

UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA NO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE ESTUDOS EM ENOLOGIA*

UTILISATION DE LA MÉTHODE DES SURFACES DE RÉPONSE DANS LE DÉROULEMENT EXPÉRIMENTAL D'ÉTUDES EN OENOLOGIE

O. LAUREANO e I. M. N. SOUSA

Instituto Superior de Agronomia/Universidade Técnica de Lisboa.
Laboratório Ferreira Lapa, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa codex, Portugal

RESUMO

Neste trabalho apresentamos uma metodologia estatística que permite poupar tempo e recursos em estudos de desenvolvimento de produtos, controlo de qualidade e optimização de processos. É a Metodologia das Superfícies de Resposta (normalmente designada por RSM). São ainda referidas a justificação e a oportunidade do uso desta técnica bem como uma descrição detalhada do seu funcionamento. No final são discutidos exemplos de aplicação ao desenvolvimento de novos produtos a partir de uvas e ao controlo de qualidade de vinhos.

Palavras chave: Metodologia das Superfícies de Resposta, Enologia, Estatística.

Mots clés: Méthodologie des Surfaces de Réponse, Oenology, Statistique.

INTRODUÇÃO

A optimização de produtos e processos é muito importante tanto em laboratório como na Indústria e envolve, normalmente, diferentes variáveis que actuam em simultâneo. Este processo

* Tradução e adaptação de um texto apresentado na 74ème Assemblée Generale de l'O. I. V. como rapport de Portugal no tema L'informatique et les méthodes nouvelles de gestion des marchés

implica o uso do delineamento experimental para se poder prever o efeito das alterações das variáveis no processo ou no produto em estudo.

O delineamento experimental foi usado pela primeira vez por Sir Ronald Fisher em investigação de problemas agrícolas. Só 30 anos mais tarde W. Edward Deming aplicou estes conceitos para melhorar a qualidade ao nível da produção industrial. Este conhecimento foi rapidamente aproveitado pela Indústria Japonesa. Foi no início dos anos 80 que a Indústria Americana se deu conta desta ferramenta fundamental no controlo de qualidade, desenvolvimento de produto e investigação aplicada (Dziezak, 1990).

A interpretação quantitativa dos resultados de experiências delineadas previamente beneficiou de um grande avanço com o desenvolvimento de métodos estatísticos e foi muito simplificada com a generalização do uso de computadores (Floros e Chinnan, 1988). Estes métodos, nomeadamente a Metodologia das Superfícies de Resposta (RSM), são muito interessantes do ponto de vista económico. Uma das suas grandes vantagens é uma redução considerável no número de experiências o que resulta numa poupança significativa de tempo e materiais. A RSM permite testar diversas variáveis em conjunto e usa delineamentos experimentais especiais e modelos de cálculo. Baseia-se em equações polinomiais que definem relações entre as variáveis independentes e as variáveis dependentes (John e Quenouille, 1977).

Tanto quanto sabemos ainda não foi publicado nenhum trabalho sobre o uso destas técnicas em estudos em Enologia.

Usar a RSM- Porquê?-Quando?

Nas técnicas tradicionais de experimentação cada variável é estudada, independentemente, matendo-se todas as outras constantes. Por exemplo, para estudar duas variáveis, cada uma com quatro níveis de variação, seriam necessárias 16 experiências. O delineamento factorial, por exemplo, vai reduzir o nº destas experiências a 4.

A RSM, usando um delineamento experimental específico (blocos centrais compostos e rotativos) oferece as seguintes vantagens:

- i) é uma metodologia racional que poupa tempo e dinheiro;

- ii) permite a identificação de valores ótimos "verdadeiros";
- iii) o erro experimental da variável dependente terá o mesmo valor para todos os pontos experimentais situados à mesma distância do centro do espaço experimental;
- iv) permite a determinação dos efeitos das variáveis individualmente e das interações entre elas.

Esta última vantagem é muito importante na medida em que pode revelar certos detalhes no comportamento das variáveis que podem ser relevantes do ponto de vista económico, *i.e.*, por exemplo, podemos concluir que se pode obter o mesmo resultado diminuindo a incorporação de determinado ingrediente muito caro, compensando com o aumento do tempo de uma operação no processamento.

A RSM pode ser usada para o efectivo desenvolvimento de produtos (Giovanni, 1983) ou na racionalização do processamento investigando onde poderá ser feita a redução de custos (problema de grande acuidade nos nossos dias), identificar as soluções para aumentar o rendimento ou determinar as causas de perdas ou defeitos. Também ajuda à eliminação de desperdícios (muito importante do ponto de vista ambiental) e de reciclagem durante a produção reduzindo a necessidade de controlo em linha (Mitchell *et al.*, 1986).

O que é de facto a Metodologia das Superfícies de Resposta?

A RSM é um método estatístico desenvolvido por Box e Wilson (1951) para determinar as concentrações ótimas dos reagentes químicos que maximizavam o rendimento em produtos. Este método inclui o planeamento das experiências, segundo delineamentos experimentais específicos, que são função do número de variáveis. Podem assim ser determinadas as condições ótimas para uma dada resposta, permitindo testar múltiplas variáveis e as suas interações ao mesmo tempo. Bradley (1958) dá uma explicação detalhada das ferramentas estatísticas e matemáticas envolvidas.

Este método é designado por Metodologia das Superfícies de Resposta, tradução do inglês "Response Surface Methodology

- (RSM)", dado que a relação entre a resposta Y e as variáveis X_i é uma superfície de dimensão $(p+1)$, sendo p o nº de variáveis X_i . A função $Y = f(x_i)$ é representada por uma equação polinomial que constitui uma aproximação da função real, o valor máximo ou mínimo de Y (resposta) dentro dos intervalos de variação das variáveis x_i , vai ser o valor óptimo da resposta.

O delineamento experimental é de blocos do tipo composto, central e rotativo desenvolvido por Box e Hunter (1957) e Cochran e Cox (1957). É formado por três partes distintas (Fig.1):

A 1ª parte é do tipo factorial clássico, com 2^p pontos experimentais (sendo $p = n^\circ$ de X_i variáveis) cada uma das variáveis tem o valor codificado de +1 ou de -1. Estes 2^p pontos experimentais constituem os vértices de um cubo com p dimensões centrado na origem do sistema de referência codificado. A distância destes pontos à origem é de $p^{1/2}$.

A 2ª parte tem em conta a não linearidade e é uma estrela de $2p$ pontos experimentais codificados de $+\alpha$ e $-\alpha$ nos eixos do sistema e uma distância de $2^{p/4}$ da origem.

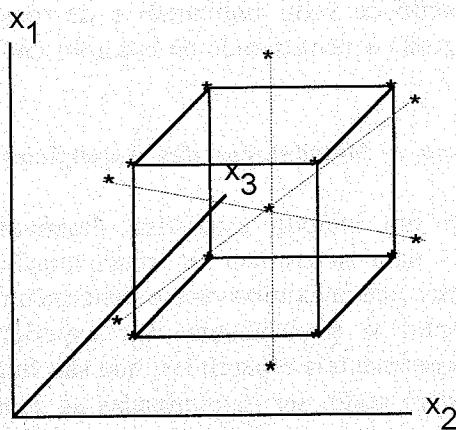


Fig. 1 - Representação da região experimental definida pelo delineamento experimental composto, central e rotativo para três variáveis; o ponto central, o cubo e os pontos estrela estão representados por *.

*Représentation de la région expérimentale définie par le déroulement expérimentale composé, central et rotatif pour trois variables: le point central, le cube et les points étoile sont représentés par *.*

A 3ª parte também tem em conta a não linearidade e consiste em pontos centrais que são repartidos para podermos ter uma medida da variância do erro experimental.

Ao escolhermos o valor de $2^{p/4}$ para α e ao repetirmos os pontos centrais o delineamento fica rotativo, *i.e.*, o erro padrão para Y vai ser o mesmo para todos os pontos que estejam à mesma distância do centro da região experimental (Vuataz, 1986). Como por exemplo podemos ver a matriz correspondente a este delineamento experimental para três variáveis no Quadro 1.

QUADRO 1

Matriz para três variáveis
Matrix pour trois variables

-1	-1	-1
-1	-1	1
-1	1	-1
-1	1	1
1	-1	-1
1	-1	1
1	1	-1
1	1	1
$-\alpha$	0	0
α	0	0
0	$-\alpha$	0
0	α	0
0	0	$-\alpha$
0	0	α
0	0	0
0	0	0
0	0	0

Definir claramente o objectivo é muitas vezes difícil, mas é fundamental para evitar problemas nas fases mais adiantadas de aplicação da metodologia. As respostas são de preferência medições objectivas, mas também podem ser usados resultados de análise sensorial (Henika, 1982), de uma propriedade bem definida e directamente relacionada com o objectivo.

Seleccionar as variáveis e os intervalos de variação da mesma implica um conhecimento prévio do problema. Se não for esse o caso a estratégia de primeira ordem tem de ser usada. Normalmente a resposta (Y), em função das variáveis (Xi), é descrita por um polinómio de 2ª ordem:

$$Y = a + \sum_i a_i x_i + \sum_{ij} a_{ij} x_i x_j + \sum_{ii} a_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é a resposta objectiva e x_i e x_j são as variáveis independentes e ε é o erro padrão residual, *i.e.*, a diferença entre os pontos experimentais e a previsão do modelo.

Os resultados são analisados em regressão múltipla para ajustar melhor a equação a todas as variáveis e o erro, *i.e.*, os valores residuais devem ter uma distribuição normal com um valor médio de zero.

Esta equação muitas vezes apresenta máximos e/ou mínimos. O valor óptimo estimado, de acordo com o objectivo, vai ser um destes pontos.

Os modelos preditivos, assim estabelecidos, podem ser usados, na forma gráfica, para desenhar superfícies ou linhas de nível dentro da região experimental. Neste caso as regiões de resposta optimizada podem ser avaliadas visualmente.

A RSM aplicada ao desenvolvimento de produtos de uva e ao controlo de qualidade de vinhos

São aqui apresentados dois trabalhos, realizados no nosso laboratório, onde esta técnica foi usada. Mais pormenores sobre estes estudos podem ser vistos em Matias *et al.* (1993) e Dallas e Laureano (1994) respectivamente.

Como é que funciona o RSM?

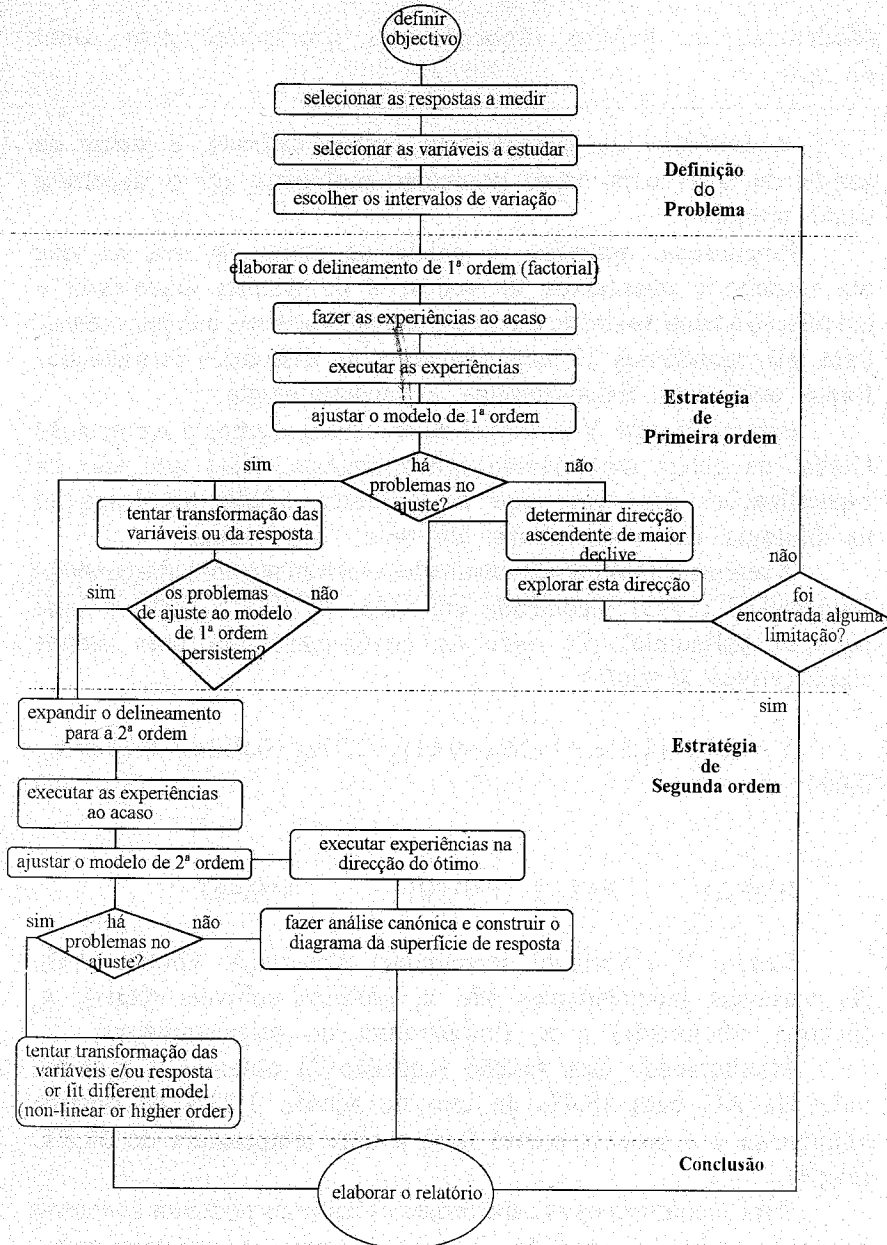


Fig. 2 - Caminho a seguir quando se usa a RSM (In Hunter e Koeler, 1989).
 Chemin à suivre quand on utilise le RSM (In Hunter e Koeler, 1989).

Modelação de geleias hipocalóricas produzidas com sumo de uva

A produção de geleias com baixas calorias, a partir de sumos de uvas com baixo potencial enológico, foi o objectivo deste trabalho.

Procurámos otimizar a geleia de sumo de uva no que diz respeito à quantidade de açúcar e de pectina adicionada e em relação à temperatura de processamento (3 variáveis independentes). Para isso realizámos 17 experiências e as diferentes formulações foram analisadas físico-química e sensorialmente.

Para a resposta Y (variável dependente) usámos a Avaliação Global da geleia determinada sensorialmente, visto que não há especificações para este tipo de produtos e não há descrição na literatura das propriedades de uma "boa geleia".

A regressão múltipla dos resultados mostrou um bom ajustamento. Rauwendaal (1993) recomenda um valor de $R^2 \geq 0.88$ a uma equação polinomial (2) onde os coeficientes são pelo menos significativos ($P < 0,05$):

$$Y = -28,97 + 1,35x_1 + 14,59x_2 - 0,01x_1^2 - 2,77x_2^2 + 0,001x_3^2 - 0,202x_1x_2 - 0,004x_1x_3 + \quad (2)$$

$$R^2=92,5 \quad F=21,0 \quad (P<0,001) \quad \epsilon=0,467$$

Sendo: Y a variável dependente: Avaliação Global (AG). As variáveis independentes são x_1 (sólidos solúveis totais), x_2 (pectina adicionada) e x_3 (temperatura do processamento).

Maximizando esta função (equação 2) obtemos o máximo valor da AG para 38,4% de teor de açúcar, 1,23% de pectina adicionada e o processamento feito a uma temperatura de 68,8°C (Fig.3).

Para encontrarmos as características texturais podemos encontrar equações como a equação 2 para as respostas determinadas instrumentalmente: a dureza e a coesividade geleia. Entrando nestas equações com o valor das variáveis que maximizam a AG calculámos para a dureza um valor de $8,5 \times 10^{-3}$ kg e para a coesividade 0,36.

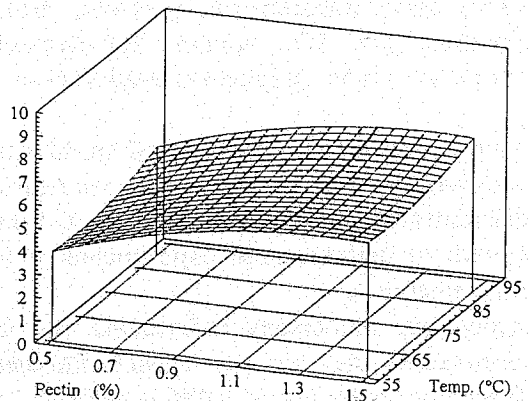
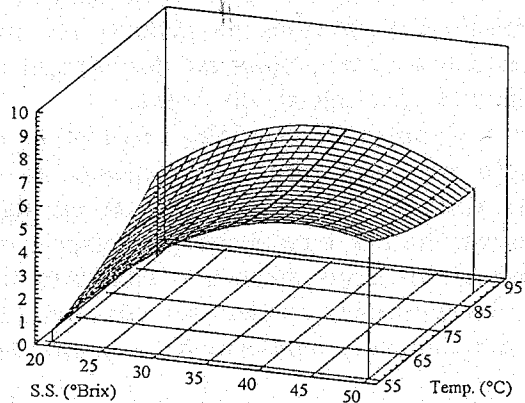
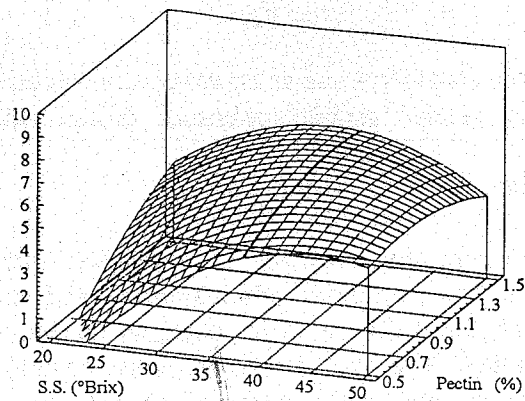


Fig. 3 - Superfícies de resposta para a Avaliação Global (AG) de geleias de sumo de uva em função de: 1.º gráfico - teor em sólidos solúveis e da percentagem de pectina adicionada; 2.º gráfico - teor em sólidos solúveis e temperatura de processamento; 3.º gráfico - percentagem de pectina adicionada e temperatura de processamento. Os valores máximos estão assinalados a traço mais grosso.

Surfaces de réponse pour l'Appréciation Globale (AG) de gelée de jus de raisin en fonction de: 1^{er} graphique - la teneur en solides solubles et du pourcentage de pectine additionnée. 2^{ème} graphique - la teneur en solides solubles et température de processus. 3^{ème} graphique - pourcentage de pectine additionnée et température de processus. Les volumes maximales sont signalées a gros trait.

Assim podemos considerar que as características texturais objectivas de uma "boa geleia" estarão próximas destes valores.

Modelação da cor em vinhos tintos

A cor é um dos atributos de qualidade mais apreciados no vinho e é um parâmetro relativamente fácil de determinar. No entanto, compreender os vários factores que contribuem para a cor do vinho já é um problema mais complexo. A cor inicial de um vinho tinto é principalmente devida aos pigmentos antociânicos, extraídos da película das uvas. Durante o envelhecimento, o aumento progressivo dos pigmentos poliméricos vermelhos altera a cor inicial do vinho.

Durante a conservação do vinho verificou-se a diminuição da concentração em antocianinas e o aumento da concentração em pigmentos polimerizados. A importância de alguns factores como o pH, o teor em SO_2 e em álcool e o tempo e a temperatura de armazenamento, os quais afectam o equilíbrio fisico-químico e a estrutura das antocianinas, podem ser responsáveis pela subtil alteração da cor durante a conservação e o envelhecimento do vinho.

O objectivo deste trabalho foi, portanto, estudar o efeito destes 5 parâmetros (pH, SO_2 , Álcool, Temperatura e Tempo) na matéria corante do vinho (pigmentos antociânicos e polímeros corados).

Usámos um delineamento experimental em blocos compostos, centrados e rotativos para 5 variáveis independentes, cada uma a 5 níveis diferentes. Foram preparadas 45 garrafas de vinho ($0,35 \text{ dm}^3$) segundo o delineamento experimental e foram depois analisadas relativamente a:

- i) Variações em antocianinas individuais por HPLC.
- ii) Determinações da cor por espectrofotometria:
 - cor dos pigmentos poliméricos (PPC) definida como a cor residual depois da adição de metabissulfito de sódio PPC = $= E_{520}^{100\text{mm}} (\text{SO}_2)$.
 - cor das antocianinas (AC) como sendo a contribuição para a cor do vinho do teor em antocianinas coradas: $aC = E_{520}^{10\text{mm}}$
 - PPC

As seguintes equações foram as que melhor se ajustaram aos resultados experimentais:

$$AC=36,9-5,59x_1-3,66x_2-2,22x_3-10,12x_5+2,49x_1x_2 \quad (3)$$

$$PPC=2,33+0,099x_1-0,082x_2-0,278x_3+0,162x_5+0,092x_5^2 \quad (4)$$

Sendo x_1 Tempo; x_2 pH; x_3 teor em SO_2 e x_5 temperatura. Destes modelos podemos concluir que o decréscimo das antocianas coradas (estrutura do catião flavilium) é fundamentalmente determinado pela temperatura de conservação. O aumento do pH diminui a taxa de decréscimo das antocianas coloridas (interacção entre x_1 e x_2 na equação 3).

A absorvência devida à presença dos pigmentos poliméricos (PPC) aumentou com a temperatura e o tempo de conservação. Pelo modelo (equação 3) podemos ver que um aumento no teor de SO_2 e no pH induz um decréscimo na cor devida aos pigmentos poliméricos (Fig. 4).

CONCLUSÕES

A Indústria vitícola tem uma produção centrada nos produtos com forte tradição e as suas características dependem do meio rural envolvente.

O mercado das bebidas alcoólicas e não alcoólicas é altamente competitivo e exigente no controlo de qualidade e no desenvolvimento de produtos. Os novos produtos desenvolvidos têm de satisfazer as necessidades naturais, e induzidas por novos conceitos de dietética, dos consumidores.

Os métodos estatísticos, fáceis de usar actualmente com a difusão dos computadores pessoais, usados na optimização em desenvolvimento de produtos e aceitabilidade do consumidor; processamento e controlo de qualidade, têm provado a sua utilidade na poupança de tempo e recursos noutras Indústrias alimentares. Pela nossa experiência, a aplicação de métodos como a Metodologia das Superfícies de Resposta aos produtos da Vinha e do Vinho mostraram-se muito interessantes.

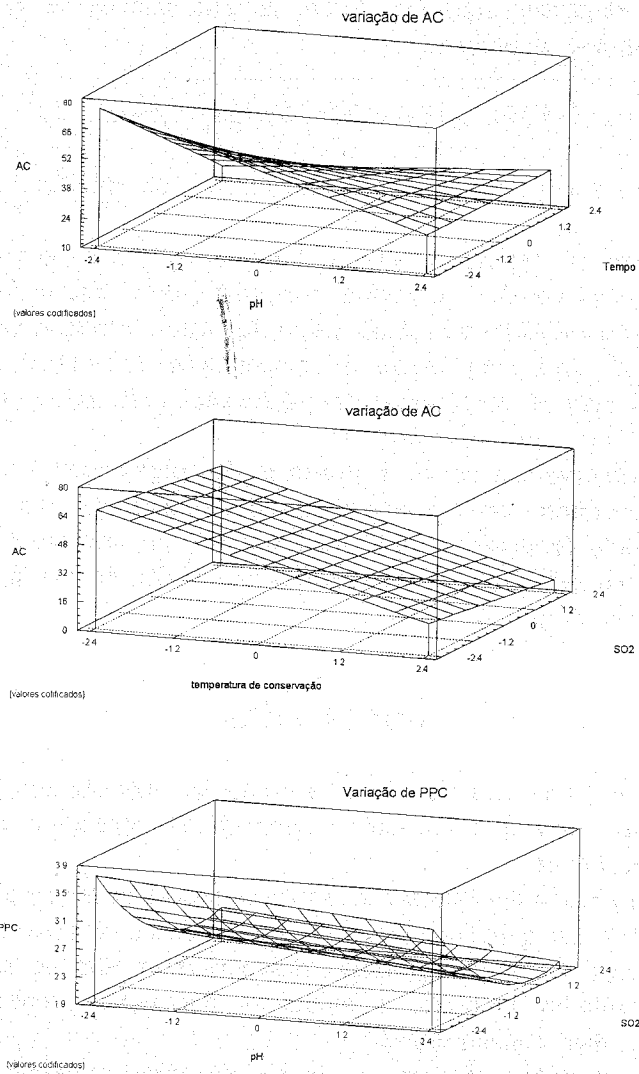


Fig. 4 - Superfícies de resposta para antocianas coradas (AC) em função do pH e do tempo de conservação (1.º gráfico) ou em função da temperatura de conservação e do SO₂ (2.º gráfico). No 3.º gráfico podemos ver a cor devida aos pigmentos poliméricos em função do pH e do teor de SO₂ adicionado ao vinho.
Surfaces de réponse pour anthocianes ionisés (AC) en fonction de: 1^{er} graphique - pH et du temps de conservation. 2^{ième} graphique - la teneur en solides solubles et temperature de processus. 3^{ième} graphique - pourcentage de pectine additionnée et temperature de processus.

RÉSUMÉ

Utilisation de la méthode des surfaces de réponse dans le déroulement expérimental d'études en Oenologie

Dans ce travail nous présentons une méthodologie statistique qui permet gagner du temps et des recours dans des études de développement de produits, contrôle de qualité et optimisation de procès. C'est la Méthodologie des Surfaces de Réponse (normalement désignée par RSM).

On parle aussi de la justification et opportunité du usage de cette technique bien comme une description détaillé de son fonctionnement.

Dans le partie final nous discutons des exemples d'applications ou développement de nouveaux produits originaires de raisins et ou contrôle de qualité de vins.

SUMMARY

The application of the response surface methodology (RSM) on the experimental design in Eonology studies

In this work, a statiscal methodology to save time and resources in studies of product development, quality control and process optimisation is presented. Is the Response Surface Methodology, usually designated by RSM.

The oportunity and justification of the use of this technique as well as a detailed description of how it works is given.

Finally, applications to the development of new products from grapes and to wine quality control are discussed.

AGRADECIMENTOS

À União Europeia e à JNICT por terem financiado os trabalhos: programa FLAIR, contrato AGRF-CT91-0052 e contrato AGR/571/90 respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Box, G.E.P. e Wilson, K.B., 1951. On the Experimental attainment of optimum conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser B*, 13 (1), 1.

- Box, G.E.P. e Hunter, J.S., 1957. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. *Ann. Math. Stat.*, **28**, 195.
- Bradley, R.A., 1958. Determination of optimum operating conditions by experimental methods. Part 1. Mathematics and statistics fundamental to the fitting of response surfaces. *Ind. Qual. Control* **15** (1), 16.
- Cochran, W.G. e Cox, G.M., 1957. "Experimental designs". 2nd. Edit. Wiley & sons. New York.
- Dallas, C. e Laureano, O., 1994. Effects of pH, alcohol content and storage time on the colour composition of a young Portuguese wine. *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 477.
- Dziedzic, J.D., 1990. Taking the gamble out of Product Development. *Food Technology*, **44** (6), 110.
- Floros, J.D. e Chinnan, M.S., 1988. Computer graphics-assisted optimization for product and process development. *Food Technology*, **42** (2/3), 72.
- Giovanni, M., 1983. Response surface methodology and product optimization. *Food Technology*, **37** (11), 41.
- Henika, R.G., 1982. Use of response surface methodology in sensory evaluation. *Food Technology*, **36** (11), 96.
- Hunter, W.G. e Koeler, T.L., 1989. Response Surface Methodology. In "Quality Control Handbook". Juran, J.M. et al., (eds.) 3rd Edition. McGraw-Hill Book Company. New York.
- John, J.A. e Quenuille, M.H., 1977. "Experiments design and analysis". 2nd Edition. Charles Griffin e Co.. London e Wycombe.
- Matias, E.C., Sousa, I.M.N. e Laureano, O., 1993. Hypocaloric jams from grape juice. In "Developments in Food Engineering". Proceedings of the 6th International Congress on Engineering and Food. Yano, T., Matsuno, R. & Nakamura, K., (eds.). Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall. London: 102.
- Mitchel, J.R., Black, H., Greson, K. Harding, S. e Mather, S., 1986. Optimization of products and processes. In "Chemistry and Physics of Baking". Blanshard, J.M.V. et al., (eds.). Royal Society of Chemistry. London.
- Vuataz, L., 1986. Response surface methods. In "Statistical Procedures in Food Research". Piggott, J.R. (ed). Elsevier Applied Science Publ. Essex.