



Ponta Grossa - PR  
de 26 a 28 de Setembro de 2012

### III Simpósio Nacional de Ensino de Ciência e Tecnologia

## PROPOSTA EXPERIMENTAL PARA ENSINO DE PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO EM INSTITUIÇÕES DE ENSINO SUPERIOR

**Vassula B. Paiva** – vassula.b.paiva@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curso Técnico Integrado em Informática  
BR 369 - km 0,5 - CEP 87301-006 - Caixa Postal: 271

Campo Mourão – Paraná

**Ieda S. Scarminio** - ieda@uel.br

Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química  
Caixa Postal 6001 – CEP 86051-990

Londrina - Paraná

**Evelyn D. Pereira** – evedaysjc@yahoo.com.br

**Paulo H. Março** – paulohmarco@gmail.com

**Patrícia Valderrama** – patriciav@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Coordenação de Licenciatura em Química  
BR 369 - km 0,5 - CEP 87301-006 - Caixa Postal: 271

Campo Mourão - Paraná

**Resumo:** Esta proposta experimental apresenta as principais definições e um breve histórico acerca da quimiometria. A proposta visa o desenvolvimento de um experimento para avaliar a extração de antocianinas do repolho roxo através de um planejamento fatorial completo do tipo  $2^2$ . Nesse caso, os dois fatores são os solventes de extração, ácido clorídrico e álcool etílico, variando suas concentrações em dois níveis. Este experimento pode ser executado em um período de 2 aulas (de 50 min, cada) de laboratório, incluindo a aquisição das medidas na região do ultravioleta-visível e vem de encontro à necessidade de se desenvolver material didático direcionado aos cursos de graduação, englobando um maior número de conceitos e utilizando técnicas instrumentais muito empregadas atualmente, tanto em pesquisa como nos laboratórios do setor produtivo.

**Palavras-chave:** Planejamento fatorial completo, Repolho roxo, Espectroscopia UV-Vis

## 1 INTRODUÇÃO

A quimiometria é definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos, bem como de lógica em química, de forma a extrair uma maior quantidade de informações e

melhores resultados analíticos (OTTO, 1999, p.1). Formalmente, a quimiometria começou na primeira metade da década de 70, mas foi somente com a popularização do computador no laboratório de química que a quimiometria se consolidou (NETO *et al.*, 2006, p.1401).

O surgimento de métodos instrumentais computadorizados para análise química promoveu a geração de uma grande quantidade informações. Até então, os químicos baseavam suas decisões em uma pequena quantidade de dados que, na maioria das vezes, era obtida de forma lenta e dispendiosa. Com essa grande quantidade de dados, de obtenção rápida e com menor esforço, foi necessária uma análise de modo a extrair uma maior quantidade de informação relevante. Foi então, que teve início a pesquisa e utilização de métodos matemáticos estatísticos que acabaram resultando nessa nova área da química conhecida como quimiometria (VALCÁRCEL, 1997, p.124).

Com o crescimento da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas para tratamento de dados encontrando aplicações distintas conforme o objetivo do estudo, como, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados, as determinações quantitativas, dentre outros. Assim, a quimiometria pode ser subdividida em diversas frentes de pesquisas e aplicações:

- Planejamento e otimização de experimentos (OTTO, 1999, p.81);
- Processamento de sinais analíticos (OTTO, 1999, p.51);
- Reconhecimento de padrões e classificação de dados (OTTO, 1999, 119);
- Calibração multivariada (OTTO, 1999, p.175);
- Métodos de inteligência artificial (OTTO, 1999, p.253).

Nessa subdivisão, o planejamento e otimização de experimentos é, sem dúvida, a mais difundida, entendida e aplicada no meio acadêmico, seja voltado ao ensino ou à pesquisa científica. Mesmo assim, o ensino da quimiometria nas graduações dos cursos de química das Instituições de Ensino Superior (IES) Brasileiras ainda é pequeno, ficando em muitos casos restrita, quando existente, à pós-graduação.

Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas (SANTOS *et al.*, 2011, p.1629). A observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas é de extrema importância para entender os processos que estão sendo monitorados em um determinado sistema. Quando é empregada uma otimização univariada, não é possível detectar interações entre as variáveis estudadas (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2002, p.246) e isso torna a otimização de um determinado processo/procedimento menos eficiente.

O uso da coloração emitida por compostos presentes no repolho roxo (*Brassica oleracea*) e em frutas e flores vem sendo um recurso didático bastante utilizado como estratégia de ensino de equilíbrio ácido-base e na identificação do caráter ácido ou básico de substâncias (SOARES *et al.*, 2001, p.225). As substâncias responsáveis pela coloração destes tecidos vegetais são as antocianinas, pigmentos da classe dos flavonóides que se diferencia dos demais por possuírem uma carga positiva no anel pirano, “Figura 1”. A cor exibida pelas antocianinas é explicada por Pauling (1939), em que a ressonância do cátion flavílico da Figura 1 causa a intensidade da cor (CANUTO, 2011, p.30).

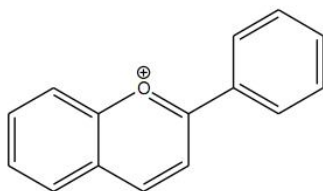


Figura 1. Estrutura básica da antocianina pertencente à subclasse dos flavonóides.

O pH é um dos fatores que afetam a estabilidade das antocianinas. É sabido que quanto maior o número de hidroxilas na molécula de antocianina, menor é a estabilidade dela e quanto maior o número de metoxilas, maior é a sua estabilidade (CAVALCANTI, 2010, p.499), sendo assim, as antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em soluções neutras ou alcalinas (CANUTO, 2011, p. 34).

De acordo com o pH do meio, as antocianinas podem ser encontradas em quatro diferentes formas químicas em solução aquosa: cátion flavílico, base quinoidal, pseudobase carbinol e chalcona. Em valores de pH baixo, como por exemplo em pH 2,00, as antocininas se apresentam na forma de cátion flavílico, “Figura 1”, exibindo cor vermelha (CANUTO, 2011, p. 34)

O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma proposta experimental utilizando planejamento fatorial completo  $2^2$  para otimizar a extração de antocianinas presentes no repolho roxo, visando o ensino de quimiometria nas instituições de ensino superior brasileiras, tão carentes em materiais, seja bibliográfico, seja laboratorial.

A estratégia a ser utilizada compreende duas aulas teóricas (de 50min, cada) e duas aulas práticas (de 50min, cada). Na primeira aula teórica sugere-se destacar os fundamentos e aspectos práticos do planejamento fatorial completo, e na segunda, a aquisição dos dados com medidas na região do ultravioleta. O experimento requer a utilização de um espectrofotômetro que opere na região do ultravioleta (entre 200 e 400 nm).

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiais

Repolho roxo, álcool etílico comercial (92,8° INPM), álcool etílico 70 (70° INPM), ácido clorídrico (ISOFAR), ácido cítrico (ALPHATEC), fosfato monobásico de potássio (SYNTH), tetraborato de sódio (MERCK), trishidroximetilaminometano (MERCK) e cloreto de potássio (LAFAN). As medidas de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 338 nm em um equipamento de espectrofotometria (PG Instruments LTd T80+).

### 2.2 Metodologia

A extração das antocianinas do repolho roxo se deu de acordo com a Tabela 1, a qual apresenta a matriz de planejamento para um planejamento fatorial completo  $2^2$  com dois fatores: ácido clorídrico (HCl) e álcool etílico, em dois níveis de concentração, 0,01 mol.L<sup>-1</sup> e 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, para o ácido clorídrico e 92,8° INPM e 70° INPM para o álcool etílico. Em cada ensaio, 5g de repolho roxo foi submetido à extração com 25 mL de HCl e 25 mL de álcool etílico nas concentrações especificadas na matriz de planejamento da “Tabela 1”. As misturas foram realizadas em béquer e deixadas em repouso pelo tempo mínimo de 10 minutos antes da realização das leituras espectrofotométricas.

Tabela 1 - Matriz de planejamento fatorial  $2^2$  para estudar a extração de antocianinas do repolho roxo.

Ensaio	Concentração de HCl (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de álcool etílico (° INPM)
1	0,01	70
2	0,1	70
3	0,01	92,8
4	0,1	92,8

Nos planejamentos de dois níveis costuma-se identificar os níveis superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente (NETO, 2003, p. 87). Usando essa notação, observa-se que os ensaios 2 e 4 na Tabela 1 correspondem ao nível (+) da concentração de HCl, enquanto os ensaios 1 e 3 correspondem ao nível (-). No caso da concentração de álcool etílico, os ensaios 1 e 2 correspondem ao nível (-), enquanto os ensaios 3 e 4 correspondem ao nível (+). Assim, a matriz de planejamento fatorial  $2^2$ , na forma codificada, para estudar a extração de antocianinas do repolho roxo seria expressa como na “Tabela 2”.

Tabela 2 - Matriz codificada de planejamento fatorial  $2^2$  para estudar a extração de antocianinas do repolho roxo.

Ensaio	Concentração de HCl (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de álcool etílico (° INPM)
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Após a extração a medida de absorbância em 338nm foi realizada pela adição de 200µL de amostra com 3 mL de solução tampão pH 2,00, devido à maior estabilidade das antocianinas em pH ácido (CANUTO, 2011, p. 34).

A solução tampão utilizado no experimento foi obtida a partir de uma solução universal (PERRIN, 1974, p.48), uma mistura contendo: 21,01g de ácido cítrico, 13,61g de fosfato monobásico de potássio, 19,07g de tetraborato de sódio, 12,11g de trishidroximetilaminometano, 7,46g de cloreto de potássio em um litro de água. Para obtenção de 50mL de solução tampão de pH 2,00, 8,7 mL de solução de ácido clorídrico 0,4 mol.L<sup>-1</sup> foi adicionado a 12,5 mL da solução universal, em balão volumétrico de 200mL e o volume foi completado com água destilada.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água destilada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um planejamento fatorial completo do tipo  $2^2$  significa que os experimentos terão dois fatores e dois níveis. Os fatores aqui são os solventes de extração: ácido clorídrico e álcool etílico, enquanto que os níveis são as suas duas concentrações estudadas (0,01 mol.L<sup>-1</sup> e 0,1 mol.L<sup>-1</sup> para HCl e 70° e 92,8° INPM para o álcool etílico).

Para fazer um planejamento fatorial completo realizam-se experimentos em todas as possíveis combinações de níveis dos fatores e cada um desses experimentos, em que o sistema em estudo é submetido a um conjunto de níveis definido é um ensaio experimental (NETO, 2003, p. 85). Na presente proposta isso pode ser verificado ao analisar a matriz de planejamento apresentada na “Tabela 1”. O estudante irá realizar 4 ensaios experimentais: um nos níveis inferiores para a concentração de HCl e de álcool etílico (ensaio 1); um no nível superior para a concentração de HCl e no nível inferior para a concentração de álcool etílico (ensaio 2); um no nível inferior para a concentração de HCl e no nível superior para a concentração de álcool (ensaio 3) e por fim, um nos níveis superiores para a concentração de HCl e de álcool (ensaio 4).

O efeito de qualquer fator (solventes de extração HCl ou álcool) sobre uma resposta pode ser verificado fazendo com que o fator mude de nível, ou seja, avaliando a resposta com base na mudança da concentração de um determinado fator, por exemplo, HCl. Nessa proposta sugere-se examinar os efeitos do aumento da concentração de HCl e álcool etílico sobre a

extração de antocianinas presentes no repolho roxo para mostrar como fazer um planejamento fatorial  $2^2$  e como analisar os resultados obtidos.

Para escolha do comprimento de onda no qual o valor de absorbância seria utilizado como indicativo da extração das antocianinas do repolho roxo, realizou-se medidas espectrais na região de 200 a 650 nm, conforme mostra a “Figura 1”.

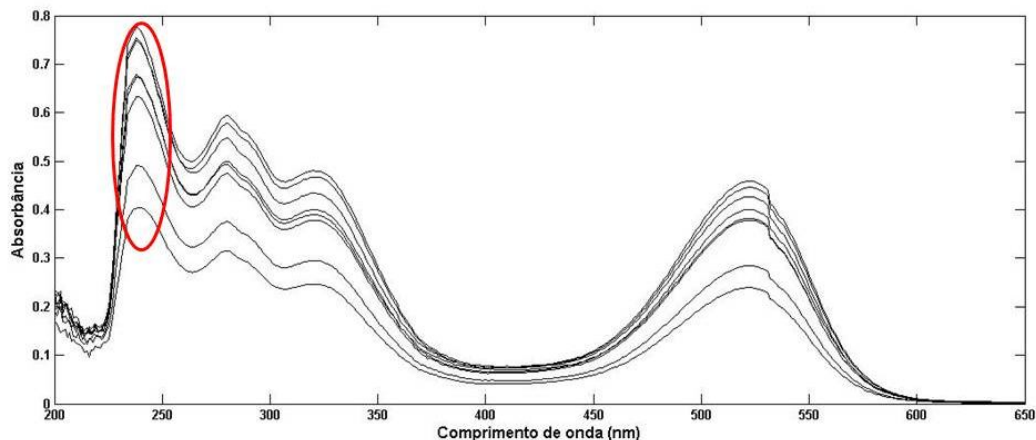


Figura 1 - Espectros de antocianinas em pH 2,00 extraídas do repolho roxo.

Como se pode observar na “Figura 1”, o ponto máximo de absorbância ocorre em 238 nm, como mostra o destaque marcado em vermelho.

Os resultados observados nos ensaios realizados em todas as quatro possíveis combinações dos níveis escolhidos são apresentados na “Tabela 3”. Todos os experimentos foram realizados em duplicata com o intuito de se estimar o erro experimental de uma resposta individual.

Tabela 3 - Resultados de um planejamento fatorial  $2^2$  para estudar a extração de antocianinas do repolho roxo.

Ensaio	Concentração de HCl (mol.L <sup>-1</sup> )	Concentração de álcool etílico (° INPM)	Absorbância em 238 nm		Média
1	0,01	70	0,4020	0,4910	0,4465
2	0,1	70	0,6330	0,6730	0,6530
3	0,01	92,8	0,7770	0,7540	0,7655
4	0,1	92,8	0,6790	0,7480	0,7135

O próximo passo é o cálculo dos efeitos. Isso mostrará o efeito de um determinado fator (HCl, por exemplo) sobre a extração de antocianinas do repolho roxo em virtude do nível em que o outro fator (álcool) está. O efeito principal para o fator HCl é calculado pela equação abaixo:

$$H = \frac{(\bar{y}_2 - \bar{y}_1) + (\bar{y}_4 - \bar{y}_3)}{2} = \frac{(\bar{y}_2 - \bar{y}_4) + (\bar{y}_1 - \bar{y}_3)}{2} \quad (1)$$

Em que,  $y_1$  corresponde à média das absorbâncias obtidas para o ensaio 1;  $y_2$  corresponde à média das absorbâncias obtidas para o ensaio 2;  $y_3$  corresponde à média das

absorbâncias obtidas para o ensaio 3 e  $y_4$  corresponde à média das absorbâncias obtidas para o ensaio 4.

Fazendo os cálculos verificou-se que  $H=0,0772$ . Este valor significa que, a absorbância sobe, em média, 0,0772 unidades quando a concentração de HCl passa do nível inferior para o nível superior.

No caso da concentração do álcool, o nível superior corresponde aos ensaios 3 e 4 e o inferior aos ensaios 1 e 2. Assim, o cálculo do seu efeito principal é realizado de acordo com a equação:

$$A = \left( \frac{(\bar{y}_3 + \bar{y}_4)}{2} \right) - \left( \frac{(\bar{y}_1 + \bar{y}_2)}{2} \right) \quad (2)$$

Para a concentração do álcool o efeito principal foi de  $A=0,1898$ . Esse resultado mostra que a absorbância aumenta 0,1898 unidades, em média, quando a concentração de álcool passa do nível inferior para o superior.

Se não houvesse interação o efeito da concentração de HCl deveria ser o mesmo com qualquer valor de concentração de álcool. Porém, isso não ocorre, o que evidencia que ocorre uma interação entre os fatores. Essa interação pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$HA = \left( \frac{(\bar{y}_4 - \bar{y}_3)}{2} \right) - \left( \frac{(\bar{y}_2 - \bar{y}_1)}{2} \right) = \left( \frac{(\bar{y}_1 + \bar{y}_4)}{2} \right) - \left( \frac{(\bar{y}_2 + \bar{y}_3)}{2} \right) \quad (3)$$

O resultado para esse cálculo apresentou um valor  $HA= -0,1292$  e representa o acontece com o sistema quando: os dois fatores passam do nível inferior (ensaio 1) para o nível superior (ensaio 4), um fator está no nível inferior e o outro no superior (ensaio 3) e sofre inversão (ensaio 4).

Nesse ponto, é necessário calcular o erro padrão, o qual somente pode ser obtido porque os ensaios foram realizados em duplicata. O erro padrão permitirá decidir se existem ou não efeitos significativos que podem ser atribuídos à ação dos fatores. O cálculo do erro padrão, nesse caso, é feito estimando-se a soma das variâncias de cada ensaio e dividindo esse resultado por 4 (número de ensaios), assim:

$$s^2 = \sum_{i=1}^4 \left( \frac{(Absorbância_1 - Absorbância_2)^2}{4} \right) \quad (4)$$

O erro padrão para um efeito é calculado como:

$$s(efeito) = \sqrt{\frac{s^2}{2}} \quad (5)$$

Para a proposta aqui apresentada, o valor de erro padrão para um efeito é de 0,0304 e o valor do erro padrão associado à média global corresponde à metade do valor do erro padrão associado a um efeito. Assim, a “Tabela 4” apresenta os resultados para a análise dos dados da “Tabela 3”.

Tabela 4 - Efeitos calculados para o planejamento fatorial  $2^2$  da Tabela 3.

Média global	$0,6446 \pm 0,0152$
Efeitos principais	
<b>H</b>	$0,0772 \pm 0,0304$
<b>A</b>	$0,1898 \pm 0,0304$
Efeito de interação	
<b>HA</b>	$- 0,1292 \pm 0,0304$

A partir do erro padrão e da distribuição  $t$  de Student é possível decidir quais dos efeitos calculados são significativamente diferentes de zero, ou seja, que devem ser interpretados (NETO, 2003, p. 95). Com 95% de confiança o valor da distribuição  $t$  de Student para 4 ensaios é de 2,776. Para decidir se o efeito deve ou não ser interpretado, esse valor da distribuição  $t$  de Student deve ser multiplicado pelo erro padrão. O resultado será estatisticamente significativo quando, os valores do erro padrão forem inferiores ao seu produto pelo ponto da distribuição  $t$  de Student. Para os erros padrão mostrados na “Tabela 4”, tem-se que todos são significativos, ou seja, os efeitos existem mesmo e devemos entender o que isso significa na prática.

Como o efeito de interação é significativo, então, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. Para fazer de forma a possibilitar um maior entendimento, a melhor alternativa realizar uma interpretação geométrica, conforme a “Figura 2”.

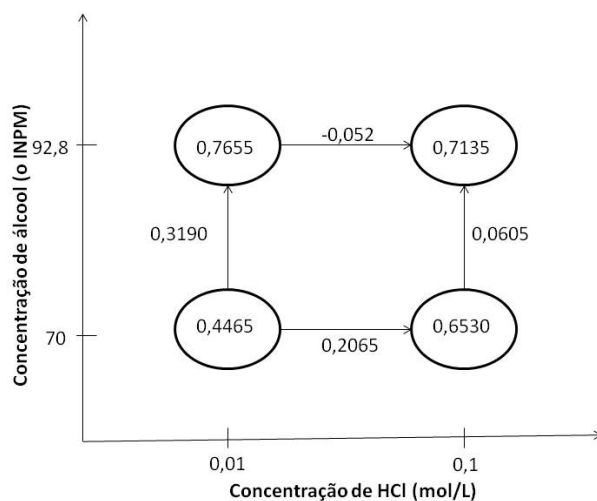


Figura 2 - Diagrama para interpretação do planejamento fatorial  $2^2$  para extração de antocianinas do repolho roxo. Os valores nos vértices do quadrado são os valores médios de absorvância obtidos em cada ensaio.

Analisando o diagrama da “Figura 2” é possível concluir que:

- Elevando a concentração de HCl a extração é mais efetiva com a concentração do álcool no nível inferior. A extração torna-se menos efetiva quando a concentração do álcool encontra-se no nível superior.
- Elevando a concentração do álcool a extração é mais pronunciada com a concentração do HCl  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  do que  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .
- A extração é mais efetiva com a concentração de HCl  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  e de álcool  $92,8^\circ \text{ INPM}$ .

O último passo consiste no modelo estatístico. O modelo estatístico é usado para descrever as respostas de um planejamento fatorial e é formulado em termos dos efeitos por unidade de variação dos fatores (Bruns pág. 101). A equação que representa o modelo é escrita como:

$$\hat{y}(x_1, x_2) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + ex_1x_2 \quad (6)$$

Em que,  $b_0$  é a média de todas as respostas do planejamento,  $b_1$  e  $b_2$  são os valores dos efeitos principais relativos à concentração de HCl e álcool etílico, respectivamente,  $b_{12}$  é o efeito de interação e 'e' é o erro aleatório associado à resposta  $\hat{y}(x_1, x_2)$ .

O erro aleatório é um valor médio, calculado pela subtração de cada um dos resultados da sua respectiva média de observações.

Para a proposta de avaliação da extração de antocianinas do repolho roxo o modelo estatístico é:

$$\hat{y} = 0,6446 + 0,0772x_1 + 0,1898x_2 - 0,1292x_1x_2 + 0,0276 \quad (7)$$

Agora a partir de um valor de concentração de HCl ( $x_1$ ) e de álcool etílico ( $x_2$ ) é possível estimar o valor de absorvância ( $\hat{y}$ ) e avaliar se essa nova condição de concentração promoverá uma maior extração de antocianinas.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento proposto permite introduzir conceitos relacionados à espectrofotometria na região do ultravioleta visível e aos métodos de planejamento fatorial, através de uma aplicação analítica prática usando avaliar a extração de antocianinas do repolho roxo.

Este experimento pode ser executado em um período de 2 aulas (de 50 min, cada) de laboratório, incluindo a aquisição das medidas UV-Vis, e vem de encontro à necessidade de se desenvolver material didático direcionado aos cursos de graduação, englobando um maior número de conceitos e utilizando técnicas instrumentais muito empregadas atualmente, tanto em pesquisa como nos laboratórios do setor produtivo.

#### *Agradecimentos*

À bolsa de iniciação científica (E.D. Pereira) e à bolsa de iniciação científica do programa PIBIC-EM (V.B. Paiva).

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANUTO, G.A.B. Caracterização, quantificação e estudo da relação retenção-propriedade anti-oxidante (QRPR) de antocianinas em extrato de morangos (*Fragaria vesca*) por cromatografia líquida de alta eficiência. São Paulo, 235 p., 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

CAVACANTI, R.N.; SANTOS, D.T.; Meireles, M.A.A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 499-509, 2010.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.



NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.; **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Campinas: Ed.UNICAMP, 2003.

OTTO, M. **Chemometrics.** Weinheim: Ed.Wiley, 1999.

PEREIRA-FILHO, E.R.; POPPI, R.J.; ARRUDA, M.A.Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.

PERRIN, D.D.; DEMPSEY, B. **Buffers for pH and metal ion control.** New York: Ed.Champman and Hall, 1974.

SANTOS, F.M.; SIMÕES, J.C.; SILVA, J.R.A.; BARTHUS, R.C.; POPPI, R.J.; AMARAL, A.C.F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.

SOARES, M.H.F.B.; SILVA, M.V.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. Aplicação de corantes naturais no ensino médio. **Eclética Química**, v. 26, p. 225-234, 2001.

VALCÁRCEL, M. A modern definition of analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.16, n.3, p. 124-131, 1997.

## **PROPOSAL TO TEACH FULL EXPERIMENTAL DESIGN TO UNDERGRADUATE COURSES AT HIGHER EDUCATION INSTITUTIONS**

**Abstract:** *This proposal presents the main definitions and a brief history about chemometrics. The proposal aims to develop an experiment which implies on the evaluation of the extraction of anthocyanins from red cabbage through a full factorial design  $2^2$ . In this experiment, the two factors are the extraction solvents (hydrochloric acid and ethyl alcohol), where its concentrations are proposed to vary in two levels. This experiment can be performed during 100 minutes (2 classes of 50 minutes each) in laboratory, which includes measurement time for the acquisition of ultraviolet-visible spectra. Moreover, there is a need on the development of educational materials directed to the undergraduate courses, presenting a wider number of concepts and updating the instrumental techniques used both in research laboratories and at the productive sector.*

**Key-words:** *Full factorial design, Red cabbage, UV-Vis spectroscopy*