre os coeficientes e raízes quadradas dos resultados calculados pelas equações de (22) até (30).

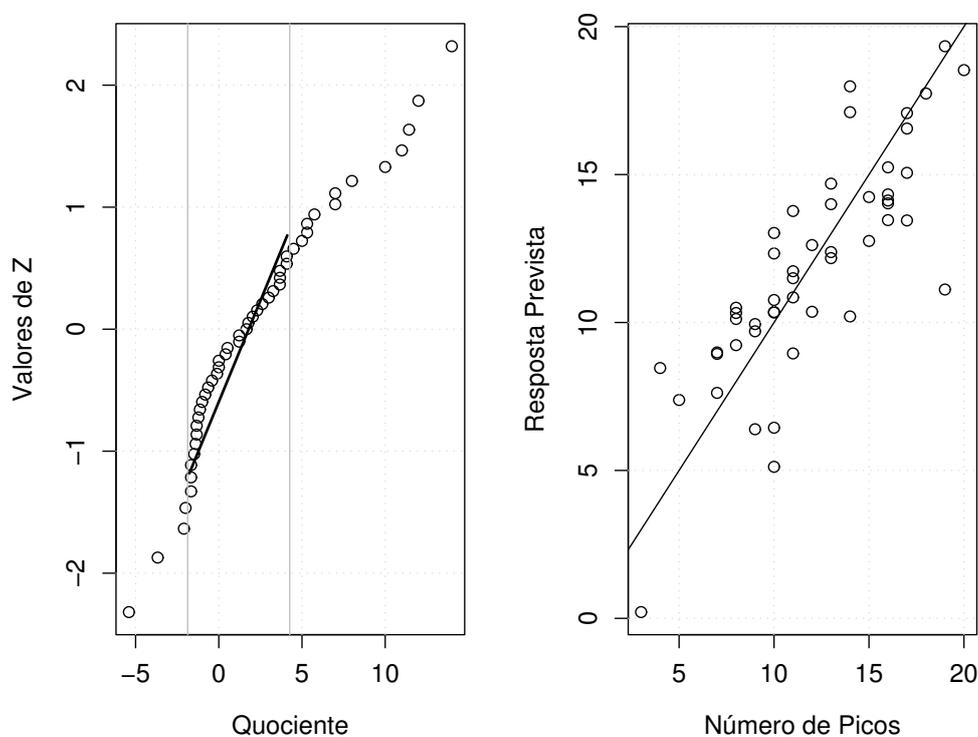


Figura 7 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 210nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) versus respostas previstas pelo modelo.

Os coeficientes correspondentes aos pontos que não caem na linha central são dados na tabela 3 juntamente com seus respectivos quocientes.

Tabela 3 – Modelo saturado e o modelo *split-plot* com 17 termos para o número de picos observados em 210nm.

Parâmetros	Coeficientes (modelo com 49 termos)	Quocientes $(g_{\dots}/\sqrt{k_{\dots}})$	Coeficientes (modelo com 17 termos)	t calculado $(g/\sqrt{e.p.})$
x_1z_1	12,0	12,0	14,3	5,4
x_1z_2	7,0	7,0	7,6	2,7
x_1z_3	10,0	10,0	8,3	3,7
x_2z_1	7,0	7,0	9,5	3,9
x_2z_2	8,0	8,6	11,1	4,4
x_3z_1	11,0	11,0	11,6	4,7
x_3z_2	14,0	14,0	17,6	7,1
x_3z_3	5,0	5,0	2,5	1,2
$x_1x_2z_2$	34,0	6,9	39,9	5,0
$x_1x_2z_3$	30,0	6,1	18,7	5,0
$x_2x_3z_3$	56,0	11,4	54,0	7,1
$x_1z_1z_2$	26,0	5,3	18,6	1,8
$x_1z_2z_3$	-18,0	-3,7	-17,2	-1,6
$x_1x_3z_1z_2$	-72,0	-3,0	-86,8	-2,3
$x_3z_1z_2z_3$	198,0	5,7	167,6	2,4
$x_1x_2x_3z_2z_3$	-912,0	-5,4	-532,9	-2,2
$x_1x_3z_1z_2z_3$	-516,0	-3,1	-268,5	-1,0

A superfície gerada por este modelo saturado (49 termos), bem como a superfície gerada por um modelo reduzido com 17 termos (mostrado na tabela 3) são mostradas juntas nas figuras 8 e 9 para inspeção visual.

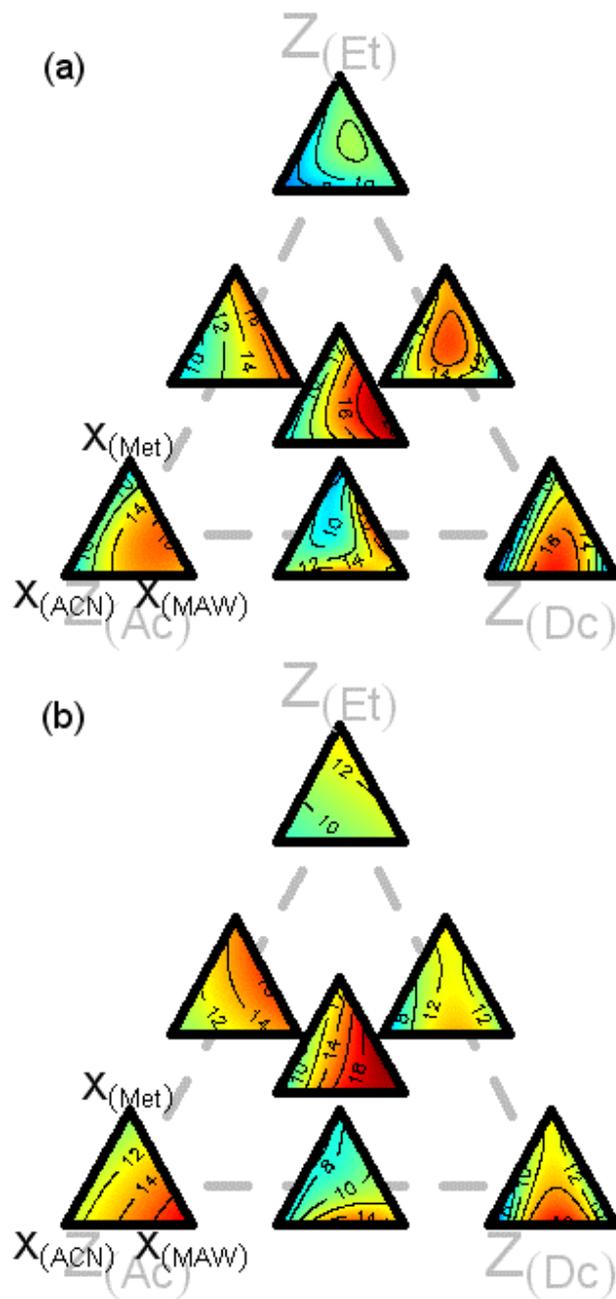


Figura 8 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 17 termos.

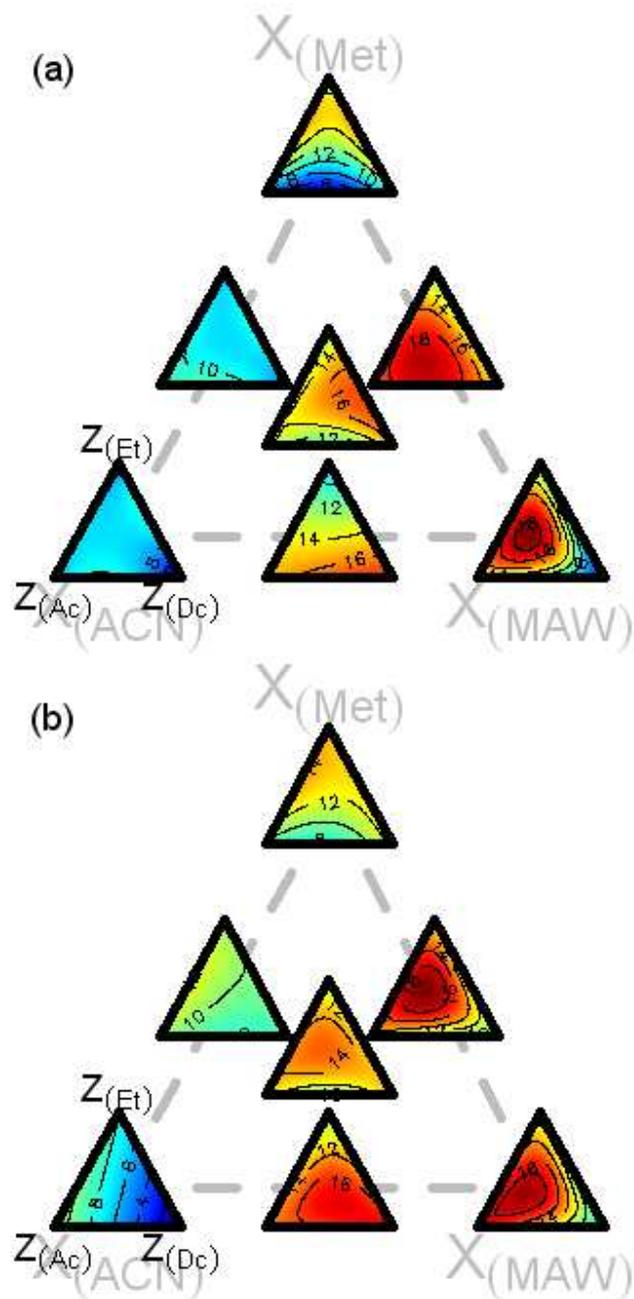


Figura 9 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 17 termos.

Um modelo contendo 17 parâmetros foi ajustado aos dados usando o procedimento *split-plot*. Os coeficientes e seus respectivos valores de t calculados são dados na tabela 3. Apenas os termos x_3z_3 e $x_1x_3z_1z_2z_3$ tiveram os

valores absolutos de t muito pequenos e então foram eliminados do modelo fornecendo o seguinte modelo substituto com 15 termos:

$$\begin{aligned}
 \hat{y} = & +14,1 \cdot x_1 z_1 + 17,6 \cdot x_3 z_2 + 11,6 \cdot x_3 z_1 + 8,3 \cdot x_1 z_3 \\
 & + 11,1 \cdot x_2 z_2 + 7,6 \cdot x_1 z_2 + 9,5 \cdot x_2 z_1 + 54,0 \cdot x_2 x_3 z_3 \\
 & - 39,9 \cdot x_1 x_2 z_2 - 17,2 \cdot x_1 z_2 z_3 + 18,7 \cdot x_1 x_2 z_3 + 18,6 \cdot x_1 z_1 z_2 \\
 & - 86,8 \cdot x_1 x_3 z_1 z_2 + 167,6 \cdot x_3 z_1 z_2 z_3 - 532,9 \cdot x_1 x_2 x_3 z_2 z_3
 \end{aligned} \tag{35}$$

Para o etanol, $z_1 = 1$, a fase móvel sendo metanol ($x_1 = 1$) prevê mais picos – 14 picos neste caso, que a fase MAW ($x_3 = 1$) – 12 picos e a fase móvel acetonitrila ($x_2 = 1$) – 10 picos. O fato pode ser confirmado pela tabela 1 e pela figura 10, com 12, 11 e 7 picos observados. Para a extração com acetato ($z_2 = 1$), o modelo fornece como previsão: 8, 11 e 18 picos para as fases móveis: metanol ($x_1 = 1$), acetonitrila ($x_2 = 1$) e MAW ($x_3 = 1$) e os respectivos resultados experimentais (observados) são 7, 8 e 14. Para a extração com diclorometano ($z_3 = 1$), o único termo binário significativo é $8,3 \cdot x_1 z_3$ que nos dá a previsão de 8 picos para o metanol ($x_1 = 1$) concordando com o resultado experimental, que é 10 picos observados.

As fases móveis: acetonitrila e MAW, para esta componente de extração (diclorometano), não parece mostrar termo significativo como era de se esperar, desde que resulta numa pequena quantidade de picos observados, no caso, 3 e 5.

O termo $54,0 \cdot x_2 x_3 z_3$ corresponde a uma forte sinergia entre os componentes acetonitrila e MAW para a extração com a solução de diclorometano e pode ser visto pela figura 10. A base do triângulo inferior direito mostra 18 picos observados para a mistura 50:50 acetonitrila/MAW enquanto que há somente 3 quando acetonitrila pura é usada e somente 5 para a componente MAW.

Os termos $39,9 \cdot x_1 x_2 z_2$ e $18,7 \cdot x_1 x_2 z_3$ indicam curvaturas para as fases móveis: metanol e acetonitrila quando usados com as soluções de extração acetato de etila e diclorometano respectivamente. Para a fase móvel metanol puro, os termos $-17,2 \cdot x_1 z_2 z_3$ e $18,6 \cdot x_1 z_1 z_2$ indicam efeito quadrático antagônico para a mistura de extração sendo acetato/diclorometano e efeito sinérgico para a mistura de extração sendo etanol/acetato respectivamente. Contudo, um termo análogo ao efeito sinérgico para a fase móvel metanol com a mistura de extração sendo etanol/diclorometano foi visto ser insignificante e não incluso no modelo.

O termo $-86,8 \cdot x_1 x_3 z_1 z_2$ representa uma combinação de efeito quadrático negativo da fase móvel metanol/MAW com o extrator etanol/acetato. Um efeito cúbico positivo entre as componentes de extração para a fase móvel MAW produz um termo significativo: $167,6 \cdot x_3 z_1 z_2 z_3$.

Em 210nm, a mistura ternária para a extração (assim como em 254nm) deve ser usada com a componente MAW como fase móvel ou com uma mistura 50:50 de metanol/acetonitrila.

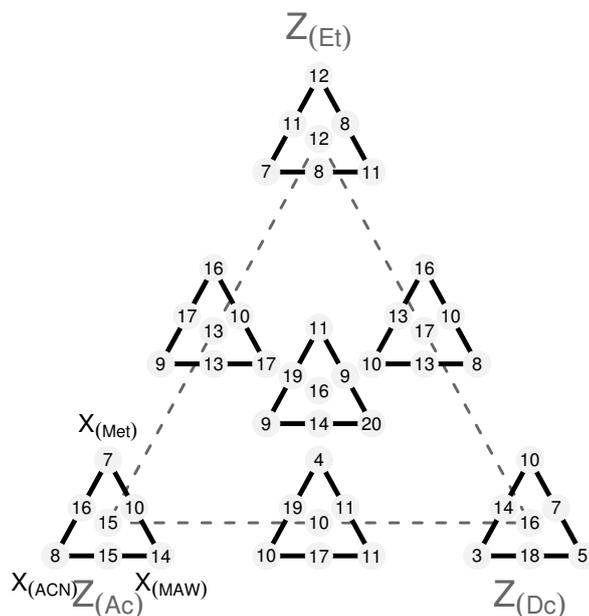


Figura 10 – Número de picos observados com detector em 210nm onde o *main-plot* representando as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.

5.3 – Análise dos dados da *B. Trimer* com detector em 254nm

As respostas experimentais (número de picos) encontradas nos cromatogramas monitorados à 254nm variam entre 1 e 20 e é dado na tabela 1 e figura 11. Com essas respostas experimentais, um modelo contendo 49 termos pôde ser ajustado e o mesmo pode ser consultado no Apêndice D.

Uma vez tendo o modelo saturado como ponto de partida, e com o auxílio de gráficos normais, seguimos a descrição dada no item 3 para a obtenção de um segundo modelo com menor número de parâmetros, mas ainda suficiente para descrever a maior parte da variância das respostas experimentais.

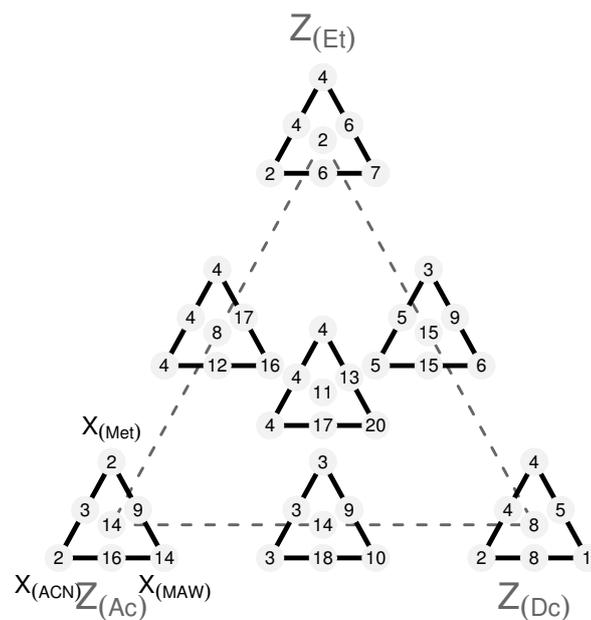


Figura 11 – Número de picos observados com detecção em 254nm. O *main-plot* representa as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.

A figura 12a mostra o gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo saturado e respectivas constantes k .

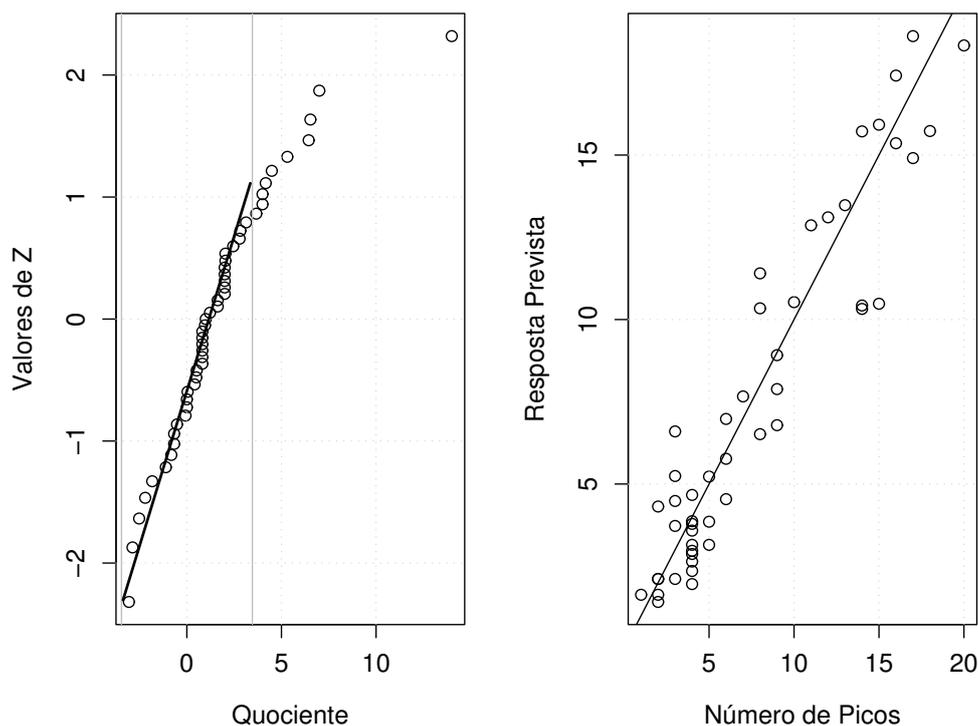


Figura 12 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 254nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) versus respostas previstas pelo modelo.

Os coeficientes correspondentes aos pontos que parecem não seguir a reta dada na figura 12a foram mantidos no novo modelo reajustado com menor número de parâmetros usando o procedimento *split-plot*. A figura 12b mostra o gráfico das respostas experimentais versus resposta prevista. O modelo reduzido assim obtido é dado na tabela 4.

Tabela 4– Modelo saturado e o modelo *split-plot* com 10 termos para o número de picos observados em 254nm.

Parâmetros	Coef. (γ) (modelo com 49 termos)	Quocientes $\left(\frac{g_{\dots}}{\sqrt{k_{\dots}}} \right)$	Coef. (γ) (modelo com 10 termos)	t calculado $\left(\frac{g}{\sqrt{e.p.}} \right)$
x_1z_1	4,0	4,0	2,5	1,2
x_1z_3	4,0	4,0	3,0	1,6
x_3z_1	7,0	7,0	6,3	2,9
x_3z_2	14,0	14,0	13,6	6,7
$x_3z_1z_2$	22,0	4,5	12,3	1,1
$x_2x_3z_2$	32,0	6,5	34,0	4,7
$x_2x_3z_3$	26,0	5,3	34,8	4,1
$x_3z_1z_2z_3$	222,0	6,4	226,5	3,4
$x_1x_3z_1z_2$	100,0	4,2	87,0	2,6
$x_2x_3z_1z_3$	88,0	3,7	98,5	2,7

As superfícies de respostas geradas pelos modelos saturado e reduzido são mostradas nas figuras 13 e 14. Estas superfícies são bastante úteis para comparação e interpretação dos modelos.

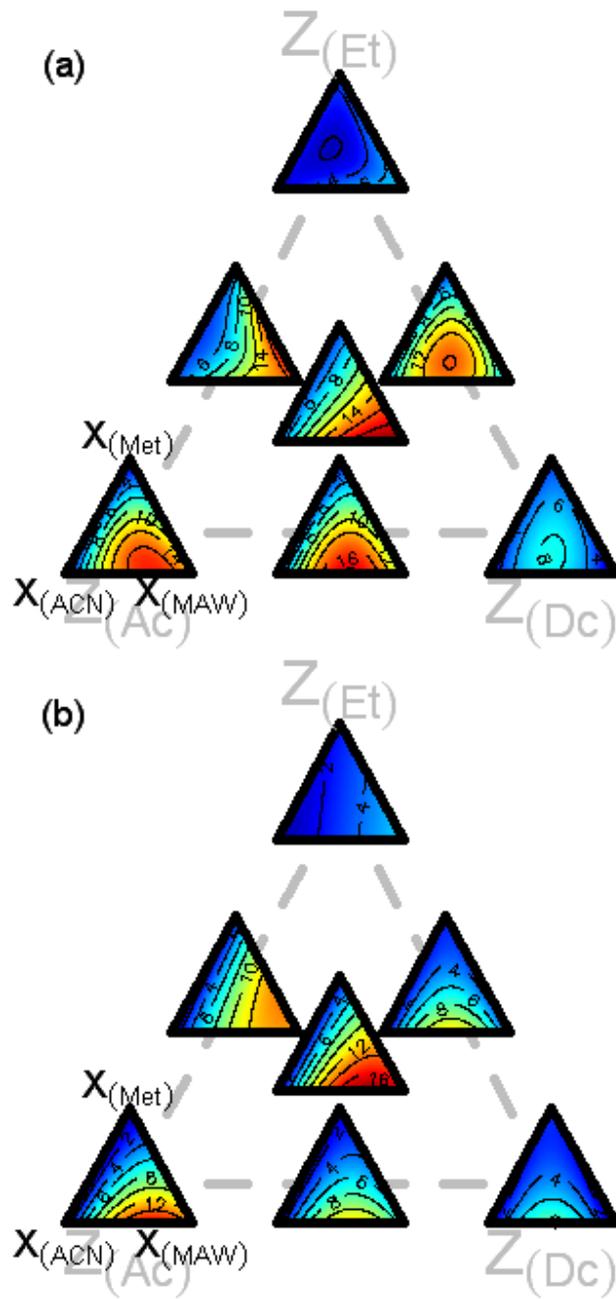


Figura 13 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 10 termos.

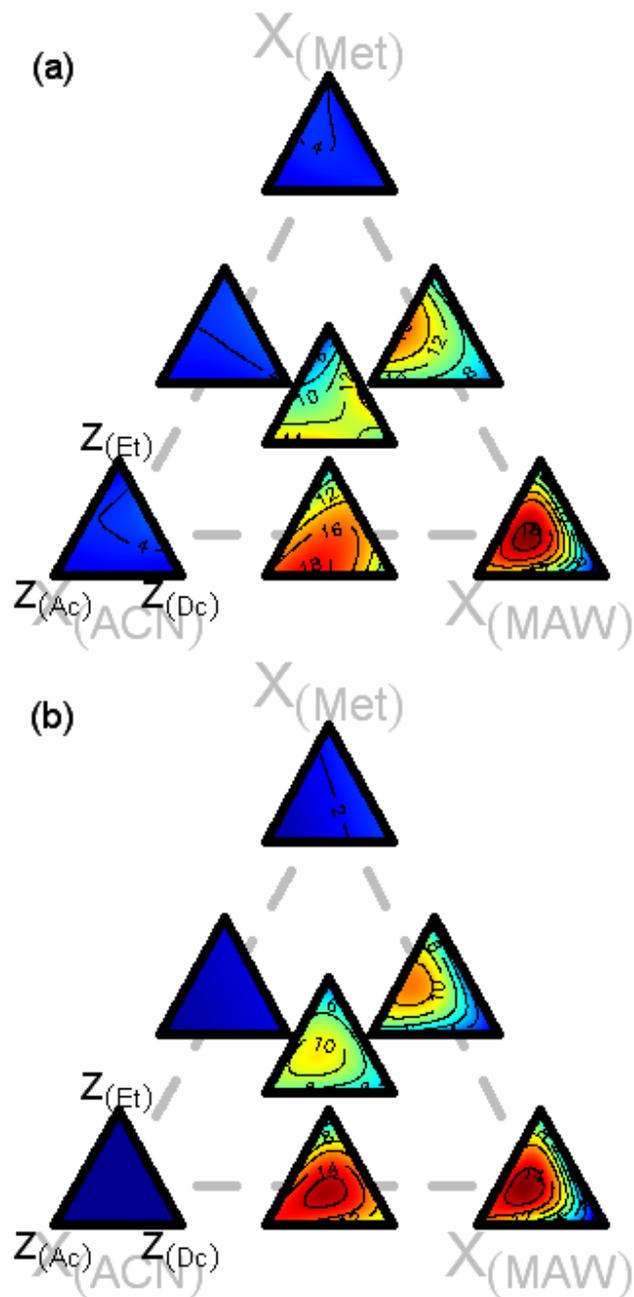


Figura 14 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 10 termos.

Os coeficientes x_{1z1} , x_{1z3} , e x_{3z1z2} , foram excluídos do modelo uma vez que os mesmos obtiveram valores de t muito baixo.

O modelo então passa a ser o dado pela equação abaixo:

$$\hat{y} = +6,3 \cdot x_3 z_1 + 13,6 \cdot x_3 z_2 + 34,0 \cdot x_2 x_3 z_2 + 34,8 \cdot x_2 x_3 z_3 + 226,5 \cdot x_3 z_1 z_2 z_3 + 87,0 \cdot x_1 x_3 z_1 z_2 + 98,5 \cdot x_2 x_3 z_1 z_3 \quad (36)$$

Pela figura 14, observa-se que os maiores valores para a resposta experimental são obtidos quando usado a fase móvel MAW e também quando usada a mistura binária de MAW e acetonitrila. É importante notar que todos os termos possuem o fator x_3 , deste modo, ressaltando sua influência no modelo.

Ainda observando a figura, verifica-se que quando usado metanol puro, acetonitrila pura ou a mistura binária dos mesmos, nestas condições, são encontrados os menores valores para as respostas, e como era de se esperar, os termos correspondentes não demonstraram ser significativos e não estão incluídos no modelo final.

Para $x_3 = 1$, a equação se torna muito simples e é dada a seguir.

$$\hat{y} = +6,3 \cdot z_1 + 13,6 \cdot z_2 + 226,5 \cdot z_1 z_2 z_3 \quad (37)$$

Neste caso, usando etanol como extrator, $z_1 = 1$, a previsão é de 6 picos contra 7 picos obtidos experimentalmente. Para acetato como extrator, $z_2 = 1$: previsão de 14 (13.6) picos concordando com os 14 picos experimentais. A mistura binária de z_1 e z_2 prevê 10 contra 16, que é o valor experimental.

O termo $226,5 \cdot x_3 z_1 z_2 z_3$ nos informa que há uma interação sinérgica quando MAW é usado como fase móvel ($x_3 = 1$) e o solvente extrator é a mistura ternária de etanol, acetato de etila e diclorometano ($z_1 = z_2 = z_3 = 1/3$). Nesta condição, o modelo prevê 15 picos, enquanto que o valor experimental é 20 picos. Embora haja a diferença de 5 picos entre a resposta experimental e prevista, pode ser vista nas figura 13 e figura 14, pela coloração vermelha, no triângulo na parte inferior direita, que esta condição é a que produz valores

experimentais mais elevados e que o modelo consegue capturar essa informação.

Há uma sinergia quando usado a mistura 1:1 de metanol e MAW com o extrator composto da mistura 1:1 de etanol e acetato. O termo $87,0 \cdot x_1 x_3 z_1 z_2$ demonstra essa interação e nesta condição ($z_1 = z_2 = x_1 = x_3 = 1/2$), o modelo prevê 10 picos e sendo o valor experimental de 17 picos.

De modo análogo, o termo $95,5 \cdot x_2 x_3 z_1 z_3$, representa a interação entre os solventes acetonitrila e MAW quando misturados na proporção 1:1 e com o extrator sendo composto pela mistura binária 1:1 de etanol e diclorometano ($z_1 = z_3 = x_2 = x_3 = 1/2$). A resposta experimental é 15, enquanto que o valor previsto é 12 (11,89) picos.

5.4 – Análise dos dados da *B. Trimer* com detector em 210nm

Para a planta do gênero *Baccharis Trimer*, quando o estudo foi monitorado a 210nm, apresentou número de picos variando entre 3 e 24, quando considerado os diferentes solventes extratores e fase móveis apresentados na tabela 1. Os valores dos coeficientes do modelo saturado (49 termos ajustados) podem ser vistos no Apêndice E. Dado o modelo saturado, gráficos normais foram empregados para escolher os parâmetros mais significativos. A figura 15a mostra o gráfico normal obtido.

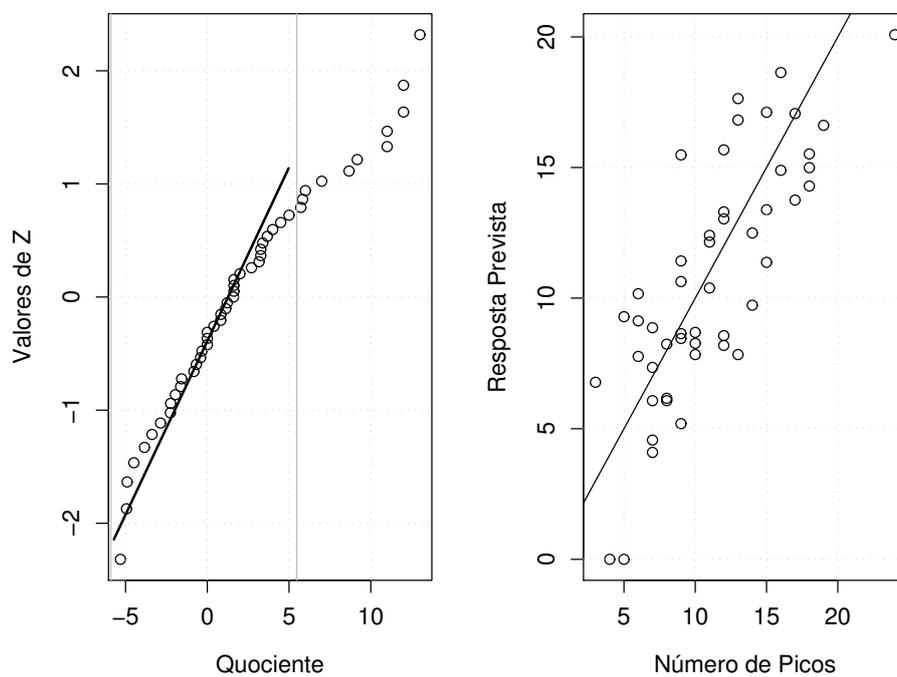


Figura 15 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 210nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) versus respostas previstas pelo modelo.

Com os termos significativos (coeficientes correspondentes aos pontos que não caem na reta) o modelo foi reajustado com menor número de parâmetros. Este novo modelo obtido é apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Modelo saturado e o modelo *split-plot* com 11 termos para o número de picos observados em 210nm.

Parâmetros	Coef. (γ) (modelo com 49 termos)	Quocientes $\left(\frac{g_{\dots}}{\sqrt{k_{\dots}}}\right)$	Coef. (γ) (modelo com 11 termos)	t calculado $\left(\frac{g}{\sqrt{e.p.}}\right)$
x_1z_1	12,0	12,0	8,2	3,6
x_1z_2	7,0	7,0	7,4	3,2
x_1z_3	11,0	11,0	10,4	4,6
x_2z_2	6,0	6,0	9,1	4,1
x_2z_3	12,0	12,0	15,7	7,0
x_3z_1	11,0	11,0	12,2	5,3
x_3z_2	13,0	13,0	17,6	7,0
$x_3z_2z_3$	28,0	5,7	39,3	3,6
$x_1x_3z_1z_2$	140,0	5,8	84,6	1,8
$x_1x_3z_1z_3$	220,0	9,2	117,0	2,4
$x_2x_3z_1z_3$	208,0	8,7	210,1	4,5

As representações das superfícies, do modelo saturado assim como a do segundo modelo com 11 termos, são mostradas juntas nas figuras 16 e 17.

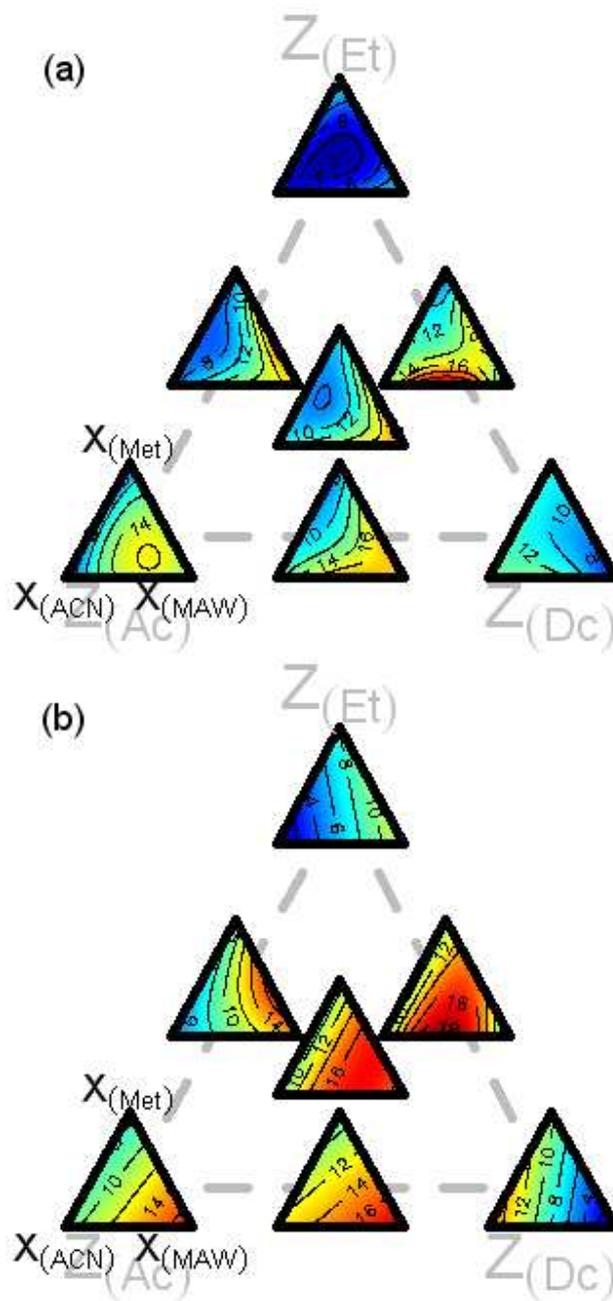


Figura 16 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 11 termos.

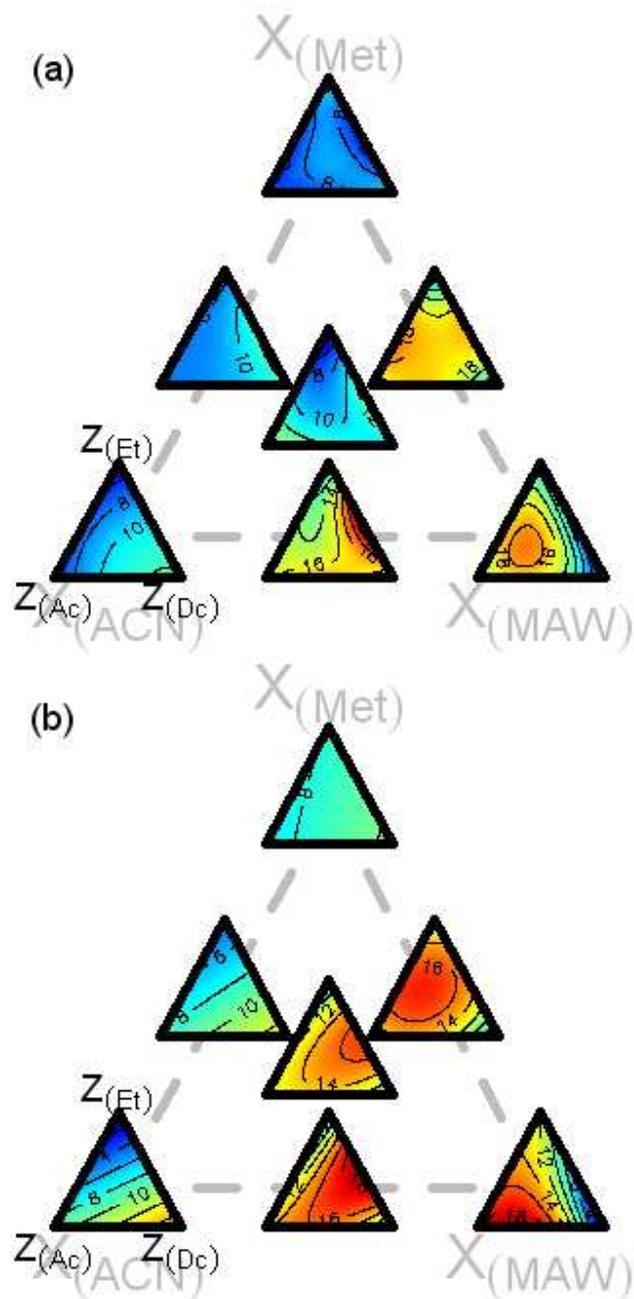


Figura 17 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 11 termos.

Pode ser visto pelas figuras 16 e 17 que o modelo reduzido ainda representa qualitativamente o modelo saturado. Observa-se diretamente na figura 16a que, dentre as sete superfícies triangulares, os maiores valores estão

presentes na base da superfície triangular no meio da aresta direita do triângulo pontilhado cinza. A figura 16b também apresenta a mesma característica. Essa condição experimental usa o extrator dado pela mistura binária de etanol e diclorometano, usando como fase móvel a mistura binária de metanol e MAW. Neste ponto, o valor experimentalmente obtido foi de 24 picos como mostrado na figura 18. Esta mesma condição também é destacada, nas figura 17a e b, pela coloração vermelha no meio da aresta direita da superfície (triângulo colorido) que está na base do triângulo pontilhado em cinza. Nesta condição em que $x_1 = z_2 = 0$ e $x_2 = x_3 = z_1 = z_3 = 1/2$, o modelo se simplifica para:

$$\hat{y} = +15,7 \cdot x_2 z_3 + 12,2 \cdot x_3 z_1 + 210,1 \cdot x_2 x_3 z_1 z_3 \quad (38)$$

A resposta prevista para a condição já mencionada é de 20 picos. Neste caso o alto valor do coeficiente – 210,1 – indica uma forte sinergia entre o sistema extrator e a fase móvel. De forma análoga, o termo $x_1 x_3 z_1 z_3$ também possui um alto valor para seu coeficiente – 117,0 – e assim evidenciando que também há interação entre o solvente extrator formado pela mistura binária de etanol e diclorometano e com a fase móvel formada pela mistura 1:1 de metanol e MAW. Nessa condição, a resposta experimental é de 18 picos enquanto que o valor previsto é 15.

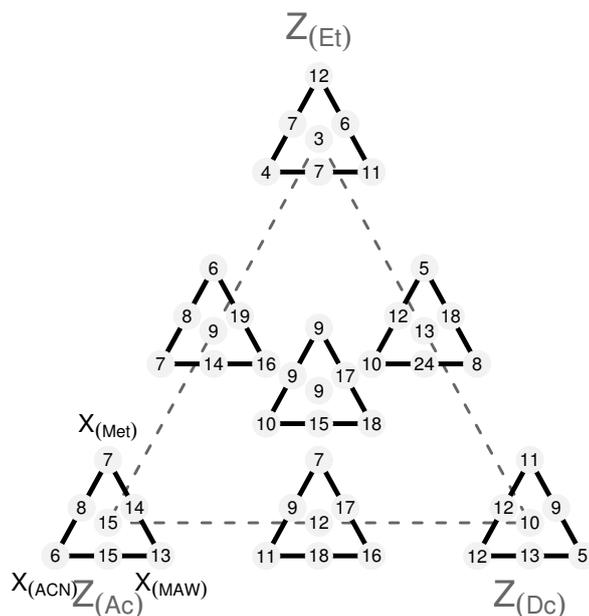


Figura 18 – Número de picos observados com detector em 210nm. O *main-plot* representa as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.

5.5 – Análise dos dados da *C. Sinensis* com detector em 254nm

Nesta aplicação os experimentos que correspondem aos pontos axiais no planejamento simplex-centróide dos extratores foram realizados. Os valores das respostas experimentais assim como as condições experimentais utilizadas são mostradas nas tabela 1 e tabela 6 e também, de forma esquematizada, na figura 19. Esses pontos axiais presentes terão o papel de conjunto de dados para testes de validação dos modelos obtidos.

Tabela 6 – Matriz de planejamento experimental para os solventes extratores (z) e fases móveis (x) com número de picos observados com detector em 254nm.

	$z_{(Et)}$	$z_{(Ac)}$	$z_{(Dc)}$	$x_{(Met)}$	$x_{(ACN)}$	$x_{(MAW)}$	MP	C254
50	4/6	1/6	1/6	1	0	0	8	2
51	4/6	1/6	1/6	0	1	0	8	3
52	4/6	1/6	1/6	0	0	1	8	15
53	4/6	1/6	1/6	1/2	1/2	0	8	2
54	4/6	1/6	1/6	1/2	0	1/2	8	9
55	4/6	1/6	1/6	0	1/2	1/2	8	14
56	4/6	1/6	1/6	1/3	1/3	1/3	8	11
57	1/6	4/6	1/6	1	0	0	9	2
58	1/6	4/6	1/6	0	1	0	9	4
59	1/6	4/6	1/6	0	0	1	9	14
60	1/6	4/6	1/6	1/2	1/2	0	9	4
61	1/6	4/6	1/6	1/2	0	1/2	9	14
62	1/6	4/6	1/6	0	1/2	1/2	9	11
63	1/6	4/6	1/6	1/3	1/3	1/3	9	8
64	1/6	1/6	4/6	1	0	0	10	4
65	1/6	1/6	4/6	0	1	0	10	3
66	1/6	1/6	4/6	0	0	1	10	8
67	1/6	1/6	4/6	1/2	1/2	0	10	5
68	1/6	1/6	4/6	1/2	0	1/2	10	9
69	1/6	1/6	4/6	0	1/2	1/2	10	19
70	1/6	1/6	4/6	1/3	1/3	1/3	10	16

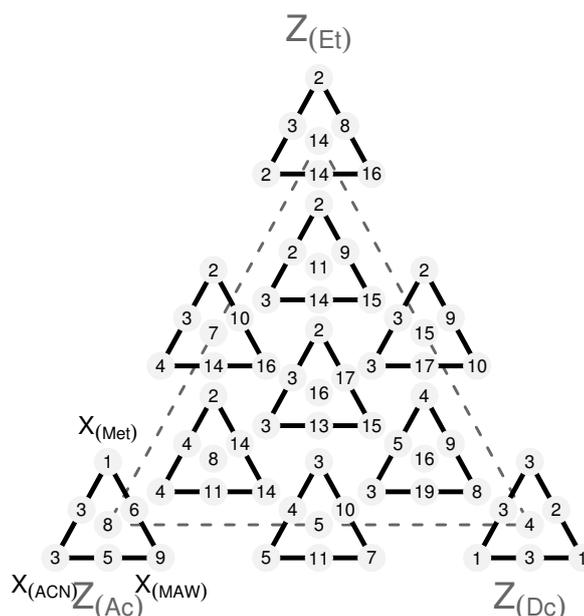


Figura 19 – Número de picos observados com detector em 254nm. O *main-plot* representa as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.

De forma análoga aos procedimentos adotados anteriormente, foi ajustado o modelo com 49 termos.

No Apêndice F está mostrado todos os coeficientes dos parâmetros do modelo de 49 termos. Com esse modelo, obtivemos o valor do erro de previsão – RMSEP (*root mean square error of prediction*) – de 2,66 na previsão do número de picos para os pontos axiais. A partir desse modelo, gráficos normais foram usados como ferramenta de auxílio na escolha de parâmetros significativos para que um segundo modelo com menor número de parâmetros fosse reajustado. O gráfico é apresentado a seguir.

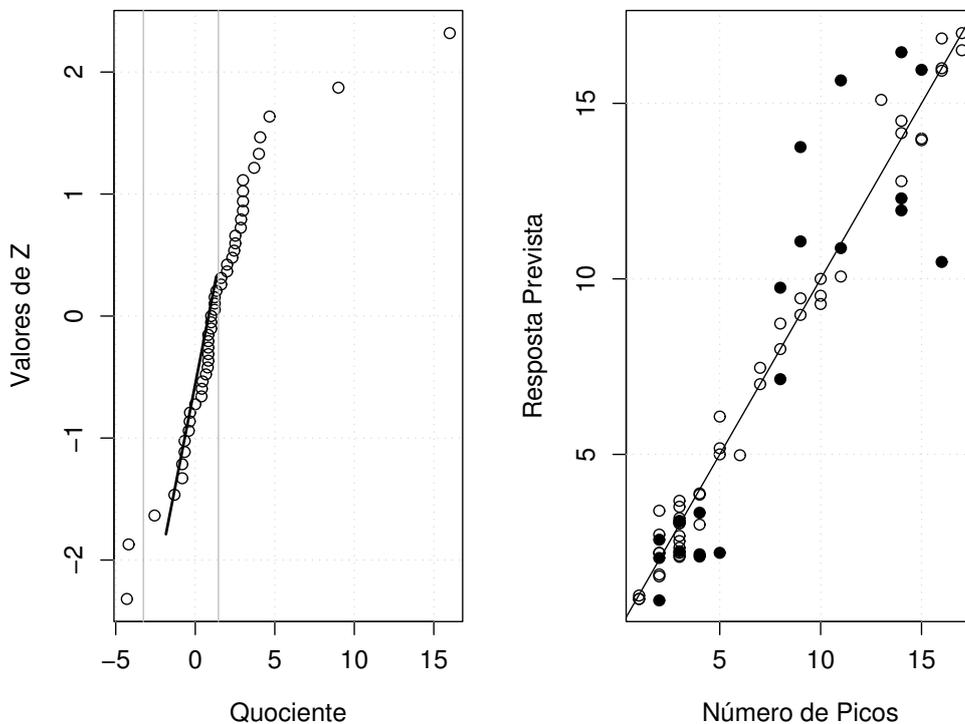


Figura 20 – Gráficos para os dados obtidos com detector em 254nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) *versus* respostas previstas pelo modelo.

Os coeficientes correspondentes aos pontos que não caem na reta em zero pela abscissa (figura 20a) são tomados como efeitos potencialmente significativos e consideramos que os outros pontos somente representam erros experimentais. A tabela 7 fornece o modelo reajustado com somente os parâmetros significativos, totalizando 22 termos.

Tabela 7 – Modelo saturado e o modelo *split-plot* com 22 termos para o número de picos observados em 254nm para o chá verde.

Parâmetros	Coef. (γ) (modelo com 49 termos)	Quocientes $(g_{...}/\sqrt{k_{...}})$	Coef. (γ) (modelo com 22 termos)	t calculado $(g/\sqrt{e.p.})$
x_1z_1	2,0	2,0	2,4	2,1
x_1z_3	3,0	3,0	2,6	2,8
x_2z_1	2,0	2,0	3,6	3,1
x_2z_2	3,0	3,0	2,2	2,2
x_3z_1	16,0	16,0	16,8	13,7
x_3z_2	9,0	9,0	8,0	7,3
$x_2z_2z_3$	12,0	2,5	11,4	2,3
$x_3z_1z_2$	14,0	2,9	13,8	2,8
$x_3z_2z_3$	8,0	1,6	9,0	1,7
$x_2x_3z_1$	20,0	4,1	19,3	4,7
$x_2x_3z_3$	8,0	1,6	11,2	2,7
$x_3z_1z_2z_3$	87,0	2,5	87,5	2,6
$x_1x_3z_1z_3$	56,0	2,3	49,7	3,0
$x_1x_3z_2z_3$	56,0	3,0	80,0	4,4
$x_2x_3z_1z_3$	112,0	4,7	107,5	5,7
$x_2x_3z_2z_3$	72,0	3,0	37,6	2,0
$x_1x_2x_3z_1$	138,0	4,0	152,0	5,7
$x_1x_2x_3z_2$	87,0	2,5	97,8	3,4
$x_1x_3z_1z_2z_3$	486,0	2,9	608,2	4,4
$x_1x_2x_3z_1z_2$	-726,0	-4,3	-685,0	-5,0
$x_1x_2x_3z_2z_3$	-708,0	-4,2	-621,7	-4,5
$x_1x_2x_3z_1z_2z_3$	4392,0	3,7	3685,4	3,9

Não houve grande perda de informação relevante com a supressão dos outros 27 termos dado que o valor recalculado do RMSEP para o novo modelo foi 2,87 e ainda permanecendo muito similar ao do modelo com 49 termos. O erro de calibração – RMSEC (*root mean square error of calibration*) – foi de 0,92.

A figura 20b mostra o gráfico das repostas previstas versus experimentais. Os círculos brancos correspondem aos experimentos que

fizeram parte do conjunto de calibração enquanto que os círculos preenchidos (pretos) representam o conjunto de validação (pontos axiais).

Pela figura 20b verifica-se que os pontos correspondentes ao conjunto de calibração estão dispersos aleatoriamente sobre a linha diagonal e com pouca dispersão. Em compensação, os pontos que correspondem ao conjunto de validação apresentam uma maior dispersão em volta desta mesma diagonal para algumas respostas com valores mais elevados, indicando uma menor precisão do modelo.

A superfície gerada por este modelo saturado (49 termos), bem como a superfície gerada por um modelo reduzido são apresentadas nas figuras 21 e 22.

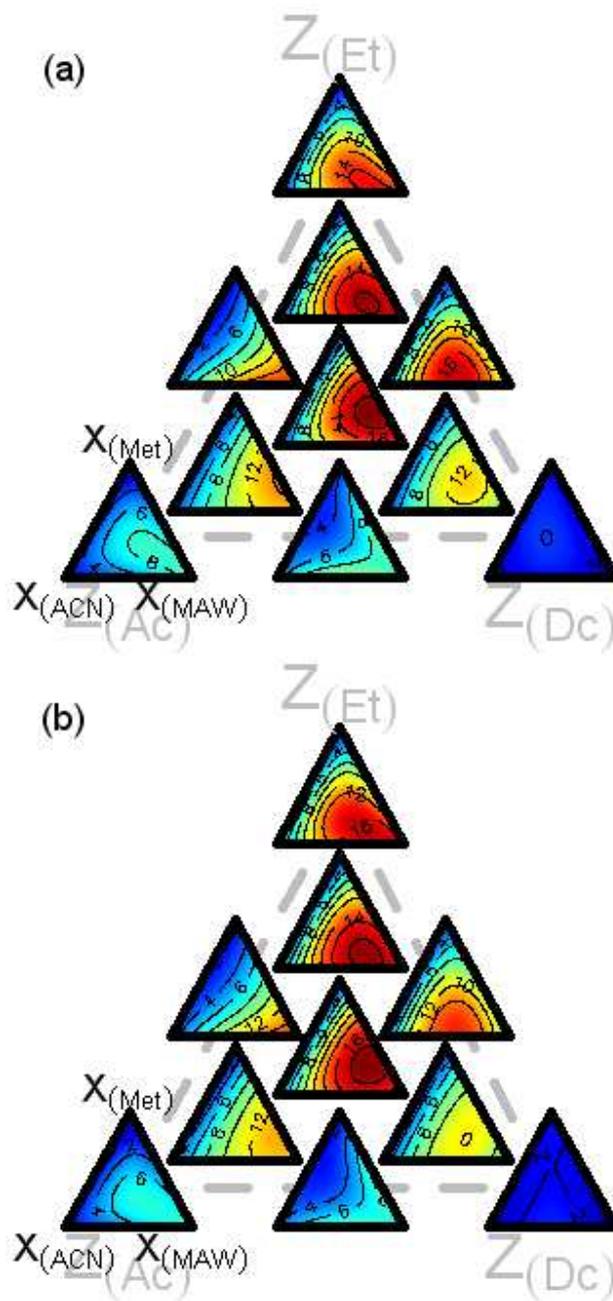


Figura 21 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.

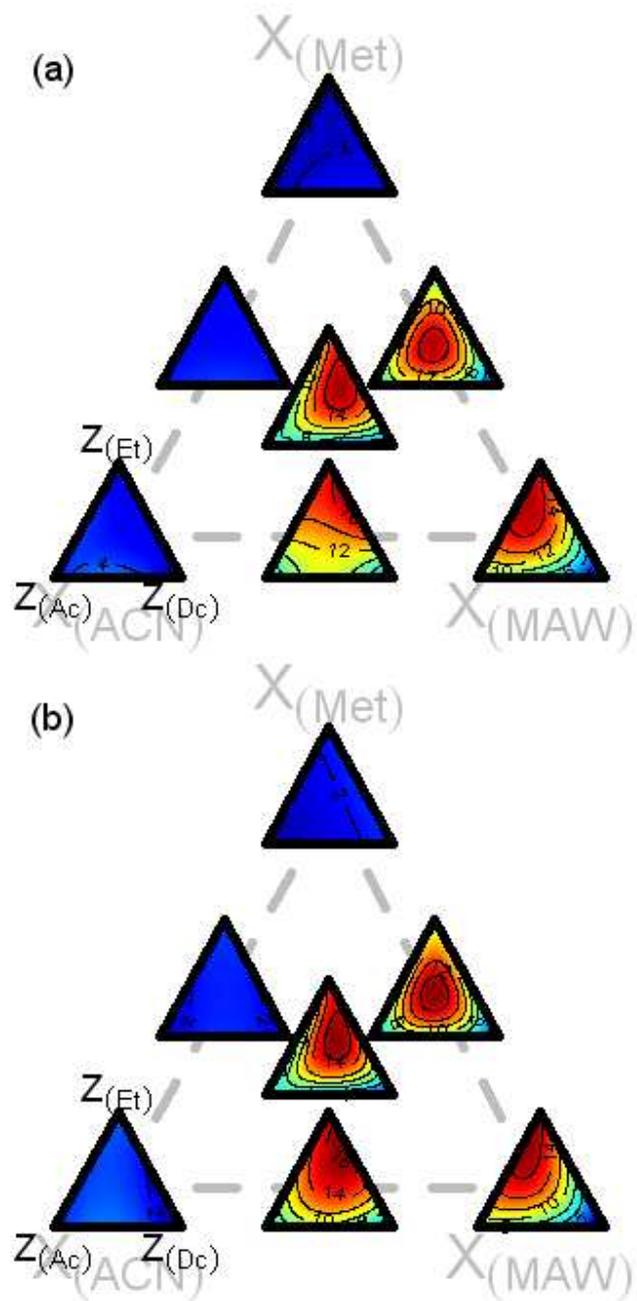


Figura 22 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 254nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.

A tabela 8 mostra os valores experimentais e previstos utilizando os modelos com 49 termos e com 22 termos.

Tabela 8 – Resposta prevista para o número de picos para o chá verde a 254nm pelo modelo com 49 termos e pelo modelo reduzido com 22 termos

	Resp. Exp.	Resp. Prev. com 49 termos	Resp. Prev. com 22 termos
50	2	1,9	2,0
51	3	2,8	3,1
52	15	16,4	16,0
53	2	2,9	2,6
54	9	13,4	13,8
55	14	15,6	16,5
56	11	15,6	15,7
57	2	1,9	0,8
58	4	3,8	3,3
59	14	13,0	12,3
60	4	3,2	2,1
61	14	13,0	12,0
62	11	10,6	10,9
63	8	10,2	9,8
64	4	2,6	2,2
65	3	2,8	2,2
66	8	8,4	7,1
67	5	3,2	2,2
68	9	11,4	11,1
69	19	10,9	11,4
70	16	11,6	10,5

O modelo reduzido ainda representa de forma satisfatória o modelo com 49 termos, uma vez que os valores dos RMSEP são muito similares para os dois modelos e são, respectivamente, 2,66 e 2,87, também pode ser visualmente confirmados pelas superfícies geradas pelos dois modelos, representados nas figura 21a/21b e figura 22a/22b. Entretanto, há um indicativo de que o modelo poderá falhar em prever valores de picos para novos experimentos dado que, a razão entre as variâncias RMSEP e RMSEC do modelo reduzido – $(2,66)^2/(0,92)^2 = 8,36$ – é um valor relativamente alto.

Os termos que representam a interação entre os solventes puros para extração e fase móvel: x_1z_2 , x_2z_3 , x_3z_3 , não estão presentes no modelo e, portanto

são interpretados como tendo coeficientes iguais a zero e estão em concordância com suas respostas experimentais que são todas iguais a um. Concluímos que estas condições são desfavoráveis para a extração e/ou separação dos componentes químicos da planta. Pela figura 22, fica evidente também que metanol (x_1) e acetonitrila (x_2) e sua mistura binária (x_1x_2) também produzem poucos picos nos cromatogramas.

Os termos de interação linear-linear x_1z_1 , x_1z_3 , x_2z_1 , x_2z_2 , x_3z_1 , x_3z_2 estão no modelo. Seus coeficientes e respectivas respostas experimentais são:

- $b_1^1 = 2,4$ (2); $b_1^3 = 2,6$ (3); $b_2^1 = 3,6$ (2); $b_2^2 = 2,2$ (3); $b_3^1 = 16,8$ (16);
 $b_3^2 = 8,0$ (9);

Esses parâmetros mostram a limitação de metanol (x_1) e acetonitrila (x_2) na separação de picos com os solventes puros para a extração, ao contrário do solvente MAW, especialmente considerando o etanol puro (z_1) como extrator.

Quando utilizado a fase móvel MAW pura, $x_3 = 1$, o modelo se reduz para a forma seguinte:

$$\hat{y} = +16,8 \cdot z_1 + 8,0 \cdot z_2 + 13,8 \cdot z_1z_2 + 9,0 \cdot z_2z_3 + 87,5 \cdot z_1z_2z_3 \quad (39)$$

Nesta condição, temos os seguintes resultados:

- A extração com etanol prevê 16,8 picos contra 8,0 previstos com uso de acetato de etila. A mistura binária desses dois componentes prevê 15,9 picos. Os valores experimentais são 16, 9 e 16, respectivamente.
- A mistura 1:1 de acetato de etila e diclorometano prevê 6,2 e sendo 7 o experimental.
- Quando a mistura ternária para extração é usada, 15 é o número de picos experimentalmente obtidos e 14,1 é o valor previsto pelo modelo.

Desta análise podemos concluir que, as condições mais favoráveis para obtenção de uma maior quantidade de picos no cromatogramas são usar etanol puro ou uma mistura binária de etanol e acetato de etila como solventes extratores. Esta descrição acima foi feita com base na observação da superfície dada no triângulo da ponta inferior esquerda da figura 22 e pela equação (39).

Ainda com base na observação da figura 22, é possível notar que os maiores valores experimentais estão presentes nas regiões vermelhas dos triângulos, sendo quatro triângulos que se destacam por essa coloração. Segue a descrição das condições experimentais dos três triângulos que ainda não foram mencionados anteriormente:

- Triângulo central, que representa os experimentos realizados com a mistura ternária 1:1:1 de metanol, acetonitrila e MAW como fase móvel;
- Triângulo no meio da base, que representa os experimentos realizados com a mistura binária 1:1, acetonitrila e MAW;
- Triângulo no meio da aresta direita, que representa os experimentos realizados com a mistura binária 1:1, metanol e MAW;

Abaixo, segue um detalhamento de cada uma dessas três condições.

1 - Triângulo central: Para esta condição onde $x_1 = x_2 = x_3 = 1/3$, o modelo simplifica-se para o seguinte formato:

$$\hat{y} = +13,2 \cdot z_1 + 7,0 \cdot z_2 + 2,1 \cdot z_3 - 20,8 \cdot z_1 z_2 + 17,5 \cdot z_1 z_3 - 3,2 \cdot z_2 z_3 + 233,2 \cdot z_1 z_2 z_3 \quad (40)$$

Neste novo caso particular, a interpretação é análoga à anterior:

- Os termos lineares $13,2 \cdot z_1$, $7,0 \cdot z_2$, e $2,1 \cdot z_3$ indicam que os solventes: etanol, acetato de etila e diclorometano prevêm 13,2, 7,0 e 2,1 picos respectivamente. Os valores experimentais são 14, 8 e 4.
- O termo $-20,8 \cdot z_1 z_2$, indica efeito de antagonismo entre os solventes etanol e acetato quando a mistura binária para extração é utilizada. A resposta experimental é 7 e a prevista é 6,0. A interpretação para os termos $17,5 \cdot z_1 z_3$ e $-3,2 \cdot z_2 z_3$, é análoga.
- O efeito cúbico-especial é evidenciado pelo alto valor do seu coeficiente: $233,2 \cdot z_1 z_2 z_3$. O valor experimental é 16 e o previsto é 16,1.

O efeito cúbico é o responsável por contribuir com 8,6 picos [$233,2 \cdot (1/3 \cdot 1/3 \cdot 1/3)$] na valor final da resposta nesta condição. A observação da figura 22 torna essa propriedade evidente.

2 - Triângulo no meio da base, o modelo simplificado é obtido pela seguinte restrição: $x_1 = 0$ e $x_2 = x_3 = 1/2$. A análise é dada a seguir.

$$\hat{y} = +15,0 \cdot z_1 + 5,1 \cdot z_2 + 2,8 \cdot z_3 + 6,9 \cdot z_1 z_2 + 26,9 \cdot z_1 z_3 + 19,6 \cdot z_2 z_3 + 43,8 \cdot z_1 z_2 z_3 \quad (41)$$

- Os termos lineares em z_1 , z_2 , e z_3 prevêm 15,0, 5,1 e 2,8 picos respectivamente para os solventes: etanol, acetato de etila e diclorometano. Os valores experimentais são 14, 5 e 3.
- Pela figura 22, verifica-se que há interação sinérgica quando utilizada a mistura de etanol e diclorometano. O termo $26,9 \cdot z_1 z_3$ indica esta interação e para esta condição experimental, o previsto pelo modelo é 15,6 picos concordando com o valor experimental de 17 picos.

- A sinergia entre os três solventes da extração é captada no modelo pelo termo $43,8 \cdot z_1 z_2 z_3$. Os valores das respostas são 13 e 15,2 para o experimental e previsto.

3 - Triângulo no meio da aresta esquerda, nesta condição experimental, $x_2 = 0$ e $x_1 = x_3 = 1/2$, o modelo se reduz para a forma seguinte:

$$\hat{y} = +9,6 \cdot z_1 + 4,0 \cdot z_2 + 1,3 \cdot z_3 + 6,9 \cdot z_1 z_2 + 12,4 \cdot z_1 z_3 + 24,5 \cdot z_2 z_3 + 195,8 \cdot z_1 z_2 z_3 \quad (42)$$

- Observando a figura 22, a sinergia entre os três solventes da extração fica bastante clara dada que a coloração vermelha está no centro do triângulo indicando maiores quantidades de picos quando a mistura ternária é utilizada no experimento. O termo $195,8 \cdot z_1 z_2 z_3$ contribui com o aumento de 7,3 para a resposta final. O valor da resposta experimental é 17 e a prevista pelo modelo é 17,1.

5.6 – Análise dos dados da *C. Sinensis* com detector em 210nm

O número de picos com o detector a 210nm varia entre 4 e 25 como pode ser visto na tabela 1. Aqui, vale notar que, experimentos correspondentes aos pontos axiais no planejamento simplex-centróide dos extratores foram realizados. Os valores das respostas experimentais assim como as condições experimentais utilizadas são mostradas na tabela 9. As repostas presentes na tabela 1 e tabela 9 são apresentadas juntas, de forma esquematizada, na figura

23. Os pontos axiais terão o papel de conjunto de dados para testes de validação dos modelos obtidos.

Tabela 9 – Matriz de planejamento experimental para os solventes extratores (Z) e fases móveis (X) com número de picos observados com detector em 210nm.

	Z(Et)	Z(Ac)	Z(Dc)	X(Met)	X(ACN)	X(MAW)	MP ^a	C210 ^b
50	4/6	1/6	1/6	1	0	0	8	6
51	4/6	1/6	1/6	0	1	0	8	7
52	4/6	1/6	1/6	0	0	1	8	20
53	4/6	1/6	1/6	1/2	1/2	0	8	8
54	4/6	1/6	1/6	1/2	0	1/2	8	19
55	4/6	1/6	1/6	0	1/2	1/2	8	12
56	4/6	1/6	1/6	1/3	1/3	1/3	8	10
57	1/6	4/6	1/6	1	0	0	9	8
58	1/6	4/6	1/6	0	1	0	9	8
59	1/6	4/6	1/6	0	0	1	9	19
60	1/6	4/6	1/6	1/2	1/2	0	9	8
61	1/6	4/6	1/6	1/2	0	1/2	9	17
62	1/6	4/6	1/6	0	1/2	1/2	9	13
63	1/6	4/6	1/6	1/3	1/3	1/3	9	10
64	1/6	1/6	4/6	1	0	0	10	8
65	1/6	1/6	4/6	0	1	0	10	9
66	1/6	1/6	4/6	0	0	1	10	14
67	1/6	1/6	4/6	1/2	1/2	0	10	10
68	1/6	1/6	4/6	1/2	0	1/2	10	19
69	1/6	1/6	4/6	0	1/2	1/2	10	22
70	1/6	1/6	4/6	1/3	1/3	1/3	10	15

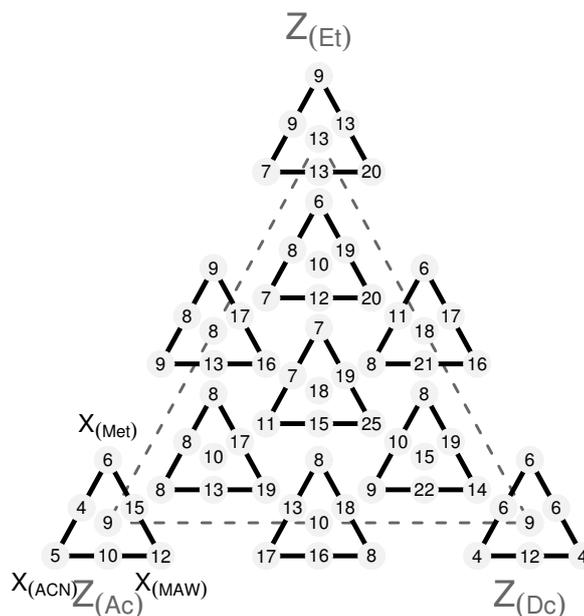


Figura 23 – Número de picos observados com detecção em 210nm. O *main-plot* representa as misturas para extração e o *sub-plot* representando as misturas para as fases móveis.

Primeiramente, o modelo com 49 termos foi determinado e o Apêndice G apresenta todos os valores dos coeficientes dos parâmetros desse modelo. Utilizando esse modelo para a previsão do número de picos para os pontos axiais, resultou em um erro de previsão – RMSEP (*root mean square error of prediction*) – de 2,63.

A figura 24a mostra o gráfico normal para os valores da razão entre os coeficientes do modelo e as raízes quadradas das constantes k_{\dots} das equações de variâncias apropriadas. Esses valores são proporcionais às razões obtidas entre os coeficientes e respectivos erros padrões, isto é, proporcionais às estimativas dos valores de t (t -calculado).

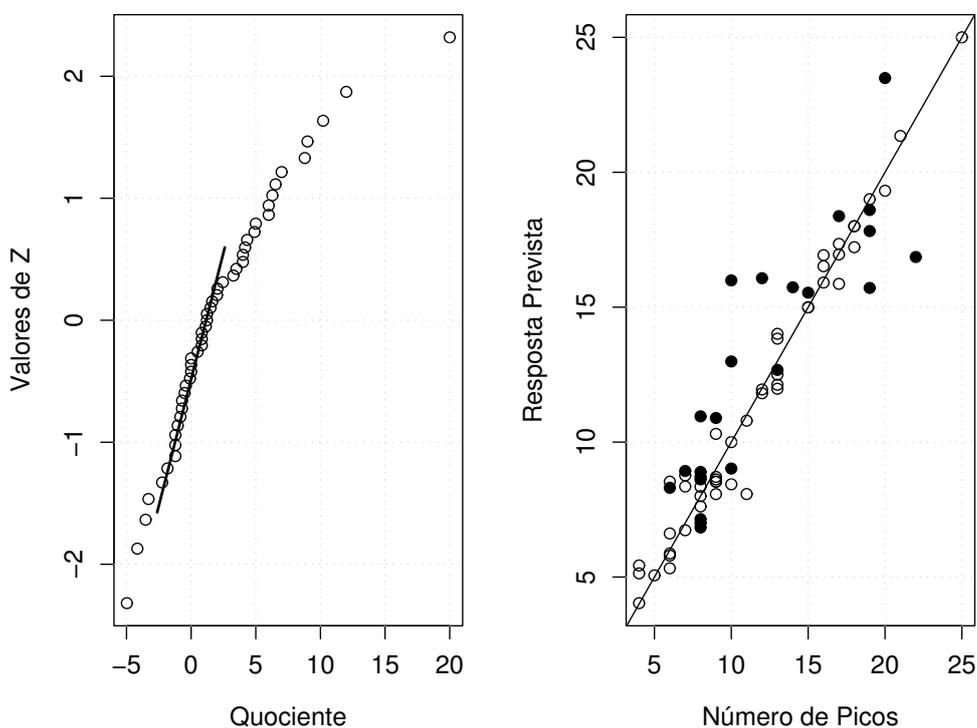


Figura 24 – Gráficos para os dados obtidos com detecção em 210nm, a) gráfico normal dos quocientes entre os coeficientes do modelo e seus respectivos fatores (constantes) para os erros padrões, b) gráfico de respostas observadas (experimentais) versus respostas previstas pelo modelo.

Os pontos que não se ajustam à linha próxima a zero na abscissa são considerados como efeitos potencialmente significativos e assumimos que os demais apenas descrevem erros experimentais. A tabela 10 fornece o modelo

reajustado com somente com os parâmetros significativos, totalizando 22 termos.

Tabela 10 – Modelo saturado e o modelo *split-plot* com 11 termos para o número de picos observados em 210nm.

Parâmetros	Coef. (γ) (modelo com 49 termos)	Quocientes $\left(\frac{g_{\dots}}{\sqrt{k_{\dots}}}\right)$	Coef. (γ) (modelo com 22 termos)	t calculado $\left(\frac{g}{\sqrt{e.p.}}\right)$
x_1z_1	9,0	9,0	9,2	7,9
x_1z_2	6,0	6,0	6,2	5,1
x_1z_3	6,0	6,0	6,9	5,9
x_2z_1	7,0	7,0	8,8	7,6
x_2z_2	5,0	5,0	5,5	4,4
x_2z_3	4,0	4,0	5,4	4,1
x_3z_1	20,0	20,0	19,8	15,8
x_3z_2	12,0	12,0	12,3	9,9
x_3z_3	4,0	4,0	4,3	3,2
$x_2z_2z_3$	50,0	10,2	44,2	7,3
$x_3z_1z_3$	16,0	3,3	13,5	2,1
$x_1x_3z_2$	24,0	4,9	24,7	4,8
$x_2x_3z_3$	32,0	6,5	29,5	5,7
$x_3z_1z_2z_3$	303,0	8,8	326,4	7,7
$x_1x_3z_1z_3$	100,0	4,2	81,9	3,7
$x_1x_3z_2z_3$	104,0	4,3	112,8	4,6
$x_2x_3z_1z_3$	84,0	3,5	94,4	3,9
$x_1x_3z_1z_2z_3$	-594,0	-3,5	-468,4	-2,6
$x_2x_3z_1z_2z_3$	-840,0	-5,0	-861,0	-5,0
$x_1x_2x_3z_1z_2$	-558,0	-3,3	-494,6	-3,6
$x_1x_2x_3z_2z_3$	-702,0	-4,2	-759,7	-4,9
$x_1x_2x_3z_1z_2z_3$	7461,0	6,3	6474,4	5,1

Não há evidência de que informação relevante tenha sido descartada com a eliminação dos outros 27 termos desde que o valor do RMSEP do novo modelo foi 2,61 e sendo muito próximo ao do modelo saturado. O erro de calibração – RMSEC (*root mean square error of calibration*) – foi de 1,23.

Os termos $x_3z_1z_3$ e $x_1x_3z_1z_2z_3$ foram eliminados do modelo final para que somente os coeficientes cujos valores (absolutos) de t -calculados fossem maiores que três. O RMSEC passou a ser 1,38 e o RMSEP, 2,55.

O modelo final é dado por:

$$\begin{aligned}
 \hat{y} = & +9,1 \cdot x_1z_1 + 6,3 \cdot x_1z_2 + 6,9 \cdot x_1z_3 + 8,8 \cdot x_2z_1 + 5,5 \cdot x_2z_2 \\
 & + 5,4 \cdot x_2z_3 + 20,7 \cdot x_3z_1 + 12,1 \cdot x_3z_2 + 5,4 \cdot x_3z_3 + 44,1 \cdot x_2z_2z_3 \\
 & + 23,8 \cdot x_1x_3z_2 + 28,0 \cdot x_2x_3z_3 + 325,6 \cdot x_3z_1z_2z_3 \\
 & + 72,1 \cdot x_1x_3z_1z_3 + 90,3 \cdot x_1x_3z_2z_3 + 105,2 \cdot x_2x_3z_1z_3 \\
 & - 790,3 \cdot x_2x_3z_1z_2z_3 - 710,0 \cdot x_1x_2x_3z_2z_3 \\
 & - 455,6 \cdot x_1x_2x_3z_2z_3 + 5483,7 \cdot x_1x_2x_3z_1z_2z_3
 \end{aligned} \tag{43}$$

A figura 24b mostra o gráfico das repostas previstas versus experimentais. Os círculos brancos correspondem aos experimentos que fizeram parte do conjunto de calibração enquanto que os círculos preenchidos (pretos) representam o conjunto de validação (pontos axiais).

Como pode ser observado pela figura 24b, os pontos referentes ao conjunto de calibração estão dispersos aleatoriamente sobre a linha diagonal (linha que representa 100% de concordância) e assim não evidenciando falta de ajuste. Em contrapartida, os pontos referentes ao conjunto de validação apresentam maior dispersão em volta desta mesma diagonal. O RMSEP apresenta o valor de 2,55 e o RMSEC apresenta o valor de 1,38 e por consequência a razão das variâncias sendo $(2,55)^2/(1,38)^2 = 3,42$. Um valor alto para esta razão pode ser uma indicação de que o modelo necessita de mais parâmetros. As representações das superfícies, do modelo saturado e reduzido, são mostradas nas figuras 25 e 26 a seguir.

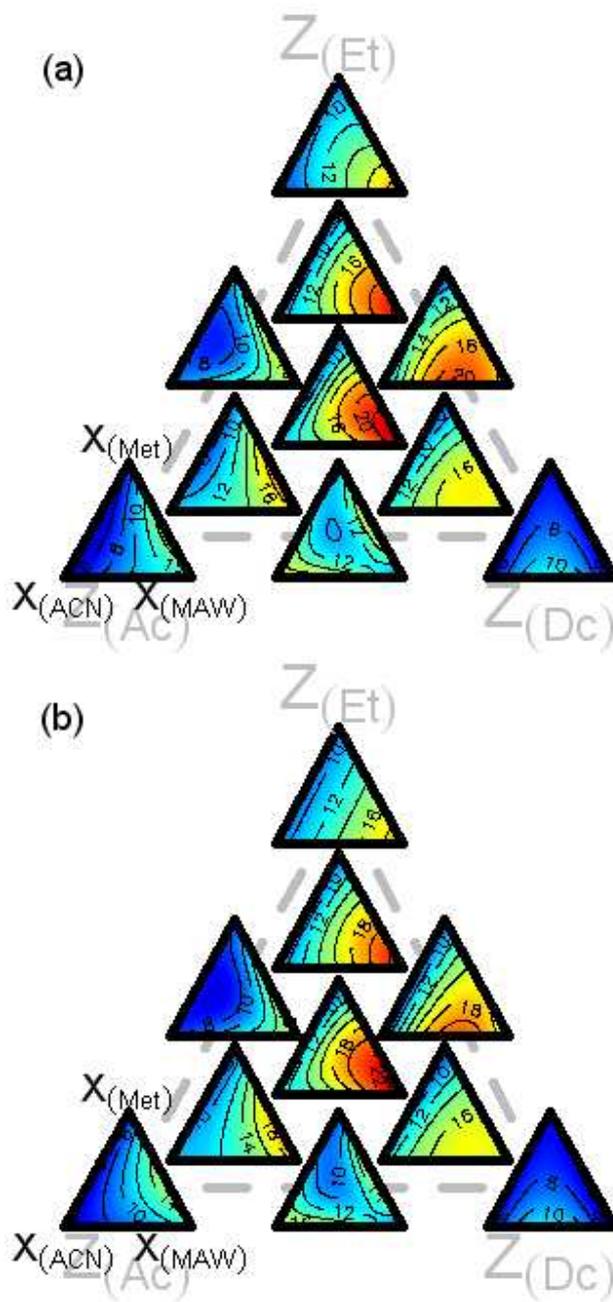


Figura 25 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *main-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.

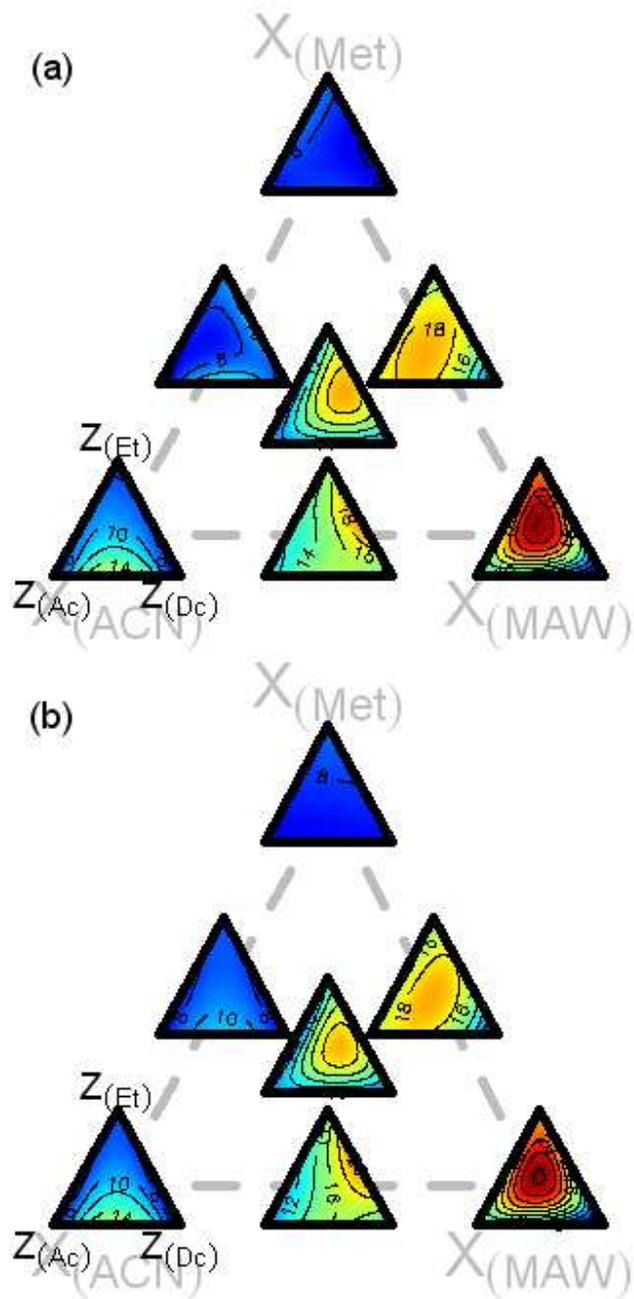


Figura 26 – Superfícies geradas a partir dos modelos para o número de picos a 210nm, mantendo os *sub-plots* fixos: a) modelo saturado; b) modelo com 22 termos.

A tabela 11 mostra os valores previstos utilizando os modelos com 49 termos e com 20 termos.

Tabela 11 – Resposta prevista para o número de picos a 210nm pelo modelo saturado e pelo modelo reduzido com 20 termos

	Resp. Exp.	Resp. Prev. com 49 termos	Resp. Prev. com 20 termos
50	6	7,8	8,2
51	7	8,8	8,9
52	20	23,4	22,8
53	8	8,2	8,6
54	19	17,5	19,1
55	12	15,7	16,3
56	10	16,3	16,1
57	8	7,4	6,8
58	8	11,2	10,9
59	19	18,1	18,4
60	8	7,2	8,9
61	17	18,5	19,6
62	13	13,0	12,9
63	10	12,3	13,2
64	8	6,4	7,2
65	9	10,5	10,9
66	14	15,4	15,1
67	10	8,9	9,0
68	19	15,5	16,7
69	22	16,3	16,9
70	15	15,6	15,6

Embora 29 termos tenham sido retirados do modelo, não há evidência de perda de informação importante dado que o valor do RMSEP para os dois modelos são ainda praticamente os mesmo, 2,63 e 2,55.

Os modelos matemáticos do tipo polinômios de Scheffé, que são os mais comumente empregados para descrever misturas químicas, possuem parâmetros de fácil interpretação física. O significado de alguns deles será descrito a seguir.

Todos os nove termos de interação linear-linear entre os solventes extratores e as fases móveis estão presentes no modelo. Esses termos representam os números de picos obtidos quando somente solventes puros

foram utilizados, tanto para as extrações quanto para as fases móveis. Por exemplo, o termo $20,7 \cdot x_3 z_1$ prevê 20,7 picos com o uso do etanol como solvente extrator (z_1) e com o solvente MAW (x_3) como fase móvel, sendo 20 picos o valor experimental observado. Esses nove termos apresentam boa concordância entre resposta prevista e experimental, sendo:

- $b_1^1 = 9,1(9)$, $b_1^2 = 6,3(6)$, $b_1^3 = 6,9(6)$; $b_2^1 = 8,8(7)$, $b_2^2 = 5,5(5)$, $b_2^3 = 5,4(4)$; $b_3^1 = 20,7(20)$, $b_3^2 = 12,1(12)$, $b_3^3 = 5,5(4)$.

Esses parâmetros mostram a limitação de metanol (x_1) e acetonitrila (x_2) na separação de picos com os três componentes puros para a extração, ao contrário do solvente MAW, especialmente considerando o etanol puro (z_1) como extrator.

O modelo possui o termo quadrático $44,0 \cdot x_2 z_2 z_3$, representando uma sinergia entre os extratores acetato de etila (z_2) e diclorometano (z_3) quando a fase móvel usada é acetonitrila (x_2). Uma mistura 50-50% desses dois solventes de extração acarreta na eluição de 17 (16,5 previsto) picos quando acetonitrila é usada e somente 4 e 5 picos são produzidos (5,5 e 5,4 previstos) para quando esses mesmos extratores são usados puros, isto pode ser comprovado pela figura 23. Esta sinergia não ocorre quando utilizados metanol (x_1) e MAW (x_3), daí conclui-se que metanol e MAW não são capazes de separar a maior parte dos componentes químicos extraídos com a mistura 1:1 de acetato de etila e diclorometano.

O modelo tem duas interações entre termos quadráticos referentes às fases móveis e termos lineares referentes aos extratores. O primeiro termo, $23,8 \cdot x_1 x_3 z_2$, mostra um efeito sinérgico entre a extração com acetato de etila e a fase móvel sendo uma mistura binária 1:1 de metanol e MAW. Metanol e MAW como fases móveis puras, produzem respectivamente, seis e doze picos

no cromatograma, enquanto que a mistura binária 1:1 desses dois componentes produz um aumento do número de picos para quinze. O segundo termo, $28,0 \cdot x_2 x_3 z_3$, representa a sinergia entre acetronila e MAW quando misturadas para compor a fase móvel e diclorometano como solvente extrator. O uso da mistura binária 1:1 resulta em doze picos enquanto que os solventes puros produzem somente quatro picos cada.

Há um efeito cúbico importante para os solventes extratores quando utilizado o solvente MAW na fase móvel e pode ser observado facilmente na figura 26. O termo $325,6 \cdot x_3 z_1 z_2 z_3$, dá uma contribuição importante para a resposta experimental. Para $x_3 = 1$ e $x_1 = x_2 = 0$, a equação simplifica como mostrado abaixo:

$$\hat{y} = +20,7 \cdot z_1 + 12,1 \cdot z_2 + 5,5 \cdot z_3 + 325,6 \cdot z_1 z_2 z_3 \quad (44)$$

Esta equação possui o valor máximo quando os três componentes estão presentes em proporções iguais, isto é, $z_1 = z_2 = z_3 = 1/3$, e com isso $\hat{y} = 24,8$. A resposta prevista possui boa concordância com a resposta experimental que é 25 picos. Essa é a maior resposta como mostrado pela figura 26 e também pela figura 23. O fato pode ser interpretado como a capacidade que a fase móvel MAW tem de separar os compostos químicos extraídos com a mistura ternária dos solventes extratores.

Há três interações do tipo quadrática-quadrática, isto é, quando há sinergia entre as misturas binárias dos solventes de extração e misturas binárias para a fase móvel. O termo $72,1 \cdot x_1 x_3 z_1 z_3$, indica que a sinergia entre metanol (x_1) e MAW (x_3), é considerada forte para a mistura binária 1:1 de etanol (z_1) e diclorometano (z_3) quando comparado com os efeitos dos solventes puros. O mesmo fato pode ser atribuído para a mistura de metanol e MAW quando o

extrator é a mistura de acetato de etila e diclorometano. O termo $90,3 \cdot x_1 x_3 z_2 z_3$, é o que descreve o fato mencionado. Por último, o termo $105,2 \cdot x_2 x_3 z_1 z_2$, representa o efeito de interação quadrático-quadrático entre a mistura de acetonitrila e MAW quando utilizados a mistura de etanol e acetato de etila como solvente extrator.

Em resumo, o modelo prevê que o melhor sistema de extração-separação será próximo àquele com a mistura ternária dos solventes extratores e usando o solvente MAW como fase móvel. A resposta experimental para esta condição é 25 picos enquanto que a resposta prevista é 24,2 confirmando a previsão do modelo. A figura 26 é a descrição gráfica dessa consideração.

5 – Conclusão

- O modelo *double*-Scheffé descreve de maneira adequada sistemas com mais que um tipo de mistura.

O modelo geral, dado a partir da multiplicação dos modelos parciais para as componentes de mistura de extração e componentes de mistura da fase móvel, apresenta fácil interpretação física e mostra-se adequado para essa aplicação química, podendo ser estendido a aplicações similares onde somente misturas sejam consideradas.

- O modelo evidencia os vários efeitos sinérgicos e antagônicos que podem ocorrer no sistema sob estudo.

Sistemas que possuem interações entre as componentes das misturas devem apresentar modelos com termos cujos coeficientes podem ser interpretados como efeitos de interação sinérgica ou antagônica que contribuem para os valores das respostas.

- A modelagem estatística, dos experimentos sem replicações é viável usando gráficos normais.

O uso de gráficos normais permitiu determinar quais os coeficientes com maior relevância para o modelo, isto é, conseguiu destacar os principais efeitos causados pelas diferentes condições experimentais. A utilização de tais gráficos substituiu as replicações, evitando a realização de grande número de experimentos e captando as informações mais importantes do sistema.

- Considerar a estrutura *split-plot* do planejamento é estatisticamente mais rigoroso.

O tratamento estatístico adequado é feito com a aplicação da teoria de modelo misto. Isso é devido ao fato de que são os modelos lineares mistos que permitem incorporar duas ou mais fontes de variância na modelagem estatística dos experimentos.

Vale ressaltar que a diferença dos modelos lineares mistos para os modelos lineares ordinários pode ser evidenciada na comparação entre os seguintes valores: 1) dos coeficientes dos parâmetros do modelo; 2) dos erros padrões desses coeficientes e 3) dos intervalos de confiança para os parâmetros. Ainda que os experimentos tivessem sido analisados como se fossem realizados em ordem completamente aleatória e pudéssemos chegar a modelos matemáticos similares, haveria grande diferença na inferência estatística a partir deles. Essa discrepância será governada pela magnitude de σ_z^2 e também pelos graus de liberdade em cada caso.

Apêndices

Apêndice A – Cromatogramas típicos.

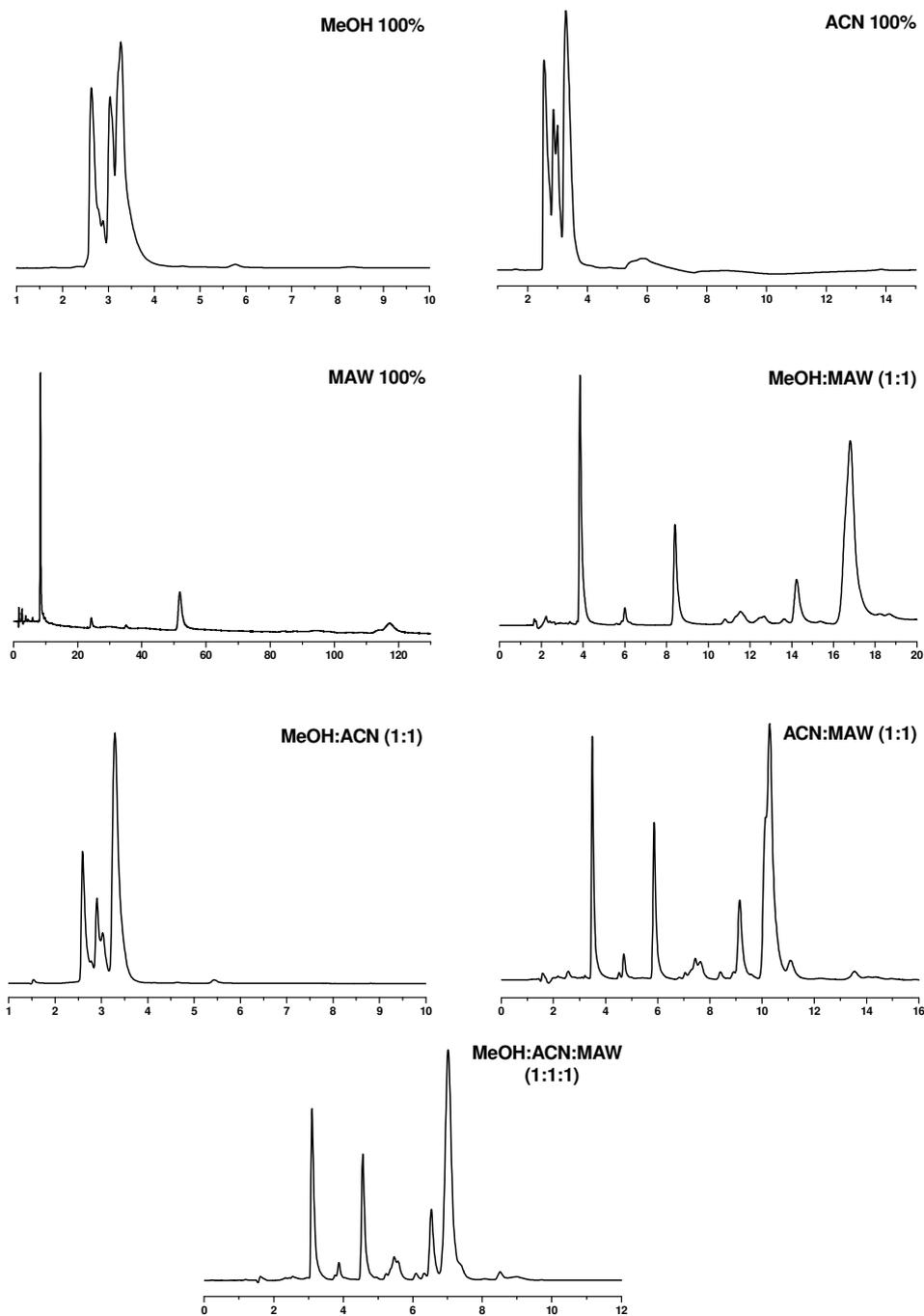


Figura 27 – Cromatogramas do extrato da *B. milleflora* preparado em mistura ternária etanol:diclorometano:MAW (1:1:1), com 7 diferentes fases móveis.

Apêndice B – Modelo saturado – *B. Milleflora*-254nm.

Tabela 12 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 254nm – *B.Milfefflora*.

Parâmetros	Coef.	k	Coef. / \sqrt{k}
x1:z1	6,00	1,00	6,00
x1:z2	2,00	1,00	2,00
x1:z3	4,00	1,00	4,00
x2:z1	3,00	1,00	3,00
x2:z2	2,00	1,00	2,00
x2:z3	3,00	1,00	3,00
x3:z1	12,00	1,00	12,00
x3:z2	17,00	1,00	17,00
x3:z3	2,00	1,00	2,00
x1:z1:z2	4,00	24,00	0,82
x1:z1:z3	-0,00	24,00	-0,00
x1:z2:z3	-4,00	24,00	-0,82
x2:z1:z2	2,00	24,00	0,41
x2:z1:z3	4,00	24,00	0,82
x2:z2:z3	2,00	24,00	0,41
x1:x2:z1	2,00	24,00	0,41
x1:x2:z2	60,00	24,00	12,25
x1:x2:z3	-2,00	24,00	-0,41
x3:z1:z2	18,00	24,00	3,67
x3:z1:z3	4,00	24,00	0,82
x3:z2:z3	-2,00	24,00	-0,41
x1:x3:z1	-16,00	24,00	-3,27
x1:x3:z2	-26,00	24,00	-5,31
x1:x3:z3	-4,00	24,00	-0,82
x2:x3:z1	-2,00	24,00	-0,41
x2:x3:z2	26,00	24,00	5,31
x2:x3:z3	30,00	24,00	6,12
x1:z1:z2:z3	27,00	1188,00	0,78
x2:z1:z2:z3	-42,00	1188,00	-1,22
x1:x2:z1:z2	-12,00	576,00	-0,50
x1:x2:z1:z3	72,00	576,00	3,00
x1:x2:z2:z3	4,00	576,00	0,17
x3:z1:z2:z3	147,00	1188,00	4,26
x1:x3:z1:z2	-44,00	576,00	-1,83
x1:x3:z1:z3	0,00	576,00	0,00
x1:x3:z2:z3	36,00	576,00	1,50
x2:x3:z1:z2	16,00	576,00	0,67
x2:x3:z1:z3	-56,00	576,00	-2,33
x2:x3:z2:z3	64,00	576,00	2,67
x1:x2:x3:z1	75,00	1188,00	2,18
x1:x2:x3:z2	-72,00	1188,00	-2,09
x1:x2:x3:z3	90,00	1188,00	2,61
x1:x2:z1:z2:z3	294,00	28512,00	1,74
x1:x3:z1:z2:z3	-264,00	28512,00	-1,56
x2:x3:z1:z2:z3	90,00	28512,00	0,53
x1:x2:x3:z1:z2	66,00	28512,00	0,39
x1:x2:x3:z1:z3	906,00	28512,00	5,37
x1:x2:x3:z2:z3	-276,00	28512,00	-1,63
x1:x2:x3:z1:z2:z3	-2439,01	1411344,00	-2,05

Apêndice C – Modelo saturado – *B. Milleflora*-210nm.

Tabela 13 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 210nm – *B.Milleflora*

Parâmetros	Coef.	k	Coef. / \sqrt{k}
x1:z1	12,00	1,00	12,00
x1:z2	7,00	1,00	7,00
x1:z3	10,00	1,00	10,00
x2:z1	7,00	1,00	7,00
x2:z2	8,00	1,00	8,00
x2:z3	3,00	1,00	3,00
x3:z1	11,00	1,00	11,00
x3:z2	14,00	1,00	14,00
x3:z3	5,00	1,00	5,00
x1:z1:z2	26,00	24,00	5,31
x1:z1:z3	20,00	24,00	4,08
x1:z2:z3	-18,00	24,00	-3,67
x2:z1:z2	6,00	24,00	1,22
x2:z1:z3	20,00	24,00	4,08
x2:z2:z3	18,00	24,00	3,67
x1:x2:z1	-6,00	24,00	-1,22
x1:x2:z2	10,00	24,00	2,04
x1:x2:z3	2,00	24,00	0,41
x3:z1:z2	18,00	24,00	3,67
x3:z1:z3	0,00	24,00	0,00
x3:z2:z3	6,00	24,00	1,22
x1:x3:z1	-2,00	24,00	-0,41
x1:x3:z2	22,00	24,00	4,49
x1:x3:z3	26,00	24,00	5,31
x2:x3:z1	-4,00	24,00	-0,82
x2:x3:z2	16,00	24,00	3,27
x2:x3:z3	56,00	24,00	11,43
x1:z1:z2:z3	-45,06	1188,00	-1,31
x2:z1:z2:z3	-48,18	1188,00	-1,40
x1:x2:z1:z2	-48,00	576,00	-2,00
x1:x2:z1:z3	-40,00	576,00	-1,67
x1:x2:z2:z3	40,00	576,00	1,67
x3:z1:z2:z3	208,32	1188,00	6,04
x1:x3:z1:z2	-32,00	576,00	-1,33
x1:x3:z1:z3	-32,00	576,00	-1,33
x1:x3:z2:z3	88,00	576,00	3,67
x2:x3:z1:z2	-24,00	576,00	-1,00
x2:x3:z1:z3	-40,00	576,00	-1,67
x2:x3:z2:z3	-40,00	576,00	-1,67
x1:x2:x3:z1	94,80	1188,00	2,75
x1:x2:x3:z2	5,64	1188,00	0,16
x1:x2:x3:z3	25,39	1188,00	0,74
x1:x2:z1:z2:z3	-20,95	28512,00	-0,12
x1:x3:z1:z2:z3	-105,56	28512,00	-0,63
x2:x3:z1:z2:z3	-364,93	28512,00	-2,16
x1:x2:x3:z1:z2	-199,64	28512,00	-1,18
x1:x2:x3:z1:z3	306,00	28512,00	1,81
x1:x2:x3:z2:z3	-933,95	28512,00	-5,53
x1:x2:x3:z1:z2:z3	2845,84	1411344,00	2,40

Apêndice D – Modelo saturado – *B. Trimera*-254nm.

Tabela 14 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 254nm – *B. Trimera*

Parâmetros	Coef.	k	Coef./ \sqrt{k}
x1:z1	4,00	1,00	4,00
x1:z2	2,00	1,00	2,00
x1:z3	4,00	1,00	4,00
x2:z1	2,00	1,00	2,00
x2:z2	2,00	1,00	2,00
x2:z3	2,00	1,00	2,00
x3:z1	7,00	1,00	7,00
x3:z2	14,00	1,00	14,00
x3:z3	1,00	1,00	1,00
x1:z1:z2	4,00	24,00	0,82
x1:z1:z3	-4,00	24,00	-0,82
x1:z2:z3	0,00	24,00	0,00
x2:z1:z2	8,00	24,00	1,63
x2:z1:z3	12,00	24,00	2,45
x2:z2:z3	4,00	24,00	0,82
x1:x2:z1	4,00	24,00	0,82
x1:x2:z2	4,00	24,00	0,82
x1:x2:z3	4,00	24,00	0,82
x3:z1:z2	22,00	24,00	4,49
x3:z1:z3	8,00	24,00	1,63
x3:z2:z3	10,00	24,00	2,04
x1:x3:z1	2,00	24,00	0,41
x1:x3:z2	4,00	24,00	0,82
x1:x3:z3	10,00	24,00	2,04
x2:x3:z1	6,00	24,00	1,22
x2:x3:z2	32,00	24,00	6,53
x2:x3:z3	26,00	24,00	5,31
x1:z1:z2:z3	18,00	1188,00	0,52
x2:z1:z2:z3	-18,00	1188,00	-0,52
x1:x2:z1:z2	-16,00	576,00	-0,67
x1:x2:z1:z3	0,00	576,00	0,00
x1:x2:z2:z3	-16,00	576,00	-0,67
x3:z1:z2:z3	222,01	1188,00	6,44
x1:x3:z1:z2	100,00	576,00	4,17
x1:x3:z1:z3	48,00	576,00	2,00
x1:x3:z2:z3	12,00	576,00	0,50
x2:x3:z1:z2	-44,00	576,00	-1,83
x2:x3:z1:z3	88,00	576,00	3,67
x2:x3:z2:z3	68,00	576,00	2,83
x1:x2:x3:z1	-99,00	1188,00	-2,87
x1:x2:x3:z2	96,01	1188,00	2,79
x1:x2:x3:z3	33,00	1188,00	0,96
x1:x2:z1:z2:z3	-12,00	28512,00	-0,07
x1:x3:z1:z2:z3	-516,00	28512,00	-3,06
x2:x3:z1:z2:z3	-372,00	28512,00	-2,20
x1:x2:x3:z1:z2	-426,01	28512,00	-2,52
x1:x2:x3:z1:z3	528,03	28512,00	3,13
x1:x2:x3:z2:z3	6,01	28512,00	0,04
x1:x2:x3:z1:z2:z3	-1323,10	1411344,00	-1,11

Apêndice E – Modelo saturado – *B. Trimer*-210nm.

Tabela 15 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 210nm – *B. Trimer*

Parâmetros	Coef.	k	Coef. / \sqrt{k}
x1:z1	12,00	1,00	12,00
x1:z2	7,00	1,00	7,00
x1:z3	11,00	1,00	11,00
x2:z1	4,00	1,00	4,00
x2:z2	6,00	1,00	6,00
x2:z3	12,00	1,00	12,00
x3:z1	11,00	1,00	11,00
x3:z2	13,00	1,00	13,00
x3:z3	5,00	1,00	5,00
x1:z1:z2	-14,00	24,00	-2,86
x1:z1:z3	-26,00	24,00	-5,31
x1:z2:z3	-8,00	24,00	-1,63
x2:z1:z2	8,00	24,00	1,63
x2:z1:z3	8,00	24,00	1,63
x2:z2:z3	8,00	24,00	1,63
x1:x2:z1	-4,00	24,00	-0,82
x1:x2:z2	6,00	24,00	1,22
x1:x2:z3	2,00	24,00	0,41
x3:z1:z2	16,00	24,00	3,27
x3:z1:z3	0,00	24,00	0,00
x3:z2:z3	28,00	24,00	5,72
x1:x3:z1	-22,00	24,00	-4,49
x1:x3:z2	16,00	24,00	3,27
x1:x3:z3	4,00	24,00	0,82
x2:x3:z1	-2,00	24,00	-0,41
x2:x3:z2	22,00	24,00	4,49
x2:x3:z3	18,00	24,00	3,67
x1:z1:z2:z3	117,00	1188,00	3,39
x2:z1:z2:z3	0,00	1188,00	0,00
x1:x2:z1:z2	20,00	576,00	0,83
x1:x2:z1:z3	76,00	576,00	3,17
x1:x2:z2:z3	-16,00	576,00	-0,67
x3:z1:z2:z3	93,00	1188,00	2,70
x1:x3:z1:z2	140,00	576,00	5,83
x1:x3:z1:z3	220,00	576,00	9,17
x1:x3:z2:z3	48,00	576,00	2,00
x2:x3:z1:z2	0,00	576,00	0,00
x2:x3:z1:z3	208,00	576,00	8,67
x2:x3:z2:z3	-8,00	576,00	-0,33
x1:x2:x3:z1	-78,00	1188,00	-2,26
x1:x2:x3:z2	39,00	1188,00	1,13
x1:x2:x3:z3	-54,00	1188,00	-1,57
x1:x2:z1:z2:z3	-330,00	28512,00	-1,95
x1:x3:z1:z2:z3	-828,00	28512,00	-4,90
x2:x3:z1:z2:z3	-834,00	28512,00	-4,94
x1:x2:x3:z1:z2	-570,00	28512,00	-3,38
x1:x2:x3:z1:z3	-648,00	28512,00	-3,84
x1:x2:x3:z2:z3	-378,00	28512,00	-2,24
x1:x2:x3:z1:z2:z3	1898,99	1411344,00	1,60

Apêndice F – Modelo saturado – *C. Sinensis*-254nm.

Tabela 16 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 254nm – *C.Sinensis*

Parâmetros	Coef.	k	Coef. / \sqrt{k}
x1:z1	2,00	1,00	2,00
x1:z2	1,00	1,00	1,00
x1:z3	3,00	1,00	3,00
x2:z1	2,00	1,00	2,00
x2:z2	3,00	1,00	3,00
x2:z3	1,00	1,00	1,00
x3:z1	16,00	1,00	16,00
x3:z2	9,00	1,00	9,00
x3:z3	1,00	1,00	1,00
x1:z1:z2	2,00	24,00	0,41
x1:z1:z3	-2,00	24,00	-0,41
x1:z2:z3	4,00	24,00	0,82
x2:z1:z2	6,00	24,00	1,22
x2:z1:z3	6,00	24,00	1,22
x2:z2:z3	12,00	24,00	2,45
x1:x2:z1	4,00	24,00	0,82
x1:x2:z2	4,00	24,00	0,82
x1:x2:z3	4,00	24,00	0,82
x3:z1:z2	14,00	24,00	2,86
x3:z1:z3	6,00	24,00	1,22
x3:z2:z3	8,00	24,00	1,63
x1:x3:z1	-4,00	24,00	-0,82
x1:x3:z2	4,00	24,00	0,82
x1:x3:z3	-0,00	24,00	-0,00
x2:x3:z1	20,00	24,00	4,08
x2:x3:z2	-4,00	24,00	-0,82
x2:x3:z3	8,00	24,00	1,63
x1:z1:z2:z3	-12,00	1188,00	-0,35
x2:z1:z2:z3	-45,00	1188,00	-1,31
x1:x2:z1:z2	-16,00	576,00	-0,67
x1:x2:z1:z3	-8,00	576,00	-0,33
x1:x2:z2:z3	-16,00	576,00	-0,67
x3:z1:z2:z3	87,00	1188,00	2,52
x1:x3:z1:z2	16,00	576,00	0,67
x1:x3:z1:z3	56,00	576,00	2,33
x1:x3:z2:z3	72,00	576,00	3,00
x2:x3:z1:z2	32,00	576,00	1,33
x2:x3:z1:z3	112,00	576,00	4,67
x2:x3:z2:z3	72,00	576,00	3,00
x1:x2:x3:z1	138,00	1188,00	4,00
x1:x2:x3:z2	87,00	1188,00	2,52
x1:x2:x3:z3	27,00	1188,00	0,78
x1:x2:z1:z2:z3	66,00	28512,00	0,39
x1:x3:z1:z2:z3	486,00	28512,00	2,88
x2:x3:z1:z2:z3	-432,00	28512,00	-2,56
x1:x2:x3:z1:z2	-726,00	28512,00	-4,30
x1:x2:x3:z1:z3	78,00	28512,00	0,46
x1:x2:x3:z2:z3	-708,00	28512,00	-4,19
x1:x2:x3:z1:z2:z3	4392,02	1411344,00	3,70

Apêndice G – Modelo saturado – *C. Sinensis*-210nm.

Tabela 17 – Modelo saturado (49 termos) para o número de picos observados em 210nm – *C.Sinensis*

Parâmetros	Coef.	k	Coef. / \sqrt{k}
x1:z1	8,49	1,00	3,96
x1:z2	6,13	1,00	2,86
x1:z3	6,40	1,00	2,99
x2:z1	6,90	1,00	3,22
x2:z2	4,54	1,00	2,12
x2:z3	3,99	1,00	1,86
x3:z1	19,31	1,00	9,01
x3:z2	12,49	1,00	5,83
x3:z3	3,86	1,00	1,80
x1:z1:z2	5,25	24,00	0,49
x1:z1:z3	-6,20	24,00	-0,57
x1:z2:z3	9,07	24,00	0,84
x2:z1:z2	10,87	24,00	1,01
x2:z1:z3	9,78	24,00	0,91
x2:z2:z3	49,05	24,00	4,55
x1:x2:z1	4,56	24,00	0,50
x1:x2:z2	-4,90	24,00	-0,54
x1:x2:z3	4,01	24,00	0,44
x3:z1:z2	-0,39	24,00	-0,04
x3:z1:z3	14,34	24,00	1,33
x3:z2:z3	0,70	24,00	0,07
x1:x3:z1	-2,84	24,00	-0,31
x1:x3:z2	20,25	24,00	2,24
x1:x3:z3	6,44	24,00	0,71
x2:x3:z1	-4,91	24,00	-0,54
x2:x3:z2	5,45	24,00	0,60
x2:x3:z3	37,99	24,00	4,19
x1:z1:z2:z3	-22,23	1188,00	-0,31
x2:z1:z2:z3	-97,41	1188,00	-1,37
x1:x2:z1:z2	-8,67	576,00	-0,19
x1:x2:z1:z3	49,14	576,00	1,08
x1:x2:z2:z3	14,23	576,00	0,31
x3:z1:z2:z3	282,71	1188,00	3,98
x1:x3:z1:z2	34,83	576,00	0,76
x1:x3:z1:z3	111,20	576,00	2,44
x1:x3:z2:z3	101,38	576,00	2,22
x2:x3:z1:z2	-6,93	576,00	-0,15
x2:x3:z1:z3	90,16	576,00	1,98
x2:x3:z2:z3	-9,11	576,00	-0,20
x1:x2:x3:z1	17,22	1188,00	0,27
x1:x2:x3:z2	-29,42	1188,00	-0,46
x1:x2:x3:z3	-19,87	1188,00	-0,31
x1:x2:z1:z2:z3	-277,41	28512,00	-0,92
x1:x3:z1:z2:z3	-482,82	28512,00	-1,61
x2:x3:z1:z2:z3	-688,23	28512,00	-2,29
x1:x2:x3:z1:z2	-588,40	28512,00	-1,83
x1:x2:x3:z1:z3	-197,31	28512,00	-0,61
x1:x2:x3:z2:z3	-722,58	28512,00	-2,25
x1:x2:x3:z1:z2:z3	5536,59	1411344,00	2,62

Referências

- 1 - G.E.P Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experiments*, Wiley, New York, 1978.
- 2 - R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B.B. Neto, *Statistical Design - Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- 3 - D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, Wiley, New York, 1991.
- 4 - S.M. Kowalski, K.J. Potcner, *Quality Progress*, 36(11), (2003)
- 5 - J.A. Cornell, *J. Qual. Technol.* 20 (1988) 2-23.
- 6 - J. A. Cornell, *J. Qual. Technol.* 22 (1990) 265-276.
- 7 - J. A. Cornell, *J. Qual. Technol.* 27 (1995) 13-33.
- 8 - J. A. Cornell, J. W. Gorman, *J. Qual. Technol.* 16 (1984) 20-38.
- 9 - S. M. Kowalski, J. A. Cornell, G. G. Vining, *Technometrics*, 44 (2002) 72-79.
- 10 - I. Mage, T. Naes, *Chemometr. Intell. Lab. Systems*, 78 (2005) 81-95.
- 11 - C. Reis, J. C. de Andrade, R. E. Bruns, R. C. C. P. Moran, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 269-279.
- 12 - J. A. Bortoloti, R. E. Bruns, J. C. de Andrade, R. K. Vieira, *Chemometr. Intell. Lab. Systems*, 70 (2004) 113-121.
- 13 - C. N. Borges, R. E. Bruns, A. A. Almeida, I. S. Scarminio, *Anal. Chim. Acta* (2007), doi:10.1016/j.aca.2007.02.067.
- 14 - D. P. Lambrakis, *J. R. Stat. Soc. B*30(1), (1968) 123-136.
- 15 - J. A. Cornell, P. J. Ramsey, *Nonlinear Analysis, Theory & Applications*, 30 (1997), 4041-4050.
- 16 - J. A. Cornell, P. J. Ramsey, *Technometrics*, 40 (1998) 48-61.
- 17 - G. Dingstad, B. Egelandstad, T. Naes, *Chemometr. Intell. Lab. Systems*, 66 (2003) 175-190.
- 18 - B. T. Schaneberg, S. Crockett, E. Bedir. I. A. Khan, *Phytochemistry*, 62 (2003) 911-918.
- 19 - F. Gong, Y. Z. Liang, P. S. Xie, F. T. Chau, *J. of Chromatogr. A*, 1002 (2003) 25-40.
- 20 - J. C. Pinheiro, D. M. Bates, *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*, Springer, New York, 2000.
- 21 - W. N. Venables, B. D. Ripley, *Modern Applied Statistics with S*, 4ª edição, Springer, New York, 2002.
- 22 - SAS Institute Inc. *1982 SAS User's Guide Statistics*, 1982 Ed. SAS Institute, Inc., Cary, NC
- 23 - J.A. Cornell, *Experiments with Mixtures: Designs, Models and Analysis of Mixture Data*, 2ª edição, Wiley, New York, 1990.
- 24 - J.A. Bortoloti, C.N. Borges, R.E. Bruns, *Analytica Chimica Acta* 544 (2005) 206-212.
- 25 - R Development Core Team (2006). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- 26 - J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, 2006, *nlme: Linear and nonlinear mixed effects models*, R package version 3.1-79.

27 - L. M. C. Silva, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

28 - A. A. Almeida, *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.