UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
ENGENHARIA AGROINDUSTRIAL – INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS

PARAMETRIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE MATRIZES VEGETAIS PARA UTILIZAÇÃO COMO ADITIVO EM ALIMENTOS

Nara Lúcia dos Santos

Santo Antônio da Patrulha

2017

PARAMETRIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE MATRIZES VEGETAIS PARA UTILIZAÇÃO COMO ADITIVO EM ALIMENTOS

Nara Lúcia dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande, como parte dos requisitos necessários à Graduação em Engenharia Agroindustrial – Indústrias Alimentícias.

Orientador: Prof. Dr. Toni Jefferson Lopes

Santo Antônio da Patrulha

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que me concedeu força e disposição para superar as dificuldades durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família pelo incentivo e apoio, especialmente a meu marido Rivelino e minha filha Brenda Martina, que de forma especial e carinhosa me deram força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldade.

Ao Professor Dr. Toni J. Lopes pela orientação e ensinamentos transmitidos, pela paciência e dedicação que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos colegas Afonso e Carina pelo auxílio prestado para o desenvolvimento deste projeto.

À Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, pelo apoio institucional.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram no transcorrer deste período para a realização deste estudo.

RESUMO

A crescente demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis, juntamente com a comprovação dos efeitos nocivos de muitos corantes artificiais, que estão presentes no processamento de alimentos, tem pressionado as indústrias a substituir gradativamente estes aditivos por corantes naturais que, por serem oriundos de frutas, flores ou folhas apresentam baixa toxicidade. Porém, a substituição dos corantes artificiais por corantes naturais apresenta desafios. Assim, com o intuito de obter as melhores condições de obtenção dos corantes naturais, este trabalho objetivou estudar diferentes processos de extração de pigmentos naturais. Os extratos estudados foram obtidos de duas matrizes vegetais (Espinafre e Casca de Limão Bergamota), através de três métodos diferentes: extração com água destilada aquecida, extração em meio alcoólico e extração em meio ácido. A quantificação das cores dos extratos foi feita através do *software Mathematica* no sistema de cor CIELab e RGB, e através de ferramentas de análise estatísticas (planejamento experimental), foi determinada as melhores condições de extração. Os resultados encontrados mostram que, com os meios de extração usados foi possível encontrar pigmentos com cores próximas a encontrada em corantes artificiais. Com ênfase, em ambos os casos, para a extração com solução alcoólica, que apresentou valores de Índice de Cor próximos aos valores encontrados para a amostra usada como padrão de comparação. Assim sendo, a metodologia adotada para a análise de cor, pode ser uma alternativa de baixo custo aos métodos de quantificação de cores convencionais.

Palavras-chave: corantes alimentícios, extratos naturais, colorimetria.

ABSTRACT

The crescent consumer demand for healthier products and the evidence of the harmful effects of many artificial dyes present in food processing, both has coerced industries to gradually replace these additives to natural dyes, that present low toxicity, which come from fruits, flowers or leaves. Therefore, the natural dyes replacement presents challenges, once that some natural pigments are sensitive to factors involved on food processing as pH, temperature and oxygen presence. Thus, in order to obtain the best conditions of natural dyes, this work aims to study different processes of natural pigments extraction. The extracted studied were obtained from two plants matrices (spinach and bergamot lime bark), through three different extraction methods: heated distilled water, alcoholic and acidic. The colors quantification of the extracts was done through Mathematica software in the CIELab and RGB color system, and through statistical analysis tools (experimental design), the best extraction conditions were determined. The results indicate that with the extraction method used it was possible to find pigments with colors close to that found in artificial dyes. With emphasis in both cases with alcoholic solution extraction, which presented Color Index values close to the values found for the sample used as comparison pattern. Therefore, the methodology used for color analysis can be a low-cost alternative to conventional color quantification methods.

Key-words: food dyes, natural extracts, colorimetry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 4

2.1. Objetivo geral 4

2.2. Objetivos específicos 4

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

3.1. Corantes 5

3.2. Corantes Alimentícios 5

3.3. Corantes Orgânicos Sintéticos 6

3.4. Corantes Orgânicos Naturais 7

3.4.1. Flavonoides 8

3.4.2. Carotenoides 9

3.4.3. Clorofila 10

3.5. Colorimetria 11

3.5.1. Sistema de Cor RGB 12

3.5.2. Sistema de Cores CIELab 13

4. MATERIAL E MÉTODOS 16

4.1. Obtenção dos extratos de vegetais 16

4.1.1. Extração dos pigmentos com água destilada 17

4.1.2. Extração de pigmentos em meio alcoólico 18

4.1.3. Extração de pigmentos em meio ácido 19

4.2. Análise de cor através de técnicas colorimétricas 19

4.3. Tratamento dos dados através de análise estatística 20

4.4. Comparação dos extratos vegetais obtidos com produtos alimentícios 22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23

5.1. Extração dos pigmentos de espinafre com água destilada 23

5.2. Extração dos pigmentos de espinafre em solução alcoólica 27

5.3. Extração dos pigmentos de espinafre com ácido cítrico 32

5.4. Extração dos pigmentos da casca de limão bergamota com água destilada 36

5.5. Extração dos pigmentos da casca de limão bergamota em solução alcoólica 40

5.6. Extração dos pigmentos da casca de limão bergamota com ácido cítrico 45

6. CONCLUSÕES 50

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

1. INTRODUÇÃO

A aparência dos alimentos é um fator importante para a seleção e escolha de um produto alimentício. Exercendo influência na aceitação ou rejeição pelo consumidor. Embora a alimentação devesse depender apenas do valor nutricional, a cor, aroma e textura são fatores que conduzem a aceitação (GRANATO; MASSON, 2010). O aspecto visual é a primeira característica a ser julgada, sendo a coloração o atributo sensorial que mais desperta a atenção de determinado alimento, exercendo importante indução a preferência (CORTEZ et al., 2017).

Porém, muitos produtos alimentícios não são naturalmente coloridos, ou tem a estrutura dos pigmentos presentes alteradas durante o processamento, devido a fatores ambientais ou do próprio alimento, como pH, temperatura e presença de oxigênio (SPENCE, 2015). Assim, as indústrias de alimentos recorrem ao uso de corantes para atender as expectativas dos consumidores, que usualmente, associam a cor com a qualidade do produto (SCHUMANN; POLÔNIO; GONÇALVES, 2008).

No entanto, a incorporação de corantes aos alimentos deve ser justificada por razões técnicas como, restaurar a cor perdida no processamento, para garantir a identidade natural do produto ou como um indicador visual de qualidade. De acordo com a Resolução nº 44 de 1977 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os corantes utilizados em produtos alimentícios são definidos como substâncias ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração dos alimentos. Sendo permitidas, atualmente, as seguintes categorias de corantes: orgânico natural, orgânico sintético, inorgânico (BRASIL, 1997).

Do ponto de vista industrial os corantes orgânicos sintéticos são os mais utilizados, pois apresentam vantagens tecnológicas, que muitas vezes não são possíveis de ser obtida utilizando corantes naturais. A maioria dos corantes artificiais apresenta alta estabilidade durante o processamento dos alimentos, não degradando facilmente na presença de luz, oxigênio, calor e acidez. Além do custo de produção ser relativamente baixo quando comparados com os corantes naturais (SCHIOZER; BARATA, 2007).

No entanto, a utilização dos corantes artificias, para substituir ou intensificar os corantes naturais nos alimentos, tem sido questionada nos últimos anos (GOMES et al., 2013). A descoberta da relação entre algumas doenças e a toxicidade dos corantes, tem levando à proibição de algumas dessas substâncias. Essa limitação tem aumentado, significativamente, o interesse das indústrias pelos corantes naturais (CONCENÇO et al., 2015).

Os corantes naturais são pigmentos extraídos de fontes naturais renováveis, como folhas, flores e frutas, apresentando assim, baixa toxicidade e consequentemente menor risco à saúde dos consumidores (MORTENSEN, 2006). Além disso, alguns pigmentos podem apresentar substâncias com propriedades funcionais, que previnem ou até mesmo, auxiliam no tratamento de enfermidades, é caso, por exemplo, dos carotenoides e das antocianinas que possuem ação antioxidante (NIKKHAH et al., 2007; TOOR; SAVAGE, 2006).

Porém, os pigmentos naturais ao serem extraídos apresentam pouca estabilidade. Degradando-se facilmente ao entrar em contato com a luz ou variação de temperatura, o que ocasiona a perda das características funcionais e alteração da cor natural, elevando o custo de obtenção desses, consideravelmente (PRODANOV et al., 2005).

Sendo assim, a utilização de corantes naturais depende principalmente do dimensionamento do processo de extração e das condições de aplicação dos pigmentos, de forma a preservar a cor natural do alimento e evitar mudanças indesejáveis de cor durante o armazenamento. De acordo com Constant, Stringheta e Sandi (2002), quando extraídos e usados corretamente, os corantes naturais podem apresentar o mesmo poder de tingimento dos corantes sintéticos sendo possível atingir praticamente todas as tonalidades desejadas na indústria de alimentos.

Atualmente, existem algumas ferramentas que podem contribuir para a otimização das condições de obtenção e aplicação dos corantes naturais durante o processamento industrial (BOTELHO, 2014). Esse controle pode ser realizado com a determinação quantitativa das cores dos pigmentos naturais, através de sistemas colorimétricos (ALONSO-SALCES et al., 2005)

A colorimetria utiliza técnicas de medição instrumental de cor, que são geralmente rápidas e simples, usadas para obter valores quantitativos de cor, através do qual é possível demonstrar correlações entre parâmetros analisados (WENDT, 2006). Quando utilizado juntamente com ferramentas de análises estatísticas, é possível alcançar com maior precisão as condições das variáveis do processo que atinjam as expectativas sensoriais de cor dos alimentos, quando comparadas com produtos similares, porém coloridos artificialmente.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram estudadas diferentes condições para o processo de extração dos corantes naturais. Os extratos foram obtidos a partir de duas matrizes vegetais: espinafre e casca de limão bergamota. Os extratos foram comparados com produtos comerciais, através de sistemas colorimétricos. Com esta proposta, procurou-se distinguir aspectos relevantes dos processos de obtenção e utilização de aditivos que conferem cor aos alimentos.

No **capítulo 3** deste trabalho é apresentada uma revisão da literatura e de tópicos de interesse, que envolve as características dos corantes naturais e artificiais, bem como, a classificação de alguns tipos de grupos de corantes naturais. Por fim, são apresentados os principais fundamentos relacionados aos sistemas colorimétricos.

No **capítulo 4** apresenta-se uma descrição detalhada das substâncias empregadas, metodologias experimentais utilizadas e análises quantitativa e qualitativa para a avaliação dos processos utilizados.

No **capítulo 5** são apresentados os resultados obtidos durantes os ensaios experimentais, e também dados da análise estatística efetuada. Posteriormente, são apontadas observações pertinentes relatadas durante o estudo.

Por fim, no **capítulo 6** é apresentada a conclusão deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar diferentes condições de obtenção de pigmentos a partir de extratos de espinafre e casca de limão bergamota, utilizando como solvente: água, solução alcoólica e solução ácida.

2.2. Objetivos específicos

-Obter os extratos de espinafre e casca de limão bergamota usando como solvente: água, solução alcoólica e solução ácida

-Analisar a coloração dos extratos, através de medidas de cor utilizando o método CIELab e RGB

-Determinar as melhores condições de obtenção dos extratos, através de técnicas de planejamento experimental.

- Realizar o tratamento das imagens via *software Mathematic*a;

- Comparar os pigmentos obtidos com um produto comercial, através do Índice de Cor

- Determinar a coloração dos extratos, utilizando como padrão de cor os seguintes produtos industrializados: gelatina de limão como padrão de cor para os extratos de espinafre e bebida carbonatada (refrigerante) como padrão para os extratos de casca de limão;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Corantes

O uso de corantes naturais data da pré-história, quando eram usados para diferentes fins, desde decoração até mesmo para pintura corporal. Há evidências do uso de corantes entre os antigos egípcios, assim como na China e na Índia (LUCARINI et al., 2017). No Brasil, os corantes têm importante relação com a história, cujo nome do país é oriundo da madeira de Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*), importante fonte de corante vermelho no século XVI (ROSSI, 2008). Além do pau-brasil, que foi extraído de forma predatória, a morina, obtida de *Chlorophora tinctoria*, foi outro corante natural de grande interesse dos colonizadores (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Até o final do século XIX os corantes eram obtidos somente de fontes naturais. Extraídos de flores, sementes, frutos, cascas, madeiras e raízes de plantas, através de diferentes processos físico-químicos, cujo objetivo era a obtenção de uma substância solúvel no meio líquido onde era mergulhado o material a ser tingido, tornando estes produtos valiosos e de grande interesse (DIAS, 2010).

No entanto, o uso dos corantes naturais decresceu rapidamente, com o surgimento dos corantes sintéticos no final do século XVIII e início do século XIX, os quais apresentavam maior estabilidade quando expostos a variações de temperaturas, pH e luz (DIAS, 2010). Com o crescimento da indústria de corantes sintéticos, outros segmentos industriais, como as indústrias de alimentos, foram impulsionados com a possibilidade de acentuar ou modificar a cor dos produtos, inclusive na tentativa de mascarar alimentos de baixa qualidade (PRADO; GODOY, 2003).

3.2. Corantes Alimentícios

A aparência é uma variável fundamental no momento da aquisição de um produto alimentício. A visão é capaz de detectar fatores organolépticos, através da cor, inibindo ou estimulando o apetite (CORTEZ et al., 2017; GRANATO; MASSON, 2010). No entanto, alguns alimentos não apresentam coloração visivelmente atraente, ou são isentos de cor, sendo necessária, neste caso a incorporação de corantes alimentícios para atender as expectativas dos consumidores, que usualmente associam a cor ao sabor, cheiro ou qualidade do produto (SPENCE, 2015).

Os corantes alimentícios são definidos pela Resolução nº 44 de 1977 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como substâncias ou a mistura de substâncias

que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração dos alimentos. No entanto, para a adição de corantes aos alimentos devem ser consideradas razões tecnicamente válidas, como por exemplo, restaurar a cor perdida no processamento e preservar a identidade natural do produto, ou para servir como um indicador visual de qualidade (BRASIL, 1997).

Os corantes permitidos para uso em alimentos são classificados da seguinte forma:

1- Corante orgânico natural: obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
2- Corante orgânico sintético: obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.

2.1- Corante artificial: corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.

2.2- Corante orgânico sintético idêntico ao natural: corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.

3- Corante inorgânico: obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados para o emprego em alimento.
4- Caramelo: corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
5- Caramelo (processo amônia): corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200mg/kg (BRASIL, 1977).

3.3. Corantes Orgânicos Sintéticos

Em 1856, William Henry Perkin sintetizou o primeiro corante, conhecido como malva ou malveína. O cientista obteve o corante acidentalmente ao estudar a oxidação da fenilamina com dicromato de potássio, o qual chamou de Púrpura de Tiro e que, posteriormente, passou a ser denominado pelos franceses de Mauve. Em 1865, Friedrich Engelhorn fundou a BASF (Badische Anilin - & Soda- Fabrik A G) para produzir corantes derivados do alcatrão de hulha. A partir de então, o interesse das indústrias pelo uso de corantes artificiais aumentou, inclusive na tentativa de mascarar alimentos de baixa qualidade (TRAVIS, 2007).

Nas primeiras décadas do século XX já existiam em todo o mundo mais de 80 corantes sintéticos disponíveis para alimentos, entretanto, não existiam quaisquer regulamentações de uso ou grau de pureza. Ao constatar o uso descontrolado, alguns países passaram a regulamentar o uso de aditivos alimentares, incluindo os corantes. Assim, agências, tais como, a FAO (*Food and Agriculture Organization*), FDA (*Food and Drug*

Administration) e, no Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), passaram a estabelecer critérios e especificações para utilização dessas substâncias e as concentrações permitidas para uso alimentício (GARCIA et al., 2012).

No Brasil, em 1977, a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do Ministério da Saúde, passou a estabelecer as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade, dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas. Atualmente, no Brasil, pela legislação é permitido o uso de apenas 16 corantes artificiais, sendo eles: Amaranto, Eritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo Crepúsculo, Tartrazina, Indigotina, Azul Brilhante FCF, Azorrubina, Verde Rápido FCF, Azul Patente V, Marrom HT, Vermelho 2G, Amarelo de quinoleína, Negro brilhante BN e Litol rubina BK. Entre os corantes orgânicos sintéticos idênticos aos naturais são permitidos os seguintes: Beta-caroteno e Caramelo II, III e IV (BRASIL, 2015).

3.4. Corantes Orgânicos Naturais

Inicialmente, os corantes artificiais satisfaziam as necessidades das indústrias alimentícias. No entanto, nos últimos anos, estudos toxicológicos tem levado a legislação de diversos países a proibir o uso de inúmeros corantes artificiais (GOMES et al., 2013). Com isso, as indústrias alimentícias estão passando por expressiva substituição dos corantes sintéticos por corantes oriundos de fontes naturais, que apresentem menor risco à saúde dos consumidores (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

Ao contrário dos corantes artificiais, os pigmentos naturais têm sido utilizados para colorir alimentos, sem evidências de danos significativos à saúde dos consumidores. Sendo que os principais corantes naturais usados, como aditivos em alimentos, são oriundos de três categorias de pigmentos: carotenoides, clorofilas e flavonoides, os quais já foram citados por alguns autores como benéficos a diferentes funções do organismo humano (ROCHA; REED, 2014). Lanfer-marquez (2003) relatou atividade antioxidante e quimiopreventiva da clorofila, pigmento responsável pela coloração verde de plantas e algas.

Fimognari e Hrelia (2007) também evidenciam as antocianinas, pigmento responsável pela cor roxa ou azul dos alimentos, como sendo redutores de danos ao DNA e outras estruturas celulares, que poderiam desencadear processos inflamatórios e doenças como o câncer. Estudos experimentais e clínicos, também destacam as propriedades antioxidantes do licopeno na prevenção de alguns tipos de câncer, em especial ao câncer de próstata. O

licopeno é um carotenoide responsável pela cor avermelhada encontrada em alguns vegetais como, por exemplo, o tomate (KIOKIAS; PROESTOS; VARZAKAS, 2016)

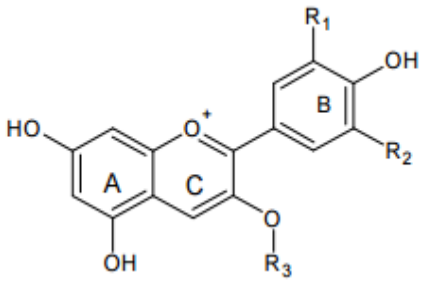
De acordo com Constant, Stringheta e Sandi (2002), além de conter benefícios á saúde e propriedades funcionais, os corantes naturais podem apresentar o mesmo poder de tingimento dos corantes sintéticos, quando extraídos corretamente. O autor também ressalta que alguns pigmentos, como as antocianinas e os carotenoides são facilmente encontrados no reino vegetal, assim como as clorofilas, que também são encontrados com abundância (STREIT et al., 2005).

3.4.1. Flavonoides

As antocianinas são pigmentos que compõe a classe de compostos conhecidos como flavonóides. As antocianinas são encontradas amplamente distribuídas na natureza, sendo responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e tonalidades de vermelho de muitas espécies do reino vegetal, principalmente em flores, frutos e folhas (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

A presença das antocianinas nas plantas, segundo López, Jiménez e Vargas (2000) é responsável pelo desempenho de funções como: antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. A cor intensa das antocianinas tem importante função nos mecanismos reprodutores das plantas, tais como a polinização e dispersão de sementes (LOPES et al., 2007). As antocianinas possuem estrutura química com 15 átomos de carbono divididos em classes, dependendo do estado de oxidação, como mostra a Figura 1 (JOSHI; GOYAL, 2011).

Figura 1. Estrutura química das antocianinas



Fonte: JOSHI; GOYAL, 2011

A estrutura química das antocianinas podem adotar diferentes configurações em meio aquoso e dependendo do grau de acidez ou alcalinidade, porém, todas as estruturas irão

apresentar absorção característica na região do espectro visível (GONNET, 2001). Além do pH, as antocianinas são rapidamente destruídas pelo aquecimento e estocagem , assim como, a presença de oxigênio pode causar a degradação por oxidação (MALACRIDA; MOTTA, 2005; NIKKHAH et al., 2007).

Além disso, em meio aquoso as antocianinas formam complexos com outros compostos tais como proteínas, ácidos orgânicos, ácidos nucléicos, alcalóides, polissacarídeos e íons metálicos, produzindo um aumento na intensidade da cor e deslocamento no comprimento máximo de absorção (CORTEZ et al., 2017).

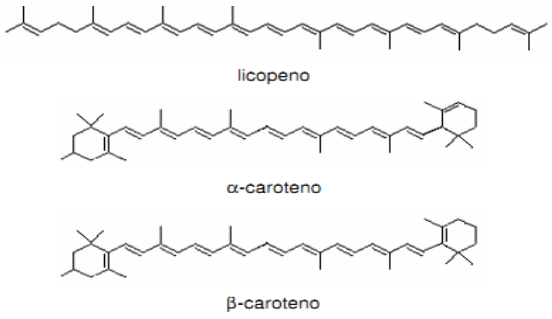
3.4.2. Carotenoides

Os carotenoides representam um grande grupo de pigmentos lipossolúveis presentes na natureza, englobando mais de 500 pigmentos naturais já identificados. São encontrados em organismos fotossintetizantes, não fotossintetizantes, algas, fungos, bactérias e em alguns animais (MORTENSEN, 2006). Nas plantas, os carotenoides são responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho, onde desempenham função no mecanismo fotossintético e na proteção contra o dano causado por exposição à luz (UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007).

Os carotenoides apresentam uma estrutura básica com 40 carbonos formados por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados linearmente. Esta estrutura pode ser modificada por diferentes rotas, como por exemplo, reações de hidrogenação, isomerização e oxidação (KIOKIAS; PROESTOS; VARZAKAS, 2016).

A estrutura química dos carotenoides quando formada por carbono e hidrogênio é altamente apolar, como por exemplo, b-caroteno e o licopeno. Porém, as xantofilas são carotenoides polares como a luteína e zeaxantina, que apresentam, além de carbono e hidrogênio, oxigênio na estrutura (UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007). As estruturas dos carotenoides mais comuns são mostradas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura dos principais carotenoides presentes em alimentos.



Fonte: KIOKIAS; PROESTOS; VARZAKAS, 2016

Devido à presença do grande número de ligações duplas conjugadas, os carotenoides oxidam com muita facilidade na presença de luz, calor, metais e enzimas provocando a degradação da cor. No ambiente natural, os carotenoides são relativamente estáveis, mas tornam-se sensíveis à luz e temperatura, sendo facilmente decompostos após trituração do vegetal e extração com solventes (DUTTA; CHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2005)**.** Desse modo, os carotenoides devem preferencialmente, ser extraídos de tecidos frescos e não danificados (MORTENSEN, 2006).

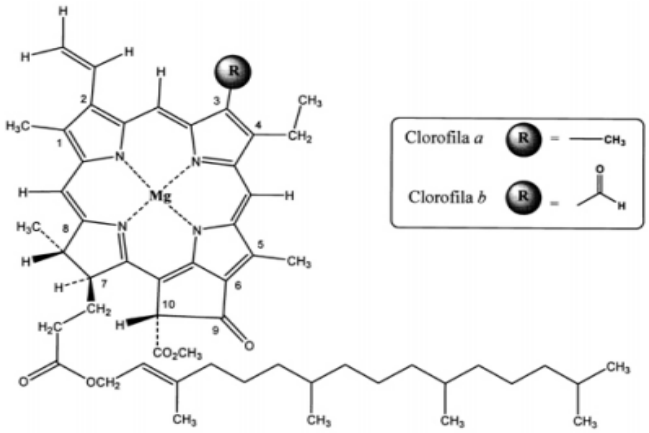
3.4.3. Clorofila

A clorofila é um pigmento natural verde presente nas plantas, mais especificamente, nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais, fazendo parte do processo de fotossíntese das plantas (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009). O nome clorofila foi proposto por Pelletier e Caventou, em 1818, para designar a substância verde extraída das folhas com o auxílio do álcool (STREIT et al., 2005).

Quimicamente, a clorofila não é uma molécula isolada, mas compreende uma família de substâncias semelhantes entre si, designadas de clorofila *a*, *b, c* e *d*. As clorofilas *a* e *b* são encontradas quase sempre em conjunto, sendo a clorofila *a* mais abundante na maioria dos casos, correspondendo a, aproximadamente, 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais, enquanto que as clorofilas *c* e *d* estão presentes principalmente em algas e cianobactérias (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio (Figura 3). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol numerados de l a 4 ou de *a* a *d* (SCHOEFS, 2002).

Figura 3. Estrutura química da clorofila *a* e *b*.



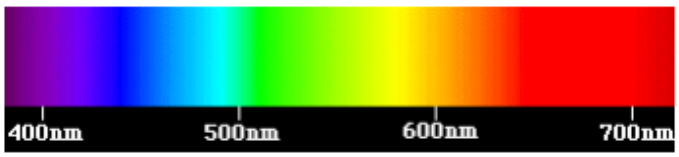
Fonte: (STREIT et al., 2005)

Em geral, a estrutura química das clorofilas são quimicamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e a degradação química. Essa caraterística faz com que os pigmentos verdes sejam alterados ou destruídos, facilmente, modificando a percepção da cor (SCHOEFS, 2002).

3.5. Colorimetria

Colorimetria é parte da ciência das cores que tem como propósito especificar numericamente a cor de um determinado estímulo visual, de acordo com padrões normatizados. A cor é resultado de um conjunto de comprimento de ondas, associada ao visível, em um pequeno intervalo do espectro de radiação eletromagnética, com comprimentos de onda de 380 a 780 nanômetros, Figura 4 (WENDT, 2006).

Figura 4. Espectro dos comprimentos de onda da luz visível.



Fonte: SOUTO, 2003

A cor é resultante de uma mistura de três atributos: tonalidade (que depende do comprimento de onda), intensidade luminosa e saturação, todos relacionados com a luz que está incidindo sobre o objeto (MINOLTA, 1991). Os comprimentos de onda na porção visível do espectro eletromagnético não absorvido pelo objeto são refletidos e estes são captados pelo

olho humano (MALHEIROS, 2007). Cada cor representa um conjunto de respostas diferentes dos detectores presentes no olho, chamados de cones. O olho humano possui três cones diferentes, com respostas espectrais distintas. Cada tipo de cone tem o máximo de sensibilidade num comprimento de onda diferente. A combinação das respostas dos três cones representa a cor final que o cérebro codifica (FAIRCHILD, 2005).

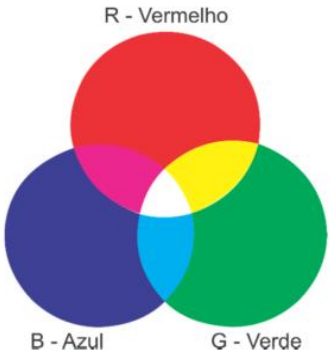
No entanto, o olho humano é capaz de perceber somente os estímulos das três cores primárias: vermelho, verde e azul. Sendo as demais cores formadas pela combinação de vários comprimentos de onda, separados da fonte de luz em várias intensidades (FAIRCHILD, 2005). Essa constatação levou ao desenvolvimento de sistemas de cor, como RGB (*Red, Green* e *Blue*), que parte do princípio que é possível obter qualquer cor com a mistura de diferentes percentuais das três cores primárias. Em 1931 a Comissão Internacional de Iluminação (*Commission Internationale de l'Eclairage* - CIE) definiu uma fonte de luz que permanecesse relativamente estável para avaliação de um objeto, que se ajustassem ao olho humano, desenvolvendo assim um observador padrão, conhecido como sistema CIE (SOUTO, 2003).

3.5.1. Sistema de Cor RGB

O sistema RGB (*Red, Green* e *Blue*) é um sistema de cores aditivo, que utiliza a combinação das cores Vermelho (*Red*, em inglês), Verde (*Green*, em inglês) e Azul (*Blue*, em inglês) (VANRELL et al., 2004). A soma de duas cores deste sistema resulta nas cores ciano (verde + azul), magenta (vermelho + azul) e amarelo (vermelho + verde), denominadas cores subtrativas (SOUTO, 2003).

Na Figura 5 são apresentados três círculos, com as cores primárias aditivas, que se interceptam entre si formando as cores subtrativas, resultantes da soma de duas cores primárias. A cor branca, na parte central, é formada pela soma das três cores primárias (NISHAD; MANICKA CHEZIAN, 2013).

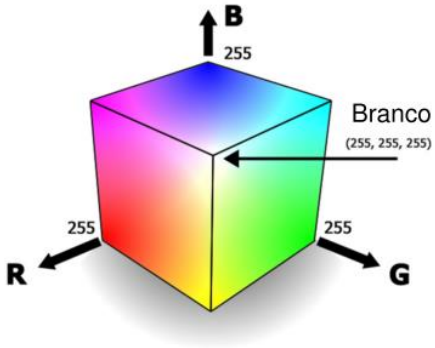
Figura 5. Representação das cores do sistema aditivo.



Fonte: NISHAD; MANICKA CHEZIAN, 2013

Cada componente de cor representa um eixo ortogonal em um espaço euclidiano tridimensional, como mostra Figura 6. A intensidade de cada cor no sistema RGB é medida em canais (256 para cada cor). O canal 0 significa completa ausência de uma cor, enquanto o canal 255 representa essa mesma cor intensidade máxima. A combinação dos canais do sistema RGB fornecem 256^3 possíveis tonalidades de cores (BOTELHO, 2014).

Figura 6. Formação de tons no sistema RGB.



Fonte: BOTELHO, 2014

3.5.2. Sistema de Cores CIELab

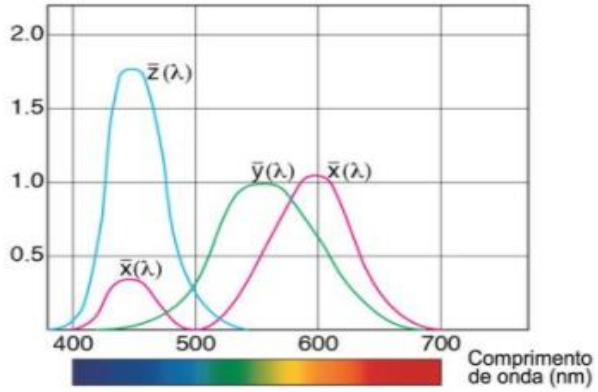
Em 1976, com a intenção de estabelecer um padrão, a CIE recomendou a utilização da escala de cor CIE L*a*b*, ou CIELab (COQUE; TOURAUD; THOMAS, 2002).

A escala de cor CIELab representa a sensibilidade humana para a cor, podendo ser usada em qualquer objeto cuja cor pode ser medida (PÉREZ-MAGARIÑO; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2003). A Figura 7 mostra as curvas de resposta espectral do olho humano. Essas curvas são conhecidas como funções de percepção da cor, sendo x(λ) tem resposta na região de comprimentos de onda vermelhos, y (λ) tem resposta na região de comprimentos de onda

verdes, e z (λ) tem resposta na região de comprimentos de onda azuis. As cores visíveis ao olho humano são o resultado de diferentes proporções de estímulos x (λ), y (λ), e z (λ) recebidos de um objeto (MINOLTA, 1991).

O sistema CIELab utiliza uma escala de cor uniforme e linear, com distâncias iguais entre dois pontos, correspondem a diferenças igualmente percebidas pelo olho humano (MINOLTA, 1991).

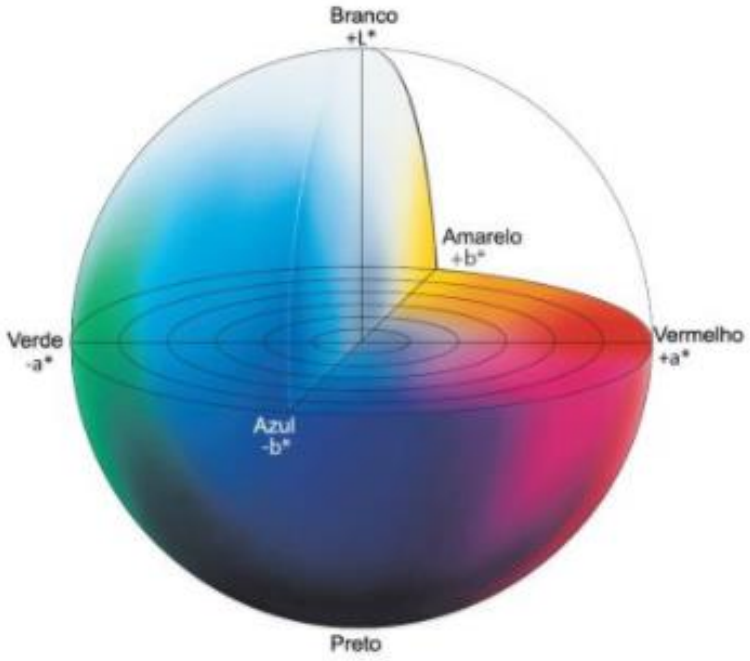
Figura 7. Resposta espectral correspondente ao olho humano.



Fonte: MINOLTA, 2017

O sistema de cores é baseado em três elementos: a luminosidade ou claridade, a tonalidade ou matiz e a saturação ou cromaticidade (SOUTO, 2003). O espaço de cores é organizado em coordenadas cartesianas, Figura 8. O eixo L* vai do topo à base, sendo que o valor máximo de L* é 100 (branco) e o mínimo é zero, o qual representa o preto. Os eixos a* e b* não tem limites numéricos específicos, de forma que o vermelho é representado por +a e o verde por –a; o amarelo como +b e o azul –b. (MINOLTA, 1991). Sendo que, a partir destas coordenadas é possível quantificar matematicamente a cor em um único valor numérico, através do Índice de cor (IC) (MOTTA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2015)

Figura 8. Diagrama representando o espaço de cores CIELab.



Fonte: (MINOLTA, 2017)

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de simulação e desenvolvimento de processos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), no Campus localizado na cidade de Santo Antônio da Patrulha, RS. Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório da universidade, durante o período de Agosto a Dezembro de 2017. O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas: 1) obtenção dos extratos de vegetais; 2) análise de cor nos sistemas CIELab e RGB; 3) tratamento dos dados através de análise estatística e 4) determinação das condições de extração e aplicação dos extratos vegetais em alimentos industrializados. As etapas citadas são descritas a seguir.

4.1. Obtenção dos extratos de vegetais

Para obtenção dos extratos foram utilizadas duas matrizes vegetais: casca de limão bergamota e espinafre, as quais foram adquiridas no comércio local da cidade de Santo Antônio da patrulha. Inicialmente, as amostras foram submetidas a uma etapa de limpeza em água corrente, para remoção das sujidades presentes. A seguir as Cascas de Limão foram secas em estufa por 24 horas. Posteriormente, as amostras passaram por redução de tamanho, com auxílio de Almofariz (Gral) e Pistilo. As amostras de espinafre foram padronizadas com auxílio de uma faca comum para obter amostras com, aproximadamente, 0,5 cm^2.

Para a extração dos pigmentos, foram usados três métodos diferentes: aquecimento em água destilada, meio alcoólico e meio ácido. As condições de extração, como temperatura, tempo e concentração, foram definidas e estudas de acordo com cada método, através de técnicas de planejamento experimental.

O planejamento experimental, é uma ferramenta utilizada em processos envolvendo análise, aprimoramento ou otimização de operações. O uso desta ferramenta permite estudar os efeitos entre um conjunto de variáveis envolvidas no processo, utilizando um reduzido número de ensaios experimentais. No planejamento experimental é avaliada a influência de cada variável no experimento, testando as diferentes combinações possíveis entre os fatores, permitindo, não somente analisar os efeitos dos fatores principais, mas também a interação entre os mesmos (FERNANDES et al., 2016).

4.1.1. Extração dos pigmentos com água destilada

As amostras padronizadas de espinafre e casca de limão bergamota foram colocadas em frasco de Erlenmeyer, juntamente com 100 mL de água destilada. Os frascos foram dispostos em Banho–Maria para determinação da influência das seguintes variáveis de processo: A) tempo, B) temperatura e C) massa de vegetais. As variáveis foram analisadas quanto a influência no Índice de Cor dos extratos em relação a uma amostra padrão. Os fatores analisados e os índices estatísticos codificados correspondentes são apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 mostra a matriz do planejamento fatorial completo 2^3, usada nos ensaios experimentais.

Tabela 1: Fatores e níveis codificados usados para obtenção dos extratos com água destilada.

Fatores	**Níveis codificados (-1)**	**Níveis codificados (0)**	**Níveis codificados (+1)**
Tempo (min)	20	40	60
Temperatura (°C)	60	70	80
***Massa (g)/Concentração (%m/v)**	5	10	15

*Valores iguais para massa e concentração mássica

Tabela 2: Matriz do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^3 com triplicata no ponto central**.**

Ensaios	**Tempo (min)**	**Temperatura (°C)**	**Massa (g)**
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

4.1.2. Extração de pigmentos em meio alcoólico

As amostras padronizadas de Espinafre e Casca de Limão Bergamota foram, colocadas em frasco de Erlenmeyer, juntamente com 100 mL de solução contendo etanol. Os frascos foram dispostos em Banho –Maria para determinação da influência das seguintes variáveis de processo: A) tempo, B) temperatura, C) massa de vegetais e D) concentração alcoólica. Os fatores analisados e os índices estatísticos codificados correspondentes são apresentados na Tabela 3. A Tabela 4 mostra a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}_{IV}, usada nos ensaios experimentais.

Tabela 3: Fatores e níveis codificados para obtenção de extratos com solução alcoólica.

Fatores	**Níveis codificados (-1)**	**Níveis codificados (0)**	**Níveis codificados (+1)**
Tempo (min)	20	40	60
Temperatura (°C)	30	45	60
***Massa (g)/Concentração (%m/v)**	5	10	15
Concentração alcoólica (%)	20	40	60

*Valores iguais para massa e concentração mássica

Tabela 4: Matriz do Planejamento Experimental Fatorial Fracionário 2^{4-1}_{IV} com triplicata no ponto central.

Ensaios	**Tempo (min)**	**Temperatura (°C)**	**Massa (g)**	**Conc. (%)**
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

4.1.3. Extração de pigmentos em meio ácido

As amostras padronizadas de espinafre e casca de limão bergamota foram, colocadas em frasco de Erlenmeyer, juntamente com 100 mL de solução contendo Ácido Cítrico. Os frascos foram dispostos em Banho –Maria para determinação da influência das seguintes variáveis de processo: A) tempo, B) temperatura, C) massa de vegetais e D) concentração de ácido. Os fatores analisados e os índices estatísticos codificados correspondentes são apresentados na Tabela 5. A matriz do planejamento fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1}, usada nos ensaios experimentais é apresentada na Tabela 4.

Tabela 5: Fatores e níveis codificados estudados para obtenção de extratos com solução ácida.

Fatores	**Níveis codificados (-1)**	**Níveis codificados (0)**	**Níveis codificados (+1)**
Tempo (min)	20	40	60
Temperatura (°C)	60	70	80
***Massa (g)/Concentração (%m/v)**	5	10	15
Concentração de ácido cítrico(%)	2	6	10

4.2. Análise de cor através de técnicas colorimétricas

Para a determinação colorimétrica dos extratos, as soluções contendo pigmentos foram colocadas em placa de Petri sobre uma folha branca, e com auxílio de uma câmera fotográfica SONY Cybershot de 14 Megapixels foi capturada as imagens dos extratos, individualmente, no mesmo local e na mesma altura para todas as amostras. As imagens foram padronizadas em tamanhos iguais e analisadas pelo *software Mathematica* v.5.1® (QUADRI, 2005) . O *software* determina a cor das imagens por meio dos sistemas de cores CIELab e RGB. O sistema CIELab localiza a cor em um espaço tridimensional, usando as coordenadas L*, a* e b*: L* (luminosidade (claro/escuro)); a* (cromaticidade no eixo da cor verde (-) para vermelha (+)); b* (cromaticidade no eixo da cor azul (-) para amarela (+)) (SANTOS et al., 2013). As equações utilizadas para obter o espaço de cor CIELab são apresentadas nas Equações 4.1, 4.2 e 4.3.

$$L^{*}=116\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{\frac{1}{3}}-16 \quad (4.1)$$

$$a^{*}=500\left[f\left(\frac{X}{X_n}\right)-f\left(\frac{Y}{Y_n}\right)\right] \quad (4.2)$$

$$b^{*}=200\left[f\left(\frac{Y}{Y_n}\right)-f\left(\frac{Z}{Z_n}\right)\right] \quad (4.3)$$

Em que: X, Y e Z são valores obtidos da combinação dos efeitos de luz, objeto e observador. E Xn, Yn e Zn são valores de referência padrão (BELTRAME, 2006).

Através das coordenadas do sistema CIELab o *software Mathematica* v.5.1® fornece também o Índice de Cor (IC) da imagem, obtido pela Equação 4.4 proposta por (CAMELO; GÓMEZ, 2004).

$$IC=\frac{2000a^{*}}{L\sqrt{(a^{*})^{2}+(b^{*})^{2}}} \quad (4.4)$$

4.3. Tratamento dos dados através de análise estatística

Os resultados experimentais obtidos, nos sistemas de cores, foram analisados estatisticamente, através do software *Statistica* 8.0, a fim de, estimar os efeitos das variáveis envolvidas no processo de extração dos pigmentos, e assim, determinar as condições otimizadas de operação.

Por meio dos resultados da matriz experimental usada, durante a extração dos pigmentos foi possível obter um modelo estatístico empírico, para ser utilizado na previsão dos valores da variável resposta. Box et al. (2005) e Fernandes et al. (2016) consideraram uma variável aleatória y, para explicar este modelo, que se distribui em torno de uma média populacional $\eta(x_1,x_2)$, com uma variância populacional $\sigma_2(x_1,x_2)$, (Equação 4.5), ou seja:

$$y(x_1, x_2) = \eta(x_1, x_2) + \varepsilon(x_1, x_2) \quad (4.5)$$

Em que ε é o desvio aleatório (resíduos) com que as observações flutuam em torno da média.

Para esse teste estatístico será utilizada a metodologia descrita por Box et al. (2005), supondo que os desvios variam segundo uma distribuição normal. No planejamento fatorial

utilizado a média populacional $\eta\ (x_1,x_2)$ pode ser representada por uma combinação linear das variáveis x_1 e x_2, Equação 4.6.

$$\eta\ (x_1, x_2) = \beta_0 + \beta_1\ x_1 + \beta_2\ x_2 \tag{4.6}$$

Ou por meio da Equação 4.7.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \varepsilon \tag{4.7}$$

Sendo, β_0 o valor da média global das respostas e β_1 e β_2 representam os valores populacionais dos efeitos lineares dos efeitos principais, por unidade de x_1 e x_2.

A escolha do modelo empírico a ser utilizado para a resposta será realizada com base na análise de variância (ANOVA) e no coeficiente de determinação (R^2), de cada modelo obtido. As Somas Quadráticas (SQ) necessárias para realizar a análise de variância são dadas nas Equações 4.8 a 4.11, (MONTGOMERY, 2012).

$$SQ_A = \frac{1}{bn}\sum_{i=1}^{a} y_{itt}^2 - \frac{y_{ttt}^2}{abn} \tag{4.8}$$

$$SQ_B = \frac{1}{an}\sum_{j=1}^{b} y_{tjt}^2 - \frac{y_{ttt}^2}{abn} \tag{4.9}$$

$$SQ_{AB} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} y_{itt}^2 - \frac{y_{ttt}^2}{abn} - SQ_A - SQ_B \tag{4.10}$$

$$SQ_E = SQ_T - SQ \tag{4.11}$$

Em que:

SQ_A, SQ_B = soma quadrática dos fatores A e B, respectivamente;

a, b = níveis;

n = número de repetições (réplicas);

SQ_{AB} = soma quadrática da interação entre os fatores A e B;

SQ_T = soma quadrática total;

SQ_E = soma quadrática do erro (desvios);
SQ = soma quadrática dos tratamentos;
y = variável resposta.

A localização dos níveis de x_1, x_2,..., x_k, que maximizam a resposta estimada (predita) representa um conjunto de x_1, x_2,..., x_k, para o qual, as derivadas parciais são iguais a zero, Equação 4.12.

$$\partial y/dx_1 = \partial y/dx_2 = ... = \partial y/dx_k = 0 \qquad (4.12)$$

4.4. Comparação dos extratos vegetais obtidos com produtos alimentícios

Foram escolhidas duas amostras de produtos alimentícios comerciais para serem usadas como imagens padrão: Gelatina de Limão e bebida carbonatada (refrigerante). Assim como, para as amostras de extratos, os produtos alimentícios foram fotografados em placas de Petri. Através das imagens foram determinadas as coordenadas nos sistemas de cores CIELab e RGB. Com estes dados foi possível comparar os extratos naturais dos vegetais com os corantes presentes nas amostras de gelatina e refrigerante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos durante a extração de pigmentos de duas matrizes vegetais: Espinafre e Casca de Limão Bergamota. Durante o desenvolvimento deste trabalho foi determinada a coloração dos pigmentos, presentes nos extratos naturais, através do sistema de cor CIELab e RGB. Posteriormente, os resultados foram analisados estatisticamente e discutidos de modo crítico, a fim de obter parâmetros otimizados nos processos de extração estudados.

5.1. Extração dos pigmentos de espinafre com água destilada

A extração dos pigmentos do espinafre com água foi realizada de acordo com a matriz do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^3. Após o processo de extração, foram obtidas as imagens dos pigmentos em solução, para serem analisadas individualmente pelo *software Mathematica* v.5.1®. O *software* determina os valores das coordenadas de cores RGB e CIELab, além de quantificar o Índice de Cor (IC) da amostra. Na Tabela 6 são apresentadas as coordenadas dos sistemas de cor CIELab e os valores do Índice de Cor (IC), para as imagens de cada ensaio, juntamente com as coordenadas da amostra de gelatina de limão, que será utilizada como padrão para comparação.

Tabela 6. Coordenadas de cor no sistema CIELab para os extratos de espinafre com água destilada.

Amostras	R	G	B	L*	a*	b*	IC	Cor
1	**0,552**	**0,557**	**0,482**	**58,468**	**-4,077**	**10,041**	**12,868**	
2	0,565	0,500	0,431	54,477	3,343	11,898	9,932	
3	0,555	0,546	0,396	57,293	-5,566	20,835	9,010	
4	0,637	0,598	0,426	62,910	-3,242	24,518	4,167	
5	0,579	0,514	0,394	55,602	1,357	18,967	2,567	
6	0,563	0,523	0,304	55,407	-4,385	31,382	4,995	
7	0,575	0,581	0,342	60,004	-10,014	31,941	9,972	
8	0,490	0,455	0,149	48,286	-6,436	42,602	6,187	
9	0,589	0,599	0,472	62,147	-6,594	16,706	11,815	
10	0,544	0,527	0,378	55,622	-4,797	21,119	7,964	
11	0,629	0,608	0,455	63,588	-4,515	21,203	6,550	
Gelatina de Limão	**0,442**	**0,517**	**0,00247**	**51,812**	**-21,958**	**55,963**	**14,099**	

Na Tabela 6 é possível observar que as coordenadas determinadas no *software Mathematica* v.5.1®, para o sistema de cor RGB, apresenta pouca variabilidade entre os ensaios, principalmente no que diz respeito a variável G (verde), 0,5079±0,0514, que está relacionada à coloração do pigmento desejado nos extratos de espinafre. Assim sendo, o Índice de Cor foi escolhido como a variável resposta para análise estatística, pois o sistema de cor CIELab não permite análise individual das coordenadas. O mesmo critério de escolha do índice de cor foi utilizado na análise das demais extrações realizadas neste estudo.

O Índice de Cor determinado para cada ensaio é apresentado na Tabela 7, juntamente com a Matriz do Planejamento Experimental usada.

Tabela 7. Matriz do Planejamento Experimental Completo 2^3, com triplicata no ponto central e Índice de Cor correspondente a extração de corante de espinafre com água destilada.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Massa (g)	IC
1	-1 (20)	-1 (60)	-1(5)	12,868
2	1 (60)	-1 (60)	-1(5)	9,932
3	-1 (20)	1 (80)	-1(5)	9,010
4	1 (60)	1 (80)	-1(5)	4,167
5	-1 (20)	-1 (60)	1(15)	2,567
6	1 (60)	-1 (60)	1(15)	4,995
7	-1 (20)	1 (80)	1(15)	9,972
8	1 (60)	1 (80)	1(15)	6,187
9	0 (40)	0 (70)	0(10)	11,815
10	0 (40)	0 (70)	0(10)	7,964
11	0 (40)	0 (70)	0(10)	6,550

Através dos resultados obtidos na Tabela 7 foi realizada a análise estatística dos efeitos das três varáveis independentes estudadas, sobre a resposta Índice de Cor (IC). A partir dos índices estatísticos obtidos foi realizada a escolha do modelo a ser utilizado, através da análise de variância (ANOVA), e do coeficiente de determinação (R^2), encontrado para cada modelo. Os valores de F calculado e tabelado correspondente a cada modelo são apresentados no Quadro 1 , juntamente com os respectivos coeficientes de determinação R^2 .

Quadro 1. Comparação entre modelos empíricos em relação a resposta Índice de Cor.

Modelo	R^2	Regressão/Resíduos		Falta de Ajuste/Erro Puro	
Linear sem interações	0,278	F_1	0,273	F_1	1,642
		F_2	4,35	F_2	19,3
Linear com interações de segunda ordem	0,800	F_1	5,896	F_1	0,409
		F_2	6,16	F_2	19,00
Linear com interações de terceira ordem	0,823	F_1	4,169	F_1	0,507
		F_2	8,89	F_2	18,51

F_1(Calculado) e F_2(distribuição de probabilidade de Fisher)

Através do Quadro 1 pode-se observar que o melhor modelo a ser utilizado, para a resposta Índice de Cor, é o modelo com interações de segunda ordem. A escolha deste modelo justifica-se por apresentar melhor relação entre o F calculado, para a Falta de Ajuste em relação ao Erro Puro (0,409), sendo este menor que o valor da distribuição de F tabelado (19,00). Com a escolha do modelo empírico realizou-se a análise dos efeitos em relação à resposta Índice de Cor, o qual é apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

		Desvio		Limites de confiança	
Fatores	**Efeito**	**Padrão**	**Valor de p**	**-95%**	**+95%**
Média/Interações	7,820	0,821	0,0109	4,285	11,355
(**A**) Tempo	-2,284	1,927	0,357	-10,574	6,006
(**B**) Temperatura	-0,256	1,927	0,906	-8,546	8,033
(**C**) Massa	-3,064	1,927	0,253	-11,354	5,226
(**A**) x (**B**)	-2,030	1,927	0,403	-10,320	6,260
(**A**) x (**C**)	1,605	1,927	0,492	-6,685	9,895
(**B**) x (**C**)	4,555	1,927	0,141	-3,735	12,845

Analisando a Tabela 8, observa-se que as variáveis estudadas, com exceção da média, não apresentaram significância dentro do intervalo de confiança utilizado de 95%. Porém, todas as variáveis foram usadas para obter a Equação 5.1, que descreve o modelo empírico para a variável resposta, Índice de Cor.

$$\mathbf{IC} = 7{,}820 - 1{,}142 - 0{,}128\mathbf{B} - 1{,}532\mathbf{C} - 1{,}015\mathbf{AB} + 0{,}802\mathbf{AC} + 2{,}277\mathbf{BC} \quad (5.1)$$

em que:

IC = Índice de Cor

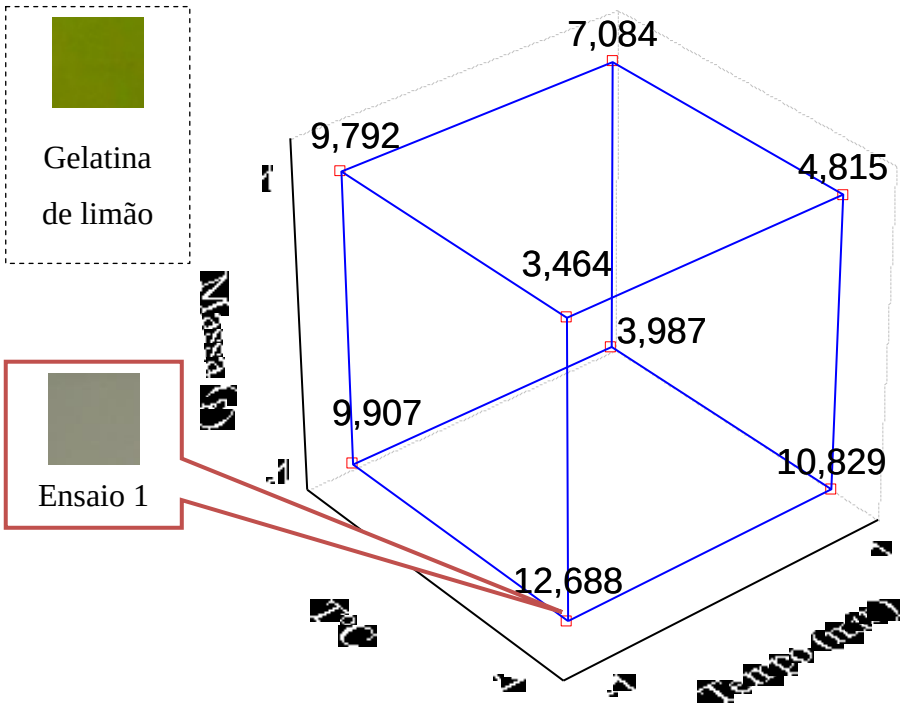
A = Tempo (min)

B = Temperatura (°C)

C = Massa (g)

As variáveis independentes estudadas, **A, B** e **C** foram usadas para gerar o Cubo de Resposta em relação ao Índice de Cor, para o modelo escolhido, Figura 9.

Figura 9. Cubo de Resposta para os fatores codificados Massa, Temperatura e Tempo em relação à resposta IC.



Analisando o cubo de resposta, Figura 9, verifica-se que a amostra que melhor representa o IC da gelatina de limão é que possui os níveis codificados -1 em ambos os eixos. Este ponto corresponde ao Ensaio 1, no qual foram usados menores valores de massa, temperatura e tempo de extração. Porém, para o sistema de cor CIELab, somente o valor de L aproxima-se do valor obtido para a amostra padrão.

5.2. Extração dos pigmentos de espinafre em solução alcoólica

A extração dos pigmentos do espinafre em solução alcoólica foi realizada de acordo com a matriz do planejamento experimental fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1}. Após o processo de extração, foram obtidas as imagens dos pigmentos em solução, para serem analisadas individualmente pelo *software Mathematica* v.5.1®. O *software* determina os valores das coordenadas de cores RGB e CIELab, além de quantificar o Índice de Cor (IC) da amostra. Na Tabela 9, são apresentadas as coordenadas dos sistemas RGB (*Red, Green e Blue*) e CIELab para os ensaios

do planejamento, juntamente com as coordenadas de cor para a gelatina de limão que será usada como padrão para comparação.

Tabela 9. Coordenadas de cores em RGB e CIELab para os extratos de espinafre em meio alcoólico.

Amostras	R	G	B	L*	a*	b*	IC	Cor
1	0,552	0,500	0,447	54,218	2,743	9,118	10,626	
2	**0,536**	**0,579**	**0,316**	**58,937**	**-14,686**	**34,043**	**13,443**	
3	**0,490**	**0,553**	**0,003**	**55,480**	**-21,024**	**59,090**	**12,084**	
4	0,547	0,504	0,350	53,850	-1,975	22,794	3,207	
5	0,470	0,517	0,102	52,452	-17,956	51,042	12,653	
6	0,583	0,528	0,413	56,742	0,489	17,701	0,973	
7	0,516	0,502	0,327	52,914	-5,923	24,789	8,784	
8	**0,360**	**0,380**	**0,002**	**39,241**	**-13,074**	**45,777**	**13,997**	
9	0,492	0,481	0,171	50,721	-9.505	42,181	8,734	
10	0,501	0,496	0,215	51,721	-9,837	38,490	9,575	
11	0,552	0,547	0,264	56,731	-9,967	38,297	8,879	
Gelatina de Limão	**0,442**	**0,517**	**0,00247**	**51,812**	**-21,958**	**55,963**	**14,099**	

O Índice de Cor determinado para cada ensaio é apresentado na Tabela 10, juntamente com a Matriz do Planejamento Experimental usada.

Tabela 10. Matriz do Planejamento Experimental Fracionário 2^{4-1}_{IV}, com triplicata no ponto central e Índice de Cor correspondente a extração de corante de espinafre em meio alcoólico.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Massa (g)	Conc. alcoólica (%)	IC
1	-1 (20)	-1 (30)	-1 (5)	-1 (20)	10,626
2	1 (60)	-1 (30)	-1 (5)	1 (60)	13,443
3	-1 (20)	1 (60)	-1 (5)	1 (60)	12,084
4	1 (60)	1 (60)	-1 (5)	-1 (20)	3,207
5	-1 (20)	-1 (30)	1 (15)	1 (60)	12,653
6	1 (60)	-1 (30)	1 (15)	-1 (20)	0,973
7	-1 (20)	1 (60)	1 (15)	-1 (20)	8,784
8	1 (60)	1 (60)	1 (15)	1 (60)	13,997
9	0 (40)	0 (45)	0 (10)	0 (40)	8,734
10	0 (40)	0 (45)	0 (10)	0 (40)	9,575
11	0 (40)	0 (45)	0 (10)	0 (40)	8,879

Através dos resultados, obtidos na Tabela 10, foi realizada a análise estatística dos efeitos das quatro varáveis independentes estudadas (tempo, temperatura, massa e concentração alcoólica), sobre a resposta Índice de Cor (IC). A partir dos índices estatísticos obtidos, foi determinado o modelo matemático empírico a ser utilizado. A escolha foi modelo foi feita através da análise de variância (ANOVA) e do coeficiente de determinação (R^2). Os valores de F (distribuição de probabilidade de Fisher) calculado e tabelado correspondente a cada modelo são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Comparação entre modelos empíricos em relação à resposta Índice de Cor.

Modelo	R^2	Regressão/Resíduos		Falta de Ajuste/Erro Puro	
Linear sem interações	0,735	F_1	8,390	F_1	54,420
		F_2	4,530	F_2	19,250
Linear com interações de segunda ordem	0,995	F_1	18089,40	F_1	1,790
		F_2	8,880	F_2	18,500
Linear com interações de terceira ordem	0,995	F_1	18089,40	F_1	1,790
		F_2	8,880	F_2	18,500

F_1(Calculado) e F_2(distribuição de probabilidade de Fisher)

Através do Quadro 2 pode-se observar, que o melhor modelo a ser utilizado, para a resposta Índice de Cor, é o modelo com interações de segunda ordem. A escolha deste modelo justifica-se por apresentar melhor relação entre o F calculado, para a regressão em relação aos resíduos (18089,40), sendo este expressivamente maior que o valor da distribuição de F tabelado (8,880). Com a escolha do modelo empírico realizou-se a análise dos efeitos em relação à varável resposta, Índice de Cor, o qual é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos para extração em meio alcoólico**.**

		Desvio		Limites de confiança	
Fatores	**Efeito**	**Padrão**	**Valor de p**	**-95%**	**+95%**
Média/Interações	9,359	0,135	0,0002	8,777	9,943
(**A**) Tempo	-3,132	0,317	0,0101	-4,499	-1,765
(**B**) Temperatura	0,0939	0,317	0,795	-1,273	1,461
(**C**) Massa	-0,738	0,317	0,146	-2,105	0,629
(**D**) Conc. álcool	7,146	0,317	0,0019	5,779	8,513
(**A**) x (**B**)	1,299	0,317	0,0548	-0,067	2,667
(**A**) x (**C**)	-0,101	0,317	0,779	-1,468	1,266
(**A**) x (**D**)	4,482	0,317	0,0049	3,115	5,850

Analisando a Tabela 11, observa-se que os valores dos efeitos das variáveis **A** e **D**, assim como a Média são estatisticamente significativos, dentro do intervalo de confiança utilizado de 95%. Em relação, à análise do sinal algébrico da variável **A** (tempo), este indica ser inversamente proporcional a resposta, ou seja, o Índice de Cor tende a ser maior quando o tempo de contato das folhas de espinafre com a solução alcoólica é menor. Porém, a variável **D** (concentração alcoólica) apresenta sinal positivo, indicando que quanto maior a concentração de álcool maior será o Índice de Cor do extrato.

A partir da regressão foram calculados os coeficientes para o Índice de Cor, o qual é representado pela Equação 5.2.

$$\mathbf{IC} = 9{,}359 - 1{,}566\,\mathbf{A} + 3{,}573\,\mathbf{D} + 2{,}241\,\mathbf{AD} \qquad (5.2)$$

Em que:

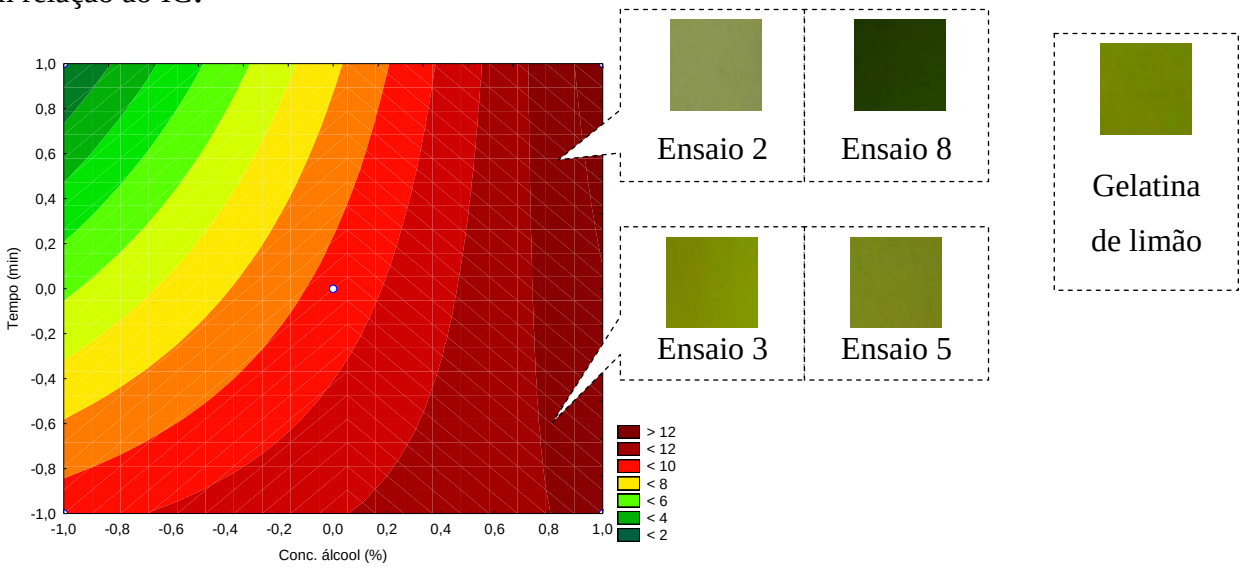
IC = Índice de Cor

A = Tempo (min)

D = Concentração alcoólica (%)

As curvas de nível geradas para o modelo escolhido são mostradas na Figura 10, juntamente com as imagens dos ensaios correspondentes a melhor região.

Figura 10. Curvas de nível para os fatores codificados tempo e concentração alcoólica em relação ao IC**.**



A região destacada na Figura 10, correspondente aos ensaios com Índices de Cor mais elevados, os quais estão localizados entre os níveis 0,8 e 1 (56 e 60 %) no eixo de Concentração Alcoólica, sendo que o eixo correspondente a varável Tempo não interfere nesta faixa de Concentração de Álcool. Em relação às coordenadas do sistema de cor CIELab, verifica-se que o ensaio 3 apresenta valores de L*, a* e b* próximos dos valores obtidos para a amostra de Gelatina de Limão. Porém a coordenada a* destaca-se por apresentar maior proximidade com a amostra padrão.

5.3. Extração dos pigmentos de espinafre com ácido cítrico

A extração dos pigmentos do espinafre em solução ácida foi realizada de acordo com a matriz do planejamento experimental fatorial fracionário 2_{IV}^{4-1}. Na Tabela 12 são apresentadas as coordenadas do sistema de cores RGB e CIELab e o Índice de Cor determinado para cada amostra, juntamente com os dados da amostra de gelatina de limão, que será utilizada como padrão para comparação.

Tabela 12. Coordenadas de cor no sistema CIELab para os extratos de espinafre em meio ácido.

Amostras	R	G	B	L*	a*	b*	IC	Cor
1	**0,545**	**0,546**	**0,503**	**57.686**	**-2,164**	**5,885**	**11,965**	
2	0,587	0,544	0,467	58,234	0,755	12,048	2,148	
3	0,663	0,616	0,456	64,899	-2,133	23,061	2,839	
4	0,583	0,506	0,390	55,079	2,913	18,799	5,560	
5	0,562	0,535	0,464	57,013	-0,694	10,687	2,273	
6	0,590	0,508	0,388	55,401	3,193	19,544	5,821	
7	**0,554**	**0,546**	**0,393**	**57,276**	**-5,880**	**21,329**	**9,280**	
8	0,577	0,525	0,347	56,046	-1,863	26,269	2,524	
9	0,588	0,546	0,431	58,223	-0,843	17,197	1,683	
10	0,628	0,567	0,413	60,457	-0,144	22,913	0,208	
11	0,651	0,614	0,486	64,574	-1,874	18,353	3,146	
Gelatina de Limão	**0,442**	**0,517**	**0,00247**	**51,812**	**-21,958**	**55,963**	**14,099**	

O Índice de Cor determinado para cada ensaio é apresentado na Tabela 13, juntamente com a Matriz do Planejamento Experimental usada.

Tabela 13. Matriz do Planejamento Experimental Fracionário 2^{4-1}_{IV}, com triplicata no ponto central e Índice de Cor correspondente a extração de corante de espinafre com ácido cítrico.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Massa (g)	Conc. alcoólica (%)	IC
1	-1 (20)	-1 (60)	-1 (5)	-1 (2)	11,965
2	1 (60)	-1 (60)	-1 (5)	1 (6)	2,148
3	-1 (20)	1 (80)	-1 (5)	1 (6)	2,839
4	1 (60)	1 (80)	-1 (5)	-1 (2)	5,56
5	-1 (20)	-1 (60)	1 (15)	1 (6)	2,273
6	1 (60)	-1 (60)	1 (15)	-1 (2)	5,821
7	-1 (20)	1 (80)	1 (15)	-1 (2)	9,28
8	1 (60)	1 (80)	1 (15)	1 (6)	2,524
9	0 (40)	0 (70)	0 (10)	0 (10)	1,683
10	0 (40)	0 (70)	0 (10)	0 (10)	0,208
11	0 (40)	0 (70)	0 (10)	0 (10)	3,146

Através dos resultados obtidos na Tabela 13 foi realizada a análise estatística dos efeitos das quatro varáveis independentes estudadas, sobre a variável resposta Índice de Cor (IC). A partir dos índices estatísticos obtidos foi realizada a escolha do modelo matemático empírico a ser utilizado, através da análise de variância (ANOVA) e do coeficiente de determinação (R^2). Os valores de F (distribuição de probabilidade de Fisher) calculado e tabelado correspondente a cada modelo são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3. Comparação entre modelos empíricos em relação ao Índice de Cor.

Modelo	R^2	Regressão/Resíduos		Falta de Ajuste/Erro Puro	
Linear sem interações	0,632	F_1	3,68	F_1	4,89
		F_2	4,53	F_2	19,25
Linear com interações de segunda ordem	0,739	F_1	2,33	F_1	13,27
		F_2	8,89	F_2	18,51
Linear com interações de terceira ordem	0,739	F_1	2,33	F_1	13,27
		F_2	8,89	F_2	18,51

F_1(Calculado) e F_2(distribuição de probabilidade de Fisher)

Através do Quadro 3 pode-se observar que o melhor modelo a ser utilizado, para a resposta Índice de Cor, é o modelo com interações de segunda ordem. A escolha deste modelo justifica-se por apresentar maior R^2 que o modelo sem interações, e valores de F calculado e tabelado iguais ao modelo com três interações. Com a escolha do modelo empírico realizou-se a análise dos efeitos em relação à resposta Índice de Cor, o qual é apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

		Desvio		Limites de confiança	
Fatores	**Efeito**	**Padrão**	**Valor de p**	**-95%**	**+95%**
Média/Interações	4,313	0,443	0,0104	2,407	6,219
(**A**) Tempo	-2,576	1,0387	0,131	-7,045	1,893
(**B**) Temperatura	-0,501	1,0387	0,677	-4,970	3,968
(**C**) Massa	-0,653	1,0387	0,593	-5,122	3,815
(**D**) Conc. Ácido Cítrico	-5,710	1,0387	0,031	-10,179	-1,241
(**A**) x (**B**)	0,558	1,0387	0,644	-3,910	5,027
(**A**) x (**C**)	0,972	1,0387	0,448	-3,497	5,441
(**A**) x (**D**)	2,356	1,0387	0,151	-2,113	6,825

Analisando a Tabela 14, observa-se que os valores dos efeitos da variável **D**, assim como a Média são estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança utilizado de 95%. Em relação, a análise do sinal algébrico da variável a variável **D** (concentração de ácido) apresenta sinal negativo, indicando que quanto maior a concentração de ácido menor será o Índice de Cor. A variável **A** (tempo), mesmo não sendo significativa dentro do intervalo de confiança adotado, apresenta maior efeito, em relação as outras variáveis do processo. Neste caso as variáveis **A** e **D** foram usadas para definir a equação para o modelo empírico.

A partir da regressão foram calculados os coeficientes do modelo para o Índice de Cor, o qual é representado pela Equação 5.3.

$$\mathbf{IC} = 9{,}359 - 1{,}566\ \mathbf{A} + 3{,}573\ \mathbf{D} + 2{,}241\ \mathbf{AD} \qquad (5.3)$$

Em que:

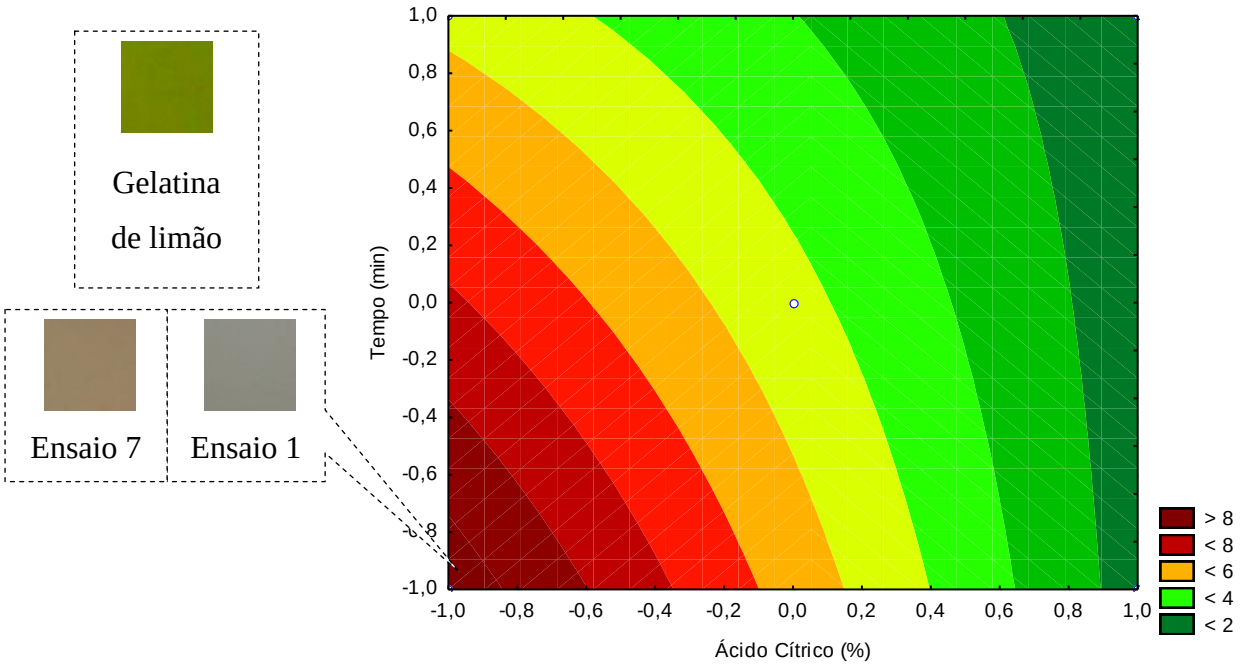
IC = Índice de Cor

A = Tempo (min)

D = Concentração de ácido cítrico (%)

As curvas de nível geradas para o modelo escolhido são mostradas na Figura 11, juntamente com as imagens dos ensaios correspondentes a melhor região. a escolha desta região correspondente as maiores resposta do Índice de Cor, a qual está localizada entre os níveis 0,8 e 1 (56 e 60 %) no eixo de concentração de ácido cítrico, sendo que, o eixo correspondente a variável tempo interfere somente em concentrações muito baixas de ácido cítrico.

Figura 11. Curvas de nível para os fatores codificados tempo e concentração alcoólica em relação à resposta IC.



Analisando as imagens destacas na melhor região, e comparando com a amostra padrão, verifica-se que a amostra 1 apresenta Índice de Cor próximo ao valor encontrado para a gelatina de limão.

Com a análise estatística dos resultados encontrados, foi possível destacar apenas um Ensaio para cada método estudado, com melhor ajuste em relação às coordenadas da amostra de gelatina de limão. Na Tabela 15 são apresentadas as coordenadas do sistema CIELab e o Índice de Cor, para cada amostra.

Tabela 15. CIELab e IC para as amostras determinadas em cada planejamento.

Método de Extração	Amostra	L*	a*	b*	IC	Cor
Água Destilada	Ensaio 1	58,468	-4,077	10,041	12,868	
Solução Alcoólica	Ensaio 3	55,480	**-21,024**	59,090	**12,084**	
Solução Ácida	Ensaio 1	57.686	-2,164	5,885	11,965	
Amostra Padrão	Gelatina de Limão	51,812	**-21,958**	55,963	**14,099**	

Analisando a Tabela 15, foi escolhido apenas um método para obter pigmentos com potencial para substituir o corante presente na amostra padrão. Neste caso, o extrato referente ao Ensaio 3, obtido com solução alcoólica apresentou Índice de Cor mais próximo da gelatina de limão. As variáveis correspondente ao Ensaio 3 apresentam tempo de 20 minutos de extração, temperatura de 60°C, 5g de espinafre e concentração alcoólica de 60%.

Além do IC, o pigmento presente no extrato é visivelmente próximo ao da gelatina. Assim como, a coordenada a* do Ensaio 3 e da gelatina estão localizadas no mesmo ponto do eixo negativo, o qual corresponde a cor verde no sistema de cor CIELab.

5.4. Extração dos pigmentos da casca de limão bergamota com água destilada

A extração dos pigmentos da Casca Limão Bergamota com água destilada foi realizada de acordo com a matriz do Planejamento Experimental Fatorial Completo 2^3. Na Tabela 16 são apresentadas as coordenadas do sistema de cor CIELab e o Índice de Cor (IC), para cada ensaio, juntamente com as coordenadas da amostra de Refrigerante, que será utilizada como cor padrão para comparação.

Tabela 16. Coordenadas de cores em CIELab para os extratos de casca de limão bergamota obtidos com água destilada.

Amostras	R	G	B	L*	a*	b*	IC	Cor
1	0,563	0,131	0,002	31,842	44,651	44,352	44,562	
2	0,491	0,064	0,002	26,036	43,977	38,050	58,094	
3	**0,421**	**0,079**	**0,004**	**22,207**	**37,043**	**33,083**	**66, 219**	
4	0,406	0,059	0,051	21,208	37,764	26,488	77,205	
5	0,249	0,037	0,016	11,222	25,434	15,745	151,525	
6	0,152	0,034	0,039	5,775	14,877	4,845	329,29	
7	0,263	0,088	0,075	14,623	21,269	13,221	116,10	
8	0,153	0,064	0,070	7,789	12,046	3,671	245,60	
9	0,236	0,043	0,038	10,830	23,826	12,808	162,65	
10	0,418	0,054	0,048	21,721	39,102	27,500	75,313	
11	0,226	0,034	0,028	9,752	23,728	12,234	182,27	
Refrigerante	**0,387**	**0,098**	**0,032**	**21,453**	**32,305**	**28,426**	**69,989**	

O Índice de Cor determinado para cada ensaio é apresentado na Tabela 17, juntamente com a Matriz do Planejamento Experimental usada.

Tabela 17. Matriz do Planejamento Experimental Completo 2^3, com triplicata no ponto central e Índice de Cor correspondente a extração de corante da casca de limão bergamota com água destilada.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Massa (g)	IC
1	-1 (20)	-1 (60)	-1 (5)	44,562
2	1 (60)	-1 (60)	-1 (5)	58,094
3	-1 (20)	1 (80)	-1 (5)	66, 219
4	1 (60)	1 (80)	-1 (5)	77,205
5	-1 (20)	-1 (60)	1 (15)	151,525
6	1 (60)	-1 (60)	1 (15)	329,29
7	-1 (20)	1 (80)	1 (15)	116,10
8	1 (60)	1 (80)	1 (15)	245,60
9	0 (40)	0 (70)	0 (10)	162,65
10	0 (40)	0 (70)	0 (10)	75,313
11	0 (40)	0 (70)	0 (10)	182,27

Através dos resultados obtidos na Tabela 17 foi realizada a análise estatística dos efeitos das quatro varáveis independentes estudadas, sobre a resposta Índice de Cor (IC). A partir dos índices estatísticos obtidos foi realizada a escolha do modelo matemático empírico a ser utilizado, através da análise de variância (ANOVA) e do coeficiente de determinação (R^2). Os valores de F (distribuição de probabilidade de Fisher) calculado e tabelado correspondente a cada modelo são apresentados no Quadro 4.

Quadro 4. Comparação entre modelos empíricos gerados pelo Planejamento Experimental Completo 2^3, com triplicata no ponto central, em relação à resposta Índice de Cor.

Modelo	R^2	Regressão/Resíduos		Falta de Ajuste/Erro Puro	
Linear sem interações	0, 744	F_1	21,732	F_1	0,851
		F_2	4,350	F_2	19,300
Linear com interações de segunda ordem	0,914	F_1	36,036	F_1	0,045
		F_2	6,160	F_2	19,00
Linear com interações de terceira ordem	0,918	F_1	23,214	F_1	0,010
		F_2	8,890	F_2	18,510

F_1(Calculado) e F_2(distribuição de probabilidade de Fisher)

Através do Quadro 4 pode-se observar que o melhor modelo a ser utilizado, para a resposta Índice de Cor, é o modelo com interações de segunda ordem. A escolha deste modelo justifica-se por apresentar melhor relação entre o F calculado (36,036) e F tabelado (6,16), para a regressão em relação aos resíduos. O modelo escolhido, também apresentou coeficiente de determinação maior que o modelo linear sem interações indicando bom ajuste entre o modelo e dados experimentais. Com a escolha do modelo empírico realizou-se a análise dos efeitos em relação à resposta Índice de Cor, o qual é apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

Fatores	**Efeito**	**Desvio Padrão**	**Valor de p**	**Limites de confiança**	
				-95%	**+95%**
Média/Interações	137,166	17,167	0,0153	63,299	211,033
(**A**) Tempo	82,945	40,262	0,175	-90,288	256,179
(**B**) Temperatura	-19,586	40,262	0,674	-192,820	153,647
(**C**) Massa	149,108	40,262	0,065	-24,125	322,342
(**A**) x (**B**)	-12,702	40,262	0,782	-185,937	160,531
(**A**) x (**C**)	70,686	40,262	0,221	-102,547	243,920
(**B**) x (**C**)	-39,970	40,262	0,425	-213,205	133,263

Analisando a Tabela 18, observa-se que somente a Média apresentou índices estatisticamente significativos, dentro do intervalo de confiança utilizado de 95%. Porém, todas as variáveis foram utilizadas, juntamente com a Média, para descrever o modelo empírico para a variável responde Índice de Cor, Equação 5.5

$$\mathbf{IC} = 137{,}166 + 41{,}473\mathbf{A} - 9{,}793\mathbf{B} + 74{,}554\mathbf{C} - 6{,}351\mathbf{AB} + 35{,}343\mathbf{AC} - 19{,}985\mathbf{BC} \qquad (5.5)$$

em que:

IC = Índice de Cor

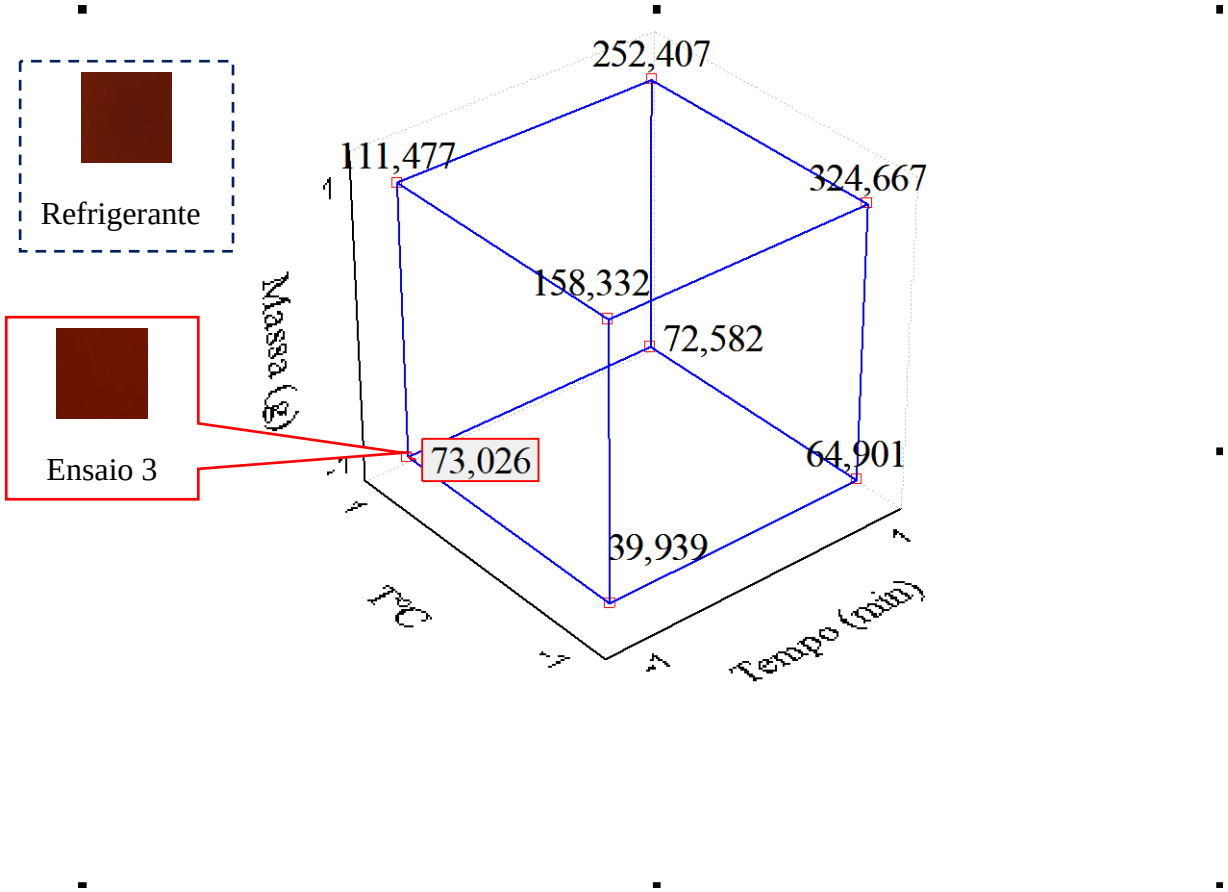
A = Tempo (min)

B = Temperatura (ºC)

C = Massa (g)

As variáveis independentes **A, B** e **C** foram usadas para gerar o Cubo de Resposta em relação ao Índice de Cor, para o modelo escolhido, Figura 12.

Figura 12. Cubo de Resposta para os fatores codificados Massa, Temperatura e Tempo em relação à resposta IC.



Através do Cubo de Resposta, Figura 12, verifica-se que o Ensaio 3 apresenta melhor ajuste em relação ao IC da amostra de Refrigerante usada como. Este ponto corresponde a maior valor de Temperatura e menores valores de Massa e Tempo de extração. Para o sistema de cor CIELab, as coordenadas L*, a* e b*, também estão aproximas dos valores obtido para a amostra padrão.

5.5. Extração dos pigmentos da casca de limão bergamota em solução alcoólica

A extração dos pigmentos da Casca Limão Bergamota em solução alcoólica foi realizada de acordo com a matriz do Planejamento Experimental Fatorial Fracionário 2^{4-1}_{IV}. Na Tabela 19 são apresentadas as coordenadas do sistema de cor CIELab e o Índice de Cor (IC), para cada ensaio, juntamente com as coordenadas da amostra de bebida carbonatada (refrigerante), que será utilizada como cor padrão para comparação.

Tabela 19. Coordenadas de cores em CIELab para os extratos de casca de limão bergamota em meio alcoólico.

Amostras	R	G	B	L*	a*	b*	IC	Cor
1	0,601	0,327	0,003	42,816	24,263	51,609	19,874	
2	0,589	0,138	0,002	33,443	46,249	46,050	42,377	
3	0,590	0,198	0003	35,726	40,187	47,252	36,268	
4	0,382	0,006	0,009	18,427	39,203	27,294	89,076	
5	0,499	0,084	0,038	27,049	43,425	35,417	57,298	
6	**0,389**	**0,058**	**0,009**	**20,093**	**36,154**	**29,412**	**77,212**	
7	0,089	0,036	0,035	3,594	4,812	1,772	522,1	
8	0,149	0,036	0,043	5,778	14,332	4,326	331,3	
9	0,175	0,040	0,034	7,173	17,504	7,531	256,1	
10	0,178	0,042	0,031	7,399	17,540	8,118	245,3	
11	0,243	0,044	0,020	11,197	24,198	15,227	151,2	
Refrigerante	**0,387**	**0,098**	**0,032**	**21,453**	**32,305**	**28,426**	**69,989**	

O Índice de Cor determinado para cada ensaio é apresentado na Tabela 20, juntamente com a Matriz do Planejamento Experimental usada.

Tabela 20. Matriz do Planejamento Experimental Fracionário 2^{4-1}_{IV}, com triplicata no ponto central e Índice de Cor correspondente a extração de corante da casca de limão bergamota em meio alcoólico.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Massa (g)	Conc. alcoólica (%)	IC
1	-1 (20)	-1 (30)	-1 (5)	-1 (20)	19,874
2	1 (60)	-1 (30)	-1 (5)	1 (60)	42,377
3	-1 (20)	1 (60)	-1 (5)	1 (60)	36,268
4	1 (60)	1 (60)	-1 (5)	-1 (20)	89,076
5	-1 (20)	-1 (30)	1 (15)	1 (60)	57,298
6	1 (60)	-1 (30)	1 (15)	-1 (20)	77,212
7	-1 (20)	1 (60)	1 (15)	-1 (20)	522,1
8	1 (60)	1 (60)	1 (15)	1 (60)	331,3
9	0 (40)	0 (45)	0 (10)	0 (40)	256,1
10	0 (40)	0 (45)	0 (10)	0 (40)	245,3
11	0 (40)	0 (45)	0 (10)	0 (40)	151,2

Através dos resultados obtidos na Tabela 20 foi realizada a análise estatística dos efeitos das quatro varáveis independentes estudadas, sobre a variável resposta, Índice de Cor (IC). A partir dos índices estatísticos obtidos foi realizada a escolha do modelo matemático empírico a ser utilizado, através da análise de variância (ANOVA) e do coeficiente de determinação (R^2). Os valores de F (distribuição de probabilidade de Fisher) calculado e tabelado correspondente a cada modelo são apresentados no Quadro 5.

Quadro 5. Comparação entre modelos empíricos em relação ao Índice de Cor.

Modelo	R^2	Regressão/Resíduos		Falta de Ajuste/Erro Puro	
Linear sem interações	0,665	F_1	3,148	F_1	5,727
		F_2	4,530	F_2	19,250
Linear om interações de segunda ordem	0,929	F_1	40,257	F_1	3,266
		F_2	8,890	F_2	18,510
Linear com interações de terceira ordem	0,929	F_1	40,257	F_1	3,266
		F_2	8,890	F_2	18,51

F_1(Calculado) e F_2(distribuição de probabilidade de Fisher)

Através do Quadro 5 pode-se observar que o melhor modelo a ser utilizado, para a resposta Índice de Cor, é o modelo com interações de segunda ordem. A escolha deste modelo justifica-se por apresentar melhor relação entre o F calculado (40,257) e F tabelado (8,890), para a regressão em relação aos resíduos. Com a escolha do modelo empírico realizou-se a análise dos efeitos em relação à resposta Índice de Cor, o qual é apresentado na Tabela 21.

Tabela 21. Cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

Fatores	**Efeito**	**Desvio Padrão**	**Valor de p**	**Limites de confiança**	
				-95%	**+95%**
Média/Interações	166,191	17,397	0,0107	91,338	241,045
(**A**) Tempo	-23,893	40,799	0,617	-199,441	151,653
(**B**) Temperatura	195,496	40,799	0,0409	19,948	371,0430
(**C**) Massa	200,078	40,799	0,0391	24,531	375,626
(**D**) Conc. álcool	-60,254	40,799	0,277	-235,802	115,292
(**A**) x (**B**)	-45,102	40,799	0,384	-220,650	130,445
(**A**) x (**C**)	-61,549	40,799	0,270	-237,097	113,998
(**A**) x (**D**)	163,949	40,799	0,0567	-11,598	339,496

Analisando a Tabela 21, observa-se que os valores dos efeitos das variáveis **B** e **C**, assim como a Média são estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança utilizado de 95%. Em relação a análise do sinal algébrico da variável **B** (temperatura), este indica ser proporcional a resposta, ou seja, o Índice de Cor tende a ser maior quando o temperatura da solução for maior. A variável **C** (massa) apresenta sinal positivo também, indicando que quanto maior a massa de casca de limão, maior será o Índice de Cor.

A partir da regressão foram obtidos os coeficientes do modelo para o Índice de Cor, o qual é representado pela Equação 5.4.

$$\mathbf{IC} = 166{,}191 + 97{,}747\,\mathbf{B} + 100{,}039\,\mathbf{C} \qquad (5.4)$$

Em que:

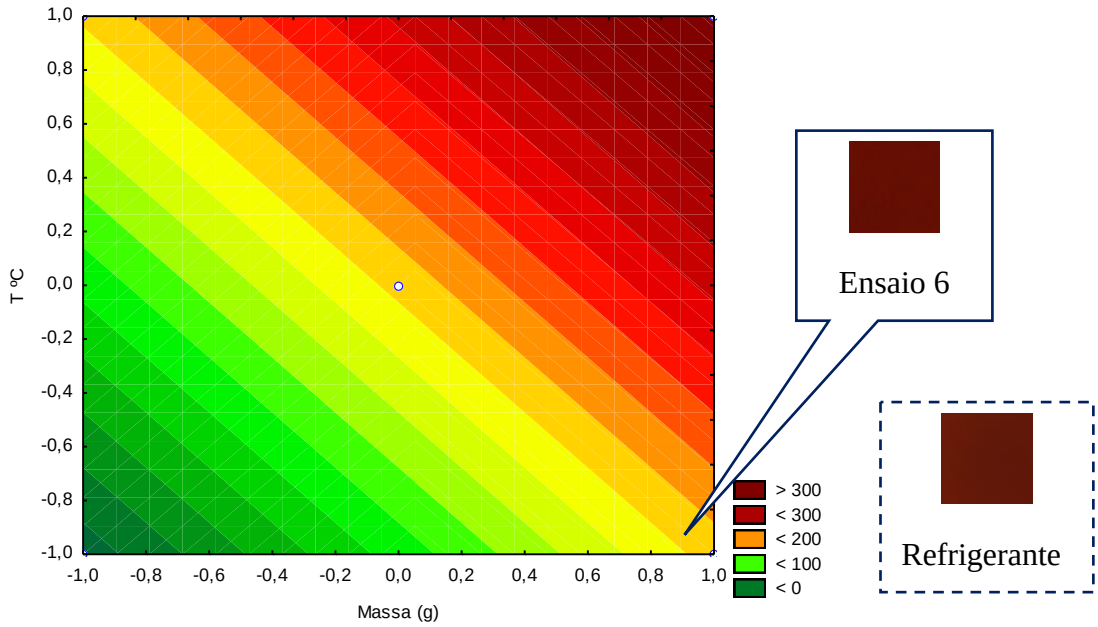
IC = Índice de Cor

B = Temperatura (°C)

C = Massa (g)

As curvas de nível geradas para o modelo escolhido são mostradas na Figura 13, na qual são destacados os ensaios com melhor ajuste para o Índice de Cor, em relação a cor usada como padrão de referência.

Figura 13. Curvas de nível para os fatores codificados Massa e Temperatura em relação à resposta IC.



Analisando as Curvas de Níveis para o modelo empírico escolhido, Figura 13, verifica-se que a amostra que melhor representa o IC do Refrigerante é o Ensaio 6, que possui os níveis codificados -1 para Temperatura e 1 para a Massa de Casca de Limão Bergamota. Para o sistema de cor CIELab, as coordenadas L*, a* e b* aproximam-se do valor obtido para a amostra padrão.

5.6. Extração dos pigmentos da casca de limão bergamota com ácido cítrico

A extração dos pigmentos da Casca Limão Bergamota com Ácido Cítrico foi realizada de acordo com a matriz do Planejamento Experimental Fatorial Fracionário 2_{IV}^{4-1}. Na Tabela 22 são apresentadas as coordenadas do sistema de cor CIELab e o Índice de Cor (IC), para cada ensaio, juntamente com as coordenadas da amostra de bebida carbonatada (refrigerante), que será utilizada como cor padrão para comparação.

Tabela 22. Coordenadas de cores em RGB e CIELab para as imagens dos extratos de casca de limão bergamota em meio ácido.

Amostras	R	G	B	L*	a*	b*	IC	Cor
1	0,573	0,339	0,002	42,557	19,338	51,032	16,653	
2	0,151	0,032	0,037	5,648	14,887	4,798	337,02	
3	**0,436**	**0,074**	**0,003**	**23,215**	**38,811**	**34,135**	**64,689**	
4	0,350	0,064	0,024	18,125	32,320	24,917	87,389	
5	0,269	0,047	0,016	12,816	26,376	18,055	128,76	
6	0,095	0,034	0,037	3,676	5,816	1,708	521,99	
7	0,253	0,046	0,030	11,901	25,023	15,291	143,39	
8	0,0827	0,045	0,048	3,979	3,600	0,867	488,59	
9	0,236	0,043	0,038	10,830	23,826	12,808	162,65	
10	0,163	0,048	0,035	6,982	14,832	7,006	259,00	
11	0,226	0,028	0,028	9,752	23,728	12,234	182,27	
Refrigerante	**0,387**	**0,098**	**0,032**	**21,453**	**32,305**	**28,426**	**69,989**	

O Índice de Cor determinado para cada ensaio é apresentado na Tabela 23, juntamente com a Matriz do Planejamento Experimental usada.

Tabela 23. Matriz do Planejamento Experimental Fracionário 2^{4-1}_{IV}, com triplicata no ponto central e Índice de Cor correspondente a extração de corante da casca de limão bergamota em meio ácido.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Massa (g)	Ácido Cítrico (%)	IC
1	-1 (20)	-1 (60)	-1(5)	-1(2)	16,653
2	1 (60)	-1(60)	-1(5)	1(10)	337,02
3	-1 (20)	1(80)	-1(5)	1(10)	64,689
4	1 (60)	1(80)	-1(5)	-1(2)	87,389
5	-1 (20)	-1(60)	1(15)	1(10)	128,76
6	1 (60)	-1(60)	1(15)	-1(2)	521,99
7	-1 (20)	1(80)	1(15)	-1(2)	143,39
8	1 (60)	1(80)	1(15)	1(10)	488,59
9	0 (40)	0(70)	0(10)	0(6)	162,65
10	0 (40)	0(70)	0(10)	0(6)	259,00
11	0 (40)	0(70)	0(10)	0(6)	182,27

Através dos resultados obtidos na Tabela 23 foi realizada a análise estatística dos efeitos das quatro varáveis independentes estudadas, sobre a resposta Índice de Cor (IC). A partir dos índices estatísticos obtidos foi realizada a escolha do modelo matemático empírico, através da análise de variância (ANOVA) e do coeficiente de determinação (R^2). Os quais são mostrados no Quadro 6, juntamente com os valores de F (distribuição de probabilidade de Fisher) calculado e tabelado, correspondente a cada modelo.

Quadro 6. Comparação entre modelos empíricos em relação à resposta Índice de Cor.

Modelo	R^2	Regressão/Resíduos		Falta de Ajuste/Erro Puro	
Linear sem interações	0,839	F_1	25,377	F_1	3,831
		F_2	4,530	F_2	19,250
Linear com interações de segunda ordem	0,977	F_1	424,530	F_1	0,416
		F_2	8,890	F_2	18,510
Linear com interações de terceira ordem	0,977	F_1	424,530	F_1	0,416
		F_2	8,890	F_2	18,510

F_1(Calculado) e F_2(distribuição de probabilidade de Fisher)

Através do Quadro 6 pode-se observar que o melhor modelo a ser utilizado, para a resposta Índice de Cor, é o modelo com interações de segunda ordem. A escolha deste modelo justifica-se por apresentar melhor relação entre o F calculado (424,530) e F tabelado (8,890), para a regressão em relação aos resíduos. Com a escolha do modelo empírico realizou-se a análise dos efeitos em relação à resposta Índice de Cor, o qual é apresentado na Tabela 24.

Tabela 24. Cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos.

Fatores	**Efeito**	**Desvio Padrão**	**Valor de p**	**Limites de confiança**	
				-95%	**+95%**
Média/Interações	217,491	15,352	0,0049	151,435	283,546
(**A**) Tempo	270,374	36,004	0,0172	115,460	425,288
(**B**) Temperatura	-55,091	36,004	0,265	-210,005	99,823
(**C**) Massa	194,244	36,004	0,0326	39,331	349,159
(**D**) Conc. Ácido	62,409	36,004	0,225	-92,505	217,323
(**A**) x (**B**)	-86,424	36,004	0,138	-241,338	68,490
(**A**) x (**C**)	98,840	36,004	0,111	-56,073	253,755
(**A**) x (**D**)	45,706	36,004	0,332	-109,208	200,620

Analisando a Tabela 24, observa-se que os valores dos efeitos das variáveis **A** e **C**, assim como a Média são estatisticamente significativos, dentro do intervalo de confiança utilizado de 95%. Em relação à análise do sinal algébrico da variável **A** (tempo), este indica ser proporcional a resposta, ou seja, o Índice de Cor tende a ser maior quando o tempo de contato da Casca de Limão com a solução for maior. A variável **C** (massa) apresenta sinal positivo também, indicando que quanto maior a massa de Casca de Limão, maior será o Índice de Cor.

A partir da regressão foram obtidos os coeficientes do modelo para o Índice de Cor, o qual é representado pela Equação 5.6.

$$\mathbf{IC} = 217{,}49 + 135{,}18\,\mathbf{A} + 97{,}12\,\mathbf{C} \qquad (5.6)$$

Em que:

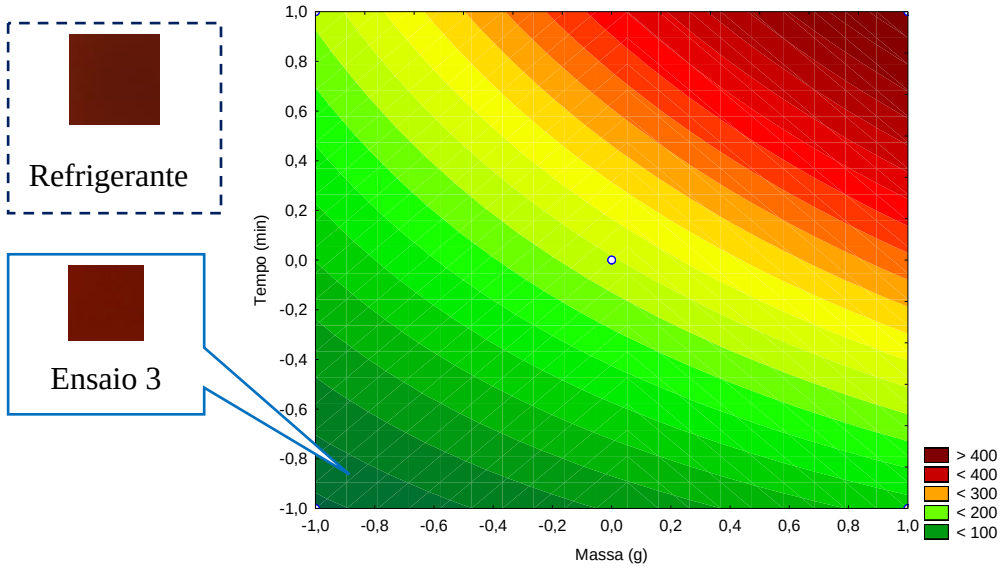
IC = Índice de Cor

A = Tempo (min)

C = Massa (g)

As curvas de nível geradas para o modelo escolhido são mostradas na Figura 14.

Figura 14. Curvas de nível para os fatores codificados Massa e Tempo em relação à resposta IC.



Analisando as Curvas de Níveis, para o modelo empírico escolhido, Figura 14, verifica-se que a amostra que melhor representa o IC do Refrigerante é o Ensaio 3, o qual está localizado nos níveis codificados -1 para Temperatura e -1 para a Massa de Casca de Limão Bergamota. Em relação ao sistema de cor CIELab, as coordenadas L*, a* e b* aproximam-se do valor obtido para a amostra usada como padrão.

Na Tabela 25 é apresentado um resumo dos Ensaios destacados em cada planejamento, juntamente com a amostra usada como padrão.

Tabela 25. CIELab e IC para as amostras determinadas em cada planejamento

Método de Extração	**Amostra**	**L***	**a***	**b***	**IC**	**Cor**
Água Destilada	Ensaio 3	22,207	37,043	33,083	**66, 219**	
Solução Alcoólica	Ensaio 6	20,093	36,154	29,412	77,212	
Solução Ácida	Ensaio 3	23,215	38,811	34,135	64,689	
Amostra Padrão	Refrigerante	21,453	32,305	28,426	**69,989**	

Analisando a Tabela 25, foi escolhido apenas um método para obter pigmentos com potencial para substituir o corante presente no refrigerante. Sendo que, os três métodos estudados apresentam potencial para extrair os pigmentos presentes na Casca de Limão Bergamota. Porém, o extrato referente ao Ensaio 3, obtido com água destilada apresentou Índice de Cor mais próximo do refrigerante. As varáveis corresponde ao Ensaio 3 apresentam tempo de 20 minutos, temperatura de 60°C e 5 g de casca de limão bergamota.

Em relação as coordenadas dos sistema CIELab, ambos os ensaios citados apresentam pontos próximo da amostra padrão.

6. CONCLUSÕES

Através da determinação dos pigmentos presente nas amostras, pelo sistema de cor CIELab, foi possível localizar as coordenadas correspondentes ao extrato natural, e assim, comparar a cor obtida com uma amostra contendo corante artificial. A localização no espaço de cor, permitiu realizar a análise estatística das variáveis envolvidas no processo de obtenção dos extratos naturais, e assim determinar as condições otimizadas, para os diferentes métodos de extração estudados.

Para os extratos de espinafre somente as amostra que foram obtidas em meio alcoólica apresentaram cores compatíveis com a amostra de gelatina, usada como padrão. Entre os ensaios do planejamento usado, o ensaio 3 (tempo de 20 minutos, temperatura de 60°C, massa de espinafre de 5g e concentração alcoólica de 60%) apresentou Índice de Cor mais próximo da amostra padrão.

Para os extratos de casca de limão bergamota, os três métodos usados apresentaram potencial para obtenção de pigmentos naturais das amostras estudas. Porém, o 3 (tempo de 20 minutos, temperatura de 80°C e massa de 5g) obtido com água destilada apresentou Índice de Cor mais próximo da amostra padrão.

Assim sendo, a metodologia adotada, usando o tratamento de imagens através do software *Matehematica* pode proporcionar a análise de cor para pigmentos presentes em extratos naturais levando a determinação das melhores condições de obtenção dos mesmos. Obtendo, assim, um sistema de cores padronizado após aplicação no produto. Com essa metodologia, acredita-se que seja possível viabilizar a substituição dos corantes sintéticos, utilizados no processamento de alimentos, por coloração natural extraída de fontes naturais.

Como proposta de trabalhos futuros, espera-se com os resultados obtidos nessa monografia, possibilitar o desenvolvimento de um guia de procedimentos, para análise de sistemas de cor CIELab e RGB, através de ferramentas de planejamento experimental. Com isso, seria possível a formação de um método capaz de avaliar a qualidade perceptível dos alimentos, que auxilie o consumidor durante a aquisição de produtos alimentícios industrializados.

No âmbito industrial, espera-se que os resultados obtidos contribuam para o desenvolvimento de equipamentos automatizados de controle de qualidade dos alimentos processados, através da cor. Visto que, a seleção e separação imediata de produtos fora dos padrões de qualidade podem reduzir significativamente os custos finais com descarte e mão-de-obra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-SALCES, R. M. et al. Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 91–98, 2005.

BELTRAME, L. T. C. **Sistemas microemulsionados aplicados à remoção da cor de efluentes têxteis**. 2006. 184p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grade do Norte, Natal, 2006.

BOTELHO, B. G. **Desenvolvimento e validação de métodos para análise direta de alimentos usando ferramentas quimiométricas , espectroscopia no infravermelho e imagens digitais**. 2014. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BOX, G. E. P., HUNTER, J. S., HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design,** Innovation, and Discovery. 2 ed. Hoboken: John Wiley & Songs;., 2005, 633p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Informe Técnico nº 68 de 03 set. 2015. Classificação dos corantes caramelos II, II e IV e dos demais corantes autorizados para uso em alimentos, 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 out. 1997. Regulamento técnico: aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

BRASIL. COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS (CNNPA), Ministério da Saúde. Resolução nº44, de 05 de ago. de 1977. Diário Oficial da União, Brasília, 1978.

CAMELO, A. F. L.; GÓMEZ, P.A. Comparison of color indexes for tomato ripening. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.534-537, 2004.

CONCENÇO, F. I. G. R. et al. Desenvolvimento e avaliação da qualidade da polpa e extrato de mirtilo (Vaccinium myrtillus) em pó. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 2, p. 1847–1859, 2015.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. **Corantes Alimentícios**. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos,** Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, dez. 2002.

COQUE, Y.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. On line spectrophotometric method for the monitoring of colour removal processes. **Dyes and Pigments**, v. 54, n. 1, p. 17–23, 2002.

CORTEZ, R. et al. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 180–198, 2017.

DIAS, M. **Estabilidade à radiação uv em estamparia do corante natural de urucum adsorvido em argila caulm**. 2010. 125f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DUTTA, D.; CHAUDHURI, R.; CHAKRABORTY, R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 1510–1520, 2005.

FAIRCHILD, M. D. **Color Appearance Models**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005. 34p.

FERNANDES, G. A.; SANTOS, M. A.; SANTOS, N. L.; LOPES, T. J. Utilização de técnicas de planejamento experimental na obtenção de carvão de pinhão (*araucaria angustifolia*) para a adsorção de corante de azul de metileno. **Revista Ciência e Engenharia**, Uberlância, v. 25, n. 1, p. 105–111, jun. 2016.

FIMOGNARI, C.;HRELIA, P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. **Mutation research**., v. 635, n. 2-3, p. 90-104, mai./jun. 2007.

GARCIA, C. E. R. et al. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (Bixa orellana L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1510–1517, 2012.

GOMES, K. M. S. et al. Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Tatrazine Yellow (E-102) on Allium cepa L . root meristematic cells. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 218–223, 2013.

GONNET, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanin revisited - 3. A further description using CIELAB differences and assessment of matched colours using the CMC model. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 473–485, 2001.

GRANATO, D.; MASSON, M. L. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1090–1096, 2010.

JOSHI, Y.; GOYAL, B. Anthocyanins : a Lead for Anticancer Drugs. **International Journal**, v. 1, n. 4, p. 1119–1126, 2011.

KIOKIAS, S.; PROESTOS, C.; VARZAKAS, T. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 4, n. 1, p. 25–37, 2016.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 227–242, 2003.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais E Da Estabilidade. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291–297, 2007.

LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 40, p. 173-289, 2000.

LUCARINI, A. C. et al. Estudo da extração de corante natural que confere proteção

ultravioleta em fibras naturais. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, p. 82–94, 2017.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. DA. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659–664, 2005.

MALHEIROS, G. C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria, 2007.

MINOLTA. **Chroma meter instruction manual**, 1991.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 5 ed. Arizona: John Wiley & Songs Ltd., 2012. 684p.

MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 1477–1491, 2006.

MOTTA, J. D.; QUEIROZ, A. J. D. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. DE. Índice de cor e sua correlação com parâmetros físicos e físico-químicos de goiaba , manga e mamão. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 74–82, 2015.

NIKKHAH, E. et al. **Effect of sugar treatment on stability of anthocyanin pigments in berriesJournal of Biological Sciences**, 2007.

NISHAD, P. M.; MANICKA CHEZIAN, R. Various Colour Spaces and Colour Space Conversion. **Journal of Global Research in Computer Science**, v. 4, n. 1, p. 44–48, 2013.

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELab parameters in red wines. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 301–306, 2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003.

PRODANOV, M. P. et al. Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 585–596, 2005.

QUADRI, M. B. Aplicativo para cálculo de cor em diversos sistemas a partir de aquisição digital. Não publicado. 2005.

ROCHA, D. S.; REED, E. Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde. **Estudos**, v. 41, n. 1, p. 76–85, 2014.

ROSSI, T. **Corantes naturais: fonte, aplicações e potenciais para uso da madeira**. IPEF-Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, 2008. Disponível em: <www.ipef.br/tecprodutos/corantes.asp>. Acesso em: 20 jun. 2017.

SANTOS, G. R.; DIAS, S.S.; CONSTANT, P.B.L.; SANTOS, J. A. B. Caracterização físico-química do repolho roxo (*Brassica oleracea*). **Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica**, v. 1, p. 758–770, 2013.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos,** Campinas, v. 3, n. 2, p. 6-24, jun. 2007.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products: properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SCHUMANN, S. P. A.; POLÔNIO, M. L. T.; GONÇALVES, E. C. B. A. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 28, n. 3, p.534-539, set. 2008.

SOUTO, R. P. Segmentação de imagem multiespectral utilizando-se o atributo matiz. **Inpe**, p. 173, 2003.

SPENCE, C. On the psychological impact of food colour. **Flavour**, v. 4, n. 1, p. 21, 2015.

STREIT, N. M. et al. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.

TOOR, R. K.; SAVAGE, G. P. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 90–97, 2006.

TRAVIS, A. S. Mauve, Its Impact, and Its Anniversaries. **Bulletin for the History of Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 35–44, 2007.

UENOJO, M.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.

VANRELL, M. et al. Induction operators for a computational colour–texture representation. **Computer Vision and Image Understanding**, v. 94, n. 1–3, p. 92–114, 2004.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 157–166, 2009.

WENDT, S. C. **Análise da mudança de cor em concretos submetidos a altas temperaturas como indicativo de temperaturas alcançadas e da degradação térmica**. 2006. 186 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.