

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica



**“OTIMIZAÇÃO SIMULTÂNEA DE VARIÁVEIS DE PROCESSO E
MISTURA EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA”**

Dissertação de Mestrado

Márcia Cristina Breitzkreitz

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Bruns

Co-orientadora: Prof. Dr^a Isabel Cristina S. F. Jardim

Campinas

Julho/ 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

B747o Breitzkreitz, Márcia Cristina.
Otimização simultânea de variáveis de processo e
mistura em cromatografia líquida de alta eficiência /
Márcia Cristina Breitzkreitz. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientador: Roy Edward Bruns.

Co-orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. CLAE. 2. Planejamento de misturas. 3. Funções de
desejabilidade. 4. Planejamento *split-plot*. I. Bruns, Roy
Edward. II. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes.
III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Instituto de
Química. III. Título.

Dedico esta dissertação aos meus pais,
Balduíno (*in memoriam*) e Olga Breitz,
minhas referências de vida
e ao André, meu Dedé.

AGRADECIMENTOS

É com grande prazer que agradeço a todos que me acompanharam nesta jornada e de maneiras diferentes a tornaram muito agradável.

Primeiramente agradeço a Deus por me dar a vida perfeita, sabedoria e por guiar meu caminho sempre;

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela possibilidade de realizar este trabalho;

Aos meus queridos orientadores, Prof. Bruns e Prof^a Bel, que me receberam de braços abertos e sempre acreditaram em mim, pela orientação, incentivo e atenção sempre presentes não só na minha acadêmica, mas também pessoal e profissional; pela paciência e compreensão ao longo desta jornada;

Aos professores Ivo Milton R. Júnior, Célio Pasquini e Jarbas José R. Rohwedder, que assistiram e guiaram os meus primeiros passos na vida acadêmica;

Aos amigos do LabCrom, Louise, Liane, Laís, Priscila, Vanessa, Alê, Zahra, Thaís, Camila, Anízio e Elias e do laboratório Q³, Cleber, João Bortoloti, João Viçoso, Serginho e Paulo pela amizade tão querida, bons momentos e boas risadas que demos juntos, e em especial à Laís, que me acompanhou nos meus primeiros experimentos;

Ao André, à minha mãe e às sempre amigas Sasá, Denise, Joice, Meri, Dani, pelo amor e presença sempre constantes, pela compreensão e motivação que me empurraram para frente nos momentos difíceis.

A todos vocês, meu muito obrigado, sem vocês eu não teria conseguido.

CURRICULUM VITAE

Formação Acadêmica

I. Mestrado em Química Analítica com ênfase em Planejamento Experimental e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Período: 08/2004 - 07/2007

II. Bacharelado em Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. Período: 03/2000: 07/2004

Atividades Científicas

I. “Determinação de parâmetros de qualidade de óleo diesel empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e técnicas de seleção de variáveis”. Orientador: Prof. Dr. Jarbas J. Rodrigues Rohwedder, Instituto de Química – UNICAMP. Período: 08/2003 - 07/2004. Bolsista FAPESP.

II. “Determinação de parâmetros de qualidade de óleo diesel empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)”. Orientador: Prof. Dr. Jarbas J. Rodrigues Rohwedder, Instituto de Química – UNICAMP. Período: 08/2002 – 07/2003. Bolsista CNPq.

III. “Determinação de enxofre total em óleo diesel empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)”. Orientador: Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Jr., Instituto de Química – UNICAMP. Período: 08/2001- 07/2002. Bolsista SAE

Comunicações em Congressos

I. M.C.Breitkreitz, I.C.S.F. Jardim, R.E. Bruns, *Split-plot design and Derringer's desirability functions for the isocratic chromatographic separation of pesticides*, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry.

II. C. N. Borges, M. C. Breitkreitz, R. E. Bruns, L. M. da C. e 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.

III. M. C. Breitkreitz, F. A. L. Ribeiro, F. D. Barboza, J. A. Martins, *Near infrared spectroscopy and multivariate calibration for quality control of enalapril maleate tablets*, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry.

IV. F. A. L. Ribeiro, F. D. Barboza, A. L. Rosa, M. C. Breitkreitz, J. A. Martins, *Method for Ginsenosides Quantification in Dry extract of ginseng by HPLC-DAD and PARAFAC*, 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry.

V. M.C. Breitkreitz, I.C.S.F. Jardim, R.E. Bruns, *Planejamento split-plot aplicado à otimização das condições de processo em CLAE – FR*, 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

VI. M.C. Breitzkreitz, I.C.S.F. Jardim, R.E. Bruns, *Otimização da seletividade da FM empregada em CLAE através de planejamento de misturas*, 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

VII. M.C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo Jr., J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini, M. U. Lucato, C. U. Davanzo, *Determinação de parâmetros de qualidade de óleo diesel empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR)*, 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

VIII. M.C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo Jr, J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini, H. A. Dantas Filho, G. E. José, M. C. U. Araújo, *Determination of total sulphur in diesel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration* - 11th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, Córdoba, Espanha.

IX. M.C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo Jr, J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini - *Utilização de espectroscopia no infravermelho próximo para a determinação de densidade de óleo diesel combustível*, 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

X. M.C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo Jr, J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini - *Determinação de enxofre total em óleo diesel empregando espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)*, 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Artigos

I. C N. Borges, M. C. Breitzkreitz, R. E. Bruns, L. M. da C. e Silva, Ieda S. Scarminio, *Unreplicated Split-Plot Mixture Designs and Statistical Models for Optimizing Mobile Chromatographic Phase and Extraction Solutions for Fingerprint Searches*, 2007, *Chem. Intell. Lab. Systems* 89 (2007) 82.

II. S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. Silva, W.N.L. Santos, C.M. Quintella, J.M. David, M.C. Breitzkreitz, I.C.S.F. Jardim, B.B. Neto, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J. Chromatogr. A*, 2007, aceito para publicação.

III. M.C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo Jr, J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini, H. A. Dantas Filho, G. E. José, M. C. U. Araújo, Determination of total sulphur in diesel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration, *Analyst*, 128, 1204-1207 (2003).

Atividades Profissionais

I. Coordenadora do grupo de pré-formulação – Projeto FDA, Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas/Grupo E.M.S. Sigma Pharma, desde 04/2007.

II. Pesquisadora/Supervisora Projetos - Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas – IIPF, 12/2005 – 03/2007.

RESUMO

Título: “Otimização simultânea de variáveis de processo e mistura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”

Autora: Márcia Cristina Breitzkreitz

Orientador: Prof. Dr. Roy Edward Bruns

Co-orientadora: Prof. Dr^a Isabel Cristina S. F. Jardim

Palavras-chave: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), planejamento de misturas, planejamento *split-plot*, funções de desejabilidade.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de modelos combinados considerando simultaneamente o tipo de Fase Estacionária (FE) como variável de processo e diferentes composições de Fase Móvel (FM) como variáveis de mistura para descrever a influência de cada uma destas variáveis, bem como a interação entre elas, na separação de diversos compostos presentes em duas amostras: uma mistura de compostos neutros e uma mistura de agrotóxicos. Os experimentos necessários para a determinação dos coeficientes dos modelos foram realizados de acordo com um planejamento *split-plot*, no qual os tipos de FE, C 8 e C 18 foram considerados *main-plots* e as composições de FM, *sub-plots*. Os resultados foram tratados de duas maneiras: de acordo com a estrutura *split-plot* do planejamento e supondo completa aleatorização na realização dos experimentos. Para descrever a qualidade da separação, foi utilizada uma função objetiva e o procedimento de otimização simultânea de várias respostas, descrito por Derringer e Suich, empregando, neste caso, critérios elementares como fator de retenção, resolução e fator de separação como respostas. Os modelos foram avaliados empregando-se Análise da Variância quanto à significância dos tratamentos e falta de ajuste.

Na descrição da qualidade da separação dos compostos nas duas misturas, o procedimento de Derringer e Suich se mostrou superior às funções objetivas, pois permitiu a construção de modelos tendo como respostas parâmetros cromatográficos, os quais são, de fato, funções da composição da FM e da FE. Estes modelos, quando combinados através da desejabilidade global, permitiram que as condições para a melhor separação de todos os compostos em cada mistura fossem alcançadas, sem perda de informações sobre a separação individual dos pares de picos. Todos os modelos apresentaram capacidade preditiva para as respostas avaliadas – fatores de retenção/resolução/fatores de retenção relativos - nas duas misturas, sem ou com pequena falta de ajuste. Embora todos os planejamentos tenham sido realizados de acordo com um procedimento *split-plot*, não foram verificadas diferenças nos valores dos erros dos coeficientes dos modelos matemáticos nos cálculos *split-plot* e supondo completa aleatorização e isto se deveu ao fato do erro *main-plot* ter sido muito menor que o erro *sub-plot*.

ABSTRACT

Title: “Optimization of process and mixture variables in High Performance Liquid Chromatography”

Author: Márcia Cristina Breitzkreitz

Advisor: Prof. Dr. Roy Edward Bruns

Co-advisor: Prof. Dr^a Isabel Cristina S. F. Jardim

Key words: High Performance Liquid Chromatography (HPLC), mixture design, split-plot design, desirability functions.

The aim of this work was to develop combined statistical models including the stationary phase (SP) as process variables and different compositions of the mobile phase (MP) as mixture variables in order to describe the influence of each type of variable as well as their interactions for the separation of compounds in two samples sets: one containing ten neutral compounds and another containing eleven pesticides. The experiments required to determine the coefficients of the models were carried out according to a *split-plot* approach, in which the stationary phases, C 8 or C 18 were considered as *main-plots* and the mobile phase compositions as *sub-plots*. The results were treated according to the *split-plot* approach and also supposing a completely random setup. The results provided by an objective function were compared to those obtained by Derringer's desirability functions constructed with simple chromatographic criteria such as resolution and relative retention factors as responses. The models were evaluated by means of Analysis of Variance, regarding regression significance and lack of fit.

In order to describe the quality of the separation of the compounds in the two mixtures, the desirability procedure was preferred over the objective functions because the responses used in the latter were, in fact, functions of the stationary and mobile phases. The models combined into a global desirability function allowed the best conditions to the separation of all compounds to be found, without loss of information on the individual peak separation. All models presented predictive capabilities for the responses evaluated with none or little lack of fit. Although the experiments were carried out according to a *split-plot* approach, no significant differences were found in coefficient errors comparing to the complete random approach, which can be explained based on the low *main-plot* error.

INDICE

Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Figuras.....	xix

CAPÍTULO 1: Introdução

1.1 Planejamento e Otimização Experimental.....	3
1.1.1 Modelos de regressão.....	4
1.1.2 Aleatorização completa vs procedimento <i>split-plot</i>	6
1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	13
1.2.1 Fatores que podem ser otimizados em CLAE	17
1.3 Otimização de sistemas cromatográficos.....	22
1.3.1 Seleção da resposta.....	23
1.4 Objetivos do Trabalho.....	33

CAPÍTULO 2: Procedimento Experimental..... 35

CAPÍTULO 3: Resultados e Discussão

3.1 Descrição da estratégia de otimização.....	45
3.2 Determinação da força cromatográfica ideal.....	46
3.3 Determinação das composições de fase móvel do planejamento.....	51
3.4 Experimentos iniciais para determinação dos níveis dos fatores	
3.4.1 Domínio experimental de misturas.....	53

3.4.2 Vazão da fase móvel.....	54
3.4.3 Temperatura.....	57
3.5 Resultados empregando somatório das resoluções como resposta.....	59
3.6 Resultados empregando critérios elementares como respostas	
3.6.1 Fator de retenção (k).....	64
3.6.2 Resolução (R_s).....	75
3.6.3 Retenção relativa.....	86
CAPÍTULO 4: Conclusões.....	93
Referências Bibliográficas.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Análise da Variância para planejamentos nos quais os experimentos foram realizados em completa ordem aleatória.....	9
Tabela II: Análise da Variância para planejamentos nos quais os experimentos foram realizados de acordo como procedimento <i>split-plot</i>	12
Tabela III: Constituintes da mistura teste.....	40
Tabela IV: Proporção das variáveis originais X_{ACN} , X_{MeOH} e X_{THF} , pseudocomponentes e volumes dos solventes acetonitrila, metanol, tetraidrofurano e água correspondentes aos pontos do planejamento simplex-centróide empregado para separação dos constituintes da mistura teste.....	55
Tabela V: Valores observados experimentalmente e preditos pelo modelo quadrático para o somatório das resoluções dos compostos da mistura teste nas composições de FM descritas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV), vazões de FM 0,3 e 1,0 mL/min e coluna C 18	56
Tabela VI: Valores observados do somatório das resoluções dos constituintes da mistura teste, nos dez pontos do planejamento simplex-centróide com as composições de FM descritas na Tabela IV nas colunas C 8 e C 18.....	59
Tabela VII: ANOVA para o modelo combinado construído empregando-se o somatório das resoluções dos constituintes da mistura teste como resposta, supondo completa aleatorização na realização dos experimentos.....	60
Tabela VIII: Coeficientes do modelo combinado, erros padrão e intervalos de 95 % de confiança obtidos empregando-se o somatório das resoluções dos constituintes da mistura teste como resposta.....	61
Tabela IX: Resumo da Análise da variância <i>split-plot</i> considerando a significância dos tratamentos <i>main-plot</i> , <i>sub-plot</i> e interação <i>main-sub-plot</i> e falta de ajuste para todos os modelos combinados empregando os fatores de retenção dos constituintes da mistura teste como respostas.....	65
Tabela X: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a retenção dos compostos de interesse da mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 8.....	69
Tabela XI: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a retenção dos compostos de interesse da mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 18.....	69
Tabela XII: Coeficientes significativos dos modelos combinados empregando como resposta a retenção dos compostos de interesse da mistura teste.....	70

Tabela XIII: Estimativa dos erros dos coeficientes para modelos empregando retenção como resposta, para um composto pouco retido (benzonitrila), com retenção intermediária (benzeno) e muito retido (naftaleno), supondo completa aleatorização e procedimento <i>split-plot</i>	70
Tabela XIV: Resumo da análise da variância considerando a significância estatística da regressão e falta de ajuste dos modelos combinados construídos empregando-se os fatores de retenção dos constituintes da mistura de agrotóxicos como resposta.....	72
Tabela XV: Resumo da análise da variância considerando a significância estatística da regressão e falta de ajuste dos modelos combinados construídos empregando-se a resolução entre os pares de picos de interesse da mistura teste como resposta.....	77
Tabela XVI: Coeficientes significativos dos modelos combinados construídos empregando-se a resolução entre os compostos de interesse da mistura teste como resposta.....	77
Tabela XVII: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a resolução dos compostos de interesse da mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 8.....	79
Tabela XVIII: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a resolução dos compostos de interesse da mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 18.....	79
Tabela XIX: Resumo da análise da variância considerando a significância estatística da regressão e falta de ajuste dos modelos combinados construídos empregando-se a retenção relativa dos constituintes da mistura de agrotóxicos como resposta.....	86
Tabela XX: Coeficientes significativos dos modelos combinados empregando-se a retenção relativa dos compostos de interesse da mistura de agrotóxicos como resposta.....	87
Tabela XXI: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a retenção relativa dos compostos de interesse da mistura de agrotóxicos nas composições de FM correspondentes aos pontos 8, 9 e 10 na coluna C 8.....	89
Tabela XXII: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para os fatores de retenção relativos dos compostos de interesse da mistura de agrotóxicos nas composições de FM correspondentes aos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 18.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Triângulo de seletividade dos solventes que podem ser utilizados em Cromatografia Líquida, de acordo com Snyder.....	19
Figura 2: Curva de van Deemter.....	21
Figura 3: Ilustração do cálculo do parâmetro (f/g) em um cromatograma.....	24
Figura 4: Funções de desejabilidade lineares unilaterais para A) maximização e B) minimização.....	29
Figura 5: Funções de desejabilidade bilaterais para A) alvo entre dois valores e B) alvo em um intervalo.....	30
Figura 6: Funções de desejabilidade unilaterais não lineares.....	31
Figura 7: Funções de desejabilidade bilaterais não lineares.....	32
Figura 8: Representação de um planejamento para determinação de coeficientes de modelos contendo variáveis de processo e mistura: planejamento simplex-centróide para misturas embutido em um planejamento fatorial 2^3	46
Figura 9: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, FM ACN :H ₂ O 55:45 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm, temperatura 25 °C.....	48
Figura 10: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, FM MeOH :H ₂ O 70:30 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm, temperatura 25 °C.....	48
Figura 11: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, FM THF :H ₂ O 50:50 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm, temperatura 25 °C.....	49
Figura 12: Cromatograma obtido na separação de onze agrotóxicos empregando coluna C 18, FM ACN :H ₂ O 30:70 (v/v), pH = 3,0, vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C	50
Figura 13: Cromatograma obtido na separação de onze agrotóxicos empregando coluna C 18, FM MeOH :H ₂ O 45:55 (v/v), pH = 3,0, vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C.....	50
Figura 14: Cromatograma obtido na separação de onze agrotóxicos empregando coluna C 18, FM THF :H ₂ O 30:70 (v/v), pH = 3,0, vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C.....	51

Figura 15: Planejamento simplex-centróide utilizado para a determinação das composições de FM a serem utilizadas para otimização da separação dos compostos na mistura teste e na mistura de agrotóxicos.....	52
Figura 16: Curvas de van Deemter para as colunas C 8 e C 18 utilizadas neste trabalho.....	54
Figura 17: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, FM ACN:H ₂ O 55:45 (v/v), vazão de FM 0,3 mL/min (A) e 1,0 mL/min (B), detecção 254 nm e temperatura 25 °C....	57
Figura 18: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, FM ACN:H ₂ O 55:45 (v/v), vazão de FM 1,0 mL/min, detecção 254 nm, temperatura 25 °C (A) e 45 °C (B).....	58
Figura 19: Gráficos de diagnóstico do modelo combinado construído empregando o somatório das resoluções dos compostos da mistura teste como resposta: gráfico de resíduos vs valores preditos (A) e gráficos de valores preditos vs valores observados (B).....	61
Figura 20: Mapas de contorno para o somatório das resoluções dos compostos da mistura teste, nas colunas C 8 (A) e C 18 (B).....	63
Figura 21: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, FM ACN:THF:H ₂ O 41:13:46 (v/v/v) (A), ACN:MeOH:THF:H ₂ O 37:12:8:43 (v/v/v/v) (B) e ACN:MeOH:THF:H ₂ O 32: 6:17:45 (v/v/v/v) (C), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm e temperatura 25 °C.....	64
Figura 22: Gráficos de fatores de retenção ao longo dos pontos do planejamento para benzonitrila (A) e naftaleno (B).....	66
Figura 23: Gráficos de valores preditos vs valores observados para os fatores de retenção dos compostos de interesse na mistura teste.....	69
Figura 24: Gráficos de valores preditos vs valores observados para os fatores de retenção dos compostos de interesse na mistura de agrotóxicos.....	74
Figura 25: Gráficos de resolução vs quantidades de cada solvente na FM para os pares de compostos de interesse na mistura teste, nas colunas C 8 e C 18.....	76
Figura 26: Gráficos de valores preditos vs valores observados para a resolução dos compostos de interesse na mistura teste.....	78
Figura 27: Mapas de contorno para a resolução entre os pares de compostos de interesse na mistura teste, nas colunas C 8 (A) e C 18 (B).....	80

Figura 28: Mapas de contorno para a função de desejabilidade global, obtida pela média geométrica das funções de desejabilidade individuais para a resolução dos compostos de interesse da mistura teste, na coluna C 18..... 82

Figura 29: Condições experimentais que fornecem valores de resolução dentro da faixa estipulada pelas funções de desejabilidade individuais – faixa de valores desejáveis entre 1,5 e 4,5 - e gráficos das funções de desejabilidade individuais com os valores preditos pelos modelos.....83

Figura 30: Condições experimentais que fornecem valores de resolução próximos ao alvo imposto ($R = 1,5$) pelas funções de desejabilidade individuais e gráficos das funções de desejabilidade individuais com os valores preditos pelos modelos..... 84

Figura 31: Mapa de contorno resultante da sobreposição de mapas de contorno individuais construídos empregando a resolução entre os pares de compostos de interesse da mistura teste na coluna C 18 como resposta..... 85

Figura 32: Gráficos de valores preditos vs valores observados para os fatores de retenção relativos dos compostos da mistura de agrotóxicos..... 88

Figura 33: Mapas de contorno para a função de desejabilidade global, obtida pela média geométrica das funções de desejabilidade individuais para os fatores de retenção relativos dos compostos de interesse da mistura de agrotóxicos, na coluna C 18..... 90

Figura 34: Cromatograma obtido na separação dos agrotóxicos de interesse empregando coluna C 8, volume de injeção 10 μ L, FM ACN:THF H₂O 15:15:70 (v/v/v), pH = 3,0, vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm e temperatura 25 °C..... 91

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Planejamento e Otimização experimental

Em qualquer área de pesquisa, sempre é interessante conhecer quais são as variáveis que afetam o sistema em estudo e a extensão desta influência, a fim de melhorar o processo de uma maneira geral, reduzir tempo e custos. O planejamento de experimentos é uma técnica de otimização multivariada que vem se tornando cada vez mais comum em laboratórios de química e engenharia química, de alimentos, fármacos entre outros. Dentre as razões deste sucesso, pode-se citar:

- Interações entre variáveis somente podem ser descobertas empregando métodos multivariados: o método clássico é univariado e assim, cada fator é otimizado de forma independente. Os experimentos são realizados mantendo-se todas as variáveis (fatores) constantes em determinados valores (níveis), variando-se apenas o nível de um determinado fator. Seguindo o mesmo procedimento, os níveis dos outros fatores são variados um de cada vez, até que o melhor resultado seja encontrado. O problema com este procedimento é que o valor ótimo de um fator pode depender dos níveis dos demais, ou seja, podem existir interações entre eles, que somente serão descobertas empregando métodos multivariados;
- Os parâmetros calculados para modelos multivariados são mais precisos do que medidas individuais utilizadas para construir um modelo matemático que descreva o sistema químico em estudo. Esta constatação é baseada no Teorema do Limite Central, o qual comprova que o erro no valor médio é menor que o erro de uma observação individual. Como os parâmetros de um modelo multivariado, chamados *efeitos*, são diferenças entre médias, estes serão mais precisos que as observações individuais;
- Otimizações multivariadas permitem ao pesquisador sistematizar seu trabalho de forma mais objetiva, economizando tempo, experimentos e materiais;
- Todas as variáveis são tratadas com igual importância, eliminando possíveis pré-julgamentos, originados da intuição química do pesquisador, que nem sempre está correta.

1.1.1 Modelos de regressão

O tipo de planejamento experimental a ser empregado em cada problema de otimização depende da natureza estatística das variáveis envolvidas, sendo que, de uma maneira geral, elas podem ser agrupadas em duas grandes classes:

- Variáveis cujos níveis podem ser ajustados de forma independente umas das outras e cuja resposta ou resultado da otimização depende dos *valores absolutos* dos fatores empregados; estas variáveis são chamadas *variáveis de processo*, e os planejamentos contendo apenas este tipo de variáveis são chamados planejamentos fatoriais^{1,2}.

- Variáveis que não podem ser ajustadas de forma independente das demais e para as quais a resposta depende das *proporções* empregadas destes fatores; variáveis deste tipo são chamadas *variáveis de mistura* e planejamentos contendo apenas este tipo de variáveis são chamados planejamentos de mistura^{2,3}.

Os modelos mais empregados para descrever efeitos das variáveis de processo são os modelos lineares (eq 1) e bi-lineares (eq 2). Para descrever a influência das variáveis de mistura, os modelos mais empregados são o quadrático (eq 3) e o cúbico especial (eq 4).

$$\text{Linear processo: } \hat{y} = \alpha_0 + \sum_{i=1}^m \alpha_i z_i \quad (1)$$

$$\text{Bi-linear processo: } \hat{y} = \alpha_0 + \sum_{i=1}^m \alpha_i z_i + \sum_{i=1}^m \sum_{j \neq i}^m \alpha_{ij} z_i z_j \quad (2)$$

$$\text{Quadrático misturas: } \hat{y} = \sum_{i=1}^p \beta_i z_i + \sum_{i=1}^p \sum_{j \neq i}^p \beta_{ij} z_i z_j \quad (3)$$

$$\text{Cúbico especial misturas: } \hat{y} = \sum_{i=1}^p \beta_i z_i + \sum_{i=1}^p \sum_{j \neq i}^p \beta_{ij} z_i z_j + \sum_{i=1}^p \sum_{j \neq i}^p \sum_{k \neq i, j}^p \beta_{ijk} z_i z_j z_k \quad (4)$$

onde m representa o número de variáveis de processo e p o número de constituintes da mistura e $\hat{y}$ representa o valor da resposta predito pelo modelo de regressão.

Através da análise das equações 1 - 4 verifica-se que, ao contrário dos modelos que descrevem resultados de planejamentos fatoriais, os modelos de misturas não apresentam um termo constante e isto se deve a uma transformação matemática introduzida no modelo com o objetivo de eliminar colinearidade na matriz de planejamento².

Entretanto, muitas vezes as propriedades dos constituintes de mistura são afetadas por mudanças nas condições de processo na qual são realizados os experimentos, por exemplo, a temperatura, umidade, tempo de agitação etc... e neste caso, diz-se que existem *interações* entre as condições de processo e as composições de mistura. É interessante então, empregar uma estratégia de planejamento que gere modelos que permitam quantificar este tipo de interação. Estes modelos podem ser obtidos pela multiplicação de modelos que incluem apenas variáveis de processo por modelos que incluem apenas variáveis de mistura e são chamados, de uma forma geral, de modelos combinados. Por exemplo, a multiplicação de um modelo linear de processo pelo cúbico especial para misturas fornece o seguinte modelo combinado:

$$\begin{aligned}\hat{y} = & \gamma_1^0 x_1 + \gamma_2^0 x_2 + \gamma_3^0 x_3 + \gamma_{12}^0 x_1 x_2 + \gamma_{13}^0 x_1 x_3 + \gamma_{23}^0 x_2 x_3 + \gamma_{123}^0 x_1 x_2 x_3 + \gamma_1^1 x_1 z_1 \\ & + \gamma_2^1 x_2 z_1 + \gamma_3^1 x_3 z_1 + \gamma_{12}^1 x_1 x_2 z_1 + \gamma_{13}^1 x_1 x_3 z_1 + \gamma_{23}^1 x_2 x_3 z_1 + \gamma_{123}^1 x_1 x_2 x_3 z_1\end{aligned}$$

Os termos $\gamma_i^0 x_i$ descrevem as propriedades de mistura dos constituintes puros, sendo γ_i^0 a resposta média esperada para o componente i , sobre todas as condições de processo; $\gamma_{ij}^0 x_i x_j$ representa o efeito de interação médio entre os constituintes i e j , sobre todas as condições de processo, $\gamma_{ijk}^0 x_i x_j x_k$ representa o efeito de interação ternário médio entre os constituintes i , j e k ; $\gamma_i^1 x_i z_1$ representa a alteração nas propriedades de mistura dos constituintes $i = 1, 2, 3$ causada pela alteração das condições de processo; $\gamma_{ij}^1 x_i x_j z_1$ representa a alteração no efeito de

interação dos constituintes i e j causada pela alteração do nível da variável de processo e finalmente, $\gamma^1_{ijkX_iX_jX_kZ_1}$ representa a alteração no efeito de interação ternária entre os componentes da mistura, causada pela alteração do nível da variável de processo.

1.1.2 Procedimento aleatório vs procedimento *split-plot*

Para evitar a ocorrência de distorção estatística dos resultados, isto é, para impedir que desvios atípicos sejam associados a determinadas combinações de níveis dos fatores estudados, os experimentos realizados para determinação dos coeficientes dos modelos de regressão devem ser conduzidos em completa ordem aleatória². Entretanto, a inclusão de variáveis de processo aumenta o número de experimentos a serem realizados: se m composições de mistura forem testadas em p condições de processo, o número de experimentos a serem realizados é $m \times p$. Considerando o número de variáveis de processo estudadas, a quantidade de níveis ou a dificuldade em alterá-los, uma completa aleatorização na realização dos experimentos se torna uma estratégia inviável. Nestes casos, uma alternativa interessante é a utilização de planejamentos com aleatorização restrita, como o planejamento *split-plot*, descrito por Wooding⁴. É interessante ressaltar que este tipo planejamento é normalmente aplicado a problemas de otimização simultânea de variáveis de processo e de mistura devido ao grande número de experimentos que devem ser realizados, porém pode ser aplicado a problemas de otimização de apenas um ou outro tipo de variável. Além disto, problemas de otimização envolvendo variáveis de processo e de mistura de forma simultânea, nos quais os experimentos foram realizados de forma completamente aleatória também têm sido descritos na literatura^{5,6}. Mas, de fato, de centenas de problemas de otimização multivariada descritos na literatura, existem poucas aplicações nas quais os dois tipos de variáveis são otimizadas simultaneamente.

Experimentos com estrutura *split-plot* tiveram início na agricultura^{7,8} sendo que nesta área, os fatores normalmente estudados incluíam o tipo de fertilizante ou o método de irrigação, os quais só podiam ser aplicados a grandes áreas de

terra, chamadas *main-plots* (ou *whole-plots*). Os *main-plots* eram divididos em sub-áreas, os *sub-plots*, dentro dos quais outros fatores eram estudados, como por exemplo, a variedade de semente plantada. Atualmente, planejamentos do tipo *split-plot* vêm ganhando espaço em aplicações industriais e acadêmicas, podendo ser encontradas aplicações na biologia⁹, química^{10,11} e indústria alimentícia¹². De uma maneira geral, em planejamentos com estrutura *split-plot*, um fator é mantido em um determinado nível, normalmente um fator cujos níveis são de difícil ajuste, e experimentos envolvendo as combinações dos níveis dos outros fatores são realizados. O nível do fator de difícil ajuste é então alterado e realizam-se os experimentos nas combinações dos níveis dos outros fatores. No contexto de um planejamento *split-plot*, o fator de difícil ajuste é considerado *main-plot* e os demais fatores, *sub-plots*. Um excelente texto introdutório sobre planejamentos do tipo *split-plot* é dado por Kowalski e Potcner¹³. Textos mais complexos envolvendo o formalismo estatístico do planejamento *split-plot* podem ser encontrados nas referências 14 – 16^{14,15,16}.

A seguir será feita uma breve comparação entre o tratamento que deve ser aplicado aos resultados de planejamentos experimentais quando os mesmos são realizados em completa ordem aleatória e com aleatorização restrita (*split-plot*), considerando a Análise da Variância e o cálculo dos erros dos coeficientes do modelo estatístico.

Análise da variância e cálculo dos erros dos coeficientes do modelo de regressão para o procedimento aleatório

Supondo um exemplo simples, como um planejamento fatorial contendo apenas dois fatores, A e B, com *a* e *b* níveis respectivamente, e *n* replicatas. Se os experimentos forem realizados em ordem aleatória completa, o modelo de análise da variância pode ser representado por¹⁷:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (5)$$

onde:

$i = 1, 2, \dots, a$; $j = 1, 2, \dots, b$; $k = 1, 2, \dots, n$; μ é a média global de todas as respostas, τ_i representa o efeito do i -ésimo tratamento do fator A; β_j o efeito do j -ésimo tratamento do fator B; $(\tau\beta)_{ij}$ o efeito de interação entre A e B e ε_{ijk} representa o erro aleatório.

Na equação 5, μ é a constante que representa a média de todas as observações. Assim, a resposta experimental é descrita pela média geral acrescida dos desvios observados quando os tratamentos específicos são aplicados. Estes desvios são os efeitos de cada fator sobre a resposta observada. A melhor maneira de verificar se estes efeitos são estatisticamente significativos, é a utilização de um procedimento estatístico conhecido como Análise da Variância, ANOVA (do inglês Analysis of Variance), sendo as hipóteses a serem testadas: $H_0 = \tau = \beta = (\tau\beta) = 0$, ou seja, não existe efeito dos fatores A e B e $H_a = \tau \neq 0$ ou $\beta \neq 0$, ou seja, pelo menos o efeito de um dos fatores é significativo.

O princípio geral da análise da variância é dividir a variabilidade total das observações em seus componentes. Desta maneira, são calculadas Somas Quadráticas (SQ), as quais representam a variabilidade atribuída a cada fator e também aquela devida ao erro experimental. Dividindo-se os valores destas Somas Quadráticas pelos seus respectivos graus de liberdade são obtidas Médias Quadráticas (MQ), as quais são utilizadas em testes F a fim de verificar os testes de hipótese citados acima. A Análise da Variância para planejamentos com completa aleatorização de experimentos é mostrada na Tabela I.

Tabela 1: Análise da Variância para planejamentos nos quais os experimentos foram realizados em completa ordem aleatória.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº graus lib*	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R / p - 1$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / n - p$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / m - p$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / n - m$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% var. explicada	SQ_R / SQ_T		
% max. explicável	$(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$		

* p representa o número de parâmetros do modelo matemático, n o número total de experimentos e m o número de níveis do planejamento.

Para verificar a significância estatística da regressão, um teste F deve ser realizado através da comparação do valor da razão MQ_R/MQ_r com o valor da distribuição F tabelada, com (p-1, n-p) graus de liberdade. A falta de ajuste do modelo matemático é testada através da comparação do valor da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} com o valor tabelado de F com (m-p, n-m) graus de liberdade. Se o valor de MQ_R/MQ_r superar o valor de F tabelado e o modelo proposto não apresentar falta de ajuste, podem ser construídos intervalos de confiança para os coeficientes do modelo de regressão possibilitando encontrar, desta maneira, os fatores que mais contribuem para o alto valor da MQ_R .

É importante notar que, na análise da variância do procedimento aleatório, existe apenas um termo representando o erro aleatório, representado por ε na equação 5. Este termo incorpora todas as fontes de variabilidade que não são devidas aos fatores estudados e inclui: erros de medidas, erros de leituras,

fatores incontroláveis, ruído em geral do processo, variabilidade devido ao ambiente etc. Supõe-se que esse erro seja uma variável aleatória e tenha uma distribuição normal e independente, com média zero e variância *constante* σ^2 , sendo esta última hipótese conhecida como homoscedasticidade. Este erro, sendo aleatório, nunca poderá ser descrito pelo modelo de regressão e, desta maneira, é chamado de resíduo e definido como sendo a diferença entre o valor predito pelo modelo de regressão e o valor observado experimentalmente. Para verificar as suposições mencionadas sobre os resíduos, devem ser verificados os principais gráficos de diagnóstico do modelo, que são os gráficos de resíduos vs valores normais esperados e resíduos vs valores preditos. Enquanto no primeiro gráfico os valores de resíduos devem cair sobre uma linha contínua que representa os valores esperados de acordo com a distribuição normal, no segundo eles devem apresentar um padrão completamente aleatório, indicando que toda a variação sistemática foi incluída no modelo. Além disto, um gráfico muito útil é o de valor predito vs valor observado experimentalmente para os pontos do planejamento e também para amostras externas, se disponíveis, pois é um indicativo da capacidade preditiva do modelo.

Os coeficientes do modelo estatístico são obtidos normalmente pelo método dos mínimos quadrados, através da equação matricial: $(\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} (\mathbf{X}^t \mathbf{y})$, na qual $\mathbf{X}$ representa a matriz de planejamento e $\mathbf{y}$ o vetor de respostas observadas. A estimativa dos erros dos coeficientes é obtida através da equação $(\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \mathbf{s}^2$, na qual $\mathbf{s}^2$ representa a estimativa da variância experimental, a qual pode ser estimada através de medidas repetidas, empregando-se $\text{MQ}_{\text{resíduos}}$ no caso do modelo não apresentar falta de ajuste e MQ_{ep} no caso de modelos com falta de ajuste.

Análise da variância e cálculo dos erros dos coeficientes do modelo de regressão para o procedimento *split-plot*

Em planejamentos do tipo *split-plot*, o trabalho experimental é reduzido, pois a completa aleatorização na realização dos experimentos é relaxada, porém a análise estatística torna-se mais complexa. O modelo estatístico de análise da variância comumente empregado é³:

$$y_{ijk} = \mu + R_i + Z_j + RZ_{ij} + X_k + ZX_{jk} + \varepsilon_{ijk} \quad (6)$$

onde:

- μ é a média de todas as observações,
- R_i é o efeito da *i*-ésima replicata ($i = 1, 2, \dots, r$) ; é um efeito aleatório: que segue uma distribuição Normal $(0, \sigma_R^2)$ e que aparece na análise estatística devido ao fato da replicação dos experimentos ter sido realizada em blocos;
- Z_j é o efeito do *j*-ésimo tratamento *main-plot* ($j = 1, 2, \dots, P$);
- RZ_{ij} é o efeito de interação *replicata-main-plot*, é um efeito aleatório com distribuição Normal $(0, \sigma_{RZ}^2)$, empregado como estimativa do erro *main plot*;
- X_k é o efeito do *k*-ésimo tratamento *sub-plot* ($k = 1, 2, \dots, m$);
- ZX_{jk} é o efeito de interação *main-plot-sub-plot* e
- ε_{ijk} representa o erro associado ao tratamento *sub-plot*, estimado através da soma dos valores dos efeitos das interações *replicata-sub-plot* RX_{ik} e *replicata-main-plot-sub-plot*, RZX_{ijk} . É um efeito aleatório com distribuição Normal $(0, \sigma_e^2)$.

Verifica-se que neste caso, existem dois termos relacionados a erros, o erro *main-plot* (RZ_{ij}), o qual é estimado através do efeito de interação replicata-main-

plot e o erro sub-plot (ε_{ijk}), estimado através da soma dos efeitos de interação replicata-sub-plot e replicata-main-sub-plot. As interações envolvendo as replicatas são empregadas para estimar as médias quadráticas referentes aos erros *main plot* e *sub-plot* uma vez que a replicação dos experimentos não deve alterar os valores dos efeitos dos fatores considerados *main* e *sub-plots*. A análise da variância para um planejamento do tipo *split-plot* é mostrada na **Tabela II**.

Tabela II: Análise da variância para planejamentos nos quais os experimentos foram realizados de acordo com a estrutura *split-plot*.

Fonte Variação	Soma Quadrática*	Nº de graus liberdade	Média Quadrática
Replicatas (R)	$SQ_R = mp \sum_{i=1}^r (\bar{R}_i - \mu)^2$	$r - 1$	$MQ_R = SQ_R / (r - 1)$
Main-plot (Z)	$SQ_Z = mr \sum_{i=1}^p (\bar{Z}_i - \mu)^2$	$p - 1$	$MQ_Z = SQ_Z / (p - 1)$
Erro <i>main-plot</i> (RZ)	$SQ_{RZ} = m \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^p (\bar{Z}_{ij} - Z_i - R_i - \mu)^2$	$(r - 1)(p - 1)$	$MQ_{RZ} = SQ_{RZ} / ((r - 1)(p - 1))$
<i>Sub-plot</i> (X)	$SQ_X = pr \sum_{i=1}^m (\bar{X}_i - \mu)^2$	$m - 1$	$MQ_X = SQ_X / (m - 1)$
<i>Main-plot - sub-plot</i> (ZX)	$SQ_{ZX} = r \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^m (\bar{Z}_{jk} - \bar{Z}_j - \bar{X}_k - \mu)^2$	$(p - 1)(m - 1)$	$MQ_{ZX} = SQ_{ZX} / ((p - 1)(m - 1))$
Erro <i>sub-plot</i> (RX + RZX)	Obtido por diferença **	$p(r - 1)(m - 1)$	$MQ_e = SQ_e / (p(r - 1)(m - 1))$

* o sub-índice i refere-se às replicatas, $i = 1, 2, 3, \dots, r$; j aos tratamentos *main-plot*, $j = 1, 2, 3, \dots, P$ e k aos tratamentos *sub-plots*, $k = 1, 2, 3, \dots, m$.

** $SQ_e = SQ_T - (SQ_R + SQ_Z + SQ_{RZ} + SQ_X + SQ_{ZX})$, onde SQ_T é a soma quadrática total,

$$SQ_T = \sum_{i=1}^n (y_i - \mu)^2$$

A significância de cada tratamento pode ser testada de forma separada: testes de hipótese envolvendo os tratamentos *main-plot* e *sub-plot*, bem como a interação *main-sub-plot* são realizados através da comparação das razões

$MQ_Z/MQ_{\text{erro main-plot}}$, $MQ_X/MQ_{\text{erro sub-plot}}$, $MQ_{ZX}/MQ_{\text{erro sub-plot}}$ com valores tabelados da distribuição F, com o número apropriado de graus de liberdade. A falta de ajuste do modelo matemático é testada através da comparação do valor de F calculado, F_{calc} , (equação 7) com o valor de F tabelado, com o número apropriado de graus de liberdade:

$$F_{\text{calc}} = \frac{(m - q)MQ_{X_{\text{faj}}}/P(m - q)}{MQ_e} + \frac{(P - 1)(m - q)MQ_{X_{\text{faj}}}/P(m - q)}{MQ_e} \quad (7)$$

Os erros dos coeficientes do modelo matemático são estimados de maneira diferente no caso do planejamento *split-plot*, pois devem ser consideradas as variâncias devido às replicatas, σ_R^2 , a variância do erro *main-plot*, σ_{RZ}^2 e variância do erro *sub-plot*, σ_e^2 . De acordo com Cornell³ os erros dos coeficientes do modelo matemático podem ser estimados através dos valores das raízes quadradas dos elementos da diagonal principal da matriz $(\mathbf{X}'\mathbf{V}^{-1}\mathbf{X})^{-1}$, sendo $\mathbf{V}$ a matriz de variância-covariância das observações experimentais (equação 8), a qual contém as estimativas das variâncias σ_R^2 , σ_{RZ}^2 e σ_e^2 :

$$\mathbf{V} = \{\mathbf{J}_{\text{Pm}} \otimes \mathbf{I}_R\}\sigma_R^2 + \{\mathbf{J}_m \otimes \mathbf{I}_{\text{RP}}\}\sigma_{RZ}^2 + \mathbf{I}_{\text{RPm}}\sigma_e^2 \quad (8)$$

1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregada de cromatografia por eluição¹⁸. As principais razões para a popularidade da técnica são: sua alta detectabilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente instáveis e, principalmente, sua grande aplicabilidade às substâncias de grande interesse para a indústria, ciência e sociedade, como

fármacos, alimentos e agrotóxicos. Entretanto, apesar de sua vasta aplicabilidade, a busca das condições ideais para uma determinada separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ainda é normalmente realizada de acordo com o procedimento univariado.

A separação de uma mistura por CLAE se dá através da interação diferenciada de seus componentes com duas fases, uma que permanece estacionária (FE) e outra que se movimenta em uma direção definida (FM). Na Cromatografia Líquida, a FM é obrigatoriamente um líquido, enquanto a FE pode ser um sólido (Cromatografia Líquido-Sólido, CLS) ou um líquido (Cromatografia Líquido-Líquido, CLL), o qual é depositado sob a forma de uma camada fina sobre um material suporte. A sílica é o material mais utilizado, tanto como FE em CLS quanto como suporte em CLL. Entretanto, atualmente, as FE mais amplamente empregadas em CLAE são as chamadas *fases quimicamente ligadas*, nas quais moléculas orgânicas, com diferentes grupos funcionais e polaridades, são ligadas covalentemente à superfície da sílica. Esta técnica surgiu para superar os problemas da CLL tradicional, como a perda da FE, depositada sobre o suporte. A ligação química, normalmente é estabelecida através de reações de sililação, nas quais os grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$), presentes na superfície da sílica, reagem com organoclorossilanos substituídos ou organoalcóxissilanos¹⁹.

Uma vez que os grupos ligados à sílica podem produzir tipos distintos de FE, dependendo de sua natureza polar, não polar ou iônica, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência pode ser classificada como sendo de Fase Normal (FN) ou de Fase Reversa (FR), de acordo com a polaridade da FE em relação à FM. No modo FN, a FE é relativamente polar e a FM apolar, enquanto no modo FR, a FE é mais apolar que a FM. Em FR, os principais grupos não polares ou pouco polares ligados à sílica são os grupos alquílicos com cadeias de 1, 4, 8 e 18 átomos de carbono. São sempre, com exceção daquela de 1 carbono, cadeias sem ramificações e, portanto, de natureza não polar. Fases estacionárias com grupos fenila ou alquil-fenila quimicamente ligados, que apresentam polaridade intermediária, também têm sido utilizadas recentemente em algumas aplicações específicas.

Atualmente, a FR é responsável pela maior parte das aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência²⁰ pois apresenta algumas vantagens em relação à CLAE-FN: maior versatilidade, podendo ser aplicada a uma grande variedade de amostras; superior seletividade para a maioria dos compostos (exceto compostos altamente polares); compatibilidade com amostras aquosas e orgânicas; as fases móveis aquosas permitem o uso de tampões, resultando em melhor simetria dos picos, seletividade e eficiência, além de serem de custo reduzido, uma vez que são misturas de solvente orgânico e água.

A retenção de um composto em Cromatografia Líquida é determinada tanto pela sua polaridade quanto pelas condições experimentais de análise. A retenção de um composto pode ser expressa através do fator de retenção, k :

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (9)$$

onde t_R é o tempo de retenção do composto e t_M é o tempo de retenção de um composto não-retido.

O numerador pode ser descrito como sendo o tempo que as moléculas dos compostos permanecem na FE, enquanto o denominador representa o tempo que as mesmas permanecem na FM. Valores grandes de k indicam que as moléculas do composto permanecem muito tempo retidas na FE. Por outro lado, valores pequenos de k indicam que as moléculas do composto estão interagindo muito fortemente com a FM, sendo arrastadas rapidamente através da coluna. Valores considerados ideais para os fatores de retenção estão compreendidos entre 0,5 e 10²¹.

A seletividade é uma medida da separação entre dois picos adjacentes, A e B, expressa pelo fator de separação, α :

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (10)$$

onde k_B é o fator de retenção do composto B, mais retido, e k_A é o fator de retenção do composto A, menos retido.

Quando os pares de picos não são adjacentes, a razão citada chama-se retenção relativa, R_R . A qualidade da separação entre picos adjacentes pode ser medida também através da Resolução, R_s , dada por:

$$R_s = \frac{1,177(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad (11)$$

onde t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos picos 1 e 2, respectivamente e w_{h1} e w_{h2} representam a largura dos picos (a meia altura) 1 e 2, respectivamente.

A resolução pode também ser expressa em função do fator de retenção, fator de separação e número de pratos da coluna, k , α e N , respectivamente, os quais são diretamente relacionados com as condições experimentais:

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \frac{k}{1 + k} \quad (12)$$

A retenção de um composto e a seletividade da separação são influenciadas pelas mesmas condições experimentais: natureza, composição e vazão da FM, natureza da FE e condições de análise (temperatura da coluna e vazão da FM).

1.2.1 Fatores que afetam a separação em CLAE

A) Natureza e composição da FM

Os solventes empregados como fase móvel (FM) em CLAE-FR devem preencher alguns requisitos, sendo os mais importantes: ser de fácil obtenção em elevado grau de pureza pois as impurezas dos solventes podem interferir e causar diminuição da detectabilidade; dissolver a amostra sem decompor seus componentes; ter polaridade e viscosidade adequadas uma vez que a viscosidade influencia no processo de transferência de massa dos compostos analisados entre FM e FE e nos valores de vazão que podem ser empregados; não decompor ou dissolver a FE e ser compatível com o detector utilizado. A FM em CLAE-FR é composta de um ou mais modificadores orgânicos (solvente orgânico) e água. Preenchidos os requisitos citados, dois parâmetros devem ser considerados em relação à FM: sua força cromatográfica (ou polaridade) e sua seletividade. Enquanto a força está relacionada à retenção dos compostos, a seletividade está relacionada à separação entre eles.

A força cromatográfica ou polaridade da fase móvel é resultado do conjunto de interações solvente – analito, as quais podem ser interações dispersivas, interações de dipolo, interações dielétricas e/ou ligações de hidrogênio. A polaridade dos solventes pode ser determinada de diferentes maneiras: 1) empregando-se os parâmetros de solubilidade de Hildebrand (δ); 2) o parâmetro solvatocrômico (ϵ) ou 3) o parâmetro de solventes de Snyder (P'), sendo este último o mais utilizado. As polaridades dos diversos solventes que podem ser utilizados em Cromatografia Líquida, determinadas empregando-se os métodos citados, encontram-se tabeladas^{21,22,23}. O parâmetro de solvente de Snyder, em FR, recebe o nome de *fator força-peso*, S .

Uma vez que a FM é uma mistura de um ou mais modificadores orgânicos e água, sua polaridade é determinada pelo somatório dos fatores força-peso de cada um dos solventes utilizados, ponderadas pelas suas respectivas proporções em volume. Para uma mistura binária tem-se:

$$\text{Polaridade FM} = S_1 \phi_1 + S_2 \phi_2 \quad (13)$$

onde S_1 , S_2 são os fatores força-peso dos solventes 1 e 2, respectivamente e ϕ_1 , ϕ_2 são as proporções em volume dos solventes 1 e 2, respectivamente.

A força cromatográfica da FM depende da porcentagem e do tipo de solvente presente. Assim, quanto mais forte (mais apolar) ou quanto maior a porcentagem do modificador orgânico na FM, maior será sua força cromatográfica. Embora as alterações na força cromatográfica da FM causem, principalmente, mudanças nos valores de retenção dos compostos, alterações na seletividade devido à mudança na *força* da FM podem acontecer, ainda que em escala reduzida. A força cromatográfica ideal para uma separação (aquela que fornece $0,5 < k < 10$) pode ser determinada de três maneiras: empiricamente, diminuindo-se gradativamente a proporção do modificador orgânico, através do uso de equações e através do emprego de um gradiente linear.

Se quando a força cromatográfica adequada da FM já foi encontrada e ainda existirem picos sobrepostos no cromatograma, deve ser realizada a troca do solvente orgânico, substituindo-se por outro de diferente seletividade. A seletividade de cada solvente pode ser medida através de suas características físico-químicas de capacidade de atuar como doador ou aceitor de prótons e a intensidade de seu momento de dipolo. Uma classificação geral muito empregada que considera estas características é proposta por Snyder e colaboradores²¹, conhecida como triângulo de seletividade de Snyder, a qual é mostrada na Figura 1. Nesta classificação, quanto maior a distância entre dois solventes, maior será a diferença de seletividade. Uma vez que se deseja alterar a seletividade de uma separação com a mudança do modificador orgânico, devem ser selecionados modificadores orgânicos com propriedades físico-químicas suficientemente distintas para que as maiores diferenças de seletividade possíveis sejam alcançadas. Uma regra geral, derivada do triângulo de seletividade de Snyder, é a chamada regra dos 4 solventes, que diz que as maiores diferenças de seletividade

são alcançadas pelo emprego de éter metil-terc-butílico (MTBE), diclorometano (CH_2Cl_2) e clorofórmio (CH_3Cl) em FN, com hexano para ajuste da força cromatográfica e acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF) em FR, com água para ajustar a força cromatográfica. Quando a técnica de mistura de solventes é empregada para otimização da seletividade da FM, devem ser selecionados solventes com propriedades físico-químicas (capacidade de atuar como ácido/base e momento de dipolo) distintas. De acordo com a classificação de Snyder, os solventes para FR que apresentam as propriedades físico-químicas mais diferenciadas são acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF).

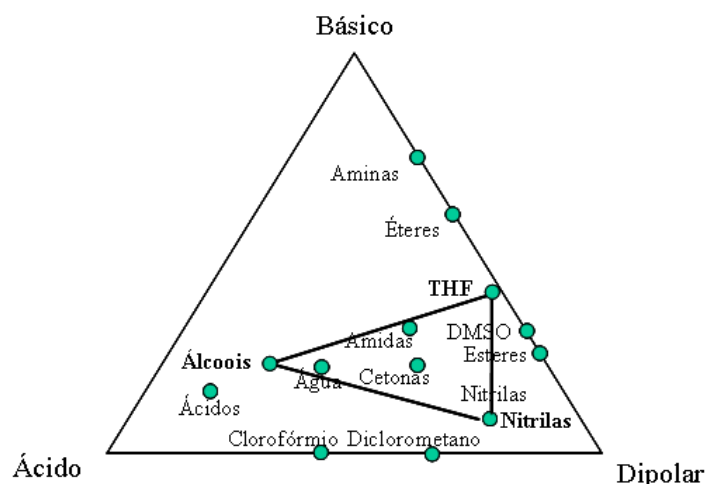


Figura 1: Triângulo de seletividade dos solventes que podem ser utilizados em Cromatografia Líquida, de acordo com *Snyder e colaboradores*²¹. O triângulo interno representa a Regra dos 4 Solventes.

B) Natureza da FE

Considerando a FE, a retenção dos compostos de uma mistura depende do tipo e concentração da fase ligada à sílica e da área superficial da FE. A retenção dos compostos varia com a natureza da fase ligada e, geralmente, aumenta com o aumento do tamanho da cadeia carbônica do polímero ligado à sílica (aumento da

hidrofobicidade). Por exemplo, a retenção em uma coluna C 18 é normalmente maior que em uma C 8, mantendo-se as demais condições fixas.

Embora maiores alterações na seletividade sejam conseguidas com a mudança do modificador orgânico, as alterações de seletividade encontradas através da mudança no tipo de coluna são muito úteis, principalmente quando somente um tipo de modificador orgânico pode ser utilizado, como por exemplo, quando a detecção de um composto deve ser feita espectrofotometricamente em comprimento de onda de 210 nm, região na qual somente acetonitrila pode ser empregada como componente orgânico da FM.

C) Condições de análise: temperatura da coluna e vazão da FM

Finalmente, a separação desejada em CLAE pode ser obtida pela alteração nas condições de análise, principalmente a temperatura da coluna e a vazão da FM. De uma maneira geral, para compostos não-iônicos, um aumento de 1 °C, leva a uma diminuição de 1 a 2 % nos valores de retenção. Este fato é devido à diminuição da viscosidade da FM com o aumento da temperatura, favorecendo assim, o processo de transferência de massa entre analitos e FM/FE. A variação da temperatura tem um efeito mais complexo na seletividade e a extensão deste efeito depende do tipo de composto químico presente na amostra. Para compostos não iônicos, o efeito da mudança de seletividade com a temperatura é menos significativo que para compostos iônicos. Existem, entretanto, algumas exceções, como por exemplo, para moléculas neutras planares, a retenção diminui mais rapidamente com o aumento da temperatura, em relação às não planares.

Por outro lado, o aumento da vazão da FM diminui a retenção de todos os compostos, uma vez que eles são forçados a atravessar a coluna mais rapidamente. Entretanto, a *eficiência* da coluna cromatográfica também é alterada com mudanças na vazão da FM, de acordo com a teoria desenvolvida por van Deemter²³. A equação proposta por J.J. van Deemter em 1956, descreve a relação entre a velocidade linear da FM e a altura de prato para os principais fatores que podem causar o alargamento dos picos cromatográficos. Originalmente, esta

equação foi desenvolvida para Cromatografia Gasosa em colunas recheadas, porém sua aplicação foi estendida para Cromatografia Líquida, uma vez que os fenômenos físico-químicos responsáveis pelo alargamento dos picos são praticamente os mesmos. A expressão mais simples da equação de van Deemter é mostrada na equação 5 e o gráfico correspondente na Figura 2.

$$H = A + B/\mu + C\mu \quad (14)$$

onde H = altura de prato, $H = L/N$, sendo L = comprimento da coluna e N = número de pratos; A = efeito de caminhos múltiplos das moléculas do soluto na coluna; B = efeito da difusão longitudinal das moléculas do soluto na FM; C = efeito da transferência de massa do soluto entre FM e FE e μ = velocidade linear da FM, $\mu = L/t_M$, sendo t_M o tempo de retenção de um composto não retido.

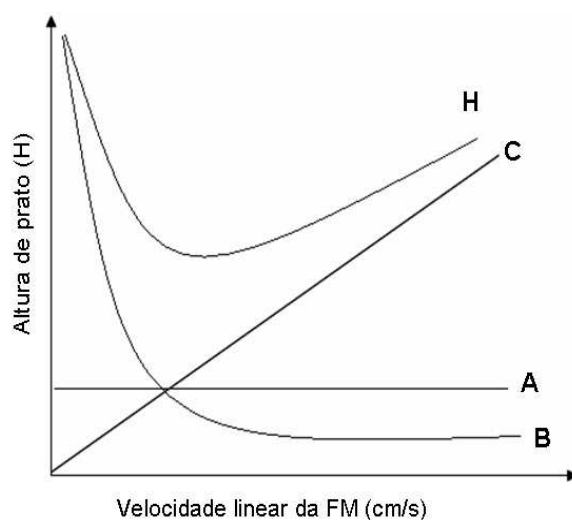


Figura 2: Curva de van Deemter (Altura de prato, H em função da velocidade linear da FM, μ) mostrando os principais efeitos que afetam a altura de prato: A: efeito de caminhos múltiplos das moléculas do soluto na coluna; B: efeito da difusão longitudinal das moléculas do soluto na FM; C = efeito da transferência de massa do soluto entre FM e FE.

Através da observação da equação 14 e da Figura 2, é possível verificar que o efeito de diferentes caminhos das moléculas do soluto dentro da coluna (termo A) não depende da velocidade linear da FM. Por outro lado, a altura de

prato é inversamente proporcional à velocidade linear da FM, considerando o efeito de difusão longitudinal do soluto na FM (termo B) e diretamente proporcional a ela, considerando o efeito de transferência de massa do soluto entre FM e FE (termo C). A equação resultante, levando em conta o efeito destes três fatores, é uma parábola com a concavidade para cima, ou seja, existe um valor mínimo para o qual a velocidade linear da FM fornece a menor altura de prato e, portanto, um maior número de pratos.

O número de pratos está relacionado com a *eficiência* da coluna cromatográfica, quanto maior o número de pratos, maior a eficiência e menor será o alargamento dos picos. O formato estreito e gaussiano dos picos é um indicativo de uma coluna com eficiência alta.

1.3 Otimização de condições cromatográficas

Em problemas de otimização em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência podem ser consideradas como variáveis de processo o tipo de fase estacionária, a temperatura da coluna e vazão da FM, pois estas variáveis podem ter seus níveis ajustados de forma independente umas das outras. Por outro lado, os solventes orgânicos e a água empregada como FM podem ser considerados componentes de uma mistura, pois a soma das suas proporções deve sempre ser igual a 100 %. Considerando apenas variáveis de processo, são encontrados trabalhos na literatura sobre a utilização de planejamentos fatoriais completos²⁴, fracionários²⁵, composto central²⁶ e Doehlert²⁷ para separação de diversas classes de compostos por CLAE. Em relação à otimização da seletividade da FM, muitos trabalhos encontrados na literatura descrevem a utilização de planejamentos de misturas baseados no triângulo de seletividade de Snyder,^{28,29,30,31} porém, pouco ou nenhum tratamento estatístico foi dado aos resultados. Mais que isto, trabalhos envolvendo otimização simultânea das condições de processo e de mistura em Cromatografia ainda não foram relatados na literatura.

1.3.1 Seleção da resposta

A resposta empregada em planejamentos fatoriais e planejamentos de misturas é um número que tem como objetivo traduzir, de forma satisfatória, a qualidade dos resultados obtidos. Os critérios empregados para descrever uma separação cromatográfica podem ser agrupados em duas grandes categorias: critérios elementares, os quais descrevem a separação de apenas um par de compostos do cromatograma e critérios compostos, também chamados de funções objetivas, os quais descrevem o cromatograma como um todo. Os principais critérios elementares são: resolução (R_s), fator de separação (α) e a retenção relativa (R_R). Os critérios compostos são, em primeira análise, combinações de critérios elementares, realizadas empregando-se diversos operadores matemáticos, como por exemplo, somatório, produto e logaritmo natural

A) Funções objetivas

Para uma função objetiva ser utilizada como resposta ela deve satisfazer alguns requisitos, sendo os principais: ser uma medida efetiva para comparação da qualidade de diversos cromatogramas; refletir os objetivos do pesquisador; não ser afetada por fatores incontroláveis ao pesquisador e não apresentar inconsistências matemáticas. O grande número de funções objetivas descritas na literatura nos últimos 15 anos reflete a dificuldade em preencher os requisitos citados. Siouffi e Phan-Tan-Luu³² concluíram recentemente que não existe uma função objetiva definitiva para otimizações em cromatografia e eletroforese capilar. Esta dificuldade é proveniente principalmente do fato de que, embora critérios elementares sejam eficientes na descrição da separação entre pares de picos, suas combinações normalmente não refletem a qualidade da separação do cromatograma como um todo.

As primeiras tentativas de desenvolver uma função objetiva foram modificações da Função de Resposta Cromatográfica (*Chromatographic*

Response Function, CRF, proposta por Morgan e Deming³³, a qual emprega o logaritmo natural da soma das razões pico-vale como uma medida da separação (equação 15), conforme mostrado na Figura 3.

$$CRF = \sum_{i=1}^{n-1} \ln \frac{f}{g} \quad (15)$$

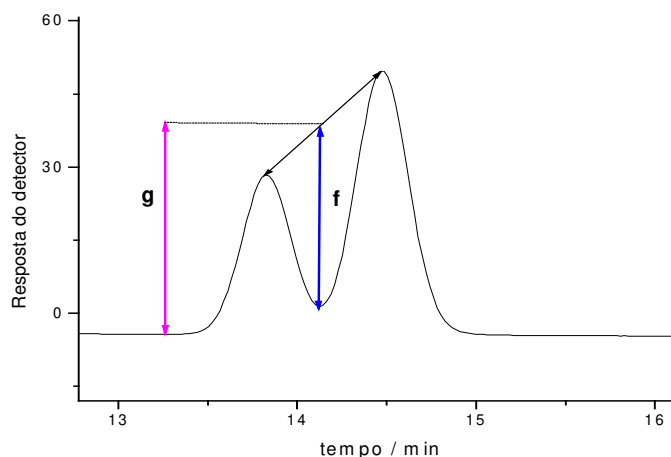


Figura 3: Ilustração do cálculo do parâmetro (f/g) em um cromatograma: f representa o meio da distância entre os máximos dos dois picos enquanto g é uma medida da profundidade do vale entre eles.

Atualmente, sabe-se que esta medida não pode ser considerada como função da FM e FE, não sendo recomendável a sua utilização³⁸. Watson e Carr adicionaram um termo que inclui o tempo de análise na equação³⁴:

$$CRF = \sum_{i=1}^{n-1} \ln \frac{f}{g} + a_i (t_A - t_L) \quad (16)$$

onde t_A representa o tempo máximo aceitável de análise, t_L o tempo de retenção do último composto eluído e a_i é uma constante de ponderação selecionada pelo pesquisador.

Glajch *et al.*³⁵ propuseram uma alteração do CRF com o nome de Função de Otimização Cromatográfica, COF, do inglês *Chromatographic Optimization Function*, uma extensão do CRF, na qual o somatório das razões picos-vale foi

substituído pelo somatório da razão (valores de resolução obtidos / valores de resolução desejados), ponderada através de uma constante A:

$$COF = \sum_{i=1}^{n-1} A_i \ln \frac{R_s}{R_{sd}} + a_i (t_A - t_L) \quad (17)$$

onde R_s representa a resolução observada, R_{sd} a resolução desejada; t_A representa o tempo máximo de análise, t_L o tempo de retenção do último composto eluído; A_i e a_i são constantes selecionadas pelo pesquisador.

Outras equações foram propostas sob o mesmo nome CRF³⁶, com destaque para a função proposta por Berridge:

$$CRF = \sum_{i=1}^{n-1} R_s + L^{w_1} - w_2 |T_A - T_L| - w_3 (T_1 - T_0) \quad (18)$$

onde R_s indica a resolução observada entre os pares de picos, L o número de pares de picos observados, T_A , T_L , T_1 e T_0 são, respectivamente, o tempo máximo aceitável de análise, o tempo de retenção do último composto eluído, o tempo de retenção do primeiro composto e o tempo mínimo aceitável de retenção para o primeiro composto; w_1 , w_2 e w_3 são fatores de ponderação, selecionados pelo pesquisador.

De uma maneira geral, as CRF são equações do tipo $CRF = constante \times \text{“fator que mede a separação”} + constante \times \text{“fator que mede o tempo de análise”}$. Entretanto, a seleção dos fatores de ponderação é completamente arbitrária e dependente do pesquisador, sendo que a seleção de diferentes fatores de ponderação pode levar a resultados ambíguos³⁷. Além disto, imposições devem ser colocadas de modo a evitar que a resposta seja dominada por grandes valores de separação, os quais podem encobrir pequenas separações observadas no cromatogramas. Por exemplo, se a resolução dos picos A e B varia de 1,5 a 5,0 e a separação entre B e C varia de 0,5 a 1,5, um aumento na resolução entre A e B o qual não representa um ganho real, pois A e B já estão separados na linha base

($R = 1,5$) pode encobrir um aumento de resolução entre B e C, para os quais um incremento de resolução representa de fato um ganho real. Além disto, Vanbel *et al.*³⁸ apontaram que a combinação arbitrária entre resolução e tempo de análise guiará o pesquisador a um ótimo arbitrário e por este motivo o seu uso não é indicado.

Até o momento foram mostradas funções que empregam a soma de critérios elementares, porém existe um outro grande grupo de funções objetivas que empregam o produto de critérios elementares, sendo a principal proposta por Drouen *et al.*³⁹ conhecida como Produto da Resolução Normalizada, *NRP* do inglês, *Calibrated Normalized Resolution product*,:

$$NRP = \frac{\prod_{i=1}^{n-1} R_s}{\bar{R}_s} \quad (19)$$

onde R_s indica a resolução entre os pares de picos i e j e $\bar{R}_s$ indica a resolução média observada entre todos os pares de picos.

Apesar desta função ter sido utilizada por muitos pesquisadores^{27,38,40} para otimização de sistemas cromatográficos, ela pode não refletir a qualidade da separação em algumas situações e apresentar inconsistências matemáticas. De fato, Vanbel *et al.*³⁸ apontaram imperfeições neste critério.

Considerando os aspectos discutidos acima, neste trabalho serão mostrados resultados empregando apenas o somatório das resoluções, conforme proposto por Berridge³⁶, porém sem nenhuma constante de ponderação para os pares de picos e também desconsiderando o termo relacionado ao tempo de análise, uma vez que ele permaneceu praticamente constante. A restrição de que se $R_{obs} > R_{linha\ base}$ ($R_{linha\ base} = 1,5$) então $R_{obs} = 1,5$, foi mantida. A função NRP foi testada e os modelos foram construídos, entretanto ela não foi eficiente na comparação da qualidade de diversos cromatogramas e, devido a isto, os resultados não serão mostrados.

B) Critérios elementares e funções de desejabilidade

Uma alternativa à utilização de funções objetivas é a utilização de critérios elementares, tais como a resolução (R_s), o fator de separação (α) e a retenção relativa (R_R) para a descrição da separação de *pares* de picos. Entretanto, se existir mais de um par de picos de interesse no cromatograma, deve ser encontrada uma composição de FM que separe simultaneamente todos os compostos de interesse. Existe na literatura um procedimento de otimização de seletividade de FM, empregando o triângulo de seletividade de Snyder e as superfícies de resposta, denominado de Sobreposição de Mapas de Contorno, *Overlapping Resolution Mapping*, ORM³⁵. Neste procedimento, são construídos mapas de contorno para cada uma das respostas e selecionadas regiões de respostas aceitáveis. As superfícies são então sobrepostas e busca-se uma região comum, na qual todas as respostas são aceitáveis.

Neste trabalho, optou-se por empregar o conceito de desejabilidade de Derringer e Suich para otimização simultânea de diversas respostas, sendo este procedimento posteriormente comparado com o procedimento de sobreposição de mapas de contorno. Derringer e Suich descreveram um método para otimização simultânea de várias respostas no qual cada resposta y_i tem associado um valor de desejabilidade parcial, d_i .⁴¹ Este valor varia de 0 a 1 de acordo com a proximidade com o valor desejado da resposta. O valor de cada resposta é calculado a cada ponto do domínio experimental através da equação do modelo e representado por $\hat{y}_i$ e, empregando equações adequadas a cada caso (descritas a seguir), o valor de desejabilidade parcial é calculado para todos os pontos do domínio experimental. Finalmente, os valores individuais de desejabilidade são combinados em uma função de desejabilidade global (D) através da média geométrica e o problema torna-se então maximizar este número. É importante ressaltar que todo o procedimento de busca do ótimo é realizado empregando-se as equações dos modelos construídos para cada uma das respostas e, desta maneira, é importante que eles tenham sido obtidos através de um planejamento estatisticamente fundamentado e que tenham sido validados.

Para definir as funções de desejabilidade parciais, o procedimento consiste basicamente em estabelecer valores mínimo, máximo e um valor alvo para a resposta considerada, $(y_i^{\min})$ e $(y_i^{\max})$, y_{alvo} respectivamente. A maneira como se chega ao valor alvo depende da forma matemática da função de desejabilidade parcial, a qual pode ser *linear* ou *não-linear* e *unilateral* ou *bilateral*. Os casos mais simples são descritos por funções lineares unilaterais, as quais podem ser utilizadas para maximizar ou minimizar uma resposta. Estas funções são chamadas lineares, pois a maneira como a desejabilidade se aproxima ou se afasta do alvo é descrita por uma função linear, sem expoentes de ordem diferente de 1 e são chamadas unilaterais, pois o valor alvo irá coincidir com um dos limites impostos, ou $(y_i^{\min})$ e $(y_i^{\max})$. Para descrever a desejabilidade de funções que requerem maximização, é assumido que acima do valor alvo, qualquer valor é perfeitamente satisfatório (desejabilidade máxima) e que abaixo do limite inferior $(y_i^{\min})$ qualquer resposta é inaceitável. Esta situação é mostrada graficamente na Figura 4 A e descrita pelas equações 20 a -20 c:

$$d = 0 \text{ se } \hat{y}_i < y_i^{\min} \quad (20 \text{ a})$$

$$d = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\min}}{y_{\text{alvo}} - y_i^{\min}} \right) \text{ se } y_i^{\min} \leq \hat{y}_i \leq y_{\text{alvo}} \quad (20 \text{ b})$$

$$d = 1 \text{ se } \hat{y}_i > y_{\text{alvo}} \quad (20 \text{ c})$$

Para descrever a desejabilidade de funções que requerem minimização, o valor alvo deve coincidir com o valor mínimo e valores abaixo do valor alvo são completamente satisfatórios. Além disto, acima do valor limite superior $(y_i^{\max})$, os valores de resposta são completamente inaceitáveis. Esta situação é descrita graficamente na Figura 4 B e através das equações 21 a -21 c:

$$d = 1 \text{ se } \hat{y}_i < y_{\text{alvo}} \quad (21 \text{ a})$$

$$d = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\max}}{y_{\text{alvo}} - y_i^{\max}} \right) \text{ se } y_i^{\max} \leq \hat{y}_i \leq y_{\text{alvo}} \quad (21 \text{ b})$$

$$d = 0 \text{ se } \hat{y}_i > y_i^{\max} \quad (21 \text{ c})$$

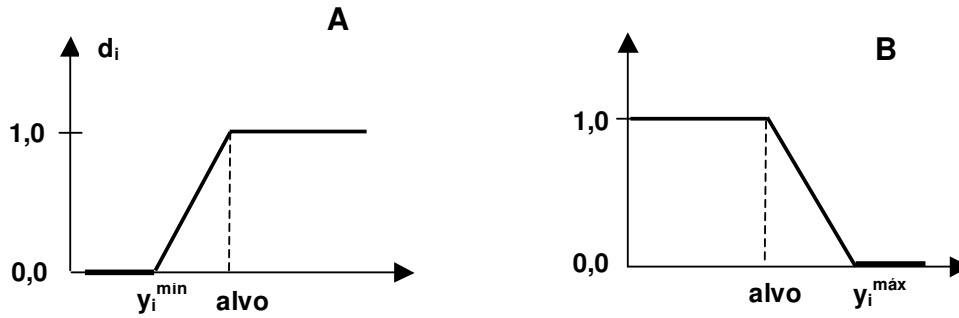


Figura 4: Funções de desejabilidade lineares unilaterais para A) maximização e B) minimização.

Entretanto, muitas vezes o valor de uma determinada resposta deve estar próximo a um determinado valor alvo e qualquer desvio em relação a este valor leva à perda de qualidade, sendo pouco ou inaceitáveis valores acima ou abaixo do valor alvo. Neste caso, os dois limites inferior e superior não coincidem com o alvo e não necessariamente são simétricos em relação a ele. Acima e abaixo destes limites as repostas são completamente inaceitáveis. Esta situação é mostrada graficamente na Figura 5 A e descrita pelas equações 22 a - 22 d.

$$d = 0 \text{ se } \hat{y}_i < y_i^{\min} \quad (22 \text{ a})$$

$$d = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\min}}{y_{\text{alvo}} - y_i^{\min}} \right) \text{ se } y_i^{\min} \leq \hat{y}_i \leq y_{\text{alvo}} \quad (22 \text{ b})$$

$$d = \left(\frac{\hat{y}_i - y_i^{\max}}{y_{\text{alvo}} - y_i^{\max}} \right) \text{ se } y_{\text{alvo}} \leq \hat{y}_i \leq y_i^{\max} \quad (22 \text{ c})$$

$$d = 0 \text{ se } y_i > y_i^{\max} \quad (22 \text{ d})$$

Existem ainda situações nas quais a resposta é completamente satisfatória entre dois valores limites, chamado intervalo-alvo (Figura 5 B). A função de desejabilidade é descrita por:

$$d = 0 \text{ se } y_i < y_i^{\min} \quad (23 \text{ a})$$

$$d = 1 \text{ se } y_i^{\min} \leq y_i \leq y_i^{\max} \quad (23 \text{ b})$$

$$d = 0 \text{ se } y_i > y_i^{\max} \quad (23 \text{ c})$$

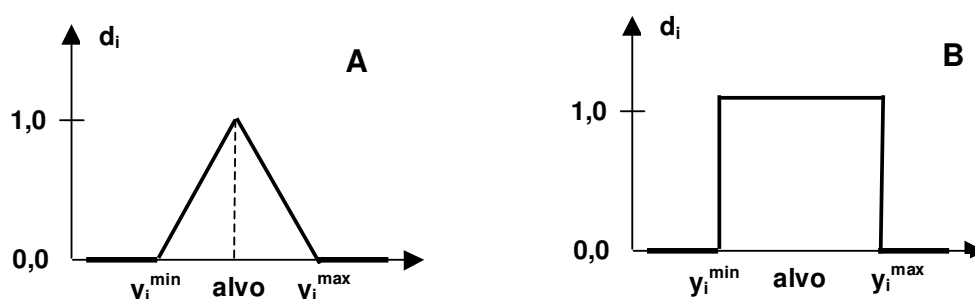


Figura 5: Funções de desejabilidade lineares bilaterais para A) alvo entre dois valores e B) alvo em um intervalo.

As funções de desejabilidade descritas até o presente momento são lineares, porém todas as possibilidades mostradas nas Figuras 4 e 5 podem ser refinadas de acordo com o interesse do pesquisador, dando origem a funções não lineares. Por exemplo, podem ser dados pesos menores a respostas próximas aos limites (Figura 6 A para maximização e C para minimização) ou maiores aos valores próximos ao alvo (Figura 6 B para maximização e D para minimização).

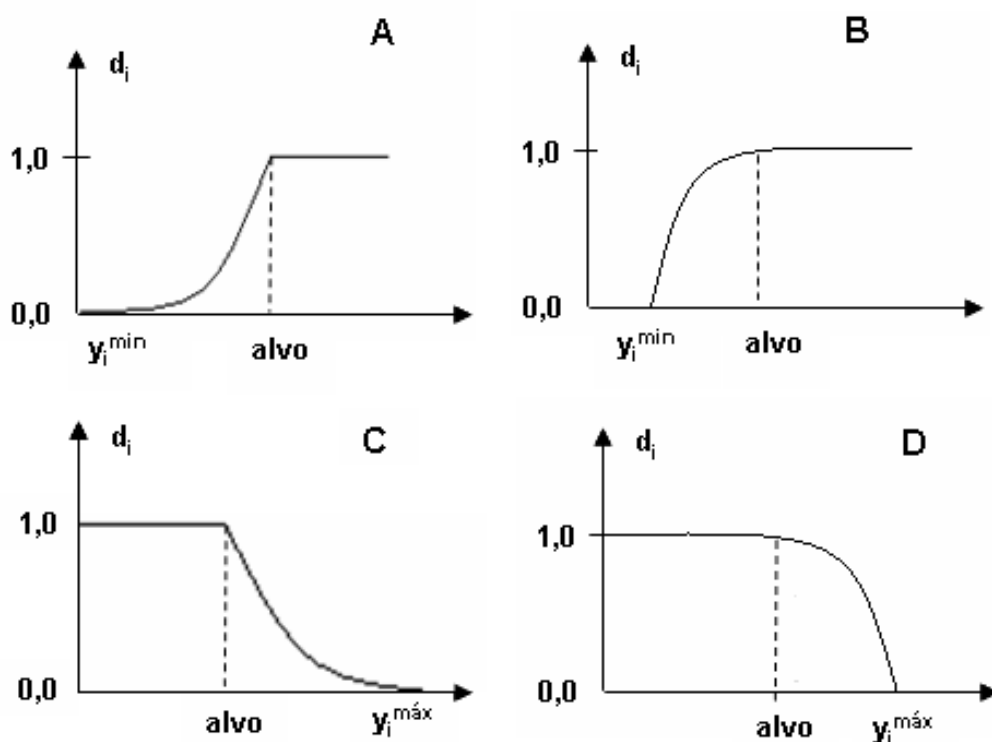


Figura 6: Funções de desejabilidade unilaterais não lineares

Os formatos das funções de desejabilidade mostrados na Figura 6 são encontrados através da alteração dos expoentes das funções descritas pelas equações 20 b e 20 b: para se alcançar a situação descrita nas Figuras 6 A e B, devem ser acrescentados expoentes > 1 e entre 0 e 1, respectivamente, na equação 20 b e para se alcançar a situação descrita nas Figura 6 C e D, devem ser acrescentados expoentes > 1 e entre 0 e 1, respectivamente, na equação 21 b.

Para transformar funções bilaterais lineares em funções bilaterais não lineares, basta alterar, da mesma maneira, os expoentes das equações 22 b e 22 c. Para penalizar valores próximos aos dois limites devem ser acrescentados expoentes maiores que 1 nas equações 22 b e c (Figura 7 A); para permitir uma faixa de valores aceitáveis maior ao redor do alvo (Figura 7 B), devem ser acrescentados expoentes entre 0 e 1 nas equações 22 b e 22 c. Finalmente, é possível ter a combinação das duas situações, mostradas nas Figuras 7 C e D.

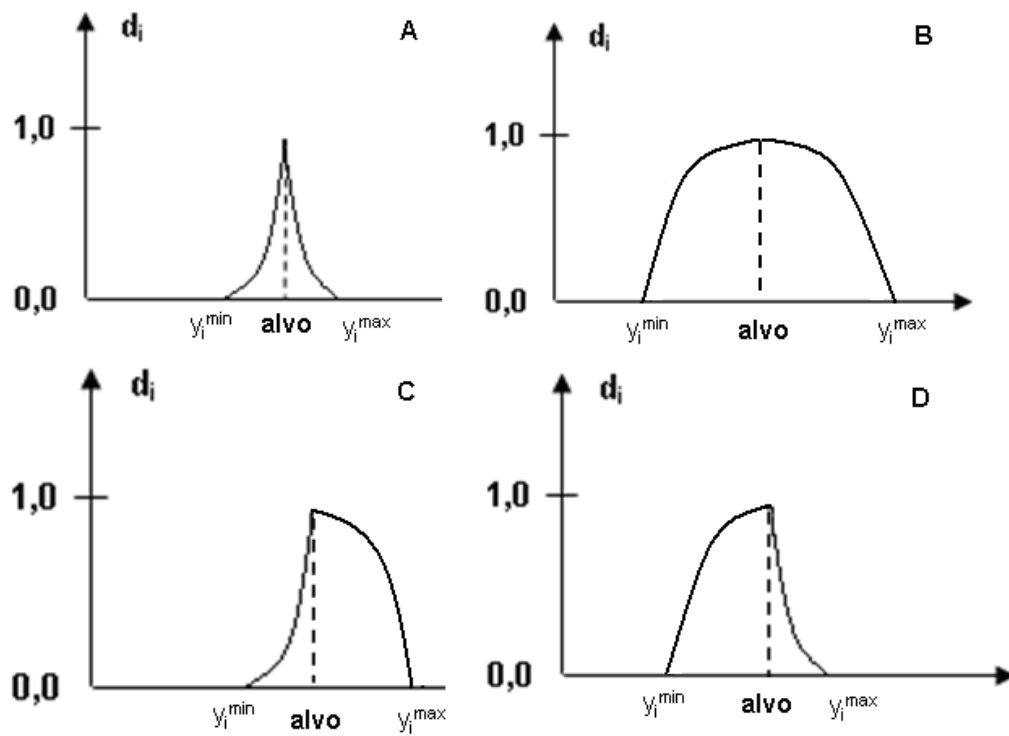


Figura 7: Funções de desejabilidade bilaterias não-lineares. As funções correspondentes aos gráficos A, B, C e D são descritas no texto.

1.4. Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como objetivos principais:

i) o desenvolvimento e a aplicação de estratégias de Planejamento e Otimização Experimental para a otimização simultânea de variáveis de processo e de mistura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a fim de selecionar as condições mais adequadas de fase estacionária (FE) e de fase móvel (FM) a serem utilizadas em uma determinada análise cromatográfica;

ii) a avaliação da importância da realização dos experimentos em ordem aleatória, através da comparação do tratamento dos resultados obtidos considerando a estrutura *split-plot* do planejamento e supondo completa aleatorização;

iii) comparação do desempenho de funções objetivas e funções de Desejabilidade de Derringer e Suich como critérios para expressar a qualidade da resposta em Cromatografia.

CAPÍTULO 2 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1 Preparo e determinação da composição da FM

Para o preparo da FM, foram utilizados os modificadores orgânicos acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF), marca *Tedia*, grau HPLC e água purificada pelo sistema Milli Q para o ajuste da força cromatográfica. Todos os solventes foram filtrados empregando-se uma membrana Millipore GV (Durapore) de PVDF, 0,22 μm de poro, hidrofílica e foram armazenados em frasco âmbar com capacidade de 1 L. Antes de cada corrida, os solventes foram desgaseificados pela passagem de um fluxo de He com pressão de 100 kPa, durante cinco minutos e 30 kPa durante as corridas.

Os componentes denominados *puros* no planejamento de mistura foram misturas de um modificador orgânico e água, em igual força cromatográfica. Para seleção das proporções modificador orgânico:água correspondentes aos componentes puros foi realizada uma corrida inicial empregando ACN:H₂O 80:20 (v/v) e corridas subseqüentes diminuindo-se a proporção de acetonitrila, de forma a encontrar a proporção de ACN:H₂O que fornecesse valores de fator de retenção (k) entre 0,5 e 10. A partir desta proporção, uma estimativa da proporção MeOH:H₂O e THF:H₂O, que fornecesse a mesma força cromatográfica, foi calculada empregando equações de transferência^{21,22}. A proporção exata a ser utilizada foi, entretanto, estabelecida experimentalmente. Para a mistura de agrotóxicos utilizou-se o mesmo procedimento, porém a corrida inicial foi realizada empregando-se uma mistura de ACN:H₂O 50:50 (v/v). A água, neste caso, teve o pH ajustado a 3,0, em um pHmetro, pela adição de ácido fosfórico 1:1 (v/v).

2.2 Equipamento e colunas

As colunas cromatográficas utilizadas foram colunas comerciais, da marca SGE, de diâmetro interno de 0,46 cm e comprimento de 15 cm, recheadas com fase ligada C8 ou C18, de tamanho de partícula 5 μm , Wakosil II. As corridas foram realizadas empregando-se um cromatógrafo a líquido marca Shimadzu,

constituindo de auto-injetor com amostragem programada de 10 μL , modelo SIL-10AF; bombas de alta pressão, tipo recíproca, pistão duplo, modelo LC-10AT; detector espectrofotométrico de arranjo de diodos, cela de 8 μL de volume, 10 mm de caminho óptico, modelo SPD-M10AVP; sistema de aquisição de dados: microcomputador, com software de aquisição de dados cromatográficos Class VP; forno para coluna, modelo CTO-10AS; controlador de sistema SCL-10 A.

2.3 Construção das Curvas de van Deemter

Para a construção das curvas de van Deemter, foi preparada uma solução padrão de naftaleno, pela adição de 10 mg de naftaleno sólido (*Vetec*) a 50 mL de ACN:H₂O 55:45 (v/v), para a medida da eficiência das colunas. Foram realizadas injeções sequenciais desta mistura em ambas as colunas, nas vazões de 0,1 a 1,9 mL/min, com intervalos de 0,1 mL/min, em temperatura fixa em 25 °C e composição da fase móvel de ACN:H₂O 55:45 (v/v).

2.4 Preparo da mistura teste e condições de injeção

Foi preparada inicialmente uma amostra sintética, chamada mistura teste, contendo compostos neutros cuja separação completa é difícil por eluição isocrática utilizando misturas aquosas de modificadores orgânicos normalmente empregados, tais como ACN e MeOH. As amostras foram preparadas a cada ponto do planejamento e dissolvidas na composição de FM correspondente. A Tabela III mostra as concentrações de cada composto na mistura. As corridas foram realizadas a 25 °C, com vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e a detecção foi realizada a 254 nm.

2.5 Preparo da mistura de agrotóxicos e condições de injeção

A mistura de agrotóxicos foi composta de imazetapir (*Chem Service*, 99,0 %), imazaquim (*Chem Service*, 99,0%), ametrina (*Novartis* 96,8 %), cianazina (*Novartis*, 98,0 %), simazina (*Novartis*, 98,3 %), atrazina (*Chem Service*, 98,0 %), bentazona (*Guará*, 99,9 %), carbaril (*Supelco* 98,0 %), carboxim (*Chem Service*, 99,0 %), tiofanato metílico (*Riedel de Haen*, 99,8 %) e metsulfuron (*Chem Service* 98,0 %). O seguinte procedimento foi executado para o preparo das soluções-estoque de todos os padrões, com exceção dos padrões de simazina e carbaril: foram pesados 0,010 g do padrão do composto sólido e dissolvidos em 10 mL de uma mistura acetonitrila:água 70:30 (v/v), de forma que a solução resultante apresentasse concentração de 1000 µg/mL. Foram transferidos 150 µL da solução-estoque de cada padrão para um balão volumétrico de 10 mL, contendo a mistura de solventes correspondente ao ponto do planejamento a ser realizado. Assim, a concentração de cada padrão na mistura foi de aproximadamente 15 µg/mL. Para o carbaril, foram transferidos 100 µL do padrão para o balão da mistura e sua concentração final foi de aproximadamente 10 µg/mL. Para a simazina, foram pesados 0,060 g e dissolvidos em 20 mL de acetonitrila pura, de forma que a solução resultante apresentasse concentração de 3000 µg/mL. Desta solução, foram transferidos 500 µL para o balão da mistura, de modo que a concentração final fosse de aproximadamente 150 µg/mL.

As corridas foram realizadas a 25 °C, em uma vazão da fase móvel de 1,0 mL/min e a detecção foi realizada em 210 nm.

Tabela III: Constituintes da mistura teste com as respectivas marcas e concentrações utilizadas.

Composto	Marca	Concentração (mg/mL)	Concentração (µg/mL)
Uracil	Aldrich	$1,0 \times 10^{-2}$	-
Fenol	Labsynth	$1,8 \times 10^{-1}$	-
β -naftol	Vetec	$6,0 \times 10^{-2}$	-
α -naftol	Vetec	$1,5 \times 10^{-1}$	-
Naftaleno	Vetec	$8,4 \times 10^{-1}$	-
Éter β -metil-naftílico	*	$2,0 \times 10^{-1}$	-
Tolueno	Tedia	-	1,4
Benzeno	Labsynth	-	1,0
Benzonitrila	Aldrich		0,1
N,N-dimetilanilina	Aldrich		0,02

* preparado no laboratório de acordo com procedimento descrito na referência ⁴²

2.6 Planejamentos para construção de modelos combinados

Foram realizados planejamentos com estrutura *split-plot* empregando a mistura de compostos neutros e a mistura de agrotóxicos incluindo o tipo de coluna como variável de processo (C8 nível baixo e C18 nível alto) e a composição de FM como variável de mistura. O tipo de coluna foi considerado *main-plot* e os *sub-plots* foram formados pelas composições de FM correspondentes aos pontos de um planejamento de misturas simplex-centróide com pontos axiais. Foi realizada uma replicata de todo o bloco para a estimativa das variâncias dos erros. Para comparar a qualidade da separação nas diversas composições de FM e FE foram utilizados dois procedimentos: 1) como resposta utilizou-se uma função objetiva para descrever a separação de todos os compostos empregando um único número e 2) foram construídos diversos modelos empregando critérios elementares (fator de retenção, resolução e fator de retenção relativo) como resposta e as condições que fornecessem a separação desejada foram encontradas empregando-se o conceito de desejabilidade de Derringer e Suich. Os modelos foram avaliados quanto à significância da

regressão e falta de ajuste. Os cálculos foram realizados de acordo com a estrutura *split-plot* do planejamento e também supondo completa aleatorização na realização dos experimentos. Os erros dos coeficientes foram comparados nos dois casos. Os cálculos foram realizados empregando os softwares Design Expert versões 6.0.4 e 7.1.1 (licença temporária de 45 dias) e Matlab 6.1.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Descrição da estratégia de otimização

Considerando que em FR, a água é empregada para o ajuste da força cromatográfica, o sistema cromatográfico poderia ser descrito por quatro componentes - os três solventes orgânicos mencionados e a água. Em planejamentos de misturas contendo quatro componentes, o sistema é representado por um tetraedro com os vértices correspondendo aos componentes puros e os pontos nas arestas e no interior escolhidos de acordo com o interesse do pesquisador. No entanto, considerando-se este enfoque, há variação na força cromatográfica, além da alteração de seletividade devido à mudança do modificador orgânico. Este tratamento não seria interessante, pois existiriam pontos do planejamento, como por exemplo, os vértices, nos quais a separação cromatográfica praticamente não aconteceria e assim, não haveria interesse na realização de experimentos com estas composições de FM. A região experimental de interesse ficaria então, restrita a uma sub-região muito pequena dentro deste tetraedro, a qual seria mais difícil de visualizar.

Além disto, as alterações na separação causadas por pequenas mudanças na força cromatográfica não provocam alterações tão acentuadas como as causadas pela mudança de um dos solventes da FM. Considerando todos estes aspectos, neste trabalho optou-se por tratar o sistema em termos de *três* componentes, o qual pode ser representado por um triângulo, em cujos vértices estão as *misturas aquosas* dos modificadores orgânicos ACN, MeOH e THF, com a mesma força cromatográfica. Assim, a separação cromatográfica desejada foi buscada através da variação de seletividade dos solventes, mantendo-se a força cromatográfica constante.

O plano inicial incluía o estudo das variáveis de processo tipo de FE, vazão da FM e temperatura da coluna, de forma simultânea com as variáveis de mistura representadas por diferentes composições de FM, de acordo com um planejamento de misturas simplex-centróide, conforme mostrado na Figura 8. As combinações dos níveis das variáveis de processo seriam consideradas *main-plots*, enquanto as diferentes composições de FM seriam consideradas *sub-plots*.

Desta maneira, as combinações de níveis das variáveis de processo seriam mantidas fixas, enquanto corridas cromatográficas empregando todas as composições de FM descritas no planejamento simplex-centróide seriam realizadas. Assim, inicialmente foram realizados estudos prévios para identificar os níveis dos fatores vazão de FM e temperatura da coluna que deveriam ser utilizados nos planejamentos.

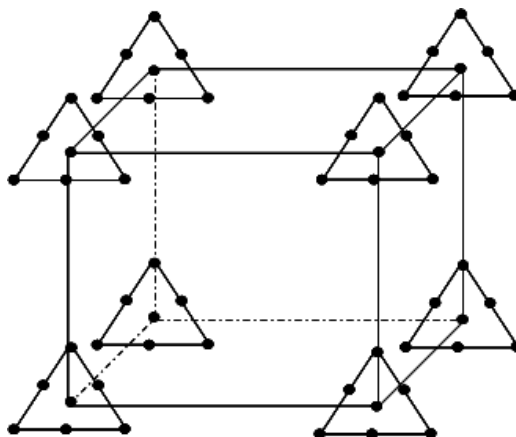


Figura 8: Representação do plano inicial: as combinações dos níveis das variáveis de processo *tipo de FE, temperatura da coluna e vazão da FM* seriam realizadas de acordo com um planejamento fatorial 2^3 (representado pelo cubo, cujos vértices seriam considerados *main-plots*) e as combinações das variáveis de mistura seriam realizadas de acordo com um planejamento simplex-centróide (representado pelos triângulos, cujos pontos seriam considerados *sub-plots*).

3.2 Determinação da força cromatográfica ideal

O primeiro passo no procedimento de otimização foi o ajuste da força cromatográfica, ou seja, foram encontradas as proporções em volume entre o modificador orgânico e água de modo que os valores dos fatores de retenção de todos os compostos se encontrassem na faixa $0,5 < k < 10$. O ajuste da força cromatográfica foi realizado empiricamente, através de diversas corridas, com subseqüentes diminuições na porcentagem do modificador orgânico.

A acetonitrila foi escolhida para a corrida inicial, uma vez que é um solvente amplamente empregado em CLAE-FR por apresentar características desejáveis

como possibilidade de detecção em baixos comprimentos de onda e por possuir baixa viscosidade. Para a mistura de compostos neutros, inicialmente foi utilizada uma mistura ACN:H₂O, na proporção 80:20 (v/v) e nas corridas subseqüentes, a força cromatográfica foi diminuída através da utilização de misturas ACN:H₂O nas seguintes proporções: 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45 e 50:50 (v/v). A força cromatográfica ideal foi alcançada com a proporção ACN:H₂O 55:45 (v/v), para a qual os valores de k estavam entre 0,9 e 8.

Para encontrar a proporção do modificador orgânico:água para os outros dois solventes orgânicos, MeOH e THF, de modo que a força cromatográfica permanecesse constante, foi empregada a equação:

$$\phi_1 S_1 = \phi_2 S_2 \quad (24)$$

onde ϕ_1, ϕ_2 representam as frações em volume do solvente 1 (conhecida) e 2 (o qual se deseja determinar) e S_1, S_2 representam a polaridade (fator força-peso em FR, tabelado) dos solventes 1 e 2, respectivamente.

Os valores dos fatores força-peso tabelados para ACN, MeOH e THF são 3,2; 2,6 e 4,5, respectivamente^{21,22}. Assim, as proporções de MeOH:H₂O e THF:H₂O encontradas empregando-se a equação 6, foram 68:32 v/v e 40: 60 v/v, respectivamente. Entretanto, uma vez que esta equação fornece apenas uma aproximação para as proporções em volume dos solventes que serão empregados, um ajuste fino foi realizado, através de corridas realizadas variando-se as proporções dos solventes orgânicos, a partir dos valores citados, até que o tempo da corrida cromatográfica fosse aproximadamente o mesmo para as misturas aquosas dos três modificadores orgânicos. Assim, empiricamente, as proporções aquosas dos solventes que forneceram aproximadamente a mesma força cromatográfica para esta separação foram: ACN: H₂O 55:45 (v/v); MeOH:H₂O 70:30 (v/v) e THF:H₂O 50:50 (v/v). As Figuras 9 -11 mostram os cromatogramas obtidos empregando-se estas composições de FM.

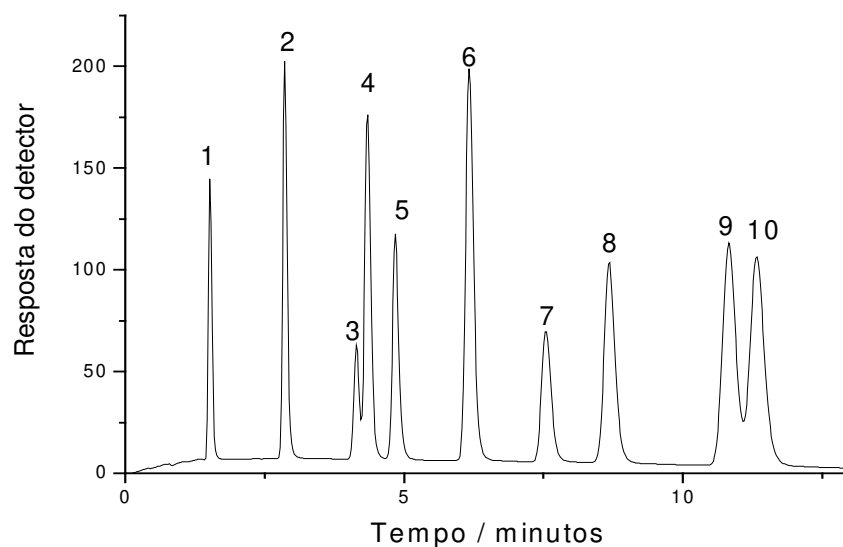


Figura 9: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μ L, FM ACN:H₂O 55:45 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm e temperatura 25 °C. Compostos: 1 = uracil, 2 = fenol, 3 = benzonitrila, 4 = β - naftol, 5 = α - naftol, 6 = benzeno, 7 = N,N-dimetilanilina, 8 = tolueno, 9 = éter β -metil-naftílico e 10 = naftaleno.

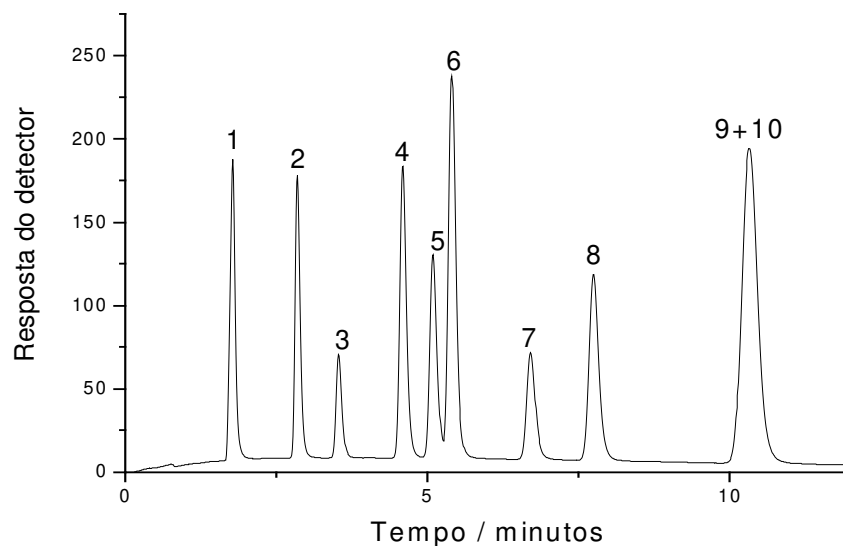


Figura 10: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μ L, FM MeOH:H₂O 70:30 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm e temperatura 25 °C. Compostos: 1 = uracil, 2 = fenol, 3 = benzonitrila, 4 = β - naftol, 5 = α - naftol, 6 = benzeno, 7 = N,N-dimetilanilina, 8 = tolueno, 9 = éter β -metil-naftílico e 10 = naftaleno.

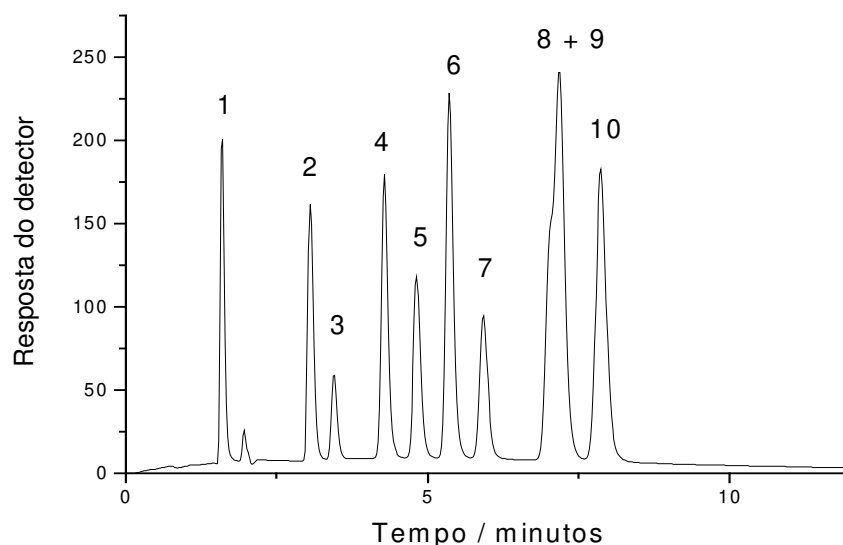


Figura 11: Cromatograma obtido na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μL , FM THF:H₂O 50:50 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm, e temperatura 25 °C. Compostos: 1= uracil, 2 = fenol, 3 = benzonitrila, 4 = β - naftol, 5 = α - naftol, 6 = benzeno, 7 = N,N-dimetilanilina, 8 = tolueno, 9 = éter β -metil-naftílico e 10 = naftaleno.

Através da análise dos cromatogramas mostrados nas Figuras 9, 10 e 11 é possível verificar a influência do tipo de modificador orgânico na seletividade da separação: enquanto os compostos 3 e 4 se sobrepuseram parcialmente quando se empregou como FM ACN:H₂O, eles foram completamente separados quando se empregou como FM MeOH:H₂O ou THF:H₂O. Por outro lado, os compostos 5 e 6, bem separados quando se empregou FM ACN:H₂O ou THF:H₂O, se sobrepuseram parcialmente em MeOH:H₂O. Da mesma maneira, os compostos 8 e 9 se mostraram bem separados com ACN:H₂O e MeOH:H₂O, porém co-eluíram quando se empregou THF:H₂O. Finalmente, os compostos 9 e 10 foram completamente separados apenas em THF:H₂O. Para a mistura de agrotóxicos, o mesmo procedimento foi adotado, porém a corrida inicial foi realizada empregando-se ACN:H₂O 50:50 (v/v). As melhores proporções de solvente orgânico:água encontradas foram ACN:H₂O 30:70, MeOH:H₂O 45:55 e THF:H₂O

30:70 (v/v) e os cromatogramas obtidos nestas condições são mostrados nas Figuras 12, 13 e 14, respectivamente.

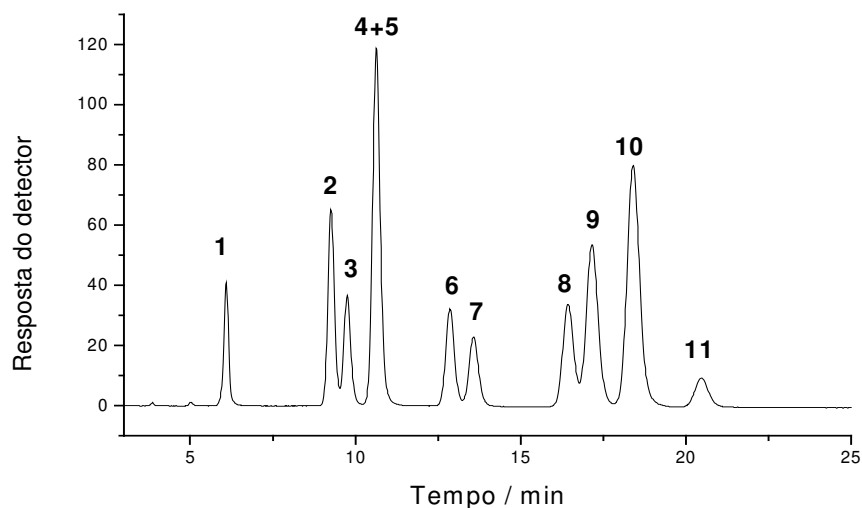


Figura 12: Cromatograma obtido na separação de onze agrotóxicos empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μ L, FM ACN:H₂O (pH = 3,0) 30:70 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm e temperatura 25 °C. Agrotóxicos: 1 = imazetapir, 2 = simazina, 3 = imazaquim, 4 = ametrina, 5 = cianazina, 6 = tiofanato, 7 = metsulfuron, 8 = bentazona, 9 = atrazina, 10 = carbaril e 11 = carboxin.

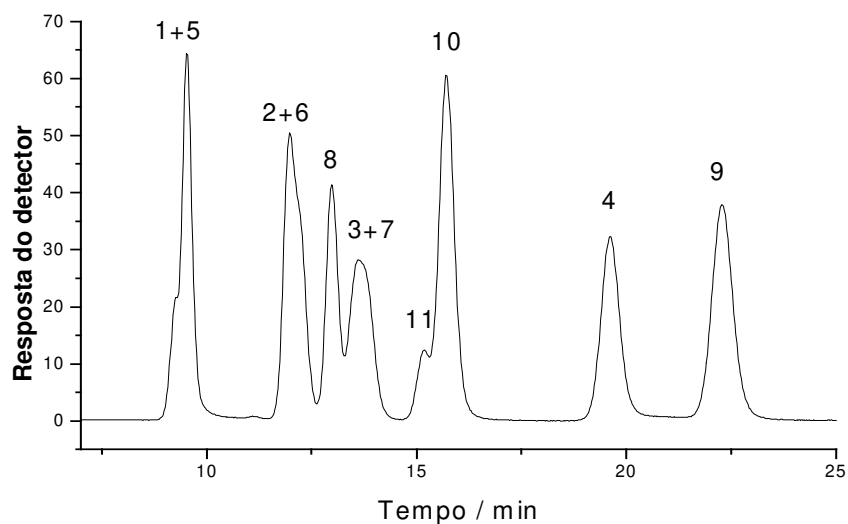


Figura 13: Cromatograma obtido na separação de onze agrotóxicos empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μ L, FM MeOH:H₂O (pH = 3,0) 45:55 (v/v), vazão 1,0 mL/min; detecção 210 nm e temperatura 25 °C. Agrotóxicos: 1 = imazetapir, 2 = simazina, 3 = imazaquim, 4 = ametrina, 5 = cianazina, 6 = tiofanato, 7 = metsulfuron, 8 = bentazona, 9 = atrazina, 10 = carbaril e 11 = carboxim.

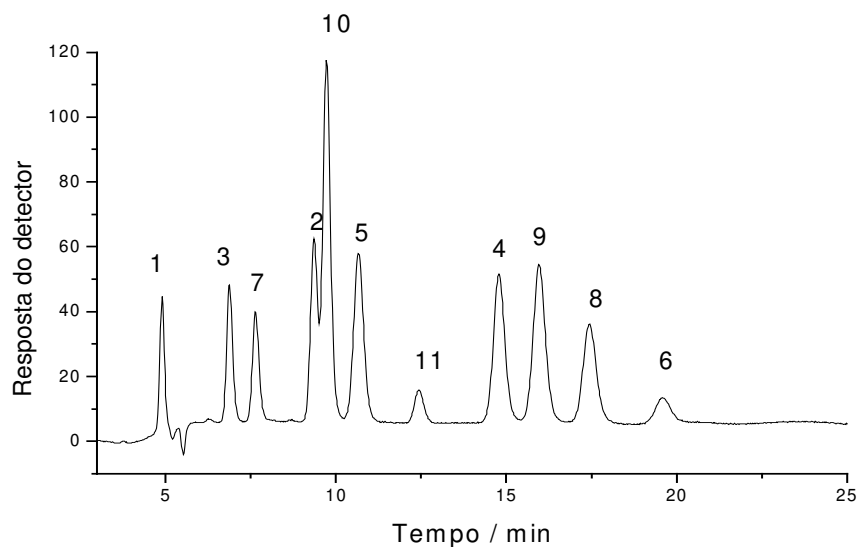


Figura 14: Cromatograma obtido para a separação da mistura de agrotóxicos empregando coluna C 18; volume de injeção 10 μ L, FM THF:H₂O (pH = 3,0) 30:70 (v/v), vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm e temperatura 25 °C. Agrotóxicos: 1= imazetapir, 2 = simazina, 3 = imazaquim, 4 = ametrina, 5 = cianazina, 6 = tiofanato, 7 = metsulfuron, 8 = bentazona, 9 = atrazina, 10 = carbaril e 11 = carboxim.

3.3 Determinação das composições de FM do planejamento

Após a determinação da força cromatográfica para os três constituintes puros de mistura, as composições de FM a serem utilizadas foram selecionadas de acordo com um planejamento simplex-centróide, com pontos axiais, conforme mostra a Figura 15.

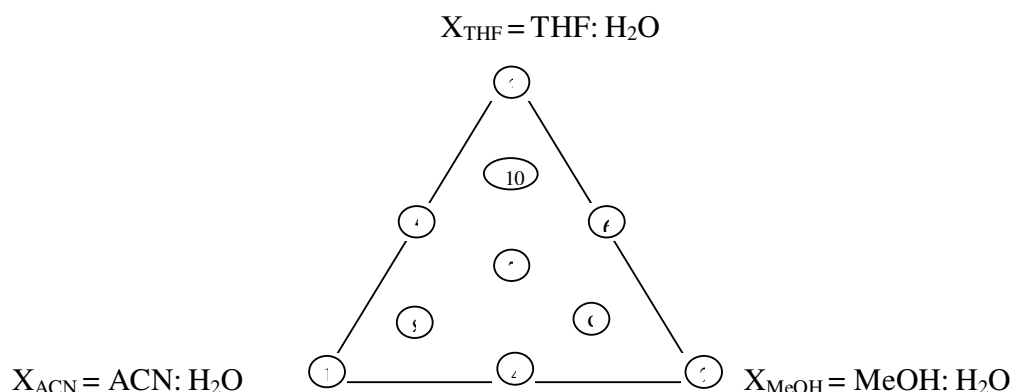


Figura 15: Planejamento simplex-centróide utilizado para determinação das composições de FM a serem utilizadas. $X_{\text{ACN}} = \text{ACN:H}_2\text{O}$ 55:45 (v/v) para mistura de compostos neutros e 30:70 (v/v) para a mistura de agrotóxicos; $X_{\text{MeOH}} = \text{MeOH:H}_2\text{O}$ 70:30 (v/v) para a mistura de compostos neutros e 45:55 (v/v) para a mistura de agrotóxicos; $X_{\text{THF}} = \text{THF:H}_2\text{O}$ 50:50 para a mistura de compostos neutros e 30:70 para a mistura de agrotóxicos.

As composições de FM correspondentes aos pontos das arestas e do interior do triângulo foram obtidas considerando-se a proporção de cada solvente orgânico em relação à porcentagem que forneceu a força cromatográfica ideal. Por exemplo, o ponto 7, corresponde a misturas em igual proporção dos três solventes aquosos (um terço de cada), então no caso da separação dos compostos neutros, tem-se que:

- ACN sendo uma mistura aquosa ACN:H₂O 55:45 (v/v), um terço corresponde a $55/3 = 18,3$ mL de *acetonitrila*;
- MeOH sendo uma mistura aquosa MeOH:H₂O 70:30 (v/v), um terço corresponde a $70/3 = 23,3$ mL de *metanol*;
- THF sendo uma mistura aquosa de THF:H₂O 50:50 (v/v). um terço corresponde a $50/3 = 16,7$ mL de *tetraidrofurano*.
- A porcentagem de água é o volume complementar a 100 mL, $100 - (18,3 + 23,3 + 16,7) = 41,7$ mL.

3.4 Experimentos iniciais para determinação dos níveis dos fatores

3.4.1 Domínio experimental de misturas

Sabe-se que, dentre os fatores que afetam a retenção e a seletividade em CLAE, a composição da FM tem maior influência, uma vez que os constituintes da amostra interagem com ela de forma efetiva durante a corrida cromatográfica. Desta maneira, optou-se por iniciar o trabalho desenvolvendo um planejamento de misturas, para reconhecimento das características da região experimental, mantendo-se as condições de processo fixas: coluna C 18, temperatura da coluna 25 °C, vazão de FM 0,3 mL/min para a mistura de compostos neutros e 1,0 mL/min para a mistura de agrotóxicos.

Para a mistura de compostos neutros, verificou-se que a região que engloba as misturas aquosas com maior quantidade de MeOH e THF não fornece uma separação satisfatória, pois há sobreposição excessiva de picos. Desta maneira, optou-se por excluir as sub-regiões envolvendo as composições de FM $0 \leq \text{ACN:H}_2\text{O} \leq 0,5$; $0,5 \leq \text{MeOH:H}_2\text{O} \leq 1,0$ e $0,5 \leq \text{THF:H}_2\text{O} \leq 1,0$. Desta maneira, para a mistura de compostos neutros o domínio experimental foi formado pela sub-região $0,5 \leq \text{ACN:H}_2\text{O} \leq 1,0$; $0 \leq \text{MeOH:H}_2\text{O} \leq 0,5$ e $0 \leq \text{THF:H}_2\text{O} \leq 0,5$.

Considerando que esta é uma região triangular reduzida dentro do triângulo maior, as composições de FM puderam ser re-calculadas e representadas por *pseudocomponentes*, através da equação 25. Esta transformação normalmente é empregada, pois torna a matriz **X** melhor condicionada para os cálculos.

$$x_{ip} = \frac{x_i - a_i}{1 - \sum_{i=1}^q a_i} \quad (25)$$

onde x_{ip} é a proporção do solvente i em termos de pseudocomponentes, x_i representa a proporção original do solvente i (no triângulo de misturas ternárias) e a_i é o limite inferior do solvente i .

Para a mistura de agrotóxicos, não foi realizada redução do domínio experimental.

3.4.2 Vazão da FM

A alteração da vazão da FM tem efeito direto no tempo da corrida, porque os compostos são obrigados a atravessar a coluna mais rapidamente, porém a eficiência também é alterada, de acordo com a teoria de van Deemter e estas alterações podem acarretar modificações na separação. Foram construídas então as curvas de van Deemter, mostradas na Figura 16, para as duas colunas para determinar a vazão na qual a eficiência das colunas é máxima. As curvas foram construídas empregando solução padrão de naftaleno (*Vetec*), de concentração 0,2 mg/mL; FM = ACN:H₂O 55:45 (v/v), temperatura da coluna = 25 °C.

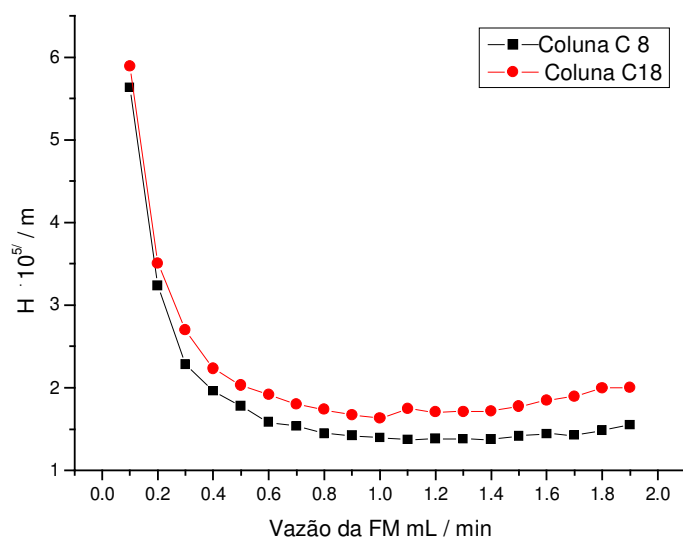


Figura 16: Curvas de van Deemter para as duas colunas empregadas neste trabalho (colunas marca SGE, de diâmetro interno de 0,46 cm e comprimento de 15 cm, recheadas com fase ligada C8 ou C18, de tamanho de partícula 5 µm, Wakosil II). H representa a altura de prato.

Através da análise das curvas mostradas na Figura 16, é possível verificar que após 1,0 mL/min a eficiência se torna praticamente constante e a utilização de vazões maiores que esta faz com que os compostos atravessem a coluna mais rapidamente apenas, o que causa sobreposição de picos. Por outro lado, vazões menores que 1,0 mL/min poderiam ocasionar melhoras na separação, apesar da perda de eficiência das colunas.

Para verificar como se dá a relação eficiência/separação para vazões menores que 1,00 mL/min foi realizado um planejamento simplex centróide empregando a coluna C 18, com temperatura fixa em 25 °C e vazões de 0,3 mL/min e 1,0 mL/min. Para este estudo, foi utilizada a mistura dos compostos neutros e como resposta o somatório das resoluções. As composições de FM em proporções das variáveis x_1 , x_2 e x_3 e as proporções em termos dos *volumes* dos solventes acetonitrila, metanol, tetraidrofurano e água correspondentes aos pontos do planejamento experimental, são mostradas na Tabela IV.

Tabela IV: Proporções das variáveis originais x_{ACN} , x_{MeOH} e x_{THF} , pseudocomponentes e volumes dos solventes acetonitrila, metanol, tetraidrofurano e água correspondentes aos pontos do planejamento simplex-centróide empregado para separação dos constituintes da mistura teste.

Ensaio	Comp. ($x_{ACN}, x_{MeOH}, x_{THF}$)	Pseudocomponentes	Composição em função dos volumes dos quatro solventes (% v/v/v/v)			
			ACN	MeOH	THF	H ₂ O
P1	(1;0;0)	(1;0;0)	55,0	0,0	0,0	45,0
P2	(0,5;0,5;0)	(0;1;0)	28,0	35,0	0,0	37,0
P3	(0,5;0;0,5)	(0;0;1)	28,0	0,0	25,0	47,0
P4	(0,75;0,25;0)	(0,5;0,5;0)	41,0	18,0	0,0	41,0
P5	(0,75;0;0,25)	(0,5;0;0,5)	41,0	0,0	13,0	46,0
P6	(0,5;0,25;0,25)	(0;0,5;0,5)	28,0	18,0	13,0	41,0
P7	(0,667;0,167;0,167)	(0,333;0,333;0,333)	37,0	12,0	8,0	43,0
P8	(0,833;0,083;0,083)	(0,667;0,167;0,167)	46,0	6,0	4,0	44,0
P9	(0,583;0,333;0,083)	(0,167;0,667;0,167)	32,0	23,0	4,0	41,0
P10	(0,583;0,083;0,333)	(0,167;0,167;0,667)	32,0	6,0	17,0	45,0

Foram empregados 7 pontos para o cálculo dos coeficientes do modelo quadrático e os pontos axiais foram empregados para predição. A Tabela V mostra os resultados obtidos.

Tabela V: Valores observados experimentalmente e preditos pelo modelo quadrático para o somatório das resoluções dos compostos da mistura teste nas composições de FM descritas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV), vazões de FM = 0,3 e 1,0 mL/min e coluna C18.

Experimento	Vazão 0,3 mL/min			Vazão 1,0 mL/min		
	Valor predito	Valor observado	Erro (%)	Valor predito	Valor observado	Erro
Ponto 8 R1	12,6	13,0	-1,64	13,2	13,3	-0,53
Ponto 8 R2		12,7			13,3	
Ponto 9 R1	11,5	11,8	1,27	12,8	12,6	0,98
Ponto 9 R2		11,0			12,7	
Ponto 10 R1	11,9	12,3	-3,33	13,3	13,5	-1,48
Ponto 10 R2		*			13,5	

* valor anômalo

Observando-se os resultados mostrados na Tabela V, pode-se verificar que i) o valor *absoluto* das respostas é maior quando se emprega a vazão de 1,0 mL/min, indicando que a separação é ligeiramente melhor nesta vazão; ii) a *precisão* entre as replicatas é maior na vazão de 1,0 mL/min, pois as diferenças entre as replicatas é menor nesta vazão e iii) a *exatidão* também é superior na vazão de 1,0 mL/min, pois a concordância entre os valores observados e preditos é maior. Vale ressaltar que maior precisão entre as replicatas e exatidão entre valores preditos e observados também foi observados entre os 7 pontos do planejamento na vazão 1,0 mL/min. Desta maneira, decidiu-se que a vazão da FM deveria ser otimizada da maneira convencional, ou seja, através da curva de van Deemter e não incluir este fator nos planejamentos. De fato, em uma revisão sobre otimização em cromatografia³², Phan-Tan-Luu e Siouffi recomendaram a sua não inclusão. Os cromatogramas obtidos empregando-se a composição de FM correspondentes ao ponto 1 do planejamento (ACN:H₂O 55:45, v/v) nas duas vazões são mostrados na Figura 17, a fim de ilustrar que realmente não há ganho na separação quando a vazão é diminuída, ou seja, que existe apenas perda na eficiência, aumento no tempo de análise e, para alguns compostos, perda na resolução.

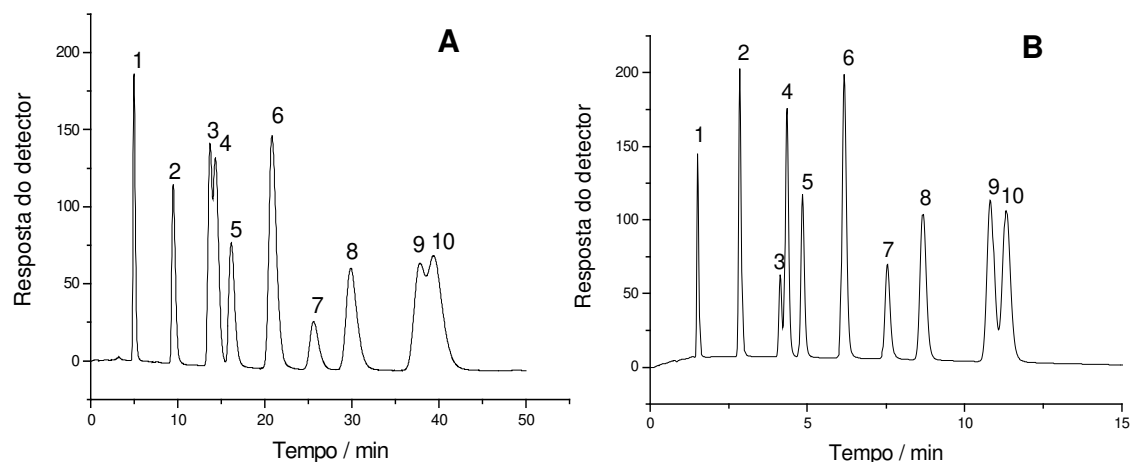


Figura 17: Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da mistura teste empregando coluna C18, volume de injeção 10 μ L, FM ACN:H₂O 55:45 (v/v), detecção 254 nm, temperatura 25 °C e vazão 0,3 mL/min (A) e 1,0 mL/min (B). Compostos: 1= uracil, 2 = fenol, 3 = benzonitrila, 4 = β - naftol, 5 = α - naftol, 6 = benzeno, 7 = N,N-dimetilanilina, 8= tolueno, 9 = éter β -metil-naftílico e 10 = naftaleno.

3.4.3 Temperatura

Uma variável de processo que estava incluída no planejamento inicial era a temperatura da coluna. Sabe-se que a variação na temperatura da coluna pode ter influência significativa na separação de alguns compostos, enquanto para outros, ela não tem efeito algum. Para verificar se a separação destes compostos seria afetada pela variação na temperatura, foram realizadas corridas mantendo-se todos os outros parâmetros constantes (vazão da FM = 0,5 mL/min ACN:THF:H₂O 41: 13 :46 (v/v/v) e coluna = C18) em duas temperaturas 25 e 40 °C. Os cromatogramas obtidos podem ser vistos na Figura 18. Devido a um problema na bomba, neste estudo não foi possível empregar a vazão de 1,0 mL/min, valor ótimo determinado pelo gráfico de van Deemter.

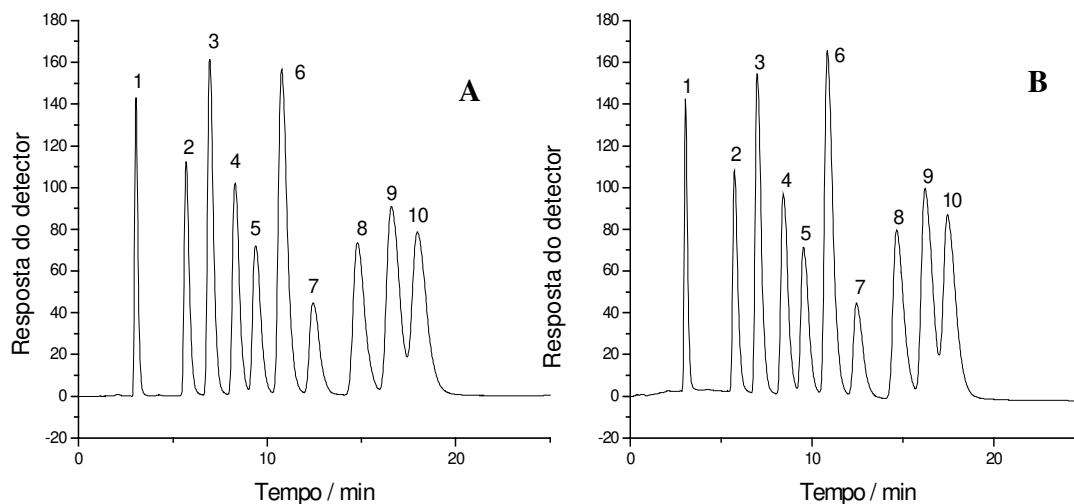


Figura 18: Cromatogramas obtidos na separação de dez compostos neutros empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μ L, FM ACN:THF:H₂O 41:13:46 (v/v/v), vazão 0,5 mL/min, detecção 254 nm, temperatura 25 °C (A) e 40 °C (B); compostos: 1= uracil, 2 = fenol, 3 = benzonitrila, 4 = β - naftol, 5 = α - naftol, 6 = benzeno, 7 = N,N-dimetilanilina, 8= tolueno, 9 = éter β -metil-naftílico e 10 = naftaleno.

Pode-se observar na Figura 18 que o aumento da temperatura não melhorou a separação dos compostos. Para a mistura de agrotóxicos, verificou-se que a separação foi prejudicada pelo aumento da temperatura, e por este motivo, em nenhum dos casos a temperatura foi incluída como uma das variáveis no planejamento.

Considerando que a variação da temperatura não causou alterações significativas na separação dos compostos nas duas misturas estudadas e que a vazão da FM a ser utilizada seria aquela determinada pelo procedimento tradicional da curva de van Deemter, os *main-plots* do planejamento foram formados pelos dois níveis da variável tipo de FE, com o nível baixo sendo a coluna C 8 e nível alto a coluna C 18. A temperatura foi fixada em 25 °C e a vazão da FM em 1,0 mL/min. Os experimentos foram realizados da seguinte maneira: Fixou-se uma coluna (escolhida de forma aleatória) e todas as combinações de FM correspondentes ao planejamento simplex-centróide mostradas na Tabela IV foram realizadas também em ordem aleatória. A coluna foi então trocada e todas

as combinações de misturas foram novamente realizadas. Este procedimento foi repetido para estimativa do erro.

3.5 Resultados empregando o somatório das resoluções como resposta

As composições de FM empregadas foram as mesmas mostradas na Tabela IV e as respostas obtidas são mostradas na Tabela VI. Foram construídos modelos combinados através da multiplicação de um modelo cúbico especial para misturas por um modelo linear para o tipo de coluna. Os resultados foram tratados supondo completa aleatorização na realização dos experimentos e empregaram-se os dez pontos do planejamento para a determinação dos coeficientes do modelo. Verificou-se que o Ponto 9 (composição de FM ACN:MeOH:THF:H₂O 32:23:4:41 v/v/v/v) na coluna C 8 foi considerado anômalo e desta maneira, foi retirado do conjunto de dados. A análise da variância para o modelo quadrático é mostrada na Tabela VII.

Tabela VI: Valores observados experimentalmente do somatório das resoluções dos constituintes da mistura teste nos dez pontos do planejamento simplex centróide com as composições de FM descritas na Tabela IV nas colunas C 8 e C 18.

	<i>Main-plot 1</i> (coluna C 8)		<i>Main-plot 2</i> (coluna C 18)	
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 1	Replicata 2
P1	10,9	10,9	12,6	12,7
P2	10,5	10,5	11,9	11,9
P3	11,3	11,3	12,0	12,2
P4	12,0	12,0	12,0	12,4
P5	13,3	13,3	13,5	13,5
P6	11,5	11,5	13,1	13,1
P7	12,1	12,0	13,5	13,5
P8	12,6	12,6	13,3	13,3
P9	10,5	10,5	12,6	12,7
P10	11,8	11,9	13,5	13,5

Tabela VII: ANOVA para o modelo combinado construído empregando-se o somatório das resoluções dos constituintes da mistura teste como resposta, supondo completa aleatorização na realização dos experimentos.

	SQ	Graus liberdade	MQ	Teste F
Regressão	28,52	13 (p-1)	2,194	95,4
Resíduos	0,55	24 (n-p)	0,023	
Falta de Ajuste	0,45	5 (m-p)	0,09	18,0
Erro Puro	0,1	19(n-m)	0,005	
Total	29,07	37(n-1)		

Os valores tabelados de $F_{13,24,95\%}$ e $F_{5,19,95\%}$ são, respectivamente, 2,25 e 2,74 indicando que as respostas dependem de fato das variáveis envolvidas porém este modelo apresenta falta de ajuste. Quando é detectada falta de ajuste, a princípio não é correto prosseguir e realizar o teste de significância da regressão. Entretanto, neste caso verificou-se que a falta de ajuste pode estar sendo detectada pelo teste F devido à pequena soma quadrática do erro puro. Devido às características da própria mistura teste na vazão empregada, as diferenças entre as replicações é muito pequena ou ainda inexistente (no caso de picos que se apresentaram sobrepostos nas duas replicatas), fato este que é refletido na pequena soma quadrática devido ao erro puro. Uma vez que o teste F para falta de ajuste é realizado dividindo-se a média quadrática devido à falta de ajuste pela média quadrática devido ao erro puro, embora as replicações sejam autênticas, eles sempre detectarão falta de ajuste dos modelos. Por outro lado, os gráficos de diagnóstico do modelo, resíduos vs valores preditos e valores preditos vs valores observados, mostrados nas Figuras 19 A e B, respectivamente, indicam um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Através da análise da Figura 19, pode se verificar que os resíduos são aleatórios, sem indício de heteroscedasticidade e que existe uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados. Além disto, através da análise do gráfico de probabilidade normal (não mostrado) verifica-se que eles de fato, seguem uma distribuição normal. Os coeficientes do modelo, seus erros padrão e os correspondentes intervalos de 95 % de confiança são mostrados na Tabela VIII.

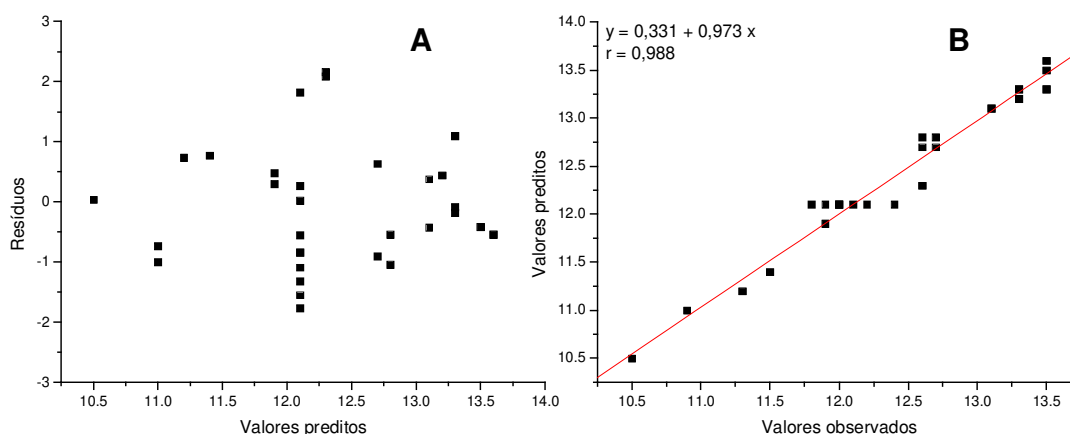


Figura 19: Gráficos de diagnóstico do modelo combinado construído empregando-se o somatório das resoluções dos compostos da mistura teste como respostas: (A) gráfico de resíduos vs valores preditos, (B) gráfico de valores preditos vs valores observados.

Tabela VIII: Coeficientes do modelo combinado, erros padrão e intervalos de 95 % de confiança, obtidos empregando-se o somatório das resoluções dos constituintes da mistura teste como resposta.

	Coeficiente	Erro-padrão	Limite inferior IC	Limite superior IC
A (ACN)	11,84	0,07	11,69	11,99
B (MeOH)	11,18	0,07	11,02	11,33
C (THF)	11,65	0,07	11,50	11,80
AB	2,44	0,37	1,68	3,21
AC	6,68	0,37	5,92	7,44
BC	3,39	0,37	2,63	4,15
AD	0,82	0,07	0,67	0,97
BD	0,68	0,07	0,53	0,83
CD	0,47	0,07	0,32	0,62
ABC	-3,95	2,45	-9,01	1,10
ABD	-2,89	0,37	-3,65	-2,13
ACD	-2,00	0,37	-2,76	-1,24
BCD	1,04	0,37	0,28	1,80
ABCD	13,58	2,45	8,52	18,64
D= Coluna				

Os resultados mostrados na Tabela VIII indicam que apenas o coeficiente que representa a interação ternária entre os constituintes da FM não é

significativo. Entretanto, para manter a hierarquia dos termos no modelo, ele foi mantido, uma vez que a sua interação com o tipo de coluna é significativa. Em experimentos envolvendo misturas ao invés de verificar a significância dos tratamentos envolvendo as misturas, ou seja, testando a hipótese nula $H_0 : b_k = 0$, contra $H_a: b_k \neq 0$, onde b_k indica o coeficiente puro de mistura do modelo combinado, é mais interessante verificar se as composições das misturas referentes aos componentes puros são realmente diferentes **entre si**, ou seja, testando a hipótese nula $E_k = b_k - (b_k' + b_k'')/2 = 0^{14}$. Com este teste, verifica-se se os contrastes entre b_k e a média de $b_k' + b_k''$ são estatisticamente significativos. Os contrastes entre b_1 e $(b_2 + b_3)/2$; b_2 e $(b_1 + b_3)/2$; b_3 e $(b_1 + b_2)/2$ calculados são: 0,425; -0,565 e 0,14 e a variância associada é de 0,008, calculada através da expressão $\text{Var}(y) = \sum a_i^2 \sigma_i^2$. Calculando-se então o intervalo de confiança para estes valores (empregando-se $t_{19,95\%} = 2,093$), tem-se que $E_1 = [0,415 \pm 0,19]$, $E_2 = [-0,545 \pm 0,19]$ e $E_3 = [0,13 \pm 0,19]$. Como os intervalos de confiança para E_1 e E_2 não incluem o zero, é possível rejeitar a hipótese nula, ou seja, os contrastes entre b_1 e a média de b_2 e b_3 e b_2 e a média de b_1 e b_3 são significativas. Apenas o intervalo de confiança para E_3 inclui o valor zero e, neste caso não é possível rejeitar a hipótese nula, ou seja, o contraste entre b_3 e a média de b_1 e b_2 não é significativa. Através da inspeção dos valores dos coeficientes, é possível concluir que isto provavelmente deve-se ao fato dos valores de b_1 e b_3 serem muito próximos. É interessante então testar se b_1 difere estatisticamente de b_3 . Realizando o mesmo procedimento, tem-se que: $E = b_1 - b_3 = 0,190$ e $\text{Var}(E) = (\sigma^2 + \sigma^2) = 0,01$, I. C. = $[0,190 \pm 0,209]$. Uma vez que este intervalo inclui o zero, pode-se concluir que ACN e THF apresentaram o mesmo efeito de mistura nesta separação. Entretanto, como será mostrado posteriormente, esta conclusão é altamente dependente da resposta empregada. A significância dos demais coeficientes pode ser avaliada empregando os intervalos de confiança construídos para os mesmos.

Os mapas de contorno para as duas colunas são mostrados na Figura 20. A separação de todos os compostos na linha base (valor máximo da função = $9 \times 1,5 = 13,5$) foi conseguida em três dos pontos do planejamento, pontos 5, 7 e 10

na coluna C 18. Os cromatogramas obtidos nos pontos 5, 7 e 10 são mostrados na Figura 21 A, B e C, respectivamente.

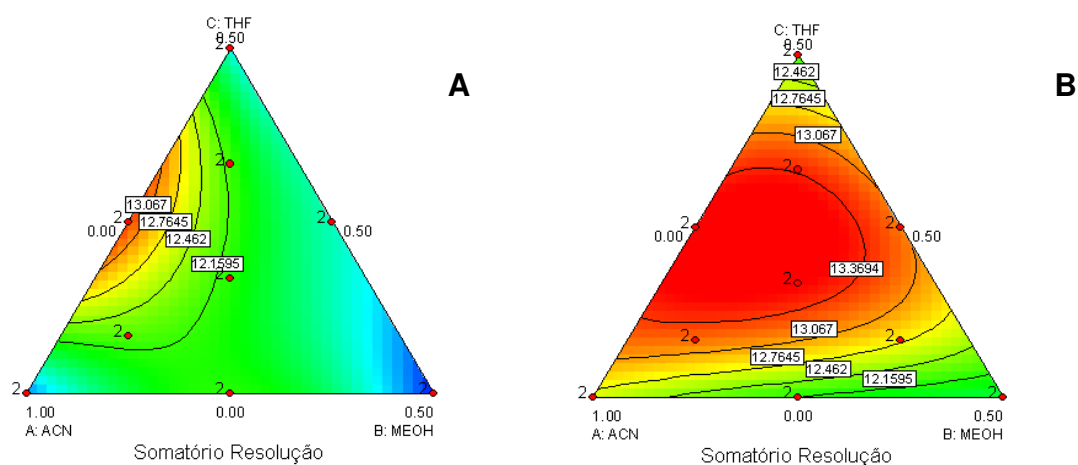


Figura 20: Mapas de contorno para o somatório das resoluções dos compostos da mistura-teste nas colunas C 8 (A) e C 18 (B). Os valores de resposta constante são indicados sobre as linhas. O número 2 indica a presença de dois pontos sobrepostos.

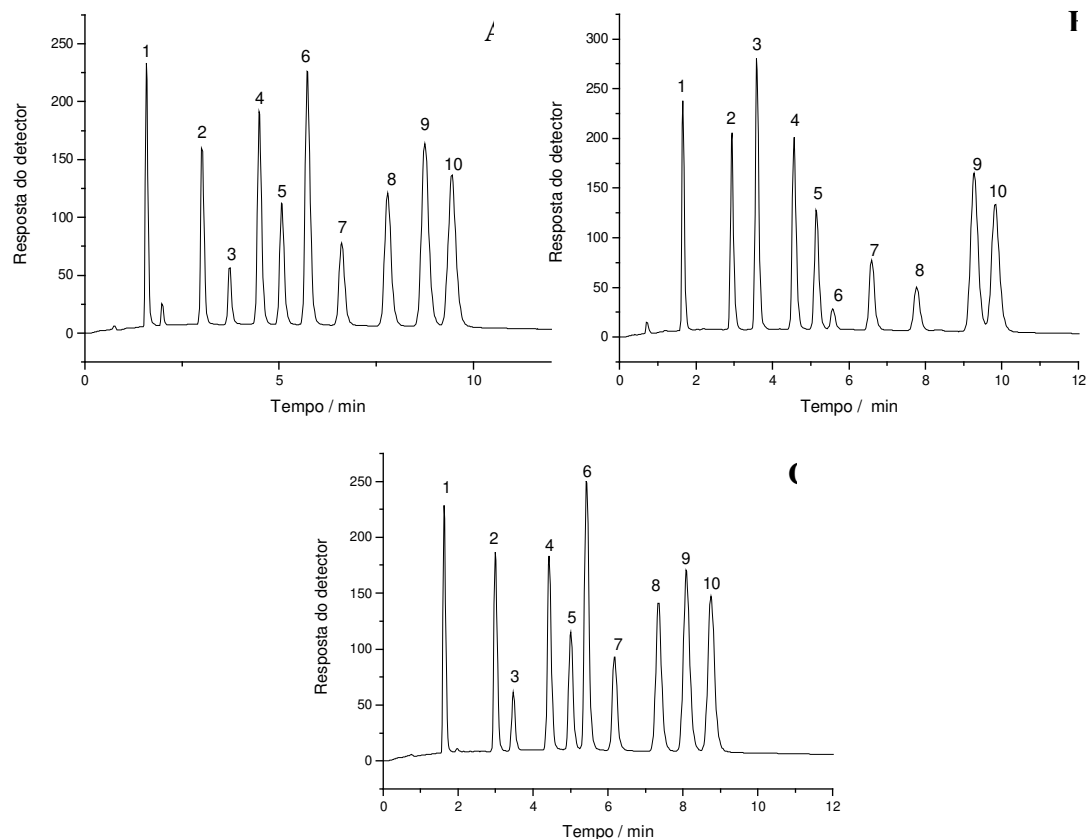


Figura 21: Cromatogramas obtidos na separação dos dez compostos da mistura teste empregando coluna C 18, volume de injeção 10 μ L, vazão 1,0 mL/min, detecção 254 nm, temperatura 25 $^{\circ}$ C e FM: ACN:THF:H₂O 41: 13: 46 (v/v/v) (A), ACN:MeOH:THF:H₂O 37:12:8:43 (B) e ACN:MeOH:THF:H₂O 32:6:17:45 (C) (v/v/v/v). Compostos: 1= uracil, 2 = fenol, 3 = benzonitrila, 4 = β - naftol, 5 = α - naftol, 6 = benzeno, 7 = N,N-dimetilanilina, 8= tolueno, 9 = éter β -metil-naftílico e 10 = naftaleno.

3.6 Resultados empregando critérios elementares como resposta

3.6.1 Fator de retenção (k)

Inicialmente, para verificar o comportamento dos modelos empregando-se como resposta critérios elementares, foram construídos modelos combinados através da multiplicação de um modelo quadrático para misturas por um linear para o tipo de coluna com os *fatores de retenção* como resposta. Foram considerados apenas os compostos que apresentaram problemas de separação

na mistura, empregando as composições de FM estudadas: benzonitrila, β -naftol, α -naftol, benzeno, tolueno, éter β -metil naftílico, tolueno e naftaleno. Estes compostos foram considerados os compostos de interesse na mistura. A análise da variância de acordo com o tratamento *split-plot* para o modelo combinado é mostrada na Tabela IX.

Tabela IX: Resumo da análise da variância *split-plot* considerando a significância dos tratamentos *main-plot*, *sub-plot* e interação *main-sub-plot* e falta de ajuste para todos os modelos combinados, empregando os fatores de retenção dos constituintes da mistura teste como respostas.

Modelo	Tratamento <i>main-plot</i> *	Tratamento <i>sub-plot</i> **	<i>Main-sub-plot</i> **	Falta de ajuste ***
Benzonitrila	576,200	1,406,500	4,00	1,989
β -naftol	738,357	177,000	7,666	1,540
α -naftol	786,381	137,800	4,600	0,486
Benzeno	1,327,300	1,108,750	10,000	2,475
Tolueno	1,380,116	508,060	15,933	1,512
Éter β -metil naftílico	2,201,890	622,120	71,879	2,395
Naftaleno	2,644,230	509,000	52,580	1,368
Valores de F tabelados	$F_{1,1,95\%} = 161,4$	$F_{5,12,95\%} = 3,11$		$F_{2,12,95\%} = 3,89$

A retenção dos compostos aumenta de forma crescente na primeira coluna da Tabela IX. Conforme se pode observar nesta tabela, a soma quadrática de *main-sub-plot* aumentou com a retenção dos compostos. Os gráficos de fatores de retenção em função dos pontos do planejamento para um composto pouco retido (benzonitrila) e para um composto muito retido (naftaleno) são mostrados na Figura 22. Nenhum modelo apresentou falta de ajuste.

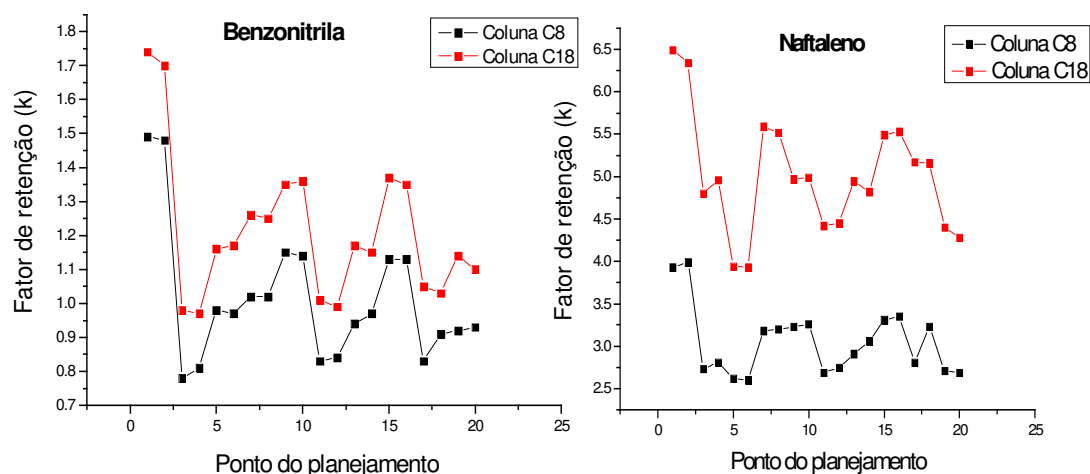
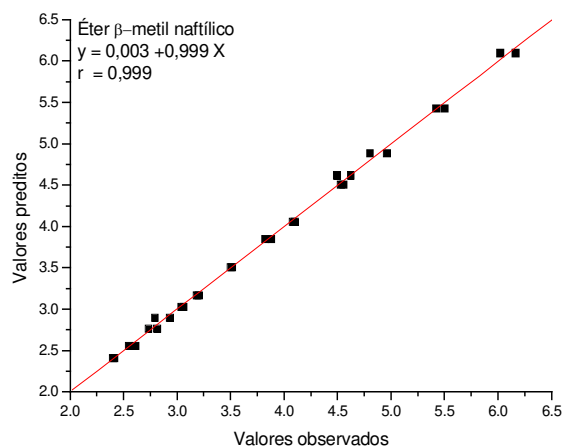
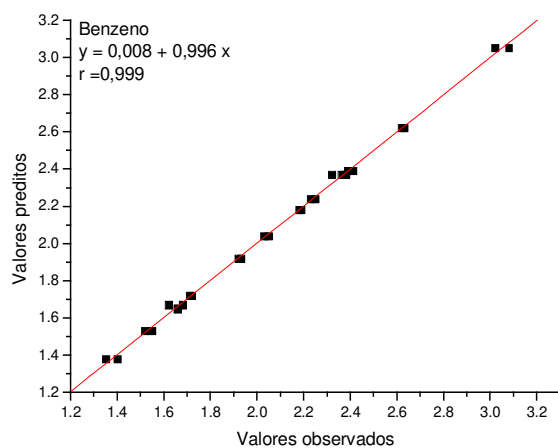
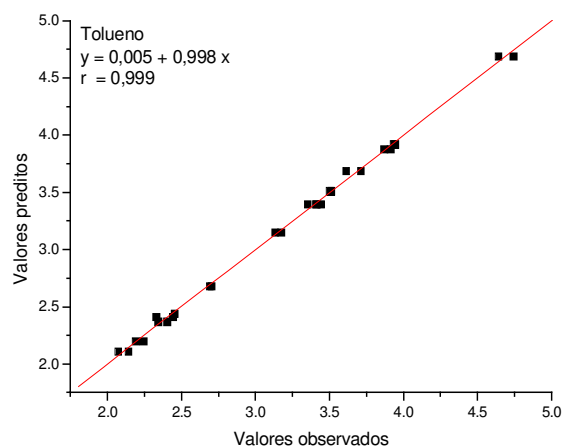
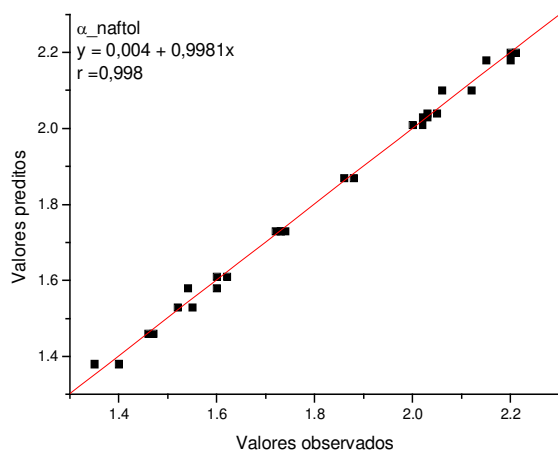
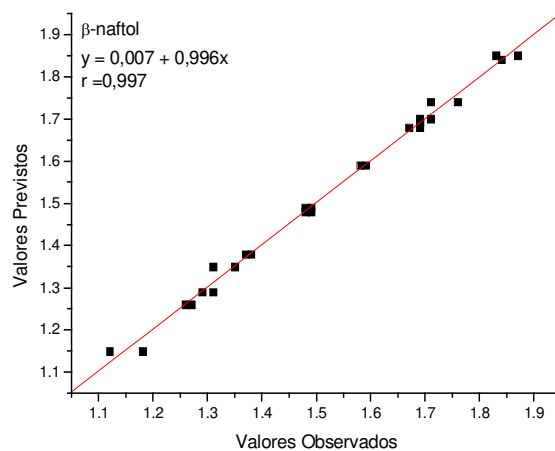
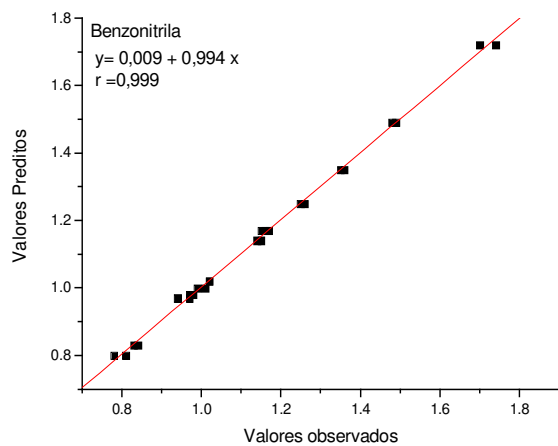


Figura 22: Gráfico dos fatores de retenção ao longo dos dez pontos do planejamento (duplicatas mostradas lado a lado) para um composto pouco retido, benzonitrila e outro muito retido, naftaleno.

Através da análise dos gráficos mostrados na Figura 22, é possível verificar que para um composto pouco retido, a retenção é similar nas duas colunas, pois as duas curvas são próximas, o que permite explicar o menor valor de média quadrática de *main-plot*, em relação a um composto mais retido. Além disto, a interação *main-sub plot* é pouco significativa, o que pode ser visto pela similaridade do perfil das curvas ao longo dos pontos do planejamento nas duas colunas. Por outro lado, para um composto muito retido, a diferença absoluta de retenção entre as colunas C8 e C18 é mais pronunciada, como já era esperado para colunas de fase reversa e isto explica a maior média quadrática de *main-plot*. Além disto, o *perfil da curva* é diferente, indicando que as composições de mistura atuam de forma diferente nas duas colunas. Foram empregados os 7 pontos do planejamento simplex-centróide para construção dos modelos e os três pontos axiais empregados como conjunto externo para predição. Os gráficos de resíduos vs valores normais esperados e resíduos vs valores preditos indicaram que os resíduos seguem uma distribuição normal, sem indícios de heteroscedasticidade. Além disto, os gráficos de valores preditos vs valores observados para os sete pontos do planejamento, mostrados na Figura 23, bem como a predição para o

conjunto externo (Tabelas X e XI) indicaram um excelente ajuste do modelo proposto.

Para todos os modelos o coeficiente linear do gráfico de valores previstos vs valores observados não se mostrou significativo, indicando que os modelos não apresentaram erro sistemático, o coeficiente angular esteve no intervalo de confiança contendo o valor 1 e o coeficiente de correlação foi superior a 0,996. Através da análise da equação do modelo matemático e realizando testes t com as estimativas dos coeficientes (razão coeficiente/erro) foi possível verificar quais coeficientes mais contribuem para as razões F significativas citadas acima. Estes valores calculados devem ser comparados com os valores tabelados, com $P (r-1)(m-1)$ graus de liberdade para o teste contendo apenas coeficientes de mistura e empregando a fórmula de aproximação de Satterthwaite's para estimar o número de graus de liberdade no caso de coeficientes contendo variáveis de processo e mistura³. Entretanto, como uma regra prática, os coeficientes que apresentarem razão coeficiente/erro > 3 podem ser considerados significativos. Os coeficientes significativos dos modelos são mostrados na Tabela XII. Como se pode observar nesta tabela, de uma maneira geral, os coeficientes lineares e quadráticos puros de mistura e os coeficientes lineares de mistura x tipo de coluna são significativos, enquanto os coeficientes que representam as interações quadráticas de mistura x tipo de coluna tendem a não ser significativos.



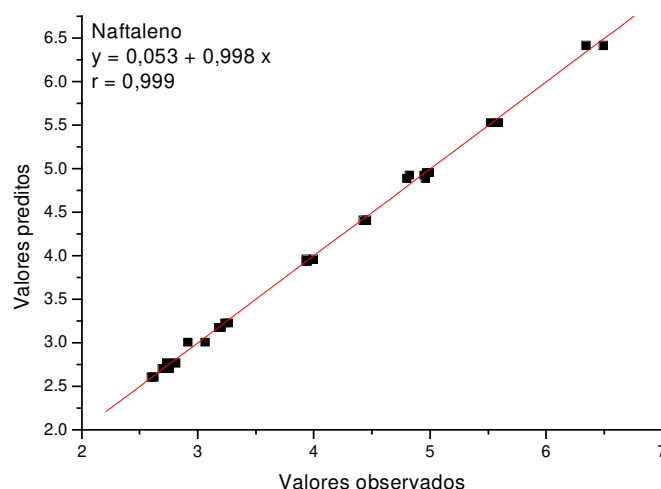


Figura 23: Gráficos de valores preditos vs valores observados para os fatores de retenção dos compostos de interesse da mistura teste.

Tabela X: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para os fatores de retenção dos compostos de interesse na mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 8.

Compostos	P8		P9		P10	
	k predito	k observado	k predito	k observado	k predito	k observado
benzonitrila	1,18	1,13	0,85	0,83	0,95	0,92
β -naftol	1,41	1,37	1,24	1,22	1,38	1,32
α -naftol	1,64	1,60	1,46	1,47	1,63	1,57
benzeno	1,91	1,84	1,49	1,47	1,69	1,63
tolueno	2,72	2,64	2,22	2,21	2,39	2,29
éter β -metil naft.	3,33	3,24	2,81	2,81	2,64	2,53
naftaleno	3,43	3,35	2,86	2,81	2,83	2,71

Tabela XI: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para os fatores de retenção dos compostos de interesse na mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 18.

Compostos	P8		P9		P10	
	k predito	k observado	k predito	k observado	k predito	k observado
benzonitrila	1,41	1,37	1,04	1,05	1,14	1,14
β -naftol	1,80	1,77	1,66	1,72	1,74	1,73
α -naftol	2,15	2,11	1,99	2,07	2,11	2,09
benzeno	2,66	2,58	2,17	2,24	2,36	2,35
tolueno	4,12	4,03	3,51	3,66	3,56	3,53
éter β -metil naft	5,29	5,17	4,74	4,96	3,98	3,99
naftaleno	5,60	5,49	4,91	5,17	4,40	4,40

Tabela XII: Coeficientes significativos dos modelos combinados empregando como resposta os fatores de retenção dos compostos de interesse na mistura teste.

Coeficiente	Benzonitrila	β -naftol	α -naftol	Benzeno	Tolueno	Éter β - metil-naftílico	Naftaleno
A (ACN)	1.604	1.669	1.951	2.647	3.923	4.975	5.192
B (MeOH)	0.886	1.369	1.623	1.710	2.753	3.830	3.829
C (THF)	1.071	1.534	1.818	2.042	2.940	2.960	3.277
AB	-0.447	-0.167	-0.213	-0.626	-0.718	-0.396	-0.618
AC	-0.367	0.223	0.327	-0.311	-0.513	-0.776	-0.553
AD	0.117	0.182	0.225	0.405	0.770	1.121	1.229
BC	-0.262	0.133	0.252	--	--	-0.326	--
BD	0.090	0.217	0.248	0.332	0.645	1.056	1.056
CD	0.095	0.157	0.208	0.325	0.568	0.551	0.664
ABD	--	--	0.142	--	--	0.162	--
ACD	--	--	--	--	--	--	--
BCD	--	--	--	--	--	--	--
D = coluna							

Considerando que a variância experimental se propaga de maneira diferente na estimativa dos erros dos coeficientes do modelo se os experimentos foram realizados com completa aleatorização ou com aleatorização restrita, foram re-calculados os *erros dos coeficientes*, supondo completa aleatorização na realização dos experimentos. Os resultados para um composto pouco retido (benzonitrila), com retenção intermediária (benzeno) e muito retido (naftaleno) são mostrados de forma comparativa na Tabela XIII.

Tabela XIII: Estimativa dos erros dos coeficientes dos modelos empregando os fatores de retenção como resposta, para um composto pouco retido (benzonitrila) com retenção intermediária (benzeno) e muito retido (naftaleno), supondo completa aleatorização e procedimento *split-plot*.

Coeficiente	Benzonitrila		Benzeno		Naftaleno	
	Aleatório	<i>Split-plot</i>	Aleatório	<i>Split-plot</i>	Aleatório	<i>Split-plot</i>
A	0,007	0,006	0,013	0,010	0,032	0,029
B	0,007	0,006	0,013	0,010	0,032	0,029
C	0,007	0,006	0,013	0,010	0,032	0,029
AB	0,032	0,029	0,058	0,048	0,145	0,137
AC	0,032	0,029	0,058	0,048	0,145	0,137
AD	0,007	0,007	0,013	0,014	0,032	0,033
BC	0,032	0,029	0,058	0,048	0,145	0,137
BD	0,007	0,007	0,013	0,014	0,032	0,033
CD	0,007	0,007	0,013	0,014	0,032	0,033
ABD	0,032	0,029	0,058	0,048	0,145	0,137
ACD	0,032	0,029	0,058	0,048	0,145	0,137
BCD	0,032	0,029	0,058	0,048	0,145	0,137

Como se pode observar na Tabela XIII, os erros dos coeficientes encontrados através dos dois procedimentos foram muito próximos, indicando que as mesmas conclusões são obtidas nos dois procedimentos. Em outras palavras, mesmo que os experimentos tenham sido realizados de acordo com uma estrutura *split-plot* e os cálculos supondo completa aleatorização, as conclusões sobre a significância dos coeficientes são as mesmas. Este fato pode ser explicado considerando-se que, enquanto no procedimento de completa aleatorização os erros dos coeficientes são obtidos através da raiz quadrada da diagonal principal da matriz $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{s}^2$, no procedimento *split-plot*, eles são estimados através da raiz quadrada da diagonal principal da matriz $(\mathbf{X}'\mathbf{V}^{-1}\mathbf{X})^{-1}$, sendo a matriz V dada pela equação 8. Por causa da natureza discreta da variável considerada *main-plot* (coluna cromatográfica) o erro no ajuste de seus níveis é muito pequeno quando comparado com o erro no ajuste das composições de FM (*sub-plots*). Como a variância das replicatas é pequena também, os termos σ^2_R e σ^2_{RZ} podem ser desprezados na equação 3 e a matriz V irá se reduzir a $I_m\sigma_e^2$ fornecendo a mesma expressão matemática do cálculo dos erros no caso de completa aleatorização.

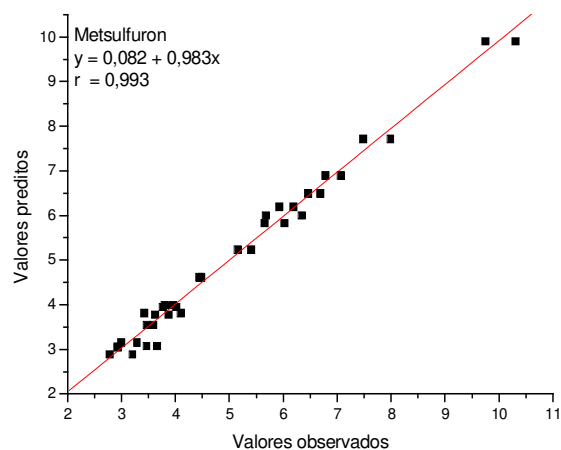
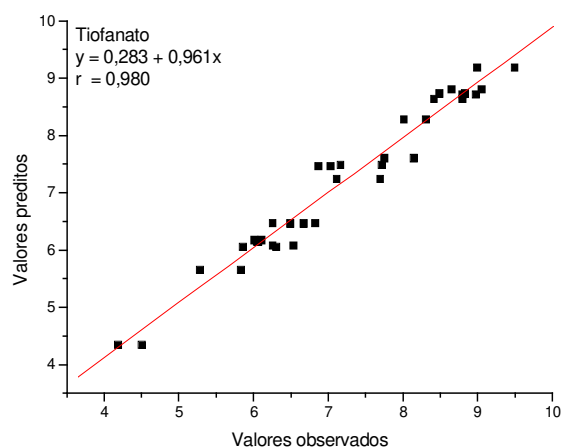
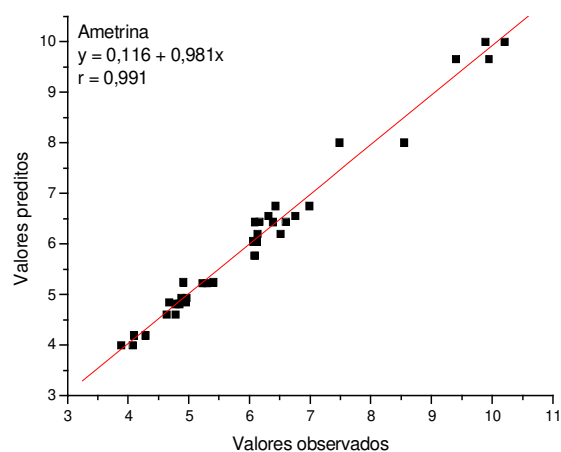
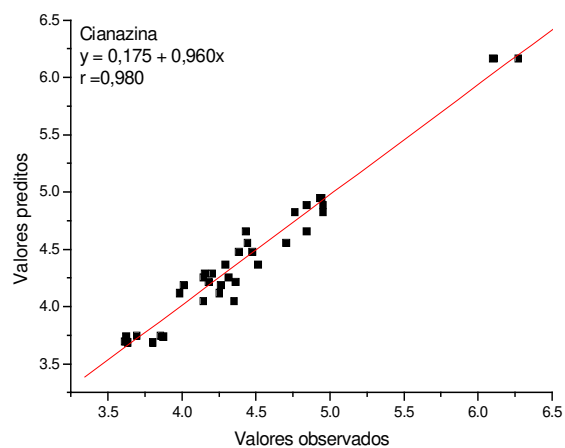
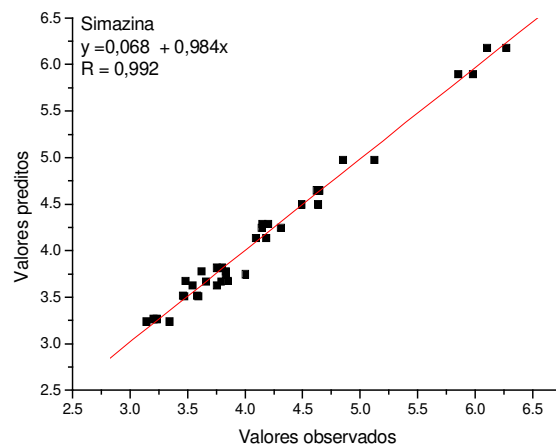
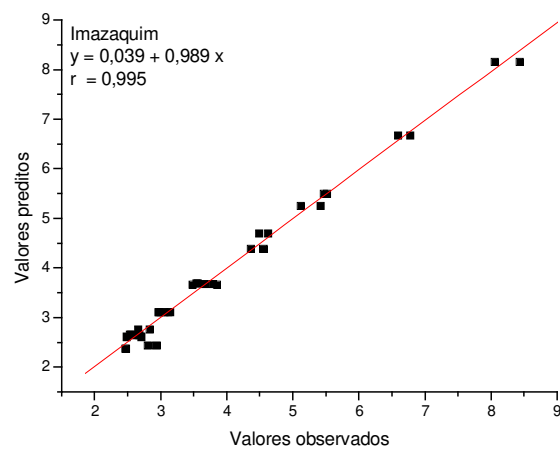
Para a mistura de agrotóxicos também foram construídos modelos para retenção de todos os compostos, excetuando-se apenas o imazetapir, o qual não apresentou problemas de separação em nenhuma FM estudada. Os modelos combinados foram obtidos pela multiplicação de um modelo linear para o tipo de coluna e cúbico especial para a composição de FM. Dois pontos axiais foram empregados para verificação de falta de ajuste, P8 e P10. O Ponto 9 não foi considerado, pois apresentou comportamento anômalo em muitos modelos, indicando um possível problema de mistura dos quatro solventes nesta proporção, ou falta de repetibilidade na mistura dos mesmos. A Tabela XIV mostra os resultados dos testes F para significância da regressão e falta de ajuste para todos os modelos. Considerando que as mesmas conclusões foram obtidas empregando o tratamento *split-plot* e supondo completa aleatorização, todos os resultados

mostrados serão provenientes do tratamento estatístico supondo completa aleatorização.

Tabela XIV: Análise da variância considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos combinados construídos empregando-se os fatores de retenção dos constituintes da mistura de agrotóxicos como resposta.

Composto	MQ_R/MQ_{res}	MQ_{fal}/MQ_{ep}
Imazaquim	239,64	4,62
Simazina	104,34	2,04
Cianazina	91,73	1,11
Ametrina	40,74	1,73
Tiofanato	41,40	4,11
Metsulfurom	116,34	2,67
Atrazina	133,71	1,39
Bentazona	16,44	3,53
Carboxim	135,97	1,29
Carbaril	158,98	1,70
Valores de F tabelados	$F_{13,22,95\%} = 2,23$	$F_{4,18,95\%} = 2,93$

Como se pode observar na Tabela XIV, a regressão é significativa para todos os compostos e alguns modelos apresentaram falta de ajuste marginalmente significativa (imazaquim, tiofanato, bentazona). Entretanto, os gráficos de diagnósticos não indicaram nenhuma anormalidade, ou seja, toda a informação experimental foi descrita pelo modelo, não existindo variação sistemática não-modelada nos resíduos. Os gráficos de valores preditos vs valores observados para todos os modelos são mostrados na Figura 24. Da mesma maneira que para a mistura de compostos neutros, testes t aplicados aos coeficientes indicaram que, de uma maneira geral, os coeficientes lineares, quadráticos e cúbicos especiais puros de mistura e lineares de mistura x tipo de coluna são significativos, enquanto os coeficientes que representam as interações quadráticas e cúbico-especiais de mistura x tipo de coluna tendem a não serem significativos.



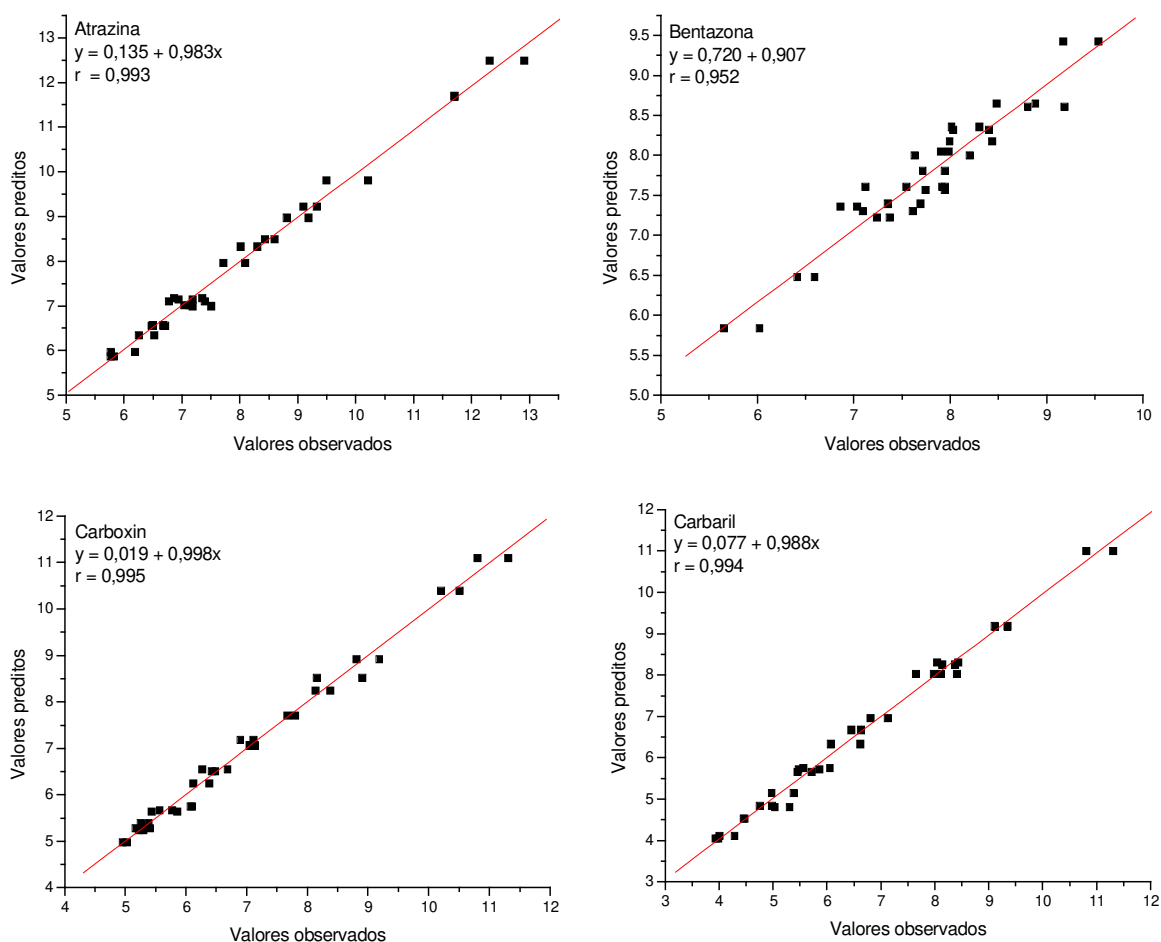


Figura 24: Gráficos de valores preditos vs valores observados para os fatores de retenção dos compostos de interesse na mistura de agrotóxicos.

Considerando todas as características dos modelos ajustados aos fatores de retenção, é possível utilizá-los para predição da *retenção* dos compostos de interesse com qualquer combinação dos solventes e nas duas colunas, o que sem dúvida, facilitaria muito o trabalho no laboratório. Entretanto, para empregar o procedimento de Derringer e Suich, o alvo deve ser muito bem definido, ou seja, o pesquisador deve ter em mente, de uma maneira muito clara, se o objetivo é maximizar, minimizar ou encontrar um determinado valor da resposta. Isto é muito difícil de ser imposto previamente no caso da *retenção* dos compostos além do

fato de que, normalmente o pesquisador tem interesse em uma determinada *separação* e assim deseja obter as condições de FM e FE que forneçam esta separação. Desta maneira, foram construídos novos modelos empregando como resposta os valores de *resolução* para a mistura de compostos neutros e fatores de retenção relativos para a mistura de agrotóxicos.

3.6.2 Resolução (R_s)

Antes da construção de qualquer modelo, foi verificado o comportamento das respostas em função das variáveis estudadas, através do gráfico de valores das proporções de cada um dos constituintes da mistura vs resposta. Através da simples inspeção visual destes gráficos é possível encontrar as variáveis que mais afetam a resposta de interesse e aquelas cuja variação dos níveis não traz incremento na resposta. Por motivos de clareza, apenas alguns exemplos serão mostrados. Por exemplo, para a separação dos pares α -naftol/benzeno, a acetonitrila teve o efeito mais pronunciado no aumento da resposta, porém atuou de forma contrária na resolução dos pares benzonitrila/ β -naftol, ou seja, enquanto que para o primeiro par o aumento deste solvente causou aumento na resposta para o segundo par o efeito foi inverso, como se pode observar na Figura 25 A e B. Por outro lado, para os pares éter β -metil-naftílico/naftaleno e tolueno/éter β -metil-naftílico o solvente que teve efeito mais pronunciado na resposta foi o THF, porém também com efeitos contrários na resolução dos dois pares, conforme se pode observar na Figura 25 C e D.

Além disto, é possível encontrar correlações entre as respostas, plotando-se uma resposta contra a outra. Verificou-se desta maneira, que as resoluções entre os pares benzonitrila/ β -naftol e α -naftol/benzeno são inversamente correlacionadas, ou seja, se a resolução entre os pares de picos benzonitrila/ β -naftol aumenta, a resolução entre os pares α -naftol/benzeno diminui. O mesmo foi observado para os pares tolueno/éter β -metil naftílico e éter β -metil naftílico/naftaleno. Considerando todos estes aspectos, é possível concluir que a otimização simultânea da separação de diversos compostos se torna muito difícil,

trabalhosa e demorada empregando o método de tentativa e erro, ou seja, sem o auxílio de uma ferramenta de planejamento experimental.

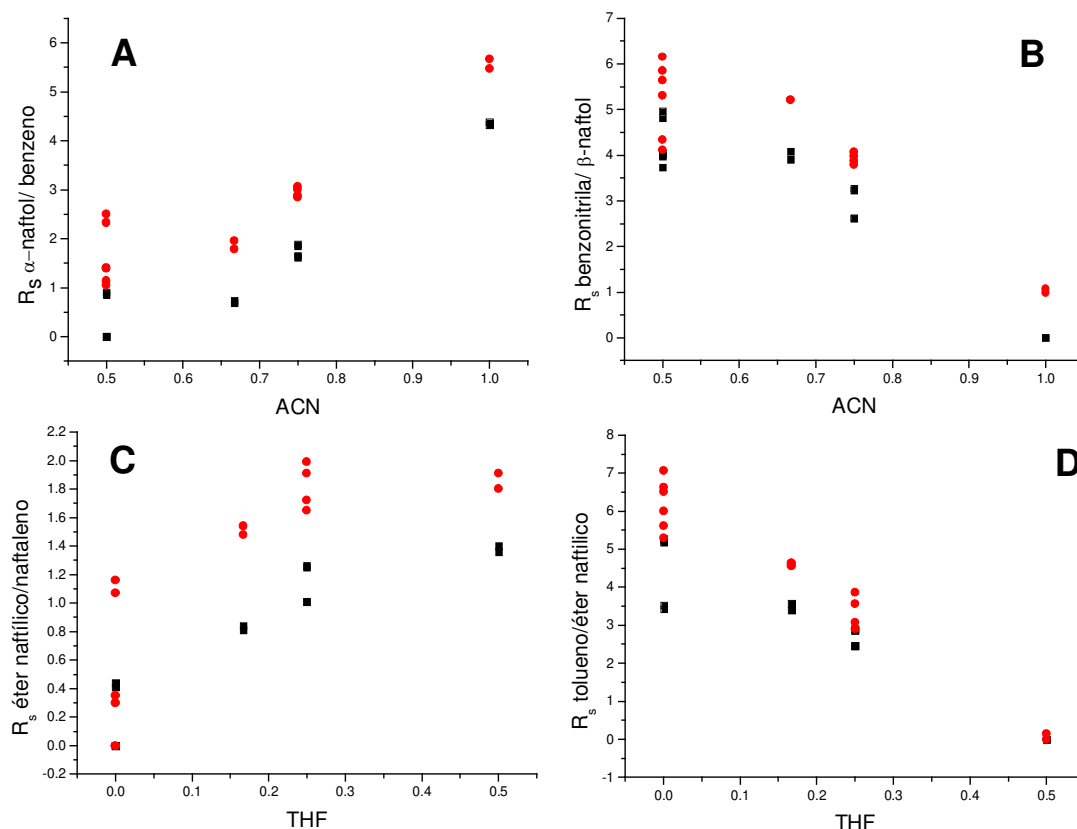


Figura 25: Gráficos de resolução vs quantidade de cada solvente na FM para alguns dos pares de compostos de interesse na mistura teste: A) α -naftol / benzeno vs ACN; B) benzonitrila / β -naftol vs ACN; C) éter β -metil-naftílico / naftaleno vs THF e D) éter β -metil-naftílico / tolueno vs THF. Em preto são mostrados resultados obtidos com a coluna C 8 e em vermelho com a C 18.

Foram construídos então modelos combinados através da multiplicação de modelos quadráticos (ou cúbico especial, no caso da separação do par α -naftol / benzeno), para a composição de FM pelo linear para o tipo de coluna. A Tabela XV mostra os resultados dos testes F para significância da regressão e falta de ajuste dos modelos. A análise da variância correspondente aos valores mostrados na Tabela XV refere-se aos modelos para os quais foi empregado o procedimento de seleção de variáveis através do método de eliminação backward, com $\alpha = 0,05$

e por este motivo o número de graus de liberdade difere em cada modelo. Com este procedimento, os graus de liberdade da soma quadrática da regressão referentes aos coeficientes não significativos são transferidos para a soma quadrática dos resíduos, fornecendo uma estimativa com mais graus de liberdade. A Tabela XVI mostra os coeficientes significativos, os quais foram utilizados em cada modelo.

Tabela XV: Resumo da análise da variância considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos combinados construídos empregando-se a resolução entre os pares de compostos de interesse na mistura teste como resposta.

Par de compostos	MQ_R/MQ_{res}	F tabelado	MQ_{fal}/MQ_{ep}	F tabelado
benzonitrila / β -naftol	440,76	$v_{8,19,95\%}=2,48$	1,90	$v_{5,14,95\%}=2,96$
α -naftol / benzeno	944,00	$v_{10,17,95\%}=2,45$	1,47	$v_{3,14,95\%}=3,34$
tolueno / éter β -metil naftílico	417,14	$v_{8,19,95\%}=2,48$	1,86	$v_{5,14,95\%}=2,96$
éter β -metil naftílico / naftaleno	750,51	$v_{10,17,95\%}=2,45$	1,88	$v_{3,14,95\%}=3,34$

Tabela XVI: Coeficientes significativos dos modelos combinados construídos empregando-se como resposta a resolução entre os compostos de interesse da mistura teste.

Coeficiente	Benzonitrila / β -naftol	α -naftol / benzeno	Tolueno/ Éter β - metil- naftílico	Éter β - metil- naftílico/ naftaleno
A (ACN)	0,50	4,96	4,47	0,77
B (MeOH)	4,66	0,70	6,03	-0,01
C(THF)	4,12	1,65	0,039	1,61
AB	2,88	-1,64	1,97	-0,82
AC	5,39	-4,10	1,86	1,70
AD	0,53	0,56	0,91	0,34
BC	4,43	-2,51	1,01	2,22
BD	0,84	0,67	0,83	-0,01
CD	0,17	0,76	--	0,24
ABC	--	-6,19	--	--
ABD	--	--	-1,24	--
ACD	--	-0,67	--	0,27
BCD	--	--	--	0,92
ABCD	--	--	--	--
D = tipo de coluna				

Como se pode observar na Tabela XV, todos os modelos apresentaram regressão altamente significativa, sem falta de ajuste. Os gráficos de diagnóstico dos modelos indicaram que os resíduos seguem uma distribuição normal, sem indícios de heteroscedasticidade. Os gráficos de valores preditos vs valores

observados para os pontos do planejamento são mostrados na Figura 26 e a predição para os três pontos axiais nas Tabelas XVII e XVIII. Os mapas de contorno para os modelos construídos são mostrados na Figura 27 A-G, para as duas colunas.

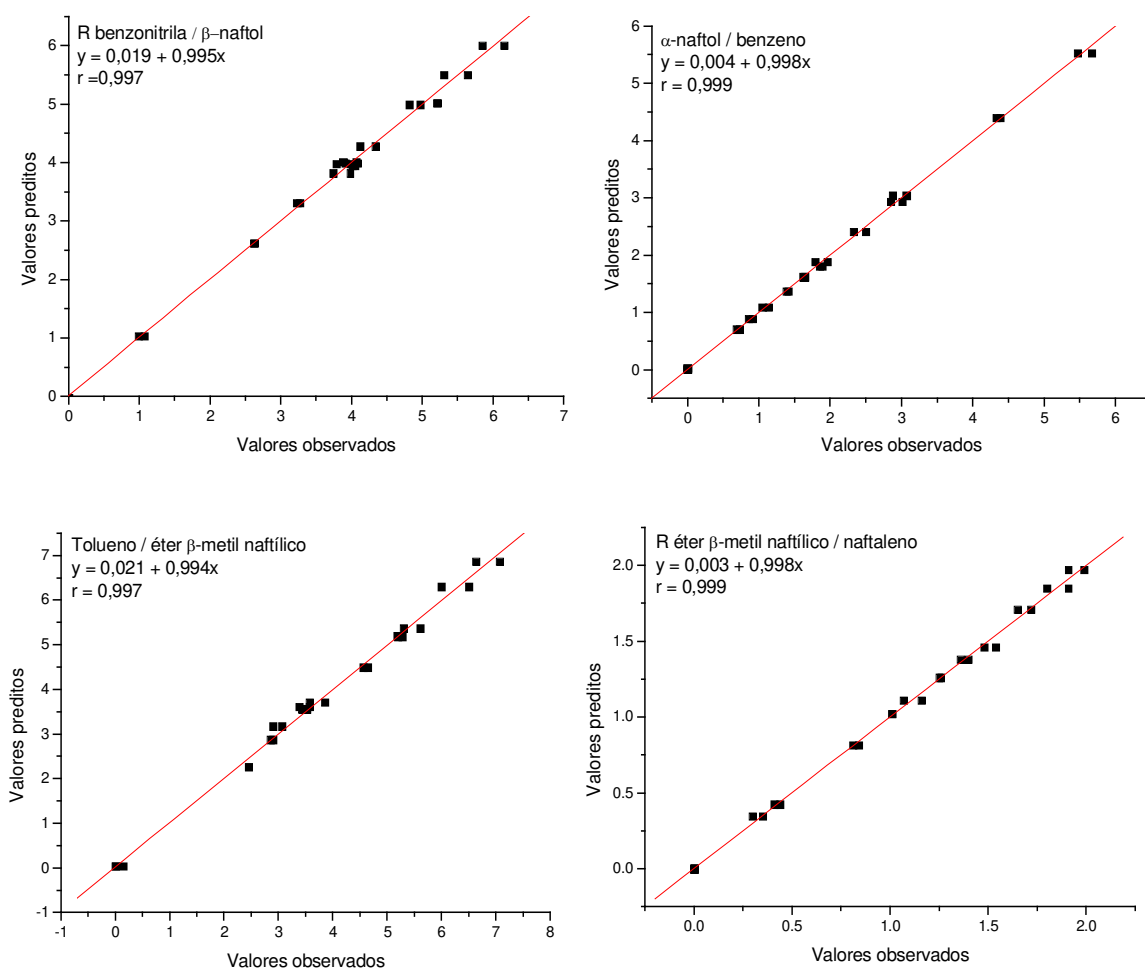


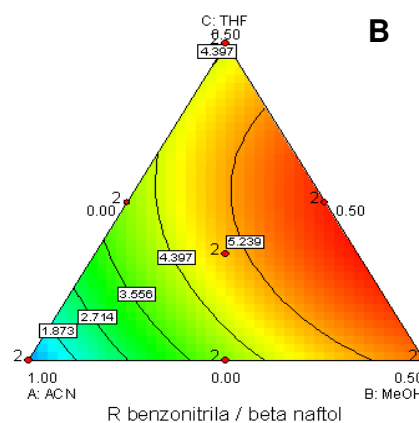
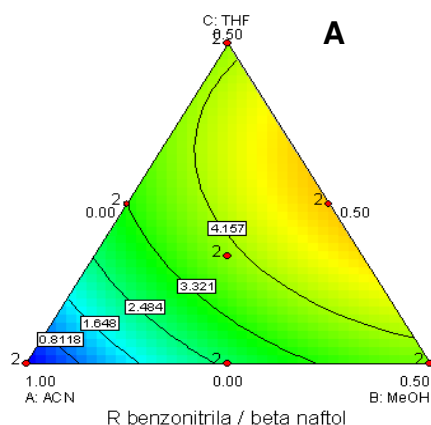
Figura 26: Gráficos de valores preditos vs valores observados para a resolução dos compostos de interesse na mistura-teste.

Tabela XVII: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a resolução dos compostos de interesse da mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 8.

Par de Compostos	P8		P9		P10	
	R predito	R observado	R predito	R observado	R predito	R observado
benzonitrila / β -naftol	2,32	2,40	4,16	4,11	4,44	4,24
α -naftol / benzeno	2,29	2,32	0,29	0,00	0,51	0,94
tolueno / éter β -metil naftílico	3,84	3,65	4,59	4,34	1,89	1,98
éter β -metil naftílico /naftaleno	0,62	0,55	0,39	0,00	1,27	1,34

Tabela XVIII: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a resolução dos compostos de interesse da mistura teste nas composições de FM indicadas pelos pontos 8, 9 e 10 (Tabela IV) na coluna C 18.

Par de Compostos	P8		P9		P10	
	R predito	R observado	R predito	R observado	R predito	R observado
benzonitrila / β -naftol	3,36	3,42	5,51	5,80	5,12	4,90
α -naftol / benzeno	3,48	3,50	1,47	1,35	1,78	1,90
tolueno / éter β -metil naftílico	5,05	5,40	5,73	6,36	2,41	2,45
éter β -metil naftílico /naftaleno	1,26	1,27	0,80	0,83	1,96	2,02



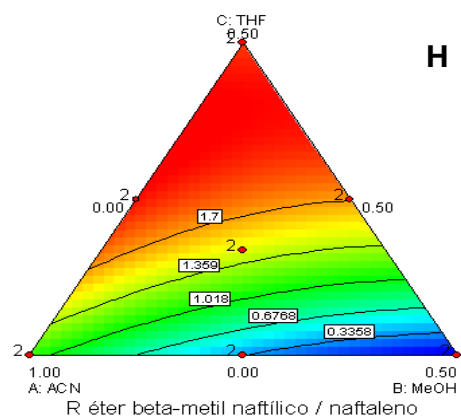
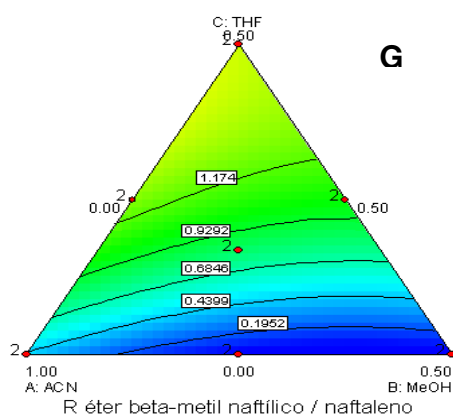
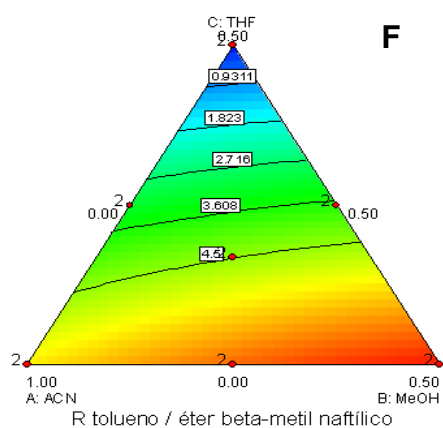
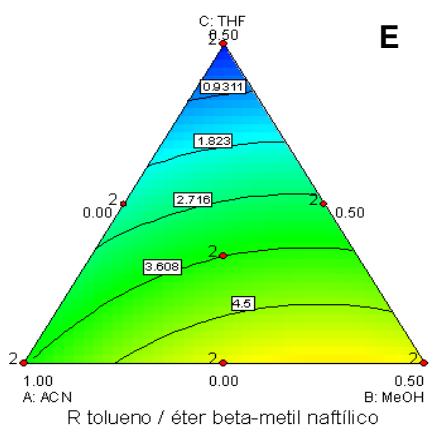
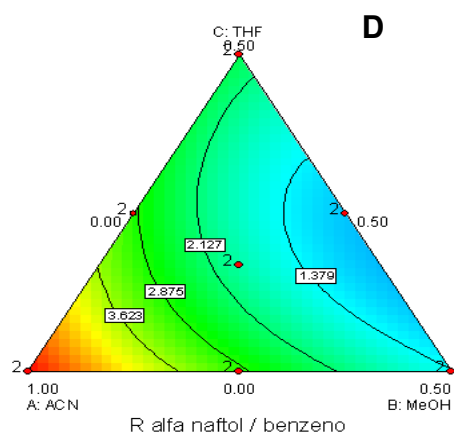
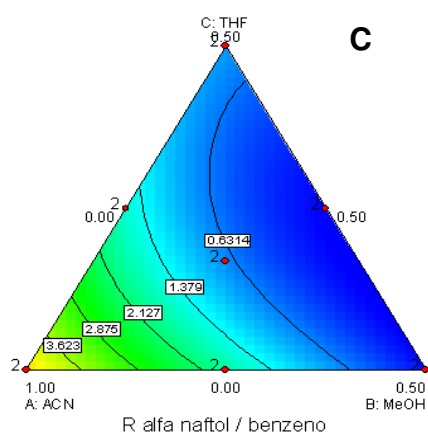


Figura 27: Mapas de contorno para a resolução entre os pares de compostos de interesse na mistura teste, nas colunas C 8 (gráficos A, C, E e G) e C 18 (gráficos B, D, F e H).

Observando-se os mapas de contorno mostrados na Figura 27, é possível verificar que os maiores valores de resolução foram sempre encontrados empregando-se a coluna C 18 e que cada par de composto apresenta um máximo de resolução com um tipo de solvente, ou com a combinação de dois solventes. Conforme discutido anteriormente, isto torna muito difícil a seleção da composição da FM que separe simultaneamente todos os compostos sem uma ferramenta de planejamento experimental.

Considerando que o objetivo foi obter a separação na linha base de todos os compostos em um tempo aceitável de análise, a função de desejabilidade foi postulada da seguinte maneira para todos os modelos:

$d = 0$ se $\hat{y}_i < y_i^{\min}$, $d = 0$ se $\hat{y}_i > y_i^{\max}$ e $d_i = 1$ se $y_i^{\min} \leq \hat{y}_i \leq y_i^{\max}$ sendo $y_i^{\min} = 1,5$, correspondente à resolução na linha base e $y_i^{\max} = 4,5$. Esta função foi mostrada na Figura 12 B. O valor máximo aceitável pode ser escolhido de acordo com o interesse do pesquisador, de forma a limitar mais ou menos o tempo da corrida. Entretanto, se o limite selecionado for muito estreito, pode ser que a solução para o problema não exista. Para esta separação, as resoluções máximas foram de 6,2; 5,67; 7,07 e 1,99 para os pares de picos benzonitrila/ β -naftol, α -naftol/benzeno, tolueno/éter β -metil naftílico e éter β -metil naftílico/naftaleno, respectivamente. O valor 4,5 foi selecionado de maneira a ter um intervalo não muito pequeno para busca e ao mesmo tempo não aumentar muito o tempo de análise. Considerado que a busca empregando as funções de desejabilidade deve ser realizada apenas dentro do domínio experimental, para o par éter β -metil naftílico/naftaleno o limite máximo imposto foi 1,99, pois este é o limite superior da resposta observada. A desejabilidade global foi obtida pela média geométrica das desejabilidades individuais. O mapa de contorno para a função de desejabilidade global na coluna C 18 é mostrado na Figura 28. Na coluna C8 não foi encontrada nenhuma região que satisfizesse as condições impostas nas funções de desejabilidade individuais.

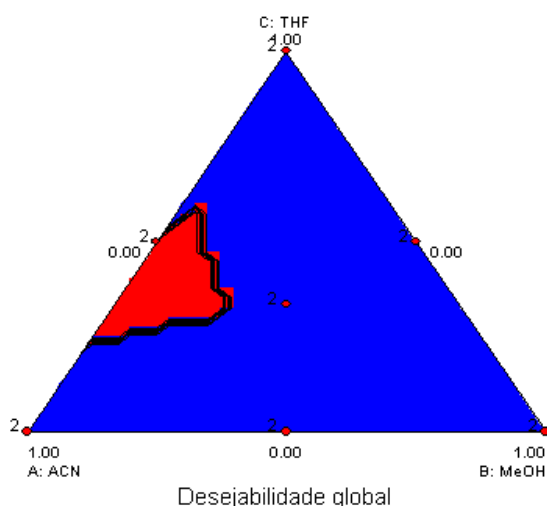


Figura 28: Mapa de contorno para a função de desejabilidade global, obtida pela média geométrica das funções de desejabilidade individuais, para a resolução dos compostos de interesse na mistura teste na coluna C 18.

Como se pode observar na Figura 28, existe uma região e não apenas um ponto que satisfaz simultaneamente todas as imposições descritas pelas funções de desejabilidade individuais e isto era de fato esperado, pois as mudanças de resolução com as mudanças nas composições de FM e FE são graduais, ou seja, não acontecem de forma brusca. Como as funções individuais foram definidas como uma *faixa* de valores-alvo foi possível encontrar a composição que fornecesse desejabilidade máxima, igual a 1, isto é que satisfizesse completamente as condições impostas pelas funções de desejabilidades individuais. Na realidade, por causa da natureza das funções de desejabilidade individuais impostas neste caso ($d = 1$ se $1,5 \leq \hat{y}_i \leq 4,5$), todos os pontos dentro da região destacada na Figura 28 apresentaram desejabilidade máxima, cada qual com a variação dentro das faixas impostas nas funções de desejabilidade individuais. A Figura 29 mostra uma das soluções (FE = C 18 e FM = ACN:THF:H₂O 41:13:46 v/v/v) que satisfaz completamente as condições impostas

pelas funções de desejabilidade individuais, que é o ponto 5 do planejamento na coluna C 18, cujo cromatograma foi mostrado na Figura 21.

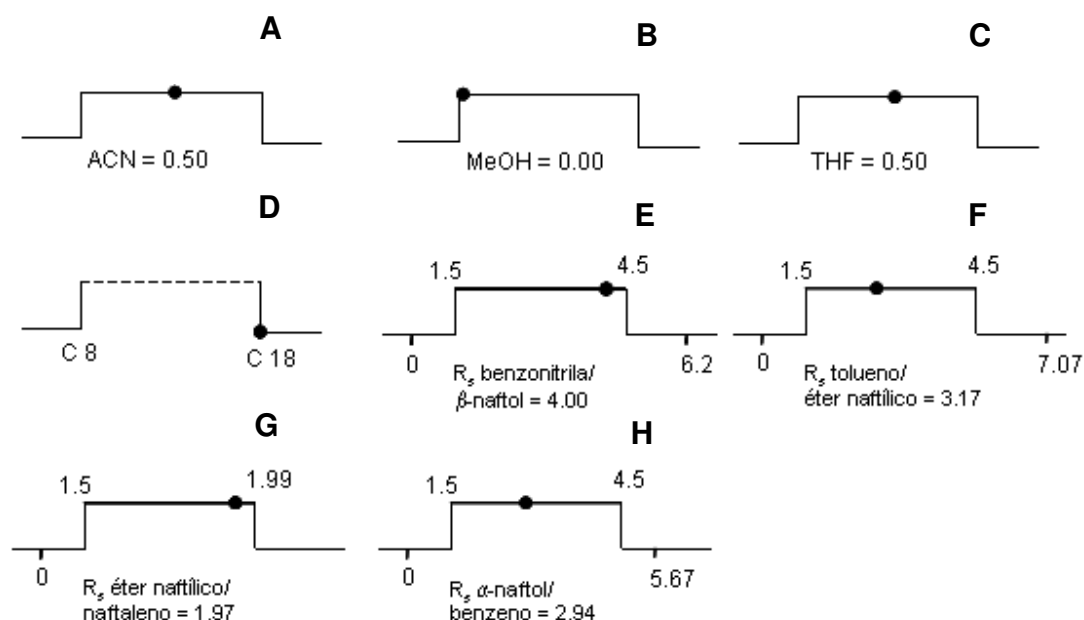


Figura 29 Condições experimentais (gráficos A-D) que fornecem valores de resolução dentro da faixa estipulada pelas funções de desejabilidade individuais (faixa de valores desejáveis entre 1,5 e 4,5) e gráficos das funções de desejabilidade individuais com os valores preditos pelos modelos (gráficos E-H). O eixo y de cada gráfico representa valores de desejabilidade individuais de 0 a 1.

Os valores de resolução dos pares de interesse mostrados na Figura 29 – R_s benzonitrila/ β -naftol = 4,00; R_s α -naftol/benzeno = 2,94; R_s tolueno/éter-naftílico = 3,17 e R_s éter naftílico/naftaleno = 1,97 - foram preditos pelos modelos. Os valores observados experimentalmente para a resolução destes pares foram: R_s benzonitrila/ β -naftol = 3,98; R_s α -naftol/benzeno = 2,93; R_s tolueno/éter-naftílico = 2,99 e R_s éter naftílico/naftaleno = 1,95 mostrando excelente concordância.

Se forem impostos critérios mais rígidos para os limites inferior e superior das resoluções aceitas ou uma maneira mais rígida de se aproximar e afastar do alvo, o valor máximo de desejabilidade pode não ser alcançado e, neste caso, serão fornecidas soluções que se aproximam do objetivo imposto (soluções

possíveis dentro do domínio experimental), com um valor de desejabilidade menor. Por exemplo, se o alvo for imposto como sendo a resolução na linha base (1,5), sendo este também o limite inferior, o limite superior igual a 4,5 e uma função unilateral linear unindo o alvo ao limite superior, a desejabilidade global máxima obtida é de 0,3, pois não existe dentro do domínio experimental, nenhuma combinação de FM e FE que satisfaça completamente estas imposições, ou seja, não é possível que todos os pares apresentem resolução 1,5 simultaneamente. Esta seria a situação ideal que representaria o melhor compromisso entre resolução e tempo de análise. A Figura 30 ilustra a situação descrita. Neste caso, são mostradas as composições de FM que fornecem as resoluções indicadas pelos pontos, as quais representam “o mais próximo possível” que se pode chegar ao alvo imposto.

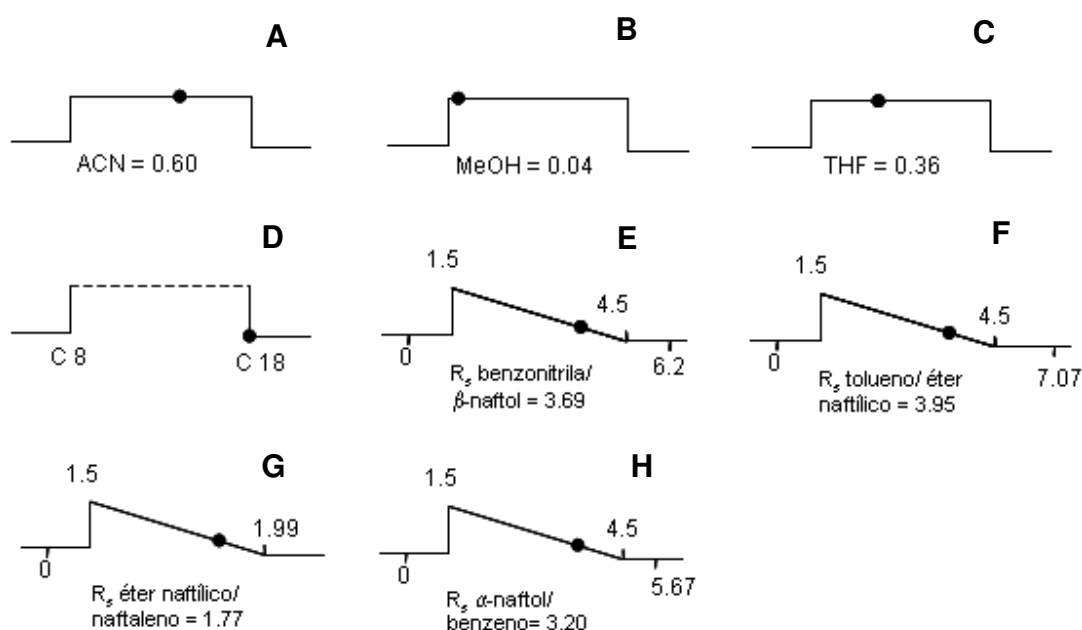


Figura 30: Condições experimentais (gráficos A-D) que fornecem valores de resolução próximos ao alvo imposto nas funções de desejabilidade individuais ($R=1,5$) e gráficos das funções de desejabilidade individuais com os valores preditos pelos modelos (gráficos E-H). O eixo y de cada gráfico representa valores de desejabilidade individuais de 0 a 1.

Um procedimento simples de otimização simultânea de diversas respostas é o de sobreposição de mapas de contorno para as diferentes respostas. Este procedimento foi descrito para otimização de separações em Cromatografia por

Glajch *et al.*³⁵ e, apesar de ser um procedimento muitas vezes eficiente na busca de uma região com as condições desejadas, o procedimento de Derringer e Suich apresenta algumas vantagens. No procedimento de sobreposição são definidas regiões de valores aceitáveis para cada resposta e dentro da região todas as respostas são igualmente aceitáveis. Sabe-se, entretanto, que dentro de cada uma das regiões existem respostas mais aceitáveis do que outras e o procedimento de Derringer e Suich permite que o alvo e a maneira de se aproximar e afastar dele sejam selecionadas da maneira mais adequada às necessidades do pesquisador através da seleção dos pesos que são dados às diferentes respostas em torno do alvo, de tal maneira que o melhor compromisso entre as diferentes respostas possa ser obtido. Além disto, trata-se de uma maneira mais elegante de encontrar as condições desejadas, pois a busca é descrita matematicamente e completamente baseada na predição dos modelos construídos. No caso específico em que se tem uma faixa de valores *igualmente* aceitáveis, os dois procedimentos devem fornecer o mesmo resultado, como pode ser verificado através do mapa de contorno obtido pela sobreposição de mapas individuais, mostrados na Figura 31, o qual se assemelha ao mapa de contorno para a desejabilidade global, mostrado na Figura 28 para a coluna C 18.

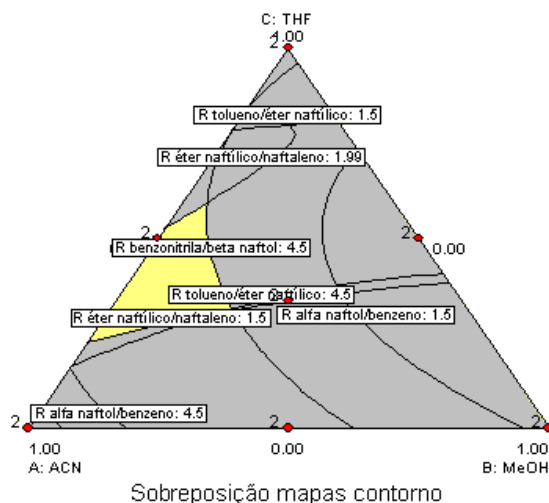


Figura 31: Mapa de contorno resultante da sobreposição de mapas de contorno individuais construídos empregando a resolução entre os pares de compostos da mistura teste na coluna C 18 como respostas. O número 2 indica dois pontos sobrepostos (replicatas).

3.6.3 Retenção relativa (R_R)

Para a mistura de agrotóxicos, considerando que ocorreu alteração na ordem de eluição dos compostos, não foi possível empregar a resolução como uma medida da separação e, desta maneira, optou-se por empregar a retenção relativa (R_R), definida como a razão entre o fator de retenção do composto mais retido pelo fator de retenção do composto menos retido. Foram selecionados os compostos ametrina, simazina, cianazina e carbaril como compostos de interesse dentro da mistura de agrotóxicos, pois eles apresentaram problemas de separação nos solventes puros comumente empregados. Foram construídos modelos combinados através da multiplicação de modelos quadráticos (ametrina/cianazina; ametrina/simazina e simazina/carbaril) ou cúbico-especiais (simazina/cianazina; ametrina/carbaril e cianazina/carbaril) para a composição de FM pelo modelo linear para o tipo de coluna. A Tabela XIX mostra os resultados dos testes F de significância da regressão e falta de ajuste dos modelos. A análise da variância correspondente aos valores mostrados na Tabela XIX refere-se aos modelos para os quais foi empregado o procedimento de seleção de variáveis através do método de eliminação backward, com $\alpha = 0,05$ e por este motivo o número de graus de liberdade difere em cada modelo. A Tabela XX mostra os coeficientes significativos, os quais foram utilizados em cada modelo.

Tabela XIX: Resumo da análise da variância considerando a significância da regressão e a falta de ajuste dos modelos combinados construídos empregando-se como resposta a retenção relativa dos constituintes da mistura de agrotóxicos

Par de compostos	MQ_R/MQ_{res}	F_{tabelado}	MQ_{faj}/MQ_{ep}	F_{tabelado}
ametrina/cianazina	75,45	$v_{10,17,95\%} = 2,45$	1,38	$v_{3,14,95\%} = 3,34$
ametrina/simazina	64,58	$v_{7,20,95\%} = 2,51$	0,30	$v_{6,14,95\%} = 2,85$
simazina/cianazina	306,36	$v_{11,16,95\%} = 2,49$	0,60	$v_{2,14,95\%} = 3,74$

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

simazina/carbaril	426,00	$v_{7,20,95\%} = 2,51$	3,57	$v_{6,14,95\%} = 2,85$
ametrina/carbaril	132,14	$v_{9,18,95\%} = 2,46$	1,45	$v_{4,14,95\%} = 3,11$
cianazina/carbaril	223,69	$v_{12,15,95\%} = 2,48$	0,67	$v_{1,14,95\%} = 4,60$

Tabela XX: Coeficientes significativos para os modelos combinados construídos empregando-se como resposta a retenção relativa dos pares de compostos de interesse da mistura de agrotóxicos.

Coeficiente	ametrina / cianazina	ametrina / simazina	simazina / cianazina	simazina / carbaril	ametrina / carbaril	cianazina / carbaril
A (ACN)	1,08	1,14	1,23	2,21	1,97	1,81
B (MeOH)	2,07	1,65	1,25	1,31	1,26	1,66
C (THF)	1,41	1,68	1,19	1,09	1,54	1,09
AB	-0,44	1,36	-0,83	0,07	-1,64	-0,01
AC	-0,16	-0,29	-0,31	-0,38	-2,34	-0,3
AD	-0,08	0,06	-0,04	0,60	-0,07	0,07
BC	-0,87	-0,51	-0,77	-0,06	-1,03	-0,22
BD	0,13	0,06	0,04	0,96	0,08	0,109
CD	0,03	--	-0,01	--	2,27	0,03
ABC	--	--	0,708	--	-0,34	2,44
ABD	0,36	--	-0,123	--	--	-0,13
ACD	0,33	--	-0,155	--	--	-0,21
BCD	--	--	--	--	--	-0,23
ABCD	--	--	--	--	--	--
D = tipo de coluna						

Como se pode observar na Tabela XIX, todos os modelos apresentaram regressão altamente significativa, sem falta de ajuste, ou com falta de ajuste marginalmente significativa (R_R simazina/carbaril). Os gráficos de diagnóstico dos modelos indicaram que os resíduos seguem uma distribuição normal, sem indícios de heteroscedasticidade. Os gráficos de valores preditos vs valores observados para os pontos do planejamento são mostrados na Figura 32 e a predição para os três pontos axiais nas Tabelas XXI e XXII.

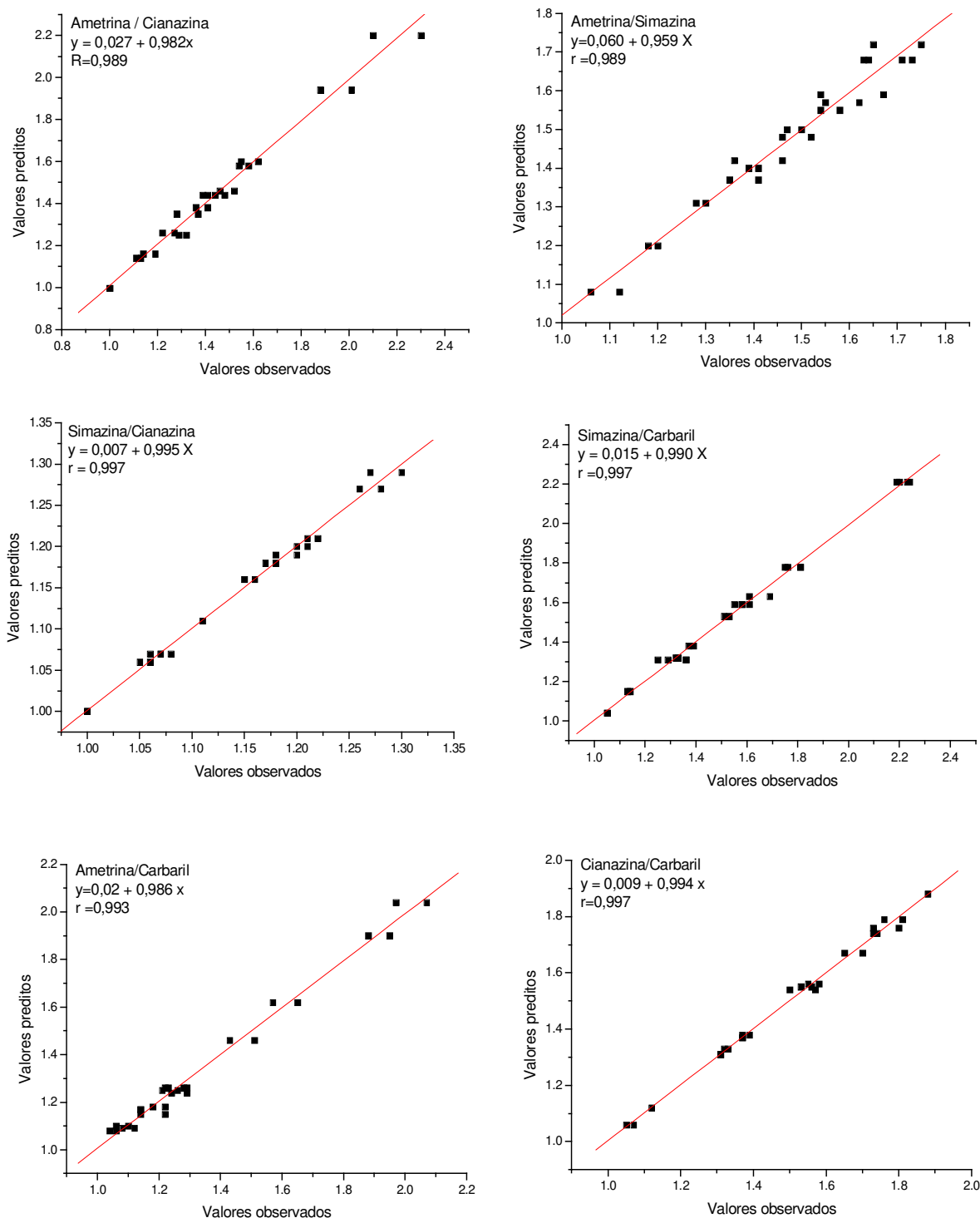


Figura 32: Gráficos de valores preditos vs valores observados para a retenção relativa dos compostos de interesse na mistura de agrotóxicos.

Tabela XXI: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a retenção relativa dos compostos de interesse da mistura de agrotóxicos nas composições de FM indicadas correspondentes aos pontos 8, 9 e 10 (Figura 9) na coluna C 8.

Par de compostos	Ponto 8		Ponto 9		Ponto 10	
	R _R predito	R _R observado	R _R predito	R _R observado	R _R predito	R _R observado
ametrina/cianazina	1,16	1,11	1,52	1,47	1,26	1,32
ametrina/simazina	1,26	1,26	1,49	1,45	1,48	1,50
simazina/cianazina	1,13	1,14	1,08	1,02	1,11	1,12
simazina/carbaril	1,89	1,87	1,51	1,53	1,40	1,39
ametrina/carbaril	1,42	1,48	1,11	1,06	1,18	1,00
cianazina/carbaril	1,64	1,63	1,55	1,55	1,29	1,24

Tabela XXII: Valores observados experimentalmente e preditos pelos modelos combinados para a retenção relativa dos compostos de interesse da mistura de agrotóxicos nas composições de FM correspondentes aos pontos 8, 9 e 10 (Figura 9) na coluna C 18.

Par de compostos	Ponto 8		Ponto 9		Ponto 10	
	R _R predito	R _R observado	R _R predito	R _R observado	R _R predito	R _R observado
ametrina/cianazina	1,26	1,29	1,77	1,75	1,41	1,43
ametrina/simazina	1,36	1,38	1,60	1,60	1,53	1,52
simazina/cianazina	1,05	1,06	1,05	1,09	1,05	1,09
simazina/carbaril	1,87	1,81	1,50	1,52	1,32	1,32
ametrina/carbaril	1,28	1,29	1,09	1,03	1,19	1,18
cianazina/carbaril	1,70	1,70	1,64	1,67	1,29	1,22

A função de desejabilidade foi postulada da mesma maneira que para a mistura de compostos neutros, ou seja, $d = 0$ se $\hat{y}_i < y_i^{\min}$, $d = 0$ se $\hat{y}_i > y_i^{\max}$ e $d_i = 1$ se $y_i^{\min} \leq \hat{y}_i \leq y_i^{\max}$ sendo para esta separação foi selecionado $y_i^{\min} = 1,1$ e $y_i^{\max} = 1,7$. Considerando que os valores máximos observados para a retenção relativa dos pares ametrina/cianazina, ametrina/simazina, simazina/cianazina, simazina/carbaril, ametrina/carbaril e cianazina/carbaril foram, respectivamente, 2,30; 1,75; 1,30; 2,24; 2,07 e 1,88, o limite superior para a região aceitável foi selecionado de tal maneira a diminuir o tempo de análise para os compostos que apresentaram valores elevados de separação. Os mapas de contorno para a função de desejabilidade global nas colunas C 8 e C 18 são mostrados na Figura 33 A e B, respectivamente.

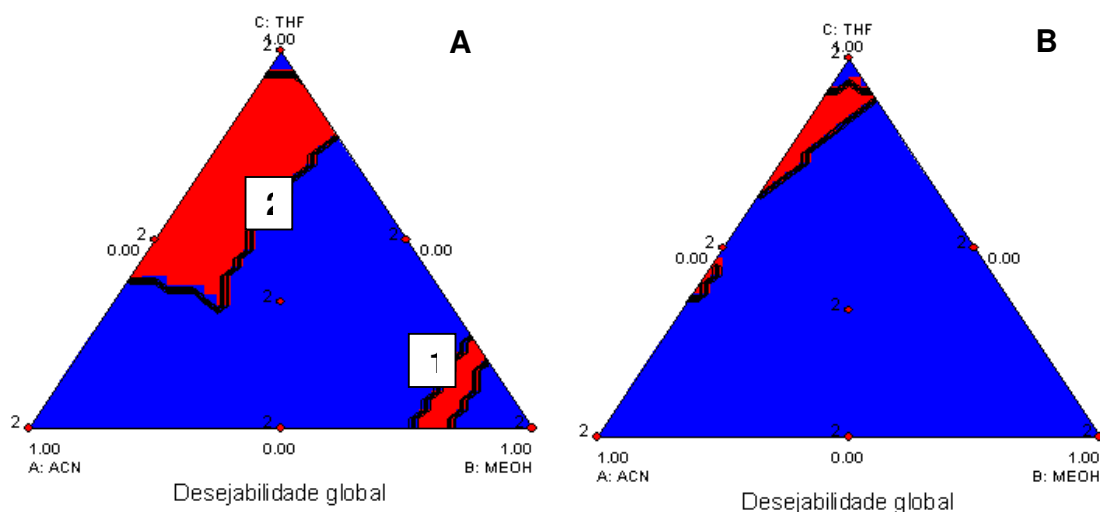


Figura 33: Mapas de contorno para a função de desejabilidade global, obtida pela média geométrica das funções de desejabilidade individuais para a retenção relativa dos compostos de interesse na mistura de agrotóxicos, na coluna C8 (A) e C18 (B). Os números indicados na Figura serão explicados no texto.

Através da análise dos valores de retenção relativos observados experimentalmente para os pontos do planejamento (não mostrados), verifica-se perfeita concordância com as regiões selecionadas na função de desejabilidade global. Por exemplo, para a coluna C 8, a composição de FM contendo MeOH:H₂O 45:55 (v/v) satisfaz todos os requisitos impostos nas funções de desejabilidade individuais, com exceção da separação do par ametrina/cianazina, para o qual a retenção relativa observada foi maior que o limite superior imposto. Entretanto, conforme foi diminuída a quantidade de metanol na FM, a retenção relativa deste par diminuiu, o que justifica a região 1 na Figura 33. Da mesma maneira, a composição de FM contendo THF:H₂O 30:70 (v/v) não satisfaz apenas a separação mínima requerida (1,1) para o par cianazina/carbaril, todos os demais critérios impostos nas demais funções de desejabilidade individuais foram satisfeitos. Conforme foi diminuída a quantidade de THF na FM, a retenção relativa destes pares aumentou, satisfazendo, desta maneira, todos os critérios impostos nas funções de desejabilidade individuais, dando origem à região 2 na Figura 33 A. De fato, o ponto 5 do planejamento que está englobado nesta região,

apresentou a separação desejada para todos os compostos, nesta coluna e é mostrado na Figura 34. Para a coluna C 18, a região com maior quantidade de THF se comporta de maneira similar que a descrita para a coluna C8, sendo observada apenas uma faixa mais estreita de composições de FM que satisfizes, simultaneamente, todos os critérios impostos. A região com maior quantidade de MeOH, indicada por 1 na Figura 34 A, não foi encontrada na coluna C 18.

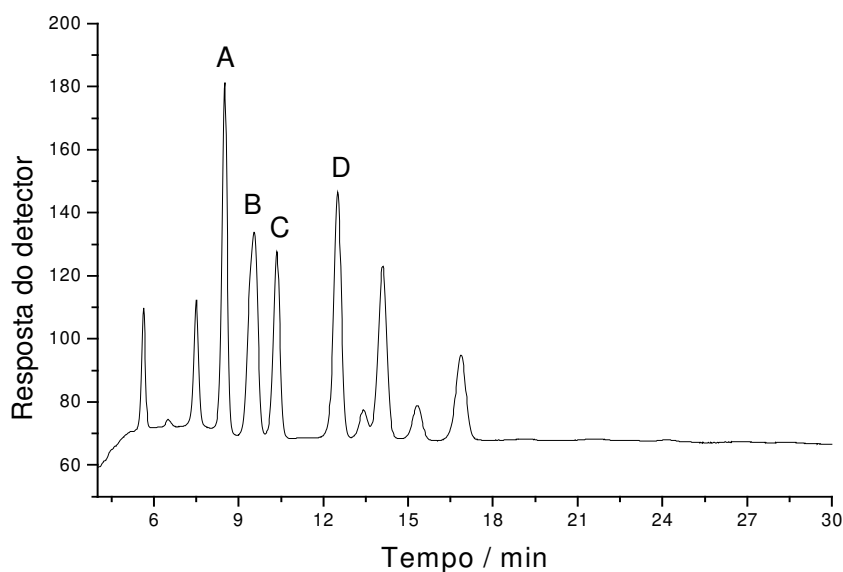


Figura 34: Cromatograma obtido na separação dos agrotóxicos de interesse A = simazina, B = ametrina, C = cianazina e D = carbaril empregando coluna C 8, volume de injeção 10 μ L, FM ACN:THF H₂O (pH = 3,0) 15:15:70 (v/v/v), , vazão 1,0 mL/min, detecção 210 nm e temperatura 25 °C.

CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES

Muitos trabalhos encontrados na literatura baseados no triângulo de seletividade de Snyder^{29,30,43,44}, descreveram a utilização de planejamentos de misturas para otimização da seletividade da fase móvel, porém, pouco ou nenhum tratamento estatístico foi dado aos resultados. Neste trabalho, a otimização da seletividade da fase móvel foi realizada de forma conjunta com a seleção da fase estacionária e guiada por métodos de planejamento e otimização experimental, permitindo a construção de modelos estatísticos que descreveram a influência das variáveis estudadas bem como a interação entre elas, na separação dos compostos de interesse. Estes modelos foram avaliados através da análise da variância quanto à significância da regressão e falta de ajuste, foram construídos intervalos de confiança e a maneira pela qual a variância experimental se propaga no cálculo dos erros dos coeficientes em um procedimento *split-plot* e com completa aleatorização foi discutida e comparada. Além disto, para descrever a qualidade da separação, foi utilizada uma função objetiva (somatório das resoluções) e o procedimento de otimização simultânea de várias respostas, descrito por Derringer e Suich, empregando critérios elementares como fator de retenção, resolução e fator de separação como respostas.

A utilização do somatório das resoluções como resposta permitiu julgar de maneira inequívoca a qualidade da separação dos compostos nas diferentes condições cromatográficas e construir um modelo combinado que descreveu, de maneira satisfatória, as observações experimentais. No entanto, este procedimento apresentou algumas desvantagens em relação ao procedimento de Derringer e Suich, sendo a principal a perda de informação dos pares de compostos individuais no cromatograma. Além disto, considerando que grandes valores de separação podem encobrir pequenas separações, este procedimento pode ainda gerar resultados enganosos, devendo ser impostas restrições, as quais são arbitrárias, para evitar que isto aconteça. O procedimento de Derringer e Suich permitiu a construção de modelos tendo como respostas critérios elementares os quais são, de fato, funções da composição da FM e da FE. Estes modelos permitiram a descrição do comportamento dos compostos, individualmente, frente às variações de FM e FE e, quando combinados através da

desejabilidade global, permitiram que as condições para a melhor separação de todos os compostos fossem alcançadas, sem a perda de informações. Todos os modelos empregando critérios elementares apresentaram capacidade preditiva, com nenhuma ou pequena falta de ajuste, indicando a viabilidade da construção de modelos combinados empregando as composições de FM de forma conjunta com a composição da FE.

O procedimento de Derringer e Suich ainda apresentou vantagens em relação ao procedimento de sobreposição de mapas de contorno, utilizado em problemas de otimização simultânea de várias respostas, pois permitiu definir valores de respostas mais desejáveis do que outras, dentro de um mesmo domínio experimental, através da seleção dos pesos que são dados às diferentes respostas em torno do valor alvo. Além disto, trata-se de uma maneira mais elegante de encontrar as condições desejadas, pois a busca é descrita matematicamente e baseada, completamente, na predição dos modelos construídos. Em outras palavras, tendo construído e validado os modelos empregando métodos estabelecidos de planejamento, os quais levam às estimativas dos coeficientes de forma independente, o procedimento de Derringer deve fornecer, de forma inequívoca, as condições desejadas, impostas nas funções de desejabilidade individuais.

Embora todos os planejamentos tenham sido realizados de acordo com um procedimento *split-plot*, não foram verificadas diferenças nos valores dos erros dos coeficientes dos modelos matemáticos nos cálculos *split-plot* e supondo completa aleatorização na realização dos experimentos. Por causa da natureza discreta da variável considerada *main-plot* (coluna cromatográfica) o erro no ajuste de seus níveis se mostrou muito pequeno quando comparado com o erro no ajuste das composições de FM (*sub-plots*). Como a variância das replicatas também foi pequena, os termos σ^2_R e σ^2_{RZ} puderam ser desprezados, reduzindo a matriz V a $I_m\sigma_e^2$ fornecendo a mesma expressão matemática do cálculo dos erros no caso de completa aleatorização.

Com base nos resultados mostrados neste trabalho, é possível estabelecer um protocolo geral para otimização da seletividade da FM - de forma conjunta ou não com as condições de processo - em Cromatografia Líquida, ou seja, para guiar a busca pela separação desejada com métodos de planejamento experimental, o pesquisador pode seguir os seguintes passos:

1) Selecionar um modificador orgânico e determinar a força cromatográfica adequada, ou seja, as proporções em volume entre este modificador orgânico e água de modo que os valores dos fatores de retenção de todos os compostos se encontrem na faixa $0,5 < k < 10$;

2) Selecionar outros dois (ou mais) solventes orgânicos de interesse; calcular a proporção modificador orgânico:água para estes solventes, de modo que a força cromatográfica da FM permaneça constante, empregando a equação $\phi_1 S_1 = \phi_2 S_2$ onde ϕ_1, ϕ_2 representam as frações em volume do solvente 1 (conhecida) e 2 (o qual se deseja determinar) e S_1, S_2 representam a polaridade (fator força-peso em FR, tabelado) dos solventes 1 e 2, respectivamente;

3) Selecionar os pontos do planejamento de mistura e, se presentes, as condições de processo (como temperatura e tipo de fase estacionária) que se deseja estudar e seus níveis; estabelecer o número de replicatas a serem realizadas para estimativa da variância experimental bem como pontos adicionais para estimativa de falta de ajuste dos modelos;

4) Realizar os experimentos em ordem aleatória, incluindo as replicações. No caso da inclusão da FE como uma variável de processo a ser estudada, foi demonstrado neste trabalho que é possível mantê-la fixa, enquanto experimentos envolvendo as combinações de FM são realizados, sem prejuízo nos resultados;

5) Selecionar a resposta a ser empregada; a qual pode ser uma função objetiva ou critérios elementares; recomenda-se a utilização de critérios elementares com posterior aplicação do procedimento de Derringer e Suich para otimização de diversas respostas;

6) Estimar os coeficientes de modelos potenciais empregando métodos de regressão multivariada;

7) Avaliar a significância da regressão e falta de ajuste dos modelos empregando análise da variância, de maneira a encontrar o modelo mais adequado para representar os resultados experimentais.

8) Empregar este modelo para encontrar as condições desejadas de separação entre os compostos de interesse.

Referências Bibliográficas

- ¹ Box G. E. P., Hunter J. S., Hunter W. G., *Statistics for Experimenters*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2005.
- ² Bruns, R., E., Scarminio, I., S., de Barros Neto, B., *Como fazer experimentos*, Editora da UNICAMP, SP, 2001.
- ³ Cornell J. A. *Experiments with mixtures: Designs, Models and the analysis of Mixture Data*, 2^a ed, John Wiley & Sons, New York, 1990.
- ⁴ Wooding W.M., *J. Qual. Tech* 5 (1973) 16.
- ⁵ Dingstad G., Egelanddsdal B., Naes T., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 66 (2003) 175.
- ⁶ Campisi B., Vojnovic D., Chicco D., Phan-Tan-Luu R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 48 (1999) 59.
- ⁷ Korvar, G. R., Radder, G.D., *Agroforestry Systems* 22 (1994) 95.
- ⁸ Scherer E.E., *Rev Bras. Cienc. Solo* 22 (1999) 49.
- ⁹ Groten J.P., Tajima O., Feron V. J., Schoen E.D., *Env. Healt Persp.* 106 (1998) 1361.
- ¹⁰ Reis C., de Andrade J. C., Bruns, R. E., Moran R. C.C. P., *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 269.
- ¹¹ Bortoloti J. A., Bruns R. E., de Andrade J. C., Vieira R. K., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 70 (2004) 113.
- ¹² Muhungu S.M., Diaz S., *J. Food Sci.* 47 (1999) 279.
- ¹³ Kowalski, S., M., Potchner, K., *J. Quality Progress* 11 (2003) 60.
- ¹⁴ Cornell, J., A., *J. Qual. Tech* 20 (1988), 1.
- ¹⁵ Kowalski S. M., Cornell, J. A., *Technometrics* 44 (2002) 72.
- ¹⁶ Mage I. and Naes T., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 78 (2005) 81.
- ¹⁷ Montgomery, D., Calado, V., *Planejamentos de Experimentos Usando o Statistica*, E-Papers, Rio de Janeiro, 2003.
- ¹⁸ Skoog, D., A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, tradução da 8^a edição americana, Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2006.
- ¹⁹ de Aquino Neto, F., R., Souza Nunes, D. S., *Cromatografia - Princípios Básicos e Técnicas Afins*, Interciência, Rio Janeiro, 2003.
- ²⁰ Schoenmakers, P. J., *Optimization of Chromatographic Selectivity - A Guide to Method Development*, Elsevier, New York, 1986.
- ²¹ Snyder, L. R., Kirkland, J.J., Glajch, L. J. *Practical HPLC Method Development*, 2^a ed., Wiley, New York, 1997.
- ²² Snyder, L. R., Kirkland, J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2^a ed., Wiley, New York, 1979.
- ²³ Meyer V., *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 3^a ed, John Wiley & Sons, Inglaterra, 1998.
- ²⁴ Lundell, N., Markides, K., *J. Chromatogr.* 639 (1993) 117.
- ²⁵ Anderson A. M., Karlsson A., Josefson M., Gottfries J., *Chromatographia* 38 (1994) 715.
- ²⁶ Nowak M., Seubert A., *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 91.
- ²⁷ Bourguignon B., Massart D. L., *J. Chromatogr.* 586 (1991) 11.

-
- ²⁸ G.D'Agostino, F. Mitchel, L. Castagnetta, M. J. O'hare, *J. Chromatogr.* 305 (1984) 13.
- ²⁹ Ong C. P., Lee H. K., Li S.F. Y, *J. Chromatogr.* (1989) 405.
- ³⁰ Outinen K., Haario H., Vuorela P., Nyman M., Ukkonen E., Vuorela H., *Eur. J. Pharm. Sci.* 6 (1998) 197.
- ³¹ Zhang Y., Lee K., Noh H., Showkat A. M., Choi S., *Microchem. J.* 78 (2004) 99.
- ³² A. M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 75.
- ³³ Morgan S. L., Deming S. N., *Chromatographia* 112 (1975) 267.
- ³⁴ Watson M.W., Carr P.W., *Anal. Chem.* 51 (1979) 1835.
- ³⁵ Glajch J.L., Kirkland J.J., Squire K.M., Minor J. M., *J. Chromatogr.* 199 (1980) 57.
- ³⁶ Berridge J. C., *J. Chromatogr.* 244 (1982) 1.
- ³⁷ Smilde A. K., Knevelman A., Coenegracht P. M., *J. Chromatogr.* 369 (1986) 1.
- ³⁸ Vanbel P. F., Tilquin B. L., Schoenmakers P. J., *Chem. Intell. Lab. Systems* 35 (1996) 67.
- ³⁹ Drouen A. C. J. H., Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., de Galan L., *Chromatographia* 16 (1982) 48.
- ⁴⁰ Vanbel P. F., *J. Pharm Biomed. Anal.* 21 (1999) 603.
- ⁴¹ Derringer G., Suich R., *J. Qual. Tech.* 12 (1980) 214.
- ⁴² Vogel, A., I., *Química Orgânica- Análise Orgânica Qualitativa*, Ao livro Técnico e USP, RJ, 1971.
- ⁴³ D'Agostino G., Mitchel F., Castagnetta L., O'hare M. J., *J. Chromatogr.* 305 (1984) 13.
- ⁴⁴ Zhang Y., Lee K., Noh H., Showkat A. M., Choi S., *Microchem. J.* 78 (2004) 99.