



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Laboratório de Separações Físicas - LASEFI

**OBTENÇÃO DE EXTRATO DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe) COM
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E CO-SOLVENTES: UM ESTUDO
DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS**

Kelly Cristine Zancan
Engenheira Química, 1998 (UFRGS)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por **Kelly Cristine Zancan**
aprovada pela Comissão
Julgadora em 19 de junho de
2001.

Tese de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do título de MESTRE
EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

Campinas, 19 de junho de 2001

Profa. Dra. **Maria Angela A. Meireles**
Presidente da Banca

Campinas – São Paulo
Maio - 2001



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Z150
V.	Ex.
TOMBO BC/	45948
PROC.	10-392/01
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	11-08-01
N.º CPD	

CM00158576-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Z150 Zancan, Kelly Cristine
Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes: um estudo da atividade biológica dos extratos / Kelly Cristine Zancan. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

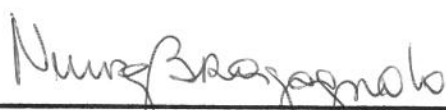
Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Gengibre. I.Meireles, Maria Angela de Almeida.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Maria Angela de Almeida Meireles (orientadora)
(FEA/UNICAMP)



Prof.^a Dra. Neura Bragagnolo (membro)
(FEA/UNICAMP)



Prof. Dr. Luiz Antônio Viotto (membro)
(FEA/UNICAMP)

Prof.^a Dra. Telma Teixeira Franco (suplente)
(FEQ/UNICAMP)

DAS UTOPIAS

**Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!**

“As pessoas que vencem neste mundo são aquelas que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

“De tudo ficaram 3 coisas:

A certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro. Fica a promessa do reencontro... Fica o desejo de boa sorte...

Fica a vontade de que lutes e venças.”

Fernando Sabino

Dedico

*Aos meus pais, Luiz
Carlos e Gelcy, e ao meu
irmão Luís Carlos
Pela presença, abraço,
carinho, dedicação,
amor e apoio que me
fizeram ter coragem e
determinação na busca
de meus ideais. Meu
muito obrigado!*

Dedico

*Ao meu noivo, Neverton,
Por todo carinho,
atenção,
paciência,
incentivo,
amizade,
confiança,
companheirismo,
compreensão e
amor.*

*Pela palavra certa na
hora certa. Por confiar
em mim até mesmo
quando eu duvidava.
Obrigada por me fazer
tão feliz!*

Agradeço

A minha “família paulista”, Célia, Romulo, Gláucia e Bárbara pela guarida e pelo porto seguro, por todo carinho e amor .

Talvez vocês nem imaginem o alcance de sua presença nem a importância do seu apoio. A vocês minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Às irmãs que fiz, Gláucia, Raquel e Junko por todo carinho, apoio, incentivo, confiança. A vocês que contribuíram comigo e juntas riram, choraram, sofreram, mas tiveram sempre nos lábios uma palavra de coragem, que é uma das causas de felicidade hoje. Obrigada por tudo!

À prof^a. Dra. Maria Angela Meireles pela orientação, apoio, confiança e incentivo durante a realização deste trabalho. Mas, principalmente pelo meu crescimento profissional. Muito obrigada!

À Dra. Márcia O. M. Marques pela ajuda para a identificação e isolamento dos extratos, mas principalmente pelo incentivo, apoio e amizade. Muito obrigada!

Aos professores da banca examinadora pelas valiosas sugestões.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Ao prof. Dr. Kil Park e ao Ms. Fernando Brod da Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP pelo apoio durante a secagem do gengibre.

Ao pessoal da Tecnologia de Alimentos da FEA/UNICAMP pelo empréstimo da câmara fria.

À Ms. Dayse Sato do Instituto Adolfo Lutz de Riberão Preto pela realização dos testes de ação bactericida e pelo carinho.

A todas as pessoas que doaram sangue para a realização dos testes de peroxidação lipídica. Muito obrigada pela colaboração.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Biologia da Unicamp, Maristela Cesquini, Graziela Stozza, Erika Romam pela ajuda para a realização dos testes de peroxidação lipídica, carinho e amizade. Ao prof. Dr. Márcio Torsoni pela orientação durante a realização destes testes.

À aluna de iniciação científica Patrícia Leal pela ajuda durante a realização dos testes de oxidação acoplada do ácido linoléico/ β -caroteno.

Ao prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do CPQBA/UNICAMP pela realização dos testes anticâncer.

Ao Dr. João Feijão Teixeira e a Dra. Cássia Regina Limonta Carvalho do IAC de Campinas pelas valiosas dicas e sugestões para este trabalho. Muito obrigada pela ajuda!

Ao técnico do LASEFI, Ari, por toda a ajuda e incentivo durante a realização deste trabalho. Valeu Ari!

À Roselaine Facanali pela ajuda para a identificação das substâncias e isolamento dos extratos, carinho e amizade.

Aos colegas do laboratório por todos momentos que desfrutamos juntos, tenham sido eles alegres ou tristes. Agradeço pelos momentos de descontração, trabalho e solidariedade.

Aos meus colegas e amigos que fiz deixo o meu muito obrigado pelo incentivo, apoio e por todos os momentos felizes que compartilhamos.

Índice

RESUMO	XXVII
ABSTRACT	XXIX
1 - INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	5
2.1.1 - <i>Propriedade dos Fluidos Supercríticos</i>	7
2.1.2 - <i>Dióxido de Carbono Supercrítico</i>	8
2.1.3 - <i>Co-Solvente</i>	9
2.1.4 - <i>Curvas e Cinética de Extração</i>	11
2.2 - GENGIBRE	13
2.2.1 - <i>Descrição Botânica</i>	14
2.2.2 - <i>Composição Química</i>	15
2.3 – ANTIOXIDANTES	18
2.3.1 - <i>Gingeróis</i>	20
3 - MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 - PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E DO LEITO	23
3.1.1 - <i>Secagem</i>	23
3.1.2 - <i>Determinação da Umidade</i>	24
3.1.3 - <i>Determinação do Tamanho das Partículas</i>	25
3.1.4 - <i>Determinação da Densidade Real</i>	25
3.1.5 - <i>Determinação da Densidade Aparente</i>	26
3.2 - EQUIPAMENTOS	26
3.2.1 - <i>Procedimento de Extração</i>	28
3.3 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	29
3.4 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	30
3.5 – ISOLAMENTO DOS GINGERÓIS E SHOAGAÓIS	30
3.6 - ANÁLISE DO EXTRATO	31
3.6.1 - <i>Análise por Espectrofotometria</i>	31
3.6.2 - <i>Análise por Cromatografia Gasosa /Espectrometria de Massas</i>	31
3.6.3 - <i>Peroxidação Lipídica da Membrana Celular</i>	32
3.6.4 - <i>Oxidação Acoplada do Ácido Linolêico e do β-Caroteno</i>	32
3.6.5 - <i>Ação Anticancerígena</i>	33
3.6.6 - <i>Ação Bactericida</i>	33
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 TESTES PRELIMINARES	35
4.1.1 - <i>Extração</i>	35
4.1.2 - <i>Cromatografia em Camada Delgada</i>	36
4.1.3 - <i>Peroxidação Lipídica da Membrana da Hemoglobina</i>	36
4.2 - CINÉTICA DE EXTRAÇÃO	37
4.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.3.1 - M_{CER}	39
4.3.2 - R_{TOTAL}	40
4.3.3 - Y_{CER}	42
3.2 - COMPOSIÇÃO DO ÓLEO	43
3.2.1 - <i>Cromatografia Gasosa</i>	43
3.2.1 - <i>Quantificação da Mistura Gingeróis e Shogaóis por Espectrofotometria de UV/ Visível</i>	50

4.3- AÇÃO ANTIOXIDANTE	52
4.3.1 - Peroxidação da Membrana Lipídica da Hemoglobina	52
4.3.2 -Oxidação acoplada do Ácido Linoléico e do β -caroteno	53
4.4 - AÇÃO ANTICANCERÍGENA	56
4.5 - AÇÃO BACTERICIDA	57
5 - CONCLUSÕES	59
SUGESTÕES	61
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO A	71
TREINAMENTO	71
ANEXO B	73
DADOS DOS EXPERIMENTOS	73
Experimento 1	73
Experimento 2	74
Experimento 3	75
Experimento 4	76
Experimento 5	77
Experimento 6	78
Experimento 7	79
Experimento 8	80
Experimento 9	81
Experimento 10	82
Experimento 11	83
Experimento 12	84
ANEXO C	85
PROGRAMA DE AJUSTE LINEAR – SAS 6.12	85
ANEXO D	86
PROGRAMA DE AJUSTE NÃO LINEAR – SAS 6.12	86
ANEXO E	88
SAÍDA DO PROGRAMA DE AJUSTE NÃO LINEAR - SAS 6.12	88
ANEXO F	101
CROMATOGRAMAS	101
ANEXO G	104
ESPECTRO DE UV	104
ANEXO H	107
CROMATOGRAFIA DE PLACA	107

Índice de Figuras

FIGURA 2.1: Diagrama de fases de uma substância pura. (1) curva de equilíbrio sólido-gás; (2) curva de equilíbrio sólido-líquido; (3) curva de equilíbrio líquido-gás; (4) ponto crítico.....	6
FIGURA 2.2: Rizomas de gengibre.....	14
FIGURA 2.3: Estrutura química dos gingeróis (a) E shogaóis (b).....	21
FIGURA 3.1: Desenho esquematizado do secador utilizado para a secagem dos rizomas de gengibre [BROD, 2000].....	24
FIGURA 3.1: Unidade de extração supercrítica.....	27
FIGURA 3.2: Célula extratora e do aparelho utilizado para empacotamento do leito.....	27
FIGURA 3.3: Fluxograma do extrator utilizado.....	28
FIGURA 3.4: Distribuição granulométrica utilizada durante todos os ensaios.....	29
FIGURA 4.1: Comparação entre os modos de pressurização do leito. ■ Sem Período estático e com pressurização intermitente; □ Com período estático e pressurização contínua. Ambas as extrações a 250 bar e 35°C.....	36
FIGURA 4.2: Teste Antioxidante de uma fração da fase difusional obtido por MONTEIRO em 1997.....	37
FIGURA 4.3: Curvas de extração do gengibre correspondentes aos maiores valores de rendimento total nas condições: CO ₂ /200 bar/35°C (▲), CO ₂ e etanol/200bar/35°C (□), CO ₂ e isopropanol/250bar/35°C (O).....	39
FIGURA 4.4: Interação entre P e Q _{solv}	40
FIGURA 4.5: Efeito da temperatura sobre R _{TOTAL}	41
FIGURA 4.6: Interação entre P e Q _{solv} para R _{TOTAL}	42
FIGURA 4.7: Comportamento da ação antioxidante de extrato do gengibre variando-se a concentração deste para uma concentração fixa de agente oxidante (TBOOH) igual a 500 µM.....	53
FIGURA 4.8: Ação antioxidante dos extratos de gengibre obtidos com CO ₂ + EtOH, onde (a) E1 (200 bar/25°C), (b) E2 (200 bar/35°C), (c) E3 (250 bar/25°C) e (d) E4 (250 bar/35°C). ◆: controle; ■ F2, primeira hora de extração, correspondente a taxa constante de extração, ▲: F4, segunda hora de extração, correspondente a taxa decrescente de extração; ●: F9, quarta hora e meia de extração, para (a), (c) e (d) e F13, sexta hora e meia de extração para (b), correspondente a fase difusional da extração.....	54
FIGURA 4.9: Comparação entre a ação antioxidante de cada extrato de gengibre coletado para a condição de 200 bar/ 25°C e etanol 1,17% (m/m) e a massa pontual. Os extratos coletados com 270 minutos e 300 minutos foram os únicos não analisados nesta condição de extração.....	55
FIGURA 4.10: Comparação entre o comportamento das diferentes linhagens de câncer testadas com a variação da concentração de extrato de gengibre. NCI640: câncer de pulmão; K562: leucemia; UACC62: melanoma; MCF7: câncer de mama; NCIADR: câncer de mama resistente.....	56
FIGURA A.1: Curva de extração do cravo.....	71
FIGURA A.2: Curva de extração do gengibre.....	72
FIGURA B.1: Curva de extração do experimento 1.....	73
FIGURA B.2: Curva de extração do experimento 2.....	74
FIGURA B.3: Curva de extração do experimento 3.....	75
FIGURA B.4: Curva de extração do experimento 4.....	76
FIGURA B.5: Curva de extração do experimento 5.....	77
FIGURA B.6: Curva de extração do experimento 6.....	78
FIGURA B.7: Curva de extração do experimento 7.....	79
FIGURA B.8: Curva de extração do experimento 8.....	80
FIGURA B.9: Curva de extração do experimento 9.....	81
FIGURA B.10: Curva de extração do experimento 10.....	82
FIGURA B.11: Curva de extração do experimento 11.....	83
FIGURA B.11: Curva de extração do experimento 12.....	84
FIGURA F.1: Cromatograma da fase de taxa crescente de extração (CO ₂ /200 bar/25°C).....	101
FIGURA F.2: Cromatograma da fração retida na coluna de porapack na fase de taxa crescente de extração (CO ₂ /200 bar/25°C).....	101
FIGURA F.3.: Cromatograma da fase de taxa decrescente (CO ₂ /200 bar/ 25°C).....	102

FIGURA F.4: Cromatograma da fração retida na coluna de porapak na fase de taxa decrescente de extração (CO ₂ /200 bar/25°C).	102
FIGURA F.5: Cromatograma da fase difusional (CO ₂ /200bar/25°C).	103
FIGURA F.6: Cromatograma da fração retida na coluna de porapak na fase difusional (CO ₂ /200 bar/25°C).	103
FIGURA G.1: Espectros de UV da condição de extração CO ₂ + Etanol/250bar/25°C. De (a) até (c) fase constante de extração; de (d) até (f) fase decrescente de extração; (a) 30 minutos; (b) 1h; (c) 1,5 h; (d) 2h; (e) 2,5 h; (f) 3 h.	104
FIGURA G.2: Espectros de UV da condição de extração CO ₂ + Etanol/250bar/25°C. De (a) até (f) fase difusional; (a) 4h; (b) 4,5 h; (c) 5,5 h; (d) 6h; (e) 6,5 h; (f) 7 h.	105
FIGURA G.3: Curva de calibração para quantificação dos da mistura de gingeróis e shogaóis nos extratos de gengibre em 280 nm.	106
FIGURA H.1: Cromatografia de placa delgada dos extratos de gengibre. Eluentes: (a) Hexano puro; (b) 60% Hexano e 40% Acetato de etila; (c) 80% Hexano e 20% Acetato de etila.	107

Índice de Tabelas

TABELA 2.1: Características gerais do dois tipos de gengibre brasileiro.....	13
TABELA 2.2: Composição química da oleoresina de gengibre obtida com solventes orgânicos [NOBREGA et al., 1997].....	17
TABELA 4.1: Característica do leito.....	37
TABELA 4.2: Condições experimentais, rendimento total e dados para taxa constante de extração (CER).....	38
TABELA 4.3: Médias ajustadas para M_{CER}	40
TABELA 4.4: Médias ajustadas de RTOTAL para temperatura.....	41
TABELA 4.5: Médias ajustadas para P e Q_{solv}	42
TABELA 4.6: Composição química da fração F1 do período de taxa constante de extração.....	44
TABELA 4.7: Composição química da fração F2 do período de taxa decrescente de extração.....	45
TABELA 4.8: Composição química da fração F5 da fase difusional.....	46
TABELA 4.9: Composição química da fração P1 do período de taxa constante de extração.....	47
TABELA 4.10: Composição química da fração P2 do período de taxa decrescente de extração.....	48
TABELA 4.11: Composição química da fração P3 da fase difusional.....	49
TABELA 4.12: Comparação entre a proporção relativa de óleo essencial mistura de gingeróis e shogaóis e a concentração dos compostos antioxidantes por UV/Visível.....	51
TABELA 4.13: Porcentagens máximas de inibição da peroxidação lipídica da hemoglobina e respectivas concentrações do extrato de gengibre.....	53
TABELA 4.14: Ação Antioxidante (AA) dos extratos de gengibre para 3 horas de reação.....	55
TABELA 4.15: Concentrações mínimas ($\mu\text{g/ml}$), MIC, de inibição dos extratos avaliados.....	57
TABELA B.1: Experimento realizado a 200 bar e 25°C com CO_2 e vazão experimental de $5,87 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	73
TABELA B.2: Experimento realizado a 200 bar e 35°C com CO_2 e vazão experimental de $5,9 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	74
TABELA B.3: Experimento realizado a 250 bar e 25°C com CO_2 e vazão experimental de $5,91 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	75
TABELA B.4: Experimento realizado a 250 bar e 35°C com CO_2 e vazão experimental de $5,87 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	76
TABELA B.5: Experimento realizado a 200 bar e 25°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,85 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	77
TABELA B.6: Experimento realizado a 200 bar e 35°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,77 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	78
TABELA B.7: Experimento realizado a 250 bar e 25°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,77 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	79
TABELA B.8: Experimento realizado a 250 bar e 35°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,77 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	80
TABELA B.9: Experimento realizado a 200 bar e 25°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,92 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	81
TABELA B.10: Experimento realizado a 200 bar e 35°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,8 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	82
TABELA B.11: Experimento realizado a 250 bar e 25°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,8 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	83
TABELA B.12: Experimento realizado a 250 bar e 35°C com CO_2 e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,73 \cdot 10^5 \text{ kg CO}_2/\text{s}$	84
TABELA G.1: Curva de calibração para a quantificação da mistura de gingeróis e shogaóis nos extratos de gengibre a 280 nm.....	106

TESE DE MESTRADO

Título: Obtenção de Extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes: um estudo da atividade biológica dos extratos

Aluna: Kelly Cristine Zancan

Orientador: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
DEA/FEA – UNICAMP

RESUMO

O gengibre e seus produtos tais como o óleo essencial e oleoresina são internacionalmente comercializados para uso nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. O óleo essencial possui os compostos mais voláteis responsáveis pelo aroma característico do gengibre e a oleoresina contém além destes, substâncias classificadas como pungentes. Algumas destas substâncias pungentes agem como importantes antioxidantes. Atualmente, antioxidante obtidos a partir de fontes naturais são associados a benefícios para saúde humana, uma vez que os radicais livres estão relacionados com doenças do coração, malária, AIDS, câncer, neurodegenerativas entre outras. Devido a isso torna-se muito importante o estudo de novos antioxidantes. O uso da extração supercrítica tem crescido muito nos últimos anos, entretanto ainda é necessária a obtenção de um número considerável de informações experimentais para que a construção de plantas industriais deste tipo de processo aconteça. Neste trabalho os efeitos da temperatura (25 e 35°C), pressão (200 e 250 bar) e o uso de co-solventes (etanol e isopropanol, ambos a 1,17% (m/m)) sobre o rendimento total e a cinética de extração da oleoresina de gengibre foram estudados. O equipamento utilizado consistiu de um extrator de leito fixo com diâmetro de $2,83 \times 10^{-2}$ m e comprimento de 0,375 m. Os ensaios foram realizados com vazão média de CO_2 de $5,83 \times 10^{-5}$ kg/s. Os experimentos tiveram 7 horas de duração. A duração do período de taxa constante de extração variou de 1,3 a 2,7 horas e os rendimentos ficaram na faixa de 1,93% a 2,65%. A identificação das substâncias presentes na oleoresina foi feita através de CG/EM. Os extratos de gengibre analisados mostraram-se antioxidantes eficazes,

possuíram ação anticancerígenas para algumas linhagens de câncer e inibiram o crescimento de algumas bactérias aqui estudadas. A espectrofotometria mostrou-se inadequada para a quantificação dos gingeróis e shogaóis. Os extratos do período de taxa constante e de taxa decrescente de extração apresentaram monoterpenos, sesquiterpenos, gingeróis e shogaóis em sua composição, enquanto o período difusional mostrou principalmente gingeróis e shogaóis.

Palavras chaves: gengibre, gingeróis, shogaóis, ação antioxidante, extração supercrítica, co- solventes.

MASTER DEGREE THESIS

Title: Obtention of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extract with CO₂ and Co-solvents: a study of biological action of the extracts

Author: Kelly Cristine Zancan

Supervisor : Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
DEA/FEA – UNICAMP

ABSTRACT

Ginger and ginger products such as essential oil and oleoresin are internationally commercialized for use in food and pharmaceutical processing. The essential oil possesses the volatile compounds responsible for the characteristic ginger flavor and the oleoresin contains also substances classified as pungent. Some of these pungent substances act as important antioxidant agents. Today, antioxidants from natural resources are associated with health benefits since oxygenated compounds are related to a positive action against heart diseases, malaria, neurodegenerative, AIDS, cancer. The use of SCFE in the last years has increased steadily but yet a number of experimental information needed for process design is still lacking. In this work the effects of temperature (25 and 35°C), pressure (200 e 250 bar), and the use of co-solvent (ethanol and isopropanol, both at 1,17% (m/m)) on the total yield (mass of oleoresin/ mass of feed) and the kinetics of ginger oleoresin extraction studied. The experimental setup used has a fixed bed extractor with a diameter $2,83 \times 10^{-2}$ m and length of 0,375 m. The assays were done at a CO₂ flow rate of $5,23 \times 10^{-5}$ kg/s. Typical experimental runs took 7 hours. The duration of the constant extraction rate period ranged from 1,3 to 2,7 hours and the yields varied from 1,93 to 2,65%. The identification of the substances presents in the extracts was done by GC/MS. The extracts analysed showed a powerful antioxidants. They also had an action against some kinds of cancer and some bacteria here studied. Spectrophotometry showed not adequate for gingerol and shogaol quantification. The extracts of the constant rate extraction period and the decrescent rate

extraction period presented of monoterpenes, sesquiterpenes, gingerols and shogaols in their composition while the extracts of diffusion period showed mainly gingerols and shogaols.

Keywords: ginger, gingerols, shogaols, antioxidant action, supercritical extraction, co-solvents.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), planta da família Zingiberaceae originária do Sudeste Asiático, foi uma das primeiras especiarias a ser conhecida na Europa por volta do século IX.

O emprego principal dos produtos de gengibre (em pó, óleo essencial e oleoresina) é na indústria de alimentos como ingredientes de diversas formulações para molhos, sopas, embutidos e em produtos de padaria e confeitaria. Cerca de 5% do gengibre seco é utilizado na indústria de perfumaria e farmacêutica, sendo entretanto o óleo essencial e a oleoresina preferidos nesse segmento. A indústria de bebidas alcoólicas e não alcoólicas também consome preferencialmente o óleo essencial e a oleoresina.

O maior volume do comércio internacional de gengibre processado é o do produto seco. A média anual de importação foi de 14.000 t no período de 1976-1980, destacando-se como importadores EUA (3.800 t), Grã-Bretanha (3.300 t), Arábia Saudita (2.300 t), Japão (2.000 a 2.500 t), Alemanha (1.000 t) e Canadá (650 t). Já em 1992, esse comércio foi estimado em 15 a 20.000 t [TAVEIRA MAGALHÃES *et al.*, 1997].

O gengibre brasileiro é comercializado no estado fresco e se destina principalmente à exportação. Estados Unidos, Grã-Bretanha, Holanda e Canadá são os maiores importadores de rizoma de gengibre brasileiro. De 73 t em 1972, a exportação de gengibre alcançou 3.800 t em 1985, estabilizando-se e voltando a crescer a partir de 1993 (6.721 t em 1994), com o preço médio chegando a US\$ 1,04/ kg em 1995 [TAVEIRA MAGALHÃES *et al.*, 1997].

O comércio internacional dos rizomas de gengibre é feito sob três formas básicas: gengibre em conserva ou cristalizado e gengibre fresco. Além dos rizomas, o gengibre também é comercializado sob a forma de produtos derivados como o óleo essencial e a oleoresina. O óleo essencial é obtido pelo processo geral de extração de óleos essenciais, isto é, destilação com arraste de vapor d'água do gengibre seco que contém os componentes voláteis responsáveis pelo aroma, enquanto a oleoresina, preparada por extração com diferentes solventes, contém, além dos constituintes voláteis, os componentes não voláteis, responsáveis pela pungência característica do gengibre.

Em cada um destes processos existem problemas associados com a temperatura elevada (destilação por arraste a vapor) e pelo uso de solventes (extração com solvente). No primeiro caso, ocorrem perdas dos componentes mais voláteis, assim como dos compostos que conferem as características do sabor e da fragrância presentes no gengibre. No segundo caso, a remoção completa do solvente é praticamente impossível o que em certos casos pode alterar as características de sabor e odor dos extratos.

Extração de produtos naturais com dióxido de carbono supercrítico efetivamente resolveu os problemas relacionados com as altas temperaturas e do uso de solventes, isto porque, neste tipo de técnica as temperaturas são baixas e o solvente utilizado é completamente eliminado ao final do processo. Pode-se também citar as vantagens de utilizar-se o dióxido de carbono como solvente, tais como, baixo custo, atóxico e não inflamável. Este tipo de processo possui características potencializadoras a transferência de massa.

A autooxidação em alimentos e sistemas biológicos têm várias implicações não somente para a saúde e nutrição dos seres humanos, mas também as áreas de ciência e tecnologia de alimentos. A geração de radicais livres em sistemas biológicos causam o aumento do estresse oxidativo. Estudos mostram que o estresse oxidativo exerce grande influência nas doenças neurodegenerativas, do coração, malária, AIDS, câncer e no processo de envelhecimento. Os antioxidantes exercem um grande papel na prevenção ou

eliminação da autoxidação e tem atraído especial atenção como aditivos de alimentos. Ambos antioxidantes naturais e sintéticos são muito utilizados em uma série de produtos alimentícios, existindo ainda muitos artigos e patentes publicados sobre aplicações, a síntese e descoberta de novos antioxidantes. O uso de antioxidantes naturais na medicina preventiva e terapêutica tem ganho notoriedade. Entretanto, o uso de antioxidantes comuns é preocupante devido a sua toxicidade, por esse motivo muitas pesquisas tem sido feitas com plantas para a descoberta de antioxidantes naturais, entre estas destaca-se o gengibre. Os gingeróis presentes no gengibre têm a características de aumentar a resposta imunológica dos seres humanos, assim como de serem poderosos antioxidantes.

Este trabalho visou a extração da oleoresina de gengibre com dióxido de carbono supercrítico e os cosolventes etanol e isopropanol ambos a 1.17% (m/m), a análise do perfil cromatográfico, bem como a análise do poder antioxidante dos extratos obtidos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Extração Supercrítica

O primeiro relato da existência de uma fase supercrítica foi realizado pelo Barão Cagniard em 1822 [PELLERIN, 1991]. Ele observou o desaparecimento das fases líquido-vapor quando a temperatura de certos materiais aumentava devido ao aquecimento em um recipiente de vidro fechado. A partir destes experimentos iniciais, o ponto crítico de uma substância pode ser descoberto [TAYLOR, 1996]. Em 1879 Hannay e Hogart realizaram os primeiros estudos sobre o poder de solvatação dos fluidos supercríticos. Estes estudaram a solubilidade do cloreto de cobalto (II), cloreto de ferro (III), brometo de potássio e iodeto de potássio em etanol supercrítico ($T_c=243^{\circ}\text{C}$, $P_c= 63.83 \text{ bar}$) e descobriram que as concentrações destes metais em etanol supercrítico eram bem mais elevadas se comparadas com a situação do solvente abaixo do ponto crítico [TAYLOR, 1996]. Em 1939 a primeira patente nesta tecnologia para concentração de suco de frutas foi registrada. E ainda entre os anos 1963 e 1972 o Instituto de Pesquisa de Krasnodar (antiga USSR) extraiu oitenta tipos diferentes de plantas usando fluidos supercríticos [PELLERIN, 1991].

Nos anos 1970 o interesse em extração supercrítica cresceu muito devido ao aumento da preocupação com os perigos de uma extração convencional com solventes [PAULAITIS *et al.*, 1983]. Nessa década ainda começaram a surgir processos de extração da cafeína do café com o uso de dióxido de carbono supercrítico. E desde 1980 há um grande desenvolvimento desta tecnologia para a extração do colesterol da manteiga, de aromas e sabores de produtos naturais, de corantes e óleos de plantas, de solventes e monômeros residuais de polímeros, de nicotina, e de ácidos graxos insaturados de óleo de peixe [TAYLOR, 1996].

Em um processo de extração supercrítica faz-se importante o conhecimento das propriedades do fluido supercrítico que será utilizado. A região de fluido supercrítico está limitada para valores de temperatura reduzida (T_r) entre 0,9 e 1,2 e pressão reduzida (P_r) maior do que 1 [PAULAITIS *et al.*, 1983; FERREIRA, 1996]. A figura 2.1 mostra o diagrama de equilíbrio para uma substância pura. Neste diagrama de pressão e temperatura existem três linhas que correspondem aos fenômenos de sublimação, evaporação e fusão. Estas mesmas linhas definem também os estados sólido, líquido e gasoso. Pontos ao longo das linhas, ou seja, entre as fases, definem os equilíbrios entre as mesmas. A região crítica tem sua origem no ponto crítico e neste ponto define-se fluido supercrítico qualquer substância que esteja acima do ponto crítico. A temperatura crítica (T_c) é a maior temperatura na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. E pressão crítica (P_c) define-se como sendo a maior pressão na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura [TAYLOR, 1996].

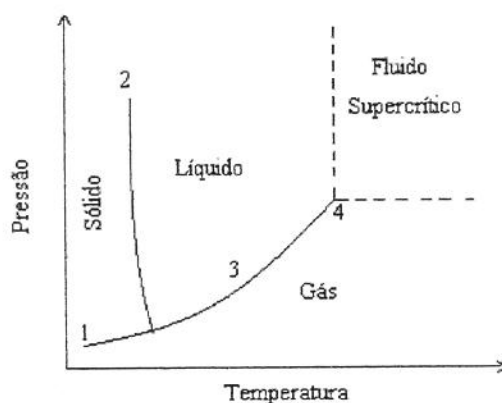


Figura 2.1: Diagrama de fases de uma substância pura. (1) curva de equilíbrio sólido-gás; (2) curva de equilíbrio sólido-líquido; (3) curva de equilíbrio líquido-gás; (4) ponto crítico.

Na extração de produtos de um substrato sólido, com fluidos supercríticos, o fluido é forçado a passar através do sólido, de baixo para cima, ocupando todos os espaços vazios do leito. A distribuição das substâncias a serem extraídas do sólido depende de como estas estão adsorvidas no material inerte, dentro dos poros ou nas células do sólido. Portanto uma

série de fatores deve ser levada em consideração na modelagem da extração da substância do substrato sólido, principalmente para produtos vegetais onde o extrato é uma mistura complexa de substâncias de solubilidades diferentes, que interagem entre si, e podem estar ligadas à matriz sólida de formas diferentes [FRANÇA, 1999].

Segundo BRUNNER [1994] a extração dos compostos solúveis do vegetal acontece em diferentes etapas.

1. A matriz sólida adsorve o solvente supercrítico, dilatando a estrutura das células ou aumentando o tamanho das membranas das células e o canais intercelulares, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua;
2. Ao mesmo tempo ocorre a dissolução dos compostos extraíveis pelo solvente;
3. Os compostos solubilizados são transferidos por difusão de dentro do sólido até a sua superfície ;
4. Os compostos solubilizados atingem a superfície externa;
5. Ocorre a transferência, das substâncias dissolvidas, da superfície para o seio do solvente supercrítico;
6. Remoção dos compostos dissolvidos do extrator.

2.1.1 – Propriedades dos Fluidos Supercríticos

As propriedades dos fluidos supercríticos são de interesse, por serem significativamente diferentes das dos líquidos e gases na região próxima ao ponto crítico, o que favorece muito as taxas de transferência de massa neste tipo de processo.

Na região situada logo acima do ponto crítico, com valores de T_r compreendidos entre 1,0 e 1,6, pequenas oscilações na pressão e/ou temperatura acarretam grandes variações na densidade. Entretanto, o mesmo não acontece para valores de T_r maiores que 1,6, uma vez que a influência desta nesta região é menor, necessitando-se, portanto de valores elevados de pressão para se obter mudanças significativas na densidade. As densidades de um fluido supercrítico assemelham-se às do estado líquido, podendo ser até cerca de 100 vezes maior que as densidades dos gases [BOOT, 1982; FERRUA, 1993].

Segundo BRODKEY [1988] a viscosidade para fluidos supercríticos diminui com o aumento da temperatura, já que o fluido encontra-se na região de altas densidades. A determinação dos valores de viscosidade faz-se importante para o cálculo das taxas de transferência de massa do soluto para o solvente [BRUNNER, 1994].

O poder de dissolução dos fluidos está relacionado com sua densidade e portanto, o poder de solvatação de um solvente puro na região supercrítica pode ser modificado por alterações na pressão e temperatura do processo, e assim pode-se alterar a seletividade de solvente para determinadas substâncias presentes no soluto. Os fluidos supercríticos apresentam também elevados valores de difusividade, o que auxilia na difusão do mesmo em matrizes sólidas, facilitando a dissolução dos solutos [RODRIGUES, 1996].

2.1.2 - Dióxido de Carbono Supercrítico

O dióxido de carbono supercrítico apresenta a densidade de um líquido, baixa viscosidade e difunde como um gás. Este é um excelente solvente para uma grande variedade de substratos naturais. A seletividade da extração de um dado substrato pode ser alcançada pela variação de temperatura e de pressão dentro da região supercrítica [PELLERIN, 1991].

A seguir estão algumas das muitas razões do porque utilizar-se dióxido de carbono como solvente de uma extração supercrítica.

1. Temperatura crítica: 31°C. As extrações podem ser conduzidas a temperaturas que não alterem as características sensorias do extrato [PELLERIN, 1991] e que não promovam a degradação de substâncias por reações de oxidação, isomerização, condensação, esterificação e desidratação [BARTLEY, 1995; PELLERIN, 1991].
2. Pressão crítica: 73,8 bar. Fácil de ser atingida para operação.
3. Inerte: Não ocorrência de reações secundárias, tais como oxidação.
4. Seguro: O dióxido de carbono é um material inofensivo com significativo uso em bebidas não alcoólicas [PELLERIN, 1991]; apresenta problemas mínimos de poluição ambiental [BARTLEY & FOLEY, 1994]; além dos riscos com acidentes serem reduzidos comparados ao solventes tradicionalmente utilizados nas indústrias, tais como hexano, acetona.
5. Baixo custo [BARTLEY & FOLEY, 1994].

2.1.3 - Co-Solvente

Mesmo a altas densidades, o dióxido de carbono possui limitada habilidade de dissolver moléculas polares, característica esta que pode ser modificada pela adição de pequenas quantidades de substâncias polares, tais como água e etanol. Estes parâmetros ainda podem ser alterados pela seleção de condições específicas de temperatura e de pressão. Estas condições acrescentam flexibilidade e ainda adaptam-se às condições de extração para os requisitos específicos do extrato a ser produzido e do produto final desejado [PELLERIN, 1991]. O componente adicionado é referido na literatura como modificador ou co-solvente. Estas substâncias, que são líquidas sobre condições ambientes,

têm sido usadas extensamente para alterar as propriedades de solvatação dos fluidos supercríticos [TAYLOR, 1996].

Solubilidade de sólidos pode ser modificada pela adição de pequenas concentrações de um solvente não polar (octano e propano, por exemplo) ou de um solvente polar (acetona, metanol, por exemplo). O dióxido de carbono possui uma pequena polaridade e nenhum momento dipolar, portanto o uso de modificadores aumenta a polaridade do solvente e a constante dielétrica. Co-solventes polares ainda interagem com os grupos funcionais do soluto facilitando a maior extração do mesmo. A utilização de um modificador pode aumentar a solubilidade do soluto, embora o aumento desta propriedade dependa da concentração do co-solvente [CHARPENTIER & SEVENANTS, 1987].

A temperatura e pressão críticas são afetadas pela incorporação de um modificador ao dióxido de carbono supercrítico. A temperatura crítica deste solvente modificado situa-se entre os valores desta para as substâncias puras. O valor de pressão crítica usualmente demonstra um valor máximo para composições intermediárias entre aquelas encontradas para o dióxido de carbono e o modificador puro [TAYLOR, 1996].

BADALYAN *et al.* [1998] observaram que o uso de etanol como co-solvente na extração de oleoresina de gengibre australiano resultou num maior rendimento da extração quando comparado com o uso de dióxido de carbono puro. MONTEIRO *et al.* [1997] concluíram que o uso de etanol como co-solvente, em termos de rendimento, é mais eficiente do que o uso de dióxido de carbono puro na extração de materiais solúveis da casca do fruto bacuri (*Platonia insignis Mart*) assim como DUNFORD & TEMELLI [1995] observaram para a extração supercrítica de fosfolipídios de canola.

BATH *et al.* [1996] determinaram como condições ótimas para a extração supercrítica de α e β -carotenos a partir de cenoura (*Daucus carota L.*) com dióxido de carbono: pressão 303,98 bar, temperatura 50°C e 10% de etanol como co-solvente.

CYGNAROWICZ & SEIDER [1990] estudaram o projeto e o controle do processo de extração de β -carotenos com dióxido de carbono supercrítico. Neste trabalho concluíram que fazendo uso de 1% de etanol como co-solvente, o custo da planta caía em 75% em comparação com o dióxido de carbono puro.

2.1.4 - Curvas e Cinética de Extração

Do ponto de vista industrial, a otimização de processos que envolvam fluidos supercríticos requer o conhecimento das propriedades termodinâmicas, solubilidade e seletividade, bem como a taxa de transferência de massa [FERREIRA *et al.*, 1999].

O processo de extração supercrítica não é uma função linear com respeito ao tempo de extração. O processo de extração pode ser dividido em três etapas a saber: (1) etapa de taxa de extração constante (CER), quando a superfície externa da partícula está completamente recoberta pelo óleo; (2) etapa de taxa decrescente de extração, onde partes da superfície das partículas não estão recobertas pelo óleo; e (3) etapa difusiva, que é caracterizada pela difusão da mistura soluto-solvente na partícula sólida. As primeiras duas etapas são responsáveis por 70% do total extraído, e com CER representando 50% [FERREIRA *et al.*, 1999].

As curvas de extração são determinadas pela massa total de óleo extraído como função do tempo de extração e podem ser obtidas pela equação a seguir [FERREIRA, 1996].

$$m_e = u \cdot \int_0^{t_f} Y(t) \cdot dt \quad [1]$$

onde: m_e é a massa de soluto extraído (kg-óleo); u é a vazão de solvente (kg-CO₂/s); t é o tempo de extração (s); t_f é o tempo final de extração para cada etapa e Y é a razão mássica do óleo na fase solvente (kg-óleo/kg-CO₂).

FERREIRA *et al.* [1999] estudaram a extração com dióxido de carbono supercrítico de óleo essencial de pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) e os resultados mostraram que a obtenção do óleo ocorreu em duas etapas: de taxa constante e de taxa decrescente de extração.

FRANÇA *et al.* [1999] realizaram a extração supercrítica de carotenóides e lipídios de buriti (*Mauritia flexuosa*) e o experimento demonstrou a existência das três etapas de extração. A análise estatística concluiu que os efeitos da vazão de solvente, pressão e temperatura sobre a taxa de transferência de massa M_{CER} , a duração do período de taxa constante t_{CER} , e o rendimento total foram significantes. Além disto verificaram que durante a extração, a concentração de carotenóides aumentava com o aumento da quantidade de dióxido de carbono empregada. Mas também que as maiores quantidades de carotenóides foram removidas nos períodos controlados ou pela taxa decrescente ou pela difusional.

O comportamento da cinética de extração da oleoresina de gengibre em dióxido de carbono supercrítico a temperaturas de 288-353 K e pressão de 80-300 bar, como sendo uma função da vazão do solvente, tamanho da partícula, temperatura e pressão foi estudado por ROY *et al.* [1996]. A taxa de extração aumentou com o aumento da temperatura na pressão de 245 bar e diminuiu na de 108 bar. Tal comportamento também foi encontrado para os tamanhos de partículas menores.

YONEY *et al.* [1995] em seus estudos sobre a influência das variáveis de processo sobre o rendimento e composição dos extratos obtidos por extração supercrítica de oleoresina de gengibre chinês com dióxido de carbono, verificaram que com o aumento da vazão do solvente, as concentrações de componentes voláteis diminuía, enquanto que a concentração do 6-gingerol aumentava.

O estudo da cinética de extração do 6-gingerol a partir de gengibre jamaicano, foi realizado a 30°C em diclorometano, etanol, isopropanol e 80% (v/v) de acetona mais 20% (v/v) de água. E a taxa de extração do 6-gingerol decresceu da seguinte forma: acetona < acetona mais água < diclorometano < etanol < isopropanol [SPIRO *et al.*, 1990a].

SPIRO & KANDIAH [1990] determinaram o coeficiente de partição e outras propriedades de equilíbrio e concluíram que o coeficiente de partição encontrado do 6-gingerol nos quatro solventes orgânicos empregados (acetona, etanol, isopropanol e diclorometano) foi maior do que aquele para o dióxido de carbono supercrítico.

2.2 - Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), planta da família Zingiberaceae originária do Sudeste Asiático, foi uma das primeiras especiarias a ser conhecida na Europa por volta do século IX. Foi introduzido no Brasil provavelmente pelos portugueses, na época do descobrimento, e tornou-se uma cultura comercial nos estados de São Paulo e do Paraná somente nas últimas décadas, após a introdução de rizomas gigantes por agricultores japoneses. O gengibre brasileiro, mostrado na figura 2.2, é comercializado no estado fresco e se destina basicamente à exportação [TAVEIRA MAGALHÃES, 1997a]. A tabela 2.1 apresenta as características gerais dos dois tipos de gengibre brasileiro [TAVEIRA MAGALHÃES *et al.*, 1997a].

Tabela 2.1: Características gerais dos dois tipos de gengibre brasileiro.

Caracterização do rizoma quanto ao:	Tipo Gigante	Tipo Caipira
Teor de umidade	80 a 85%	80 a 90%
Composição centesimal (g/100g mat.seco):		
Proteína	7,23 a 7,70	5,55 a 13,84
Extrato etéreo	3,60 a 7,29	3,25 a 8,35
Carboidrato total	78,54 a 81,62	76,32 a 84,86
Fibra	9,56 a 16,17	5,50 a 11,72
Cinzas	6,94 a 7,08	4,30 a 7,99
Extrato alcoólico	5,42 a 8,01	1,66 a 7,99
Extrato volátil	1,49 a 2,64	0,40 a 2,68
Extrato não volátil	2,11 a 4,65	2,02 a 5,99

2.2.1 - Descrição Botânica

A família Zingiberaceae da sub ordem Scitaminae contém cerca de 40 gêneros e centenas de espécies. Algumas espécies deste gênero têm sido estudadas quanto a sua importância econômica em relação ao uso de seus rizomas, brotos, flores e sementes para o uso em alimentos e medicamentos. O *Zingiber officinale* Roscoe que produz gengibre pertence ao gênero *Zingiber* Boehmer e está sendo cultivado, hoje em dia, em muitos países tropicais e subtropicais [GOVINDARAJAN, 1982].

O gengibre (*Zingiber Officinale* Roscoe) é planta herbácea de rizoma perene, articulada e aromática. A parte aérea é formada de caules eretos de altura variando entre 30 e 120 cm e de folhas grandes [GOVINDARAJAN, 1982].

As diferentes variedades existentes evoluíram devido a hibridização natural da espécie. Existem muitas diferenças quanto ao rendimento, rizomas, peso seco, óleo essencial e oleoresina, e conteúdo de fibras de espécie para espécie. Estas variações podem ser influenciadas pelas condições agro-climáticas [GOVINDARAJAN, 1982].

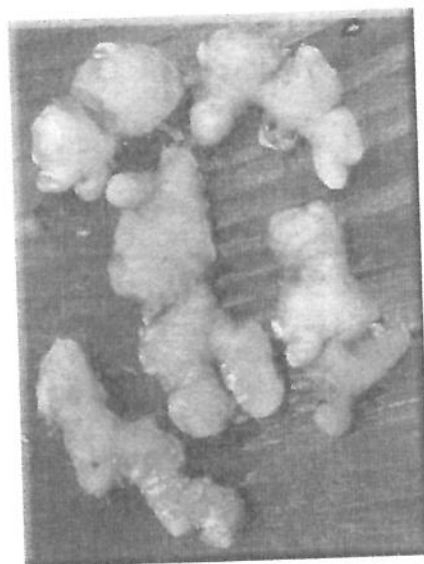


Figura 2.2: Rizomas de gengibre.

2.2.2 - Composição Química

O gengibre é comercializado internacionalmente, além dos rizomas, sob a forma de produtos derivados, tais como o óleo essencial e a oleoresina. O óleo essencial contém componentes voláteis responsáveis pelo aroma, enquanto a oleoresina contém, além dos constituintes aromáticos voláteis, os componentes não voláteis, responsáveis pela pungência característica do gengibre [TAVEIRA MAGALHÃES, 1997b]. A tabela 2.2 apresenta uma comparação da composição química da oleoresina de gengibre extraída por solventes orgânicos (etanol e isopropanol) e com dióxido de carbono supercrítico [NOBREGA *et al.*, 1997].

A oleoresina de gengibre é obtida convencionalmente por extração do rizoma seco e moído com solventes. Grandes diferenças no rendimento e características do extrato final (odor, sabor, pungência) podem ser obtidas variando a origem geográfica, a idade do rizoma, o tipo de solvente e o método de extração empregado. Industrialmente, etanol, acetona, tricloroetano e dicloroetano são os solventes mais utilizados. Geralmente o teor de óleo essencial nas oleoresinas comerciais de gengibre situa-se na faixa de 25-30% porém oleoresinas em que se variou a origem do rizoma e condições de extração mostraram teores entre 7-28% [PURSEGLOVE *et al.*, 1981].

Segundo BARTLEY [1995] e PELLERIN [1991] os principais compostos responsáveis pela pungência, cheiro forte e penetrante da oleoresina são alcanonas fenólicas conhecidas por gingeróis ou shogaóis, mais especificamente o 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol.

TAVEIRA MAGALHÃES *et al.* [1997b] estudaram a influência da secagem no rendimento e composição de óleos essenciais e oleoresinas de gengibre extraídos por arraste a vapor. Observaram que na secagem do gengibre, em nível laboratorial, na temperatura de 50°C, ocorreu redução do rendimento do óleo essencial de gengibre e do teor de sesquiterpenos na maioria das amostras. Em contrapartida, para o óleo analisado da

secagem em nível de planta piloto – temperatura de secagem de 35°C - notaram que o rendimento era maior. Além disto, a análise do perfil cromatográfico destes extratos demonstrou que ocorreram modificações bem significativas, com queda acentuada do teor de citral para a temperatura de 50°C quando comparado com a temperatura de secagem de 35°C.

Os efeitos da destilação a vapor na degradação térmica de gingeróis não voláteis do gengibre em aldeídos voláteis e cetonas por análise através de cromatografia gasosa capilar foram estudados por CHEN & HO [1987].

NISHIMURA [1995], investigando a identificação dos odores característicos de rizomas frescos de gengibre japonês, encontrou a presença de compostos oxigenados através de análise de extrato de aroma diluído (AD) e cromatografia gasosa multidimensional modificada acoplada a espectrometria de massas (CGMM/EM). Os compostos que apresentaram um alto fator de diluição de sabor (FS) foram o linalool, geraniol, geranial, neral, borneol, isoborneol, 1,8-cineol, 4-terpineol, acetato de geranil, 2-pinen-5-ol, (E)-2-octenal, (E)-2-decenal e (E)-2-dodecenal. Entretanto nenhum destes compostos em particular representa as características de odor do gengibre. Já os monoterpenos e (E)-2-alcenal que possuem altos valores de FS têm grande importância no odor de gengibre fresco.

WU & YANG [1994] avaliaram os efeitos da irradiação γ sobre os compostos voláteis dos rizomas de gengibre através do uso de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Concluíram que o gengibre pode ter uma diminuição na qualidade do sabor após cinco meses exposto à radiação γ , pois os compostos voláteis tornam-se instáveis, e que uma dose de radiação inferior a 0,05 kGy não altera as qualidades do sabor, do gosto e da cor após um longo tempo.

Tabela 2.2: Composição química da oleoresina de gengibre obtida com solventes orgânicos [NOBREGA *et al.*, 1997].

	EtOH [*] 2h	EtOH [*] 4h	EtOH [*] 6h	ISOP [*] 2H	ISOP [*] 6H	CO ₂ -1 [#]	CO ₂ -2 [#]	CO ₂ -3 [#]	CO ₂ -4 [#]
Subsâncias	%								
2-hepatnol	-	-	-	-	-	0,40	-	-	--
α -pineno	-	0,78	1,11	-	1,14	0,85	-	-	-
canfeno	-	2,74	2,97	-	4,02	2,78	-	-	-
β -mirceno	-	0,81	1,26	-	2,10	3,12	-	-	-
β -pineno	-	4,60	4,72	-	4,99	22,63	1,00	-	-
m-dietilbenzeno	-	-	-	-	-	1,38	-	-	-
o-dietilbenzeno	-	-	-	-	-	0,75	-	-	-
p-cimeno	3,19	-	-	4,52	-	-	-	-	-
Nonanal	-	1,23	0,97	-	0,97	-	-	0,54	4,07
Citronenal	-	-	-	-	-	1,23	-	-	-
Neral	-	2,80	1,13	-	1,97	3,00	2,53	0,76	-
Geranial	-	3,42	2,54	-	5,16	2,17	5,10	2,66	-
2-undecanona	-	-	-	-	-	0,87	tr	tr	-
Ar-curcumeno	Tr	3,30	3,05	Tr	2,99	4,29	5,36	3,49	tr
α -zingibereno	7,57	44,42	37,53	15,53	35,10	31,18	50,1	39,17	6,91
Farneseno	14,74	18,01	18,74	15,82	14,43	12,47	20,8	17,47	2,01
β -sesquifelandreno	2,44	13,22	12,86	13,79	11,25	8,83	15,08	12,99	2,68
Metil 14-metil-pentadecanoato	24,30	-	-	15,20	-	-	-	-	-
Metil 4,6,10,14-tetrametil petadecanoato	4,01	-	-	4,99	-	-	-	-	-
Metil linolelaidato	18,93	-	-	6,62	-	-	-	-	-
Metil 11-octadecanoato	12,71	-	-	5,98	-	-	-	-	-
6-gingerol	-	1,32	3,81	-	1,29	-	tr	14,07	80,71
Não identificado	11,88	3,35	9,31	17,55	18,88	3,36	-	8,85	3,62

^{*}EtOH = etanol; Isop = isopropanol;

[#]CO₂-1 = extrato coletado nos 30 minutos iniciais em colunas de porapak Q; CO₂-2 = extrato coletado nos 30 minutos iniciais da extração; CO₂-3 = extrato coletado após os 30 minutos iniciais até os 90 minutos de extração; CO₂-4 = extrato coletado durante a despressurização do sistema.

Os componentes responsáveis pelo poder pungente da oleoresina de gengibre foram obtidos por CHEN *et al.* [1986] utilizando dióxido de carbono líquido a pressões de 41-48 bar e temperaturas de 45°C. Os compostos foram isolados por cromatografia em camada delgada preparativa acompanhada pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A

identificação destes compostos foi realizada através de CLAE e de espectrometria de massas (EM). O 6-gingerol foi o composto encontrado em maior quantidade, cerca de 11,88% do extrato.

Os componentes responsáveis pela pungência da oleoresina de gengibre de uma espécie australiana seca foram extraídos usando dióxido de carbono supercrítico com densidade igual a 850 kg/m³ e posteriormente isolados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e electrospray. Os seguintes compostos foram encontrados: 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol, gingerdiona e hexahidrocurcumeno [BARTLEY, 1995].

BARTLEY & FOLEY [1994] utilizaram dióxido de carbono supercrítico no range de densidades entre 680 a 935 kg/m³ para obter a oleoresina de gengibre de uma espécie australiana. Os extratos produzidos por extração supercrítica apresentaram qualidade superior àqueles obtidos por extração com solvente orgânico e arraste a vapor por terem apresentado os primeiros maior quantidade dos compostos que estão presentes no gengibre “in natura”. Em todos os extratos obtidos por extração supercrítica predominam os compostos: neral e geranial (monoterpenos oxigenados), zingibereno, α -bisabuleno e β -sesquifelandreno (sesquiterpenos).

2.3 – Antioxidantes

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em pequenas concentrações comparada àquelas de um substrato oxidável, retarda ou previne a oxidação deste substrato [ARUOMA *et al.*, 1995].

O uso de antioxidantes tanto natural como artificial tem sido utilizado para a diminuição das reações de oxidações que provocam a degradação dos alimentos [LEE *et al.*, 1986].

A oxidação de compostos lipídicos em alimentos por reações em cadeia de radicais livres é um grande problema para alimentos manufaturados. Estas reações são as responsáveis pelo desenvolvimento de sabores desagradáveis em alimentos tais como manteiga, batata chips, óleos vegetais, amendoim e produtos feitos a base de carne cozida. A oxidação dos ácidos graxos e seus esteres, que ocorre nos alimentos, depende da estrutura química dos ácidos graxos, da natureza dos alimentos processados, bem como da temperatura em que eles foram armazenados e/ou cozidos [AESCHBACH *et al.*, 1993].

O descobrimento de antioxidantes naturais se faz necessário, tendo em vista que os artificiais são muito criticados por causar danos a saúde. Como exemplo destes danos temos o inchaço dos rins, bem como influência na atividade enzimática deste órgão [KIKUZAKY & NAKATANI, 1993].

ARUOMA *et al.* [1995] relatam que os antioxidantes naturais também podem ser benéficos à saúde humana, uma vez que as espécies oxigenadas reativas exercem influência nas doenças do coração, malária, doenças neurodegenerativas, AIDS, câncer e no processo de envelhecimento.

Os radicais livres são átomos ou grupo de átomos que possuem, em sua última camada, um ou mais elétrons desemparelhados. Como consequência podem doar elétrons (atividade redutora) ou retirar elétrons de outras substâncias para se estabilizarem (atividade oxidante). O oxigênio é considerado um bom agente oxidante por receber elétrons de outras moléculas redutoras, formando espécies reativas de oxigênio (EROs). Os organismos aeróbicos são expostos continuamente a concentrações de EROs que foram formadas como subprodutos do metabolismo aeróbico normal. As EROs são geradas normalmente através do desvio de elétrons da cadeia respiratória e pela atividade da membrana plasmática de macrófagos que as produz em defesa contra microrganismos invasores [MADHAVI *et al.*, 1995].

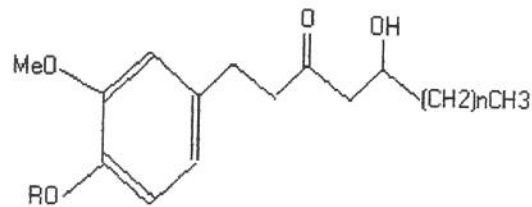
Segundo MADHAVI *et al.* [1996] antioxidantes são compostos químicos que são capazes de doar radicais hidrogênio. A estrutura molecular de um antioxidante é tão adequada que ele não somente doa um átomo de hidrogênio mas também é capaz de formar um radical de baixa reatividade e não é difícil a possibilidade de reação com lipídios. Os antioxidantes podem ser de dois tipos: os primários ou interruptores da reação em cadeia dos radicais livres e os secundários ou preventivos. Antioxidantes primários, quando presentes em quantidade de traços, podem reagir com radicais peróxidos antes deles reagirem com as moléculas lipídicas insaturadas e convertê-los em produtos mais estáveis. Antioxidantes secundários são compostos que retardam a taxa de iniciação da reação em cadeia de formação dos radicais livres por vários mecanismos diferentes daqueles seguidos pelos antioxidantes primários.

ARUOMA *et al.* [1995] estudaram a atividade antioxidante de gengibre em pó. Concentrações maiores do que 5 mg/ml foram testadas e inibiram a peroxidação de lipossomas fosfolipídicos. Além disto o gengibre demonstrou-se um excelente capturador de radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e foi capaz de reagir com ácido hipocloroso (HOCl) a uma taxa suficiente para proteger as enzimas catalase e alfa-1-proteinase contra inativação. O gengibre também exerceu ação pro-oxidante estimulando a formação de $\text{OH}^\cdot$ na presença de certos reagentes.

2.3.1 - Gingeróis

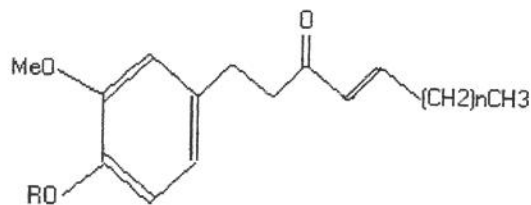
Os gingeróis são cetonas fenólicas, com propriedades antioxidantes e pungentes, presentes na oleoresina de gengibre. São usados na medicina tradicional chinesa para o tratamento de uma série de doenças gastrointestinais, respiratórias e motoras. Mais especificamente os compostos responsáveis por tais características são: 4-, 6-, 8-, 10- e 12-gingeróis. A série de shogaóis, ainda mais pungente do que os gingeróis, é difícil de ser encontrada no gengibre fresco, e são derivados a partir dos correspondentes gingeróis durante a exposição a processos térmicos ou a longos tempos de estocagem. Shogaóis e gingeróis são análogos, com uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 nos shogaóis,

resultado da desidratação dos gingeróis. As estruturas destes compostos podem ser vista na figura 2.3 [HE *et al.*, 1997].



Composto	n	R	Peso Molecular
4-gingerol	2	H	266
6-gingerol	4	H	294
8-gingerol	6	H	322
10-gingerol	8	H	350
Me-6-gingerol	4	Me	308

(a)



Composto		R	Peso Molecular
6-shogaol	4	H	276
8-shogaol	6	H	304
10-shogaol	8	H	332
Me-6-shogaol	4	Me	290

(b)

Figura 2.3: Estrutura química dos gingeróis (a) e shogaóis (b).

Segundo HISERODT *et al.* [1998] *Mycobacterium avium* é um parasita intracelular, facultativo, aeróbico e de lento crescimento, que causa uma doença respiratória com sintomas parecidos com o da tuberculose, a que aproximadamente 70% das pessoas estão expostas. Entretanto apenas aquelas com deficiência no sistema imunológico são as que desenvolvem a doença, tais como os aidéticos. *Mycobacterium tuberculosis* é uma doença patogênica contagiosa que causa a tuberculose. É uma doença de tratamento longo e caro, pois faz-se necessário o uso de mais de um tipo de medicamento por ser a bactéria resistente a uma série de drogas. Portanto o interesse no estudo de drogas novas e mais eficientes no combate destas doenças torna-se necessário. HISERODT *et al.* [1998] isolaram 6-, 8- e 10-gingerol por CLAE e realizaram uma avaliação preliminar da inibição dos microorganismos *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium* por estes compostos. Concluíram que estes gingeróis inibem o crescimento destes microorganismos, sendo que o 10-gingerol foi o composto que apresentou melhor atividade para inibição da *Mycobacterium avium*.

CHEN *et al.* [1986] assim como BARANOWSKI [1984] afirmam que uma análise com cromatografia gasosa dos gingeróis é mais difícil para a quantificação destes, pois ocorrem reações de decomposição destes compostos em shogaóis, devido às altas temperaturas empregadas nesta técnica. Em consequência, muitos autores têm estudado o uso de cromatografia líquida de alta eficiência associada a outras técnicas na determinação dos gingeróis. Podemos citar entre estes BARANOWSKI [1984], CHEN *et al.* [1986], HE *et al.* [1997] entre muitos outros.

HE *et al.* [1997] analisaram os constituintes pungentes do gengibre por CLAE e por identificação direta dos picos dos cromatogramas, do gengibre fresco e da oleoresina, através da combinação dos espectros no UV e espectrometria de massas com interface “electrospray” (“HPLC-UV-ES-MS”), concluíram que o comprimento de onda mais indicado para a detecção dos gingeróis no ultravioleta seja o de 280 nm.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Preparo e Caracterização da Matéria-Prima e do Leito

O gengibre foi adquirido em novembro de 1999 pela empresa Agroexotic e provenientes do município de São José do Rio Preto - SP. Os rizomas "in natura" foram acondicionados em sacos de nylon de aproximadamente 25 kg e armazenados na câmara fria do DTA-FEA da Unicamp na faixa de temperatura de -15 a -20°C.

3.1.1 - Secagem

O equipamento utilizado para a secagem dos rizomas constituiu-se de um secador contínuo de fluxo paralelo ou em contrafluxo pertencente a Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp apresentado na figura 3.1. O gengibre congelado foi cortado em fatias de 1 mm de espessura e logo a seguir triturado em um processador de alimentos doméstico (Wallita Master) durante 5 segundos. Após a comonuição de todo o material, este foi colocado no secador em quantidades de aproximadamente 10 kg. A temperatura de secagem foi de 30°C e tempo médio de secagem de 17 horas. O gengibre seco foi acondicionado em sacos plásticos de 1,5 kg e armazenado em freezer doméstico (Metalfrio, HC-4, São Paulo, Brasil) a -5 °C.

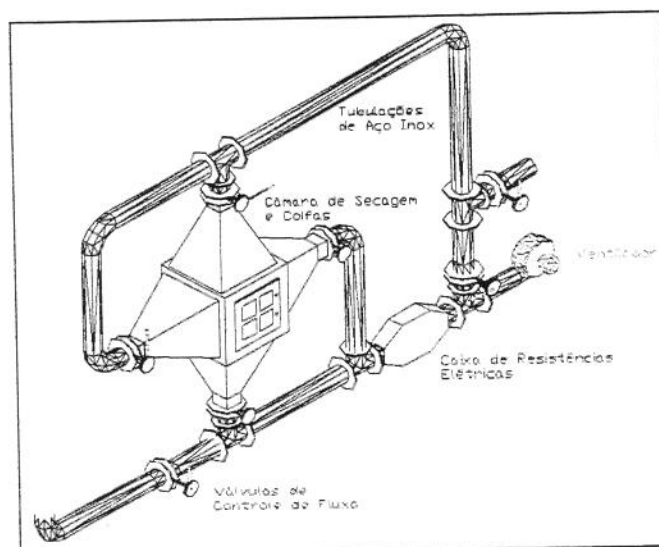


Figura 3.1: Desenho esquematizado do secador utilizado para a secagem dos rizomas de gengibre [BROD, 2000].

3.1.2 - Determinação da Umidade

O método utilizado para a determinação da umidade das partículas do gengibre é o método de Jacob descrito por MONTEIRO [1999]. O equipamento utilizado na determinação da umidade é constituído de um condensador, um tubo coletor graduado, que receberá a água evaporada da amostra, manta de aquecimento em balão de 250 ml. Aproximadamente 15 g do material “in natura” e 30 g do material seco foram utilizados para a determinação da umidade dos rizomas antes e depois da secagem. O material foi colocado no balão e coberto com 200 ml de xilol deixando-se o material em refluxo por 3 horas para o material “in natura” e 1 hora para o material seco. A umidade das amostras foi calculada pela equação 3.1.

$$U = \left(\frac{V_{H_2O} \cdot \rho_{H_2O}}{m_{amostra}} \right) \cdot 100 \quad [3.1]$$

onde: U= umidade;

V_{H_2O} = volume de água extraída da amostra;

ρ_{H_2O} =densidade da água;

$m_{amostra}$ = massa da amostra

3.1.3 - Determinação do Tamanho das Partículas

A distribuição do tamanho das partículas de gengibre secas e moídas foi determinada com o auxílio de uma série peneiras do tipo Tyler da marca Granutest e um agitador mecânico da marca Produtest.

O diâmetro médio das partículas foi determinado através da equação que utiliza o diâmetro da partícula de superfície externa média obtido pela utilização de peneiras granulométricas da série Tyler. A equação 3.2 foi usada para o cálculo do diâmetro médio de partículas [MONTEIRO, 1999].

$$D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}}}{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{D_{pi}^3}}} \quad [3.2]$$

e sendo,

$$x_i = \frac{M_i}{M} \quad [3.3]$$

onde: D_p = diâmetro médio das partículas;

x_i = percentagem retida de amostra na fração i ;

D_{pi} = diâmetro da partícula da fração i ;

M_i = massa de amostra da fração i ;

M = massa total

n = número de frações.

3.1.4 - Determinação da Densidade Real

A densidade real (d_r) foi determinada utilizando-se picnometria com gás Hélio com o auxílio de um densímetro (MICROMERITICS, Multivolume pycnoeter 1305) de uma

balança analítica (QUIMIS, modelo AS 210 com precisão de +/-0,0001) e de um pesa filtro. As medidas foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp.

3.1.5 - Determinação da Densidade Aparente

A densidade aparente (d_a) foi calculada utilizando-se o volume total da coluna de extração e a massa de gengibre contida na mesma. Com os dados de densidade real e aparente foi calculada a porosidade total do leito.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad [3.4]$$

3.2 - Equipamentos

O equipamento de extração supercrítica pode ser observado na figura 3.1 e consiste basicamente de duas bombas de alta pressão, três banhos termostáticos programáveis, um medidor de vazão e uma célula extratora. O fluxograma do extrator utilizado neste trabalho está apresentado na figura 3.3, assim com um detalhe da célula extratora pode ser visto na figura 3.2.

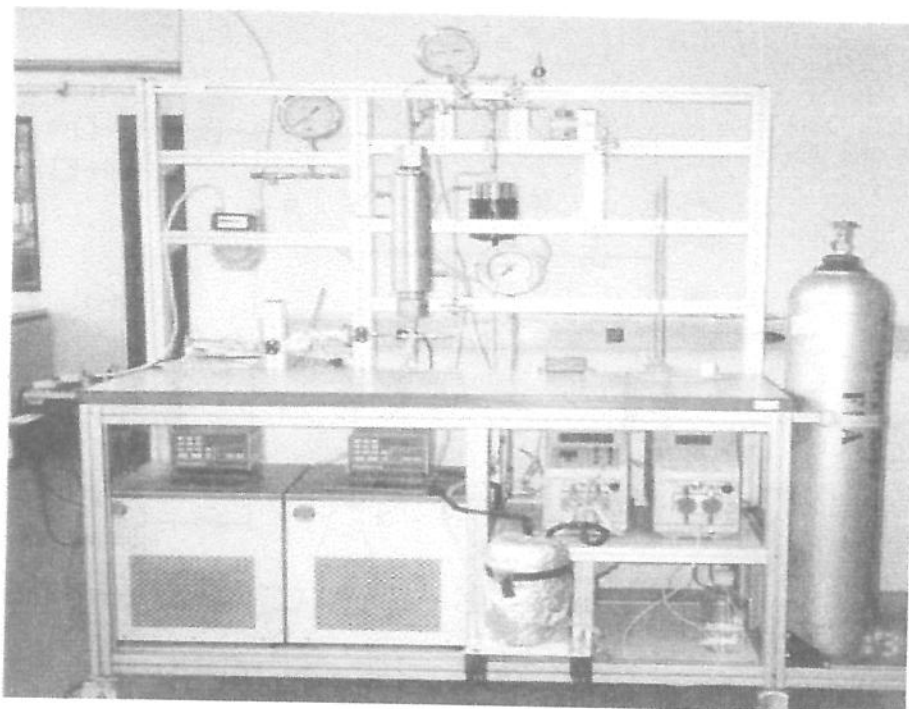


Figura 3.1: Unidade de extração supercrítica .

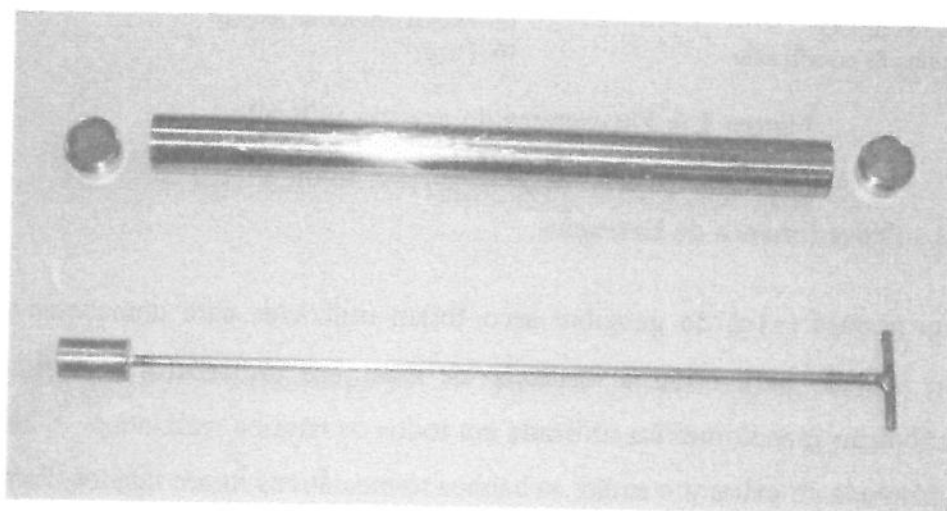
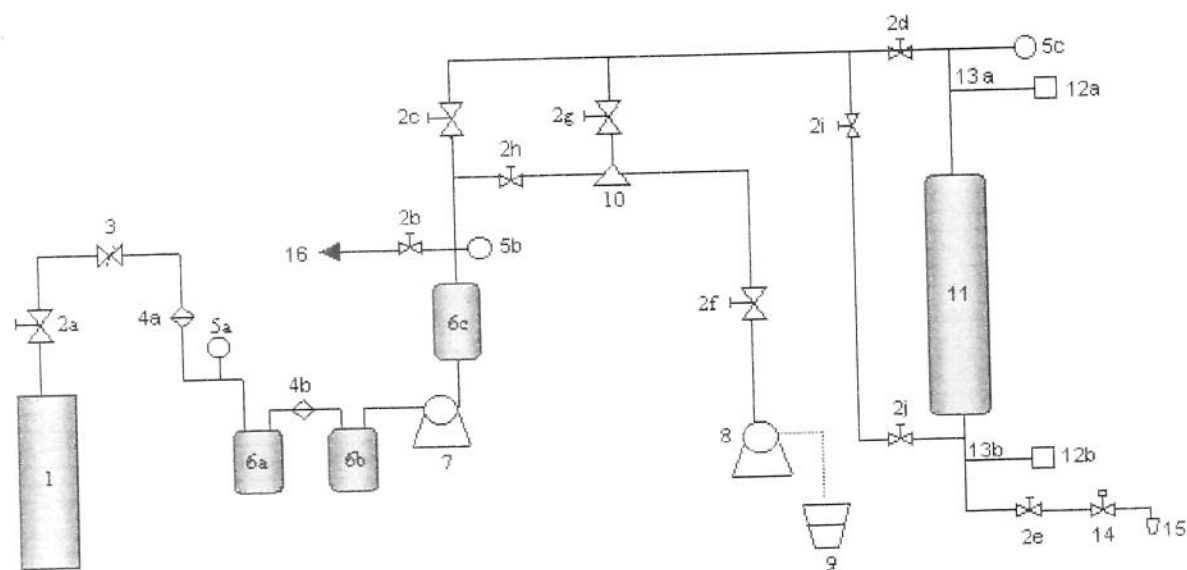


Figura 3.2: Célula extratora e o aparelho utilizado para empacotamento do leito .



- 1-Cilindro de CO₂
- 2-Válvulas
- 3-Válvula de retenção
- 4-Filtro de linha
- 5-Manômetro
- 6-Tanque pulmão encamisado
- 7-Bomba de CO₂
- 8-Bomba de co-solvente

- 9- Recipiente de co-solvente
- 10- Misturador de CO₂ e co-solvente
- 11- Extrator encamisado
- 12- Indicador de temperatura
- 13- Termopar Ferro-constantan
- 14- Válvula micrométrica
- 15- Frasco coletor do extrato
- 16- Purga

Figura 3.3: Fluxograma do extrator utilizado.

3.2.1 - Procedimento de Extração

Oitenta gramas ($\pm 1g$) do gengibre seco foram utilizadas para empacotar o leito, tomando-se o cuidado para evitar a formação de caminhos preferenciais. A figura 3.4 mostra a distribuição granulométrica utilizada em todos os ensaios realizados. A célula de extração foi adaptada no extrator e então, os banhos termostáticos foram ligados. Para que o sistema entrasse em equilíbrio térmico foram necessárias duas horas. Uma vez que o banho termostático da bomba atingiu -10°C o sistema foi pressurizado até 1 bar acima da pressão de trabalho para evitar uma queda indesejável da pressão no início da extração. Assim que o tanque pulmão alcançou a pressão desejada as válvulas de entrada (2c e 2d) do extrator foram abertas até que a pressão dentro do extrator atingisse a pressão de trabalho. O sistema foi deixado em repouso por 30 minutos para que o solvente atingisse todos os pontos dentro do extrator. Logo após as válvulas 2e e 14 foram abertas quando iniciou-se a coleta dos

extratos. A válvula micrométrica (14) foi mantida aquecida durante toda o processo de extração devido o efeito Joule Thompson. Colunas de captura dos voláteis contendo adsorvente Porapak Q (Waters, 80/100mesh) foram adaptadas na saída do solvente do frasco coletor. As amostras foram coletadas com intervalos de 30 minutos durante a extração e por 45 minutos durante a despressurização. Após 7 horas de extração as válvulas 2c e 2d foram fechadas quando iniciou-se a despressurização do sistema. As colunas de captura foram trocadas após 30, 60, 120, 240, 360 e 420 minutos de extração e durante a despressurização do sistema. Quando na extração foram utilizados os co-solventes etanol (Merck, 99%, Alemanha) ou isopropanol (Merck, 99%, Alemanha) o procedimento utilizado foi um pouco diferente. Os experimentos iniciaram fazendo-se a purga das tubulações e da bomba de co-solvente (8) com o solvente empregado, logo a seguir o misturador (10) de CO₂ e co-solvente foi ligado e as válvulas 2f, 2g, 2h, 2c e 2d foram abertas. E então o procedimento foi idêntico ao utilizado com CO₂ puro.

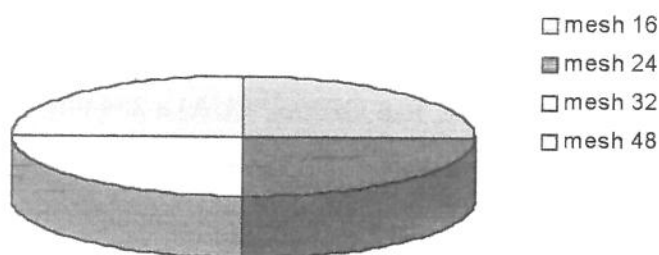


Figura 3.4: Distribuição granulométrica utilizada durante todos os ensaios.

3.3 – Determinação dos Parâmetros Cinéticos

O cálculo dos parâmetros cinéticos, taxa de extração para o período de velocidade constante (C_{CER}), concentração do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (Y_{CER}), t_{CER} - duração da etapa de taxa constante de extração (CER), o rendimento do extrato no período CER (R_{CER}) foi feito com auxílio do software SAS 6.12. Para tanto procedeu-se da seguinte forma: inicialmente foram traçadas duas retas sobre a curva de extração (massa de extrato acumulada vs tempo de extração) e obteve-se uma estimativa para a intercepção destas retas, ou seja, para t_{CER} . Este valor foi utilizado como dado de entrada em um

programa de ajuste linear escrito em linguagem SAS que forneceu novas estimativas para os parâmetros procurados. Com estes valores alimentou-se outro programa de ajuste não linear, também em linguagem SAS, que forneceu os valores finais dos parâmetros, os coeficientes angular e linear da fase de extração constante. Com o valor do coeficiente angular e da vazão de CO_2 utilizado durante o experimento calculou-se o Y_{CER} [RODRIGUES, 2000].

3.4 – Cromatografia em Camada Delgada

Esta técnica foi empregada para a escolha do eluente mais adequado para o fracionamento do extrato de gengibre. Os extratos foram aplicados em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (20cm x 20cm, Merck, Alemanha) com auxílio de um capilar, eluídas com n-hexano puro (Merck, 99%, Alemanha), n-hexano - acetato de etila (Merck, 99%, Alemanha) nas proporção 6:4, 8:2 e 9:1 e da mistura de éter etílico (Cinética Química, P.A., Brasil) e Hexano (Merck, 99%, Alemanha) na proporção de 7:3. As placas foram reveladas em lâmpada UV (Chromato-Vue, San Gabriel, EUA) a 254 nm.

3.5 – Isolamento dos Gingeróis e Shogaóis

O fracionamento do extrato e posterior isolamento da classe dos gingeróis e shogaóis foi realizado por cromatografia em camada delgada preparativa. As placas foram preparadas com 80g de sílica gel GF₂₅₄ (Fluka Chemika, Suíça), suspensa em 155 ml de água destilada, distribuída sobre as placas de vidro, por meio de um cursor “Quickfit”, com espessura de 1mm, secas ao ar e ativadas em estufa a 100 °C por duas horas. A amostra utilizada para fracionamento foi obtida pela condição de extração $\text{CO}_2/250 \text{ bar}/25^\circ\text{C}$ e coletada no período de despressurização. As placas foram eluídas com uma mistura de hexano (Merck, P.A., Alemanha) e acetato de etila (Merck, P.A., Alemanha) na proporção de 9:1 e reveladas no UV a 254 nm para identificação da fração que contém os gingeróis e shogaóis, uma vez que estes absorvem neste comprimento de onda. Estes foram removidos da sílica gel com metanol e filtrados em funil de vidro sinterizado. Esta solução foi

concentrada em rotaevaporador e submetida a análise por CG/EM (Shimadzu, QP5000, Kyoto, Japão) onde verificou-se unicamente a presença de gingeróis e shogaóis.

3.6 - Análise do Extrato

3.6.1 –Análise por Espectrofotometria

A análise dos extratos de gengibre obtidos por dióxido de carbono supercrítico por espectrofotometria foi realizada em espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-3010, Tokyo, Japão) com o intuito de verificar a presença das classes de compostos shogaóis e gingeróis e também de determinar a concentração total destes compostos. As medidas foram realizadas no espectro de UV/Visível de 200 a 500 nm. A curva de calibração foi construída com a mistura isolada de gingeróis e shogaóis, obtida de extratos coletados durante a despressurização dos experimentos sem co-solventes, no comprimento de onda de 280 nm e encontra-se no anexo G.

3.6.2 - Análise por Cromatografia Gasosa /Espectrometria de Massas

A composição do extrato referente a oleoresina foi analisada em cromatógrafo a gás (CG) com detector por ionização em chama (Shimadzu, GC 17A , Kyoto, Japão GC 17A) e cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM , Shimadzu, QP5000, Kyoto, Japão) providos de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25 mm x 0.25 μ m, J&W Scientific). O gás de arraste foi o hélio (White Martins, 99,9% de pureza), vazão de 1,7 mL/min, temperaturas do detector e do injetor de 280°C e 240°C para o CG e de 250°C e 230°C respectivamente para o CG/EM e injetado 1 μ L de amostra (split: 1/15). A temperatura da coluna foi mantida a 50°C por 5 minutos e a seguir aquecida até 280°C a 5°C/min. A identificação dos compostos foi baseada em: comparação dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do CG/EM (Nist 62 Library); e literatura [MCLAFFERTY & STAUFFER, 1989]; e índices de retenção [ADAMS, 1995]. As análises que utilizaram o GC/EM foram realizadas no LPN (Laboratório de Produtos

Naturais) no Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas.

3.6.3 – Peroxidação Lipídica da Membrana Celular

Este teste teve a intenção de verificar a propriedade antioxidante dos extratos de gengibre selecionados por cromatografia gasosa que possuíam alta concentração de gingeróis e shogaóis. Na determinação da peroxidação lipídica da membrana celular, utilizou-se o método descrito por STOCKS & DORMANDY [1971] modificado, que fornece a quantidade de malondialdeído, produto da degradação dos lipídios pela peroxidação. Neste teste o acréscimo de uma substância provoca a peroxidação da hemoglobina que é medida espectrofotometricamente em 532 nm, uma vez que esta reação de oxidação forma um produto de cor rosada. O sangue foi coletado de doadores voluntários no dia dos experimentos.

3.6.3.1 – Descrição do Método

À 1 ml de suspensão de eritrócitos, de concentração conhecida, primeiramente na ausência da fração analisada e depois na presença desta (a diferentes concentrações), adicionou-se o agente oxidante, terc-butil-hidroperóxido, TBOOH, (Aldrich, 70% (m/m) aquoso, EUA) e realizou-se a incubação por 30 minutos à 37°C. A reação foi paralisada pela adição de 0,5 ml de ácido tricloroacético 25% (m/m) (Merck, 99,5%, Alemanha) e então centrifugada por 1 minuto a 3400 rpm. À 1 ml do sobrenadante foi adicionado 1 ml de ácido tiobarbitúrico 1% (Merck, 99%, Alemanha) em hidróxido de sódio 0,05M. Esta solução foi, então incubada a 100°C por 15 minutos, onde verificou-se a formação do produto colorido. A formação do complexo foi determinada em 532 nm após o resfriamento das amostras em gelo.

3.6.4 – Oxidação Acoplada do Ácido Linoléico e do β - Caroteno

Neste teste todos os extratos de gengibre das três etapas de extração foram analisadas. A metodologia segundo PRATT *et al.* [1979] foi utilizada empregando-se

algumas modificações para o extrato de gengibre. O substrato da reação foi preparado da seguinte forma: num balão de rotavapor (Buchi, CH-9230, Flawil, Schweiz) foram adicionados 10 mg de β -caroteno (Aldrich, >95%, 414-273-3850, EUA), 10 ml de clorofórmio, 60 mg de ácido linoléico (Nu-chek, 99%, U-59A-D4-G, EUA) e 200 mg de tween 80 (Synth, P.A., Brasil). Esta solução foi concentrada em rotavapor a 50°C e posteriormente ressuspensa em 50ml de água bidestilada, sendo este considerado o substrato da reação. Para a reação procedeu-se da seguinte forma: à 1 ml do substrato foram adicionados 2 ml de água bidestilada e 0,05 ml do extrato de gengibre diluído em etanol (Merck, 99,8% (0,02 g de extrato/1 ml de etanol). Esta mistura foi colocada em banho termostático a 40°C e monitorado por espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-3010) nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas no comprimento de onda de 470 nm.

3.6.5 – Ação Anticancerígena

A avaliação da atividade anticancer foi realizada em cinco linhagens originárias de tumores humanos. Os extratos nas concentrações de 0,62 a 125 μ g/ml foram adicionados em placas de 96 divisões contendo quatro linhagens por placa. Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético (50%). Após 60 minutos o ácido tricloroacético foi removido das placas por aspiração e então as placas foram lavadas com água corrente para que depois da secagem pudessem ser coradas com sulforrodamina B (SRB). O excesso de SRB foi removido das placas após 10 minutos através de lavagem com ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de tampão tris base e a leitura óptica foi realizada em leitor de elisa em 515 nm. O teste foi realizado no CPQBA – Unicamp em Campinas sob responsabilidade do Dr. João Ernesto Carvalho.

3.6.6 – Ação Bactericida

A atividade bactericida dos extratos de gengibre com maiores concentrações de gingeróis e shogaóis foi estudada determinando-se a inibição que a presença dos extratos de gengibre podem provocar em meios de cultura inoculados com *Mycobacterium avium* (Ma) - ATCC 15769; *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra - ATCC 25177; *Mycobacterium*

tuberculosis H37Rv - ATCC 27294; *Mycobacterium kansasii* (Mk) - ATCC 12478; *Mycobacterium mageritense* (Mm) - ATCC 29571 e *Mycobacterium intracellulare* (Mi) - ATCC 25169. As bactérias utilizadas foram de coleção. Neste caso também algumas frações foram previamente selecionadas segundo a maior quantidade de gliceróis e shogóis. Estas análises foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz em Riberão Preto no estado de São Paulo sob responsabilidade da Ms. Dayse Sato.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Testes Preliminares

4.1.1 - Extração

Testes preliminares foram realizados com e sem co-solvente para verificar qual o melhor modo de pressurização do leite, intermitente ou contínua, e com ou sem período estático. Segundo MONTEIRO [1999] os gingeróis e shogaóis são extraídos durante quase todo o processo de extração, entretanto durante a fase difusional eles aparecem predominantemente. Pensando nisso um experimento foi realizado para verificar qual seria a duração total dos ensaios. Observa-se na figura 4.1 que sete horas de extração são suficientes para o estudo da extração dos extratos de gengibre, já que a fase difusional inicia-se já na terceira hora, ou seja, com sete horas de extração oito amostras da fase difusional são suficientes para realização dos testes previstos e também para as análises dos mesmos. A figura 4.1 mostra também a comparação entre os ensaios realizados sob as mesmas condições de pressão, temperatura e vazão de CO₂. Percebe-se que a condição de período estático e pressurização contínua a partir do topo do leite é mais adequada do que a outra. Pode-se concluir que neste caso os 30 minutos são necessários para que o CO₂ atinja todos os pontos dentro do extrator.

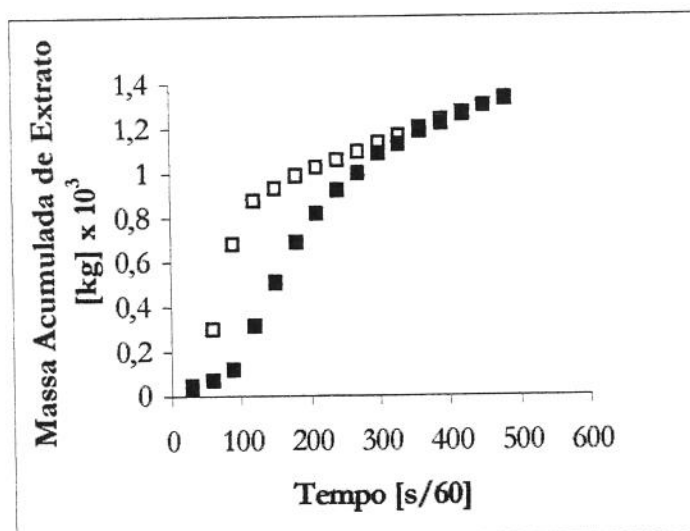


Figura 4.1: Comparação entre os modos de pressurização do leito. ■: Sem Período estático e com pressurização intermitente; □: Com período estático e pressurização contínua. Ambas as extrações a 250 bar e 35°C.

4.1.2 – Cromatografia em Camada Delgada

O anexo H apresenta as placas dos testes feitos com hexano puro, mistura de hexano com acetato de etila nas proporções 6:4 e 8:2. O hexano puro e a mistura hexano-acetato de etila (6:4) não promoveram uma boa separação dos componentes do oleoresina, no segundo caso ocorreu a superposição das substâncias do óleo essencial (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.) com os gingeróis e shogaóis. A mistura hexano-acetato de etila (8:2) apresentou uma boa separação, porém o eluente mais adequado para o fracionamento dos extratos foi a mistura hexano - acetato de etila (9:1).

4.1.3 - Peroxidação Lipídica da Membrana da Hemoglobina

Um extrato de Monteiro [1999] foi analisado segundo a metodologia descrita no item 3.6.3 para verificar a atividade antioxidante do extrato de gengibre. Neste teste fixou-se a concentração do extrato e variou-se a de agente oxidante (terc-butil hidroperóxido-TBOOH) para verificar a eficiência do extrato frente a peroxidação da hemoglobina. A figura 4.2 apresenta as curvas obtidas neste ensaio. Um percentual de inibição da peroxidação da membrana da hemoglobina de cerca de 40% foi encontrado, o que foi um bom resultado por tratar-se de uma amostra de 1997. Sabe-se da literatura que os compostos antioxidante com

o passar do tempo sofrem degradação seja pela luz, calor ou presença de oxigênio. Conhecendo-se este fato após o teste foi obtido um espectro de UV deste extrato e observou-se realmente a presença significativa dos shogaóis, produto da degradação dos gingeróis. De posse destes resultados decidiu-se avaliar os extratos produzidos neste trabalho por esta metodologia.

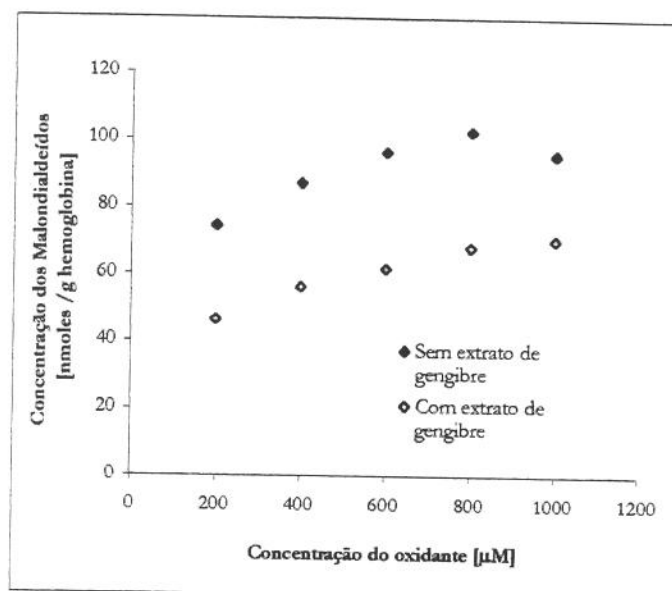


Figura 4.2: Teste antioxidante de uma fração da fase difusional obtido por MONTEIRO em 1997.

Para a realização deste teste ainda foram realizados outros ensaios com o objetivo de encontrar-se uma concentração de TBOOH que produzisse uma quantidade significativa de malondialdeído e a concentração escolhida foi de 500 μM.

4.2 - Cinética de Extração

As características do leito e das partículas estão apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Característica do leito.

Diâmetro médio de partícula	0,39 mm
Densidade Real	1,52 g/cm ³
Densidade Aparente	0,35 g/cm ³
Porosidade	0,77

A umidade do gengibre “*in natura*” foi de 85,5 % (massa de água/massa de sólido úmido) e do gengibre seco foi de 17%. As extrações foram realizadas nas pressões de 200 e 250 bar, nas temperaturas de 25°C e 35°C e tendo como solvente o CO₂ sem co-solvente, CO₂ com etanol 1,17% (m/m) e o CO₂ com isopropanol 1,17% (m/m). A vazão total média de solvente foi igual a $5,86 \times 10^{-5}$ kg/s e a vazão de CO₂ variou de $4,24 \times 10^{-5}$ a $6,02 \times 10^{-5}$ kg/s. A tabela 4.2 apresenta as condições de extração, a taxa de transferência de massa no período de taxa constante de extração (M_{CER}), a razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída do extrator (Y_{CER}) e o rendimento total (R_{TOTAL}).

A figura 4.3 apresenta as curvas de extração das condições de operação onde os maiores valores de rendimento total foram obtidos. As “splines” ajustadas para cada curva também são mostradas nesta figura. Como pode ser observado, duas retas descrevem quantitativamente as curvas de extração. É importante ressaltar que as demais condições testadas apresentaram comportamento semelhante as curvas mostrados na figura 4.3 e podem ser visualizadas no anexo A.

Tabela 4.2: Condições experimentais, rendimento total e dados para taxa constante de extração(CER).

P (bar) ±1	T (°C) ±0,1	Solvente	Qmédia (kgCO ₂ /s)x10 ⁵	M _{CER} (kg/s)x10 ⁷	Y _{CER} (kg/s)x10 ⁵	t _{CER} (s/60)	R _{CER} (%)	R _{total} (%)
200	25	CO2	5,90	1,63	2,76	135,50	1,33	2,10
200	35	CO2	5,91	1,66	2,82	140,17	1,70	2,65
250	25	CO2	6,02	1,77	2,95	141,33	1,42	2,22
250	35	CO2	5,90	2,19	3,71	112,17	1,35	2,34
200	25	CO ₂ - Etanol	5,88	1,46	2,48	160,50	1,56	2,31
200	35	CO ₂ - Etanol	5,75	2,17	3,77	138,67	1,69	2,48
250	25	CO ₂ - Etanol	5,80	1,37	2,37	141,50	1,13	1,93
250	35	CO ₂ - Etanol	5,84	1,72	2,95	136,67	1,44	2,27
200	25	CO ₂ - Isopropanol	5,96	2,64	4,43	79,83	1,24	2,14
200	35	CO ₂ - Isopropanol	5,90	2,23	3,77	100,50	1,18	1,95
250	25	CO ₂ - Isopropanol	5,82	1,52	2,61	118,83	1,15	2,06
250	35	CO ₂ - Isopropanol	5,65	2,63	4,66	88,17	1,11	2,19

*vazão média de solvente (CO₂ ou CO₂+co-solvente).

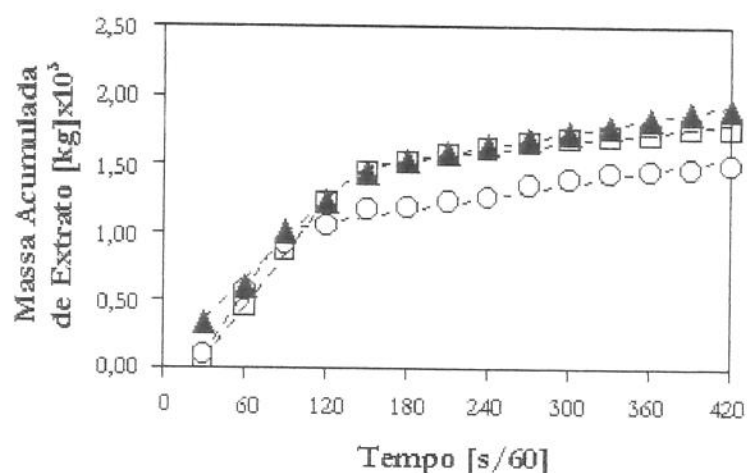


Figura 4.3: Curvas de extração do gengibre correspondentes aos maiores valores de rendimento total nas condições: CO₂/200bar/35°C (▲), CO₂ e etanol/200bar/35°C (□), CO₂ e isopropanol/250bar/35°C (○).

4.3 - Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) foi realizada com auxílio do software SAS versão 6.12 para verificar a influência dos fatores pressão, temperatura e tipo de solvente utilizado na taxa de extração para o período de velocidade constante (M_{CER}), razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna (Y_{CER}) e o rendimento total do extrato (R_{total}). O anexo D apresenta as linguagens dos programas linear e não linear enquanto o anexo E os outputs do programa não linear.

4.3.1 - M_{CER}

Para a variável resposta M_{CER} , o ajuste que mostrou-se adequado foi o M_{CER} em função de Q , P , Q_{solv} e a interação entre P e Q_{solv} , sendo Q_{solv} uma co-variável. O efeito da temperatura neste caso não foi significativo. Para esse modelo, a interação entre P e Q_{solv} mostrou-se significativa ($p=0,069$) após ter sido ajustado para co-variável Q .

Examinando-se o gráfico da interação entre P e Q_{solv} e a tabela das médias ajustadas para M_{CER} , figura 4.4 e tabela 4.3, observa-se que o efeito da pressão é negativo para o solvente CO₂ – IsopC3, ou seja, quando a pressão muda de 200 para 250, M_{CER} reduz de

2,74 para $1,51 \times 10^{-7}$ kg/s. Para o solvente CO_2 - EtOH a redução de M_{CER} é menos acentuada, mudando de 1,61 para $1,36 \times 10^{-7}$ kg/s. Por outro lado, quando o solvente utilizado é o CO_2 , M_{CER} aumenta de 1,84 para $2,42 \times 10^{-7}$ kg/s quando a pressão muda de 200 para 250.

Tabela 4.3: Médias ajustadas para M_{CER} .

Pressão [bar]	Solvente	Média Ajustada para $M_{\text{CER}} \times 10^7$ kg/s
200	CO_2	1,84
200	CO_2 - EtOH	1,61
200	CO_2 - IsopC3	2,74
250	CO_2	2,42
250	CO_2 - EtOH	1,36
250	CO_2 - IsopC3	1,51

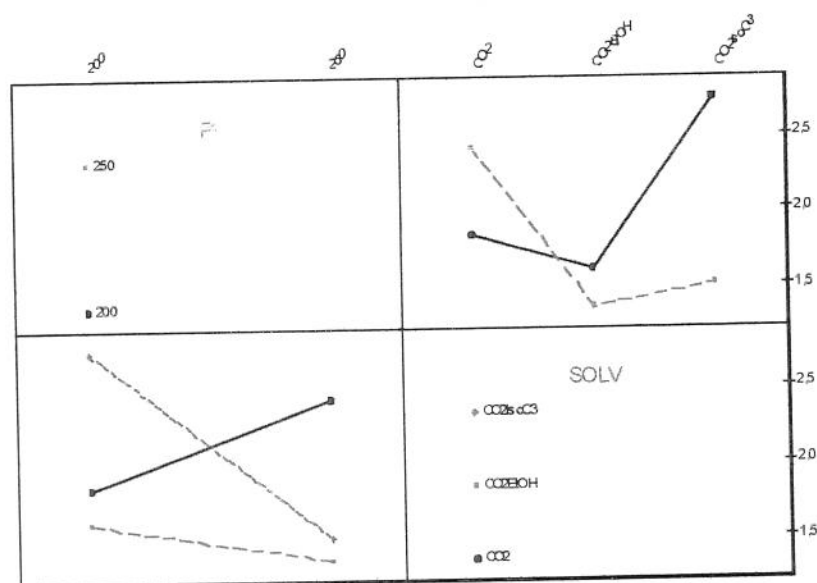


Figura 4.4: Interação entre P e Qsolv.

4.3.2 - R_{TOTAL}

Para a variável resposta rendimento total, R_{TOTAL} , foi ajustado o modelo R_{TOTAL} em função de Q, Q_{CO_2} , T, P, Qsolv e a interação entre P e Qsolv, sendo Q e Q_{CO_2} co-variáveis.

O coeficiente de ajuste R^2 foi igual a 0,91 e coeficientes de variação igual a 5,28%. Os efeitos significantes foram T ($p = 0,067$) e a interação entre P e Qsolv ($p = 0,08$) após ajustar para as co-variáveis Q e QCO₂. Quando T muda de 25 para 35, R_{TOTAL} aumenta de 1,94 para 2,5 (figura 4.5 e tabela 4.4).

Tabela 4.4: Médias ajustadas de R_{TOTAL} para temperatura.

Temperatura [°C]	Médias ajustadas para R_{TOTAL}
25	1,94
35	2,5

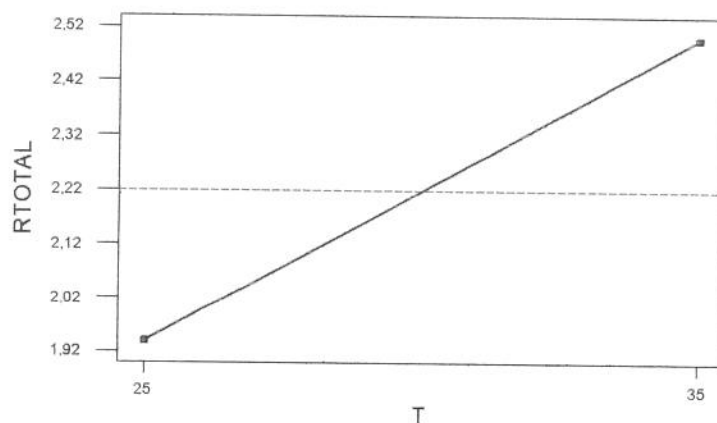
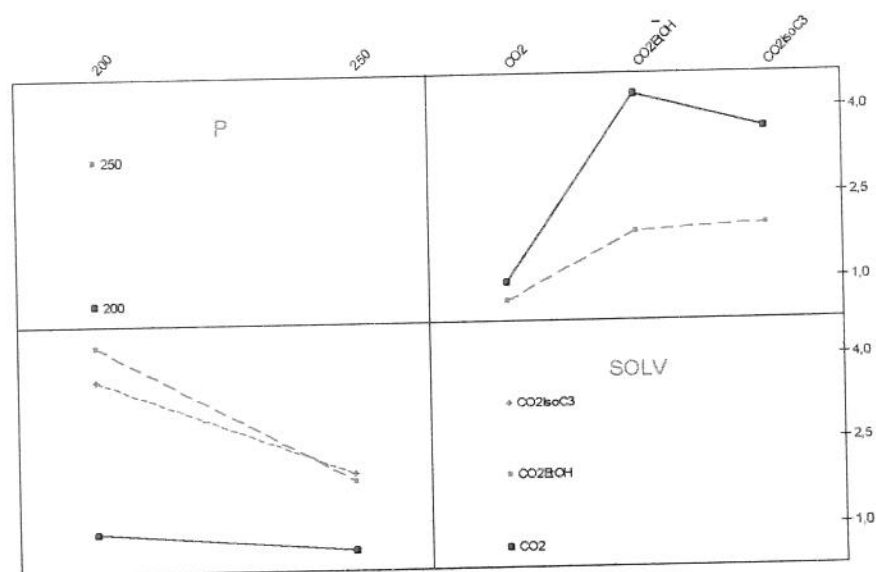


Figura 4.5: Efeito da temperatura sobre R_{TOTAL} .

Analisando-se a interação entre P e Qsolv, figura 4.6 e tabela 4.5, observa-se que o efeito da pressão é negativo para todos os solventes, ou seja, R_{TOTAL} decresce quando ocorre o aumento de pressão de 200 para 250, sendo que esta diminuição é mais acentuada para os solventes CO₂ – IsoC3 e CO₂ – EtOH, 1,68 e 2,41 respectivamente, e menos acentuado para o CO₂, 0,32.

Tabela 4.5: Médias ajustadas para P e Q_{solv}.

Pressão [bar]	Solvente	Média ajustada para R _{TOTAL}
200	CO ₂	0,96
200	CO ₂ - EtOH	4,26
200	CO ₂ - IsopC3	3,65
250	CO ₂	0,64
250	CO ₂ - EtOH	1,85
250	CO ₂ - IsopC3	1,97

**Figura 4.6:** Interação entre P e Q_{solv} para R_{TOTAL}.

4.3.3 - Y_{CER}

Nenhum dos fatores mostrou-se significante para esta variável.

3.2 - Composição do óleo

3.2.1 - Cromatografia Gasosa

Os extratos selecionados para a análise cromatográfica foram os correspondentes a 1^a (F1), 2^a (F2) e 5^a (F5) hora de extração. Da figura 4.3 observa-se que estes extratos correspondem respectivamente ao período de taxa constante de extração (CER), período de taxa decrescente e o da fase difusional. A análise cromatográfica mostrou de um modo geral que na oleoresina (monoterpenos, monotерpenos oxigenados, sesquiterpenos gingeróis e shogaóis) tanto o período de taxa constante de extração como o de faixa decrescente apresentam um perfil cromatográfico muito semelhante. Para os extratos obtidos na fase difusional pode-se observar a preponderância dos gingeróis e shogaóis para todas as condições empregadas, o que pode ser observado nas figuras F.5 e F.6 do anexo F. As tabelas 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam a composição química dos extratos de gengibre obtidos. As tabelas 4.9, 4.10 e 4.11 apresentam a composição química dos compostos que ficaram retidos nas colunas de Porapak-Q, sendo que neste caso também foram analisados os correspondentes as 3 fases de extração, onde P1 corresponde a segunda hora de extração (CER), o P2 a 1.5h e 2h (período de taxa decrescente de extração) e o P3 a 2.5h, 3h, 3.5h, 4h e 4.5h (fase difusional). Para todos extratos obtidos no período de taxa constante de extração e no período de taxa decrescente de extração o geranial, neral, citronelol, α -zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno, ar-curcumeno estão presentes. Para os porapacks o α -pineno, canfeno, β -mirceno, β -felandreno, 1,8-cineol, citronelal, citronelol, borneol, α -terpineol, neral, α -copaeno, ar-curcumeno, α -zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno são os compostos presentes em maior quantidade correspondendo aproximadamente 70% do extrato analisado, além de uma pequena porcentagem de gingeróis e shogaóis. Segundo NISHIMURA [1995] estes compostos são responsáveis em grande parte pelo aroma característico do rizoma de gengibre *in natura*. É importante ressaltar que a quantidade de aldeídos e cetonas encontrada é muito baixa, fato que segundo CHEN & HO [1987] significa a pequena degradação dos gingeróis durante o processo de extração. O anexo F mostra cromatogramas das três fases de extração e das frações retidas nas colunas de porapak para uma mesma condição de extração.

Tabela 4.6: Composição química da fração F1 do período de taxa constante de extração.

Substância	F1											
	^b C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
	Composição (% area)				Composição (% area)				Composição (% area)			
Citronelol	-	-	0,69	-	0,57	0,55	-	-	0,58	-	0,60	0,67
Neral	3,47	3,23	3,93	3,67	2,44	2,85	2,36	2,47	3,04	2,53	2,65	2,96
Acetato de linalol	-	-	-	-	0,44	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	6,84	5,98	7,59	6,80	5,09	5,45	5,05	5,03	5,98	4,94	5,05	5,70
Ar-curcumeno	4,19	3,48	3,97	4,02	3,59	3,48	3,52	3,84	3,93	3,58	3,83	4,28
Valenceno	0,98	0,87	1,45	1,22	1,05	1,05	1,02	1,02	1,20	1,02	1,10	1,25
α -zingibereno	20,86	16,36	22,16	20,30	19,17	17,59	17,06	16,86	18,92	16,48	17,26	20,34
Trans - β - Guaieno	2,24	1,87	2,26	2,25	1,88	1,85	1,75	1,85	2,07	1,89	1,98	2,17
β -bisaboleno	7,76	6,42	7,79	7,47	7,07	6,41	6,08	6,11	6,64	6,09	6,35	7,12
γ - cadineno	3,90	3,16	3,89	3,85	3,40	3,22	3,12	3,28	3,47	3,17	3,37	3,72
β -sesquifelandreno	9,06	7,24	8,76	8,69	8,15	7,37	7,24	7,52	7,90	7,30	7,72	8,55
Germacreno B	0,90	0,72	0,96	0,88	0,90	0,78	0,83	0,84	0,84	0,76	0,84	0,93
Zingerona	1,57	1,65	1,10	1,02	0,95	0,99	1,43	1,20	1,02	0,90	0,71	-
gingerol+shogaol	37,38	48,23	33,27	38,77	43,00	47,48	49,03	48,50	42,49	50,07	46,14	41,05
Não identificados	-	0,79	2,18	1,06	2,31	1,99	1,87	1,48	1,92	1,27	2,40	1,26

^a F1: Amostra do período de taxa constante de extração.^b C1, E1, I1: 200 bar e 25°C; C2, E2, I2: 200 bar e 35°C; C3, E3, I3: 250 bar e 25°C; C4, E4, I4: 250 bar e 35°C. C: CO₂; E: CO₂ + EtOH, e I: CO₂ + IsoC3.

Tabela 4.7: Composição química da fração F2 do período de taxa decrescente de extração.

Substância	^a F2											
	^b C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
	Composição (% area)				Composição (% area)				Composição (% area)			
Citronelol	0,47	-	0,59	-	-	0,55	-	-	-	-	-	0,58
Neral	2,35	1,52	3,45	3,20	2,22	2,71	2,34	2,20	1,42	2,02	1,78	2,40
Acetato de linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	4,76	2,97	6,65	6,11	4,69	5,32	5,08	4,88	3,06	4,33	3,61	4,72
Ar-curcumeno	3,12	1,95	3,49	3,68	3,34	3,42	3,36	3,23	2,24	3,14	2,81	3,40
Valenceno	0,61	-	1,24	1,03	0,94	0,90	0,99	0,86	-	-	-	0,91
α -zingibereno	14,99	7,39	18,87	17,58	17,09	16,09	16,09	13,92	9,06	12,24	10,88	15,45
Trans - β - Guaieno	1,65	1,03	2,01	2,10	1,79	1,83	1,69	1,62	1,08	1,64	1,41	1,72
β -bisaboleno	5,68	3,15	6,76	6,86	6,43	6,22	5,82	5,27	3,64	5,01	4,43	5,61
γ - cadineno	2,87	1,65	3,36	3,56	3,20	3,08	3,03	2,83	1,83	2,66	2,35	2,95
β -sesquifelandreno	6,81	3,96	7,67	8,26	7,64	7,31	6,96	6,45	4,58	6,33	5,64	6,85
Germacreno B	0,68	-	0,83	0,84	0,85	0,75	0,77	0,73	-	-	-	0,71
Zingerona	1,97	1,84	1,31	1,51	1,32	1,02	1,01	1,47	1,23	1,72	0,97	0,89
gingerol+shogaol	51,56	73,58	41,79	43,93	49,29	49,68	50,51	55,10	70,46	59,21	64,50	52,46
Não identificados	1,51	0,96	1,98	1,34	1,20	1,12	2,35	1,44	1,40	1,70	1,62	1,35

^a F2: Amostra do período taxa decrescente de extração.^b C1, E1, I1: 200 bar e 25°C; C2, E2, I2: 200 bar e 35°C; C3, E3, I3: 250 bar e 25°C; C4, E4, I4: 250 bar e 35°C. C: CO₂; E: CO₂ + EtOH, e I: CO₂ + IsoC3.

Tabela 4.8: Composição química da fração F5 da fase difusional.

Substância	^a F5											
	^b C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
	Composição (% area)				Composição (% area)				Composição (% area)			
β-mirceno	2,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronelol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neral	-	-	1,48	-	0,98	0,82	1,40	1,44	1,44	1,67	1,25	2,02
Acetato de Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geranial	3,15	-	4,28	5,32	2,32	1,83	2,75	3,16	3,10	3,80	2,72	3,92
Ar-curcumeno	4,16	2,09	2,61	3,27	1,57	1,40	1,57	1,72	1,73	2,34	1,76	2,51
Valenceno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-zingibereno	4,40	2,26	10,04	10,73	3,62	3,92	4,36	4,90	5,15	6,88	5,01	5,40
Trans - β - Guaieno	-	-	-	-	-	0,56	0,63	-	-	1,40	1,02	-
β-bisaboleno	2,92	-	4,43	5,07	1,49	1,72	1,81	2,33	2,38	3,23	2,43	2,08
γ - cadineno	-	-	2,08	2,27	0,68	0,77	0,85	0,99	1,19	1,55	1,21	-
β-sesquifelandreno	3,57	-	5,08	5,75	1,81	2,01	2,23	2,82	2,86	3,98	2,97	2,67
Germacreno B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zingerona	11,13	-	2,09	-	1,91	1,68	1,43	1,67	1,97	1,25	1,55	1,65
Gingerol+shogaol	62,51	93,14	65,93	64,63	84,72	84,20	81,25	79,96	80,18	72,41	79,07	76,86
Não identificados	5,30	-	1,98	-	0,90	1,08	1,72	1,01	-	1,49	1,01	2,89

^aF5: Amostra do período difusional.^b C1, E1, I1: 200 bar e 25°C; C2, E2, I2: 200 bar e 35°C; C3, E3, I3: 250 bar e 25°C; C4, E4, I4: 250 bar e 35°C. C: CO₂; E: CO₂ + EtOH, e I: CO₂ + IsoC3.

Tabela 4.9: Composição química da fração P1 do período de taxa constante de extração.

Substância	^a P1											
	^b C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
	Composição (% area)				Composição (% area)				Composição (% area)			
α -pineno	0,92	1,26	2,15	0,65	1,82	1,90	4,47	3,56	0,70	2,20	2,54	1,98
Canfeno	2,51	3,36	5,76	1,79	4,89	4,91	11,13	8,38	2,11	5,41	6,19	5,06
β -pineno	-	-	0,31	-	0,25	-	-	0,41	-	-	-	-
6-metil 5-hepteno - 2-ona	-	-	0,39	-	0,51	-	-	0,68	-	-	0,59	0,49
β -mirceno	0,94	1,05	2,04	1,23	1,64	1,39	3,22	2,31	1,33	1,71	1,78	1,66
α -felandreno	-	-	0,55	0,32	0,40	-	0,90	0,67	-	0,47	0,49	0,46
β - felandreno	5,32	5,63	10,93	6,54	9,22	7,86	17,03	12,79	7,50	9,19	9,56	9,22
1,8-cineol	2,46	2,39	4,49	2,71	4,34	3,73	6,32	4,77	2,73	3,33	3,65	3,57
m - dietilbenzeno	-	4,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o - dietilbenzeno	-	2,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinoleno	-	-	0,37	-	0,36	-	-	0,40	-	-	-	-
Linalol	0,80	0,64	0,92	0,77	1,04	1,22	1,20	1,11	0,68	0,84	0,91	0,93
Citronelal	0,50	0,45	0,61	0,55	0,69	0,88	0,85	0,66	0,52	0,56	0,56	0,58
Borneol	0,77	0,58	0,69	0,75	0,75	1,04	0,87	0,86	0,65	0,75	0,79	0,81
α -terpineol	0,53	0,41	0,49	0,54	0,53	0,68	-	0,54	-	0,51	0,54	0,53
Citronelol	0,86	0,71	0,70	0,90	0,85	1,05	0,71	0,82	0,74	0,90	0,95	0,89
Neral	5,83	4,79	5,76	6,08	6,12	7,40	5,71	5,56	5,06	5,27	5,20	5,55
Acetato de Linalol	0,58	0,49	0,44	0,63	0,60	0,71	-	0,68	0,60	0,75	0,73	0,80
Geranial	9,45	7,83	8,86	9,86	9,19	11,16	8,69	8,25	8,57	8,54	8,15	8,52
2-undecanona	0,34	-	0,32	0,35	0,35	-	-	0,33	-	-	-	0,36
α -copaeno	0,59	0,51	0,65	0,67	0,67	0,79	0,73	0,72	0,75	0,73	0,75	0,77
(E) - β - farneseno	-	-	0,29	0,32	0,31	-	-	0,34	-	-	-	-
Allo-aromadendreno	-	-	0,28	0,35	0,33	-	-	-	-	-	-	0,36
γ -muruleno	0,47	0,44	0,37	0,57	0,49	0,52	-	0,39	0,52	0,53	0,51	0,48
Ar-curcumenol	4,07	3,68	3,56	4,66	4,09	4,53	3,33	3,82	5,25	4,63	4,69	4,67
Valenceno	1,34	1,14	1,33	1,39	1,28	1,52	1,23	1,24	1,62	1,47	1,50	1,51
α -zingibereno	20,85	17,51	20,00	23,02	21,31	23,12	16,39	17,37	25,46	21,30	21,49	22,35
Trans - β - Guaíeno	2,18	1,93	2,06	2,57	2,23	2,49	1,88	2,01	2,82	2,51	2,49	2,48
α -bisaboleno	7,23	6,44	6,78	8,22	7,19	7,87	5,21	5,58	8,65	7,23	7,23	7,24
γ - cadineno	3,56	3,28	3,30	4,16	3,56	4,06	2,94	3,20	4,47	3,96	3,99	3,92
β -sesquifelandreno	8,05	7,31	7,20	9,22	7,85	8,47	6,00	6,53	9,91	8,42	8,36	8,38
Germacreno B	0,73	0,72	0,59	0,84	0,64	0,66	-	0,51	0,85	0,70	0,67	0,68
Zingerona	0,40	0,58	0,25	0,44	0,17	-	-	-	-	-	-	-
gingerol+shogaol	15,99	17,78	5,34	6,96	1,24	0,52	-	1,96	5,09	6,50	4,92	3,14
Não identificados	3,32	2,41	2,20	2,92	4,47	1,50	1,20	3,21	3,44	1,61	1,50	2,62

^a P1 Extratos retidos na coluna de captura no período de taxa constante de extração.^b C1, E1, I1: 200 bar e 25°C; C2, E2, I2: 200 bar e 35°C; C3, E3, I3: 250 bar e 25°C; C4, E4, I4: 250 bar e 35°C. C: CO₂; E: CO₂ + EtOH, e I: CO₂ + IsoC3.

Tabela 4.10: Composição química da fração P2 do período de taxa decrescente de extração.

Compound	^a P2											
	^b C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
Compound	Composição (% area)				Composição (% area)				Composição (% area)			
α -pineno	0,82	0,58	0,51	-	0,71	0,78	2,49	3,44	-	1,13	0,59	0,99
Canfeno	2,28	1,53	1,48	-	2,02	2,12	6,36	7,81	1,32	2,98	1,66	2,80
β -pineno	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-	-
6-metil 5-hepteno - 2-ona	0,32	-	0,36	-	0,33	0,33	-	0,55	-	0,55	-	-
β -mirceno	0,97	0,60	1,73	-	1,04	1,09	2,15	2,27	1,78	2,03	1,63	1,61
α -felandreno	0,24	-	0,42	-	0,26	0,34	-	0,68	-	0,57	-	-
β -felandreno	5,64	3,54	9,35	1,96	5,97	6,28	11,62	12,86	10,32	11,44	9,29	8,87
1,8-cineole	2,55	1,49	3,52	0,95	2,74	2,69	4,52	4,26	3,78	3,84	3,28	3,38
m - dietilbenzeno	-	1,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o - dietilbenzeno	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinoleno	0,23	-	0,36	-	0,24	-	-	0,39	-	-	-	-
Linalol	0,95	0,53	0,87	0,93	0,89	0,92	1,02	1,07	0,94	1,04	0,97	0,93
Citronelal	0,59	-	0,61	0,66	0,66	0,70	0,79	0,71	-	0,70	0,69	0,64
Borneol	0,83	0,62	0,73	0,88	0,83	0,87	0,82	0,86	0,89	0,92	0,93	0,86
α -terpineol	0,63	-	0,49	0,63	0,58	0,60	-	0,56	-	0,62	0,64	0,58
Citronelol	1,06	0,79	0,74	1,04	0,97	0,97	0,75	0,83	0,94	1,02	1,08	1,00
Neral	6,77	4,80	5,88	6,91	6,43	6,44	6,00	5,60	6,44	6,13	5,92	5,81
Acetato de Linalol	0,72	0,57	0,48	0,73	0,68	0,67	-	0,67	-	0,86	0,87	0,88
Geranial	11,19	8,22	9,42	11,27	10,17	10,23	9,66	9,01	10,56	9,93	9,53	9,31
2-undecanona	0,39	-	0,34	-	0,38	0,37	-	0,35	-	0,39	-	-
α -copaeno	0,66	0,52	0,70	0,80	0,74	0,75	0,80	0,73	0,89	0,85	0,86	0,81
(E) - β -farneseno	0,35	-	0,33	-	0,38	0,35	-	0,32	-	-	-	-
Allo-aromadendreno	0,34	-	0,32	-	0,37	0,37	-	0,31	-	0,40	-	-
γ -muuroleno	0,62	0,70	0,44	0,72	0,64	0,62	-	0,39	-	0,65	0,66	0,58
Ar-curcumeno	4,57	4,11	4,16	5,21	4,84	4,81	4,33	3,75	5,21	4,76	5,35	5,06
Valenceno	1,23	1,08	1,46	1,56	1,41	1,45	1,56	1,26	1,70	1,31	1,49	1,58
α -zingibereno	22,13	18,17	22,50	24,95	24,80	23,24	21,18	16,77	24,03	20,33	22,51	23,40
Trans - β - Guaieno	2,36	2,21	2,38	2,96	2,64	2,65	2,43	2,07	2,88	2,60	2,85	2,68
α -bisaboleno	7,86	7,02	7,75	9,02	8,62	8,26	6,93	5,62	8,14	7,12	7,97	7,65
γ - cadineno	3,73	3,68	3,78	4,74	4,20	4,24	3,92	3,17	4,53	4,00	4,43	4,31
β -sesquifelandreno	8,69	8,25	8,33	10,35	9,37	9,26	8,08	6,54	9,58	8,43	9,43	9,12
Germacreno B	0,78	0,74	0,69	0,87	0,75	0,75	-	0,52	-	0,61	0,73	0,73
Zingerona	0,23	0,85	0,29	0,61	-	-	-	-	-	-	-	-
gingerol+shogaol	6,05	25,72	7,08	10,17	2,77	5,23	3,76	3,48	4,98	2,62	4,80	4,86
Não identificados	4,22	0,52	2,50	0,91	3,13	2,64	0,84	2,41	-	2,17	1,84	1,57

^a P2: Extratos retidos na coluna de captura no período de taxa decrescente de extração.^b C1, E1, I1: 200 bar e 25°C; C2, E2, I2: 200 bar e 35°C; C3, E3, I3: 250 bar e 25°C; C4, E4, I4: 250 bar e 35°C. C: CO₂; E: CO₂ + EtOH, e I: CO₂ + IsoC3.

Tabela 4.11: Composição química da fração P3 da fase difusional.

Substância	^a P3											
	^b C1	C2	C3	C4	E1	E2	E3	E4	I1	I2	I3	I4
	Composição (% area)				Composição (% area)				Composição (% area)			
α -pineno	0,63	1,00	1,11	0,95	-	-	1,50	0,91	-	0,68	0,96	0,74
Canfeno	1,62	2,40	2,77	2,25	0,48	0,73	3,59	2,28	1,68	1,65	2,35	1,79
β -pineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-metil 5-hepteno - 2-ona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -mirceno	0,78	0,68	1,45	1,11	0,65	0,89	1,80	2,62	1,40	1,90	1,76	1,63
α -felandreno	-	-	0,33	-	-	-	0,50	0,69	-	-	-	-
β - felandreno	4,39	4,11	8,27	6,54	3,74	5,29	10,28	14,52	8,52	11,23	10,76	8,93
1,8-cineole	1,73	1,17	3,11	1,86	1,77	1,95	3,46	3,89	2,64	3,24	2,88	3,07
m - dietilbenzeno	-	8,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
o - dietilbenzeno	-	4,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpinoleno	-	-	0,31	-	-	-	-	0,46	-	-	-	-
Linalol	1,07	0,59	0,99	0,83	0,97	1,06	1,11	1,05	-	1,08	1,15	1,21
Citronelal	0,79	0,43	0,74	0,58	0,72	0,79	0,78	0,70	-	0,81	0,85	0,87
Borneol	1,10	0,72	0,92	0,88	0,99	1,10	1,04	0,93	1,11	0,98	1,11	1,16
α -terpineol	0,87	0,55	0,64	0,65	0,75	0,77	0,70	0,66	-	0,68	0,77	0,81
Citronelol	1,35	0,98	0,90	0,98	1,18	1,14	0,95	0,93	-	1,00	1,15	1,23
Neral	8,40	5,55	6,99	6,60	7,40	7,63	7,08	6,31	7,59	6,78	7,14	7,66
Acetato de Linalol	0,92	0,80	0,60	0,68	0,87	0,84	0,79	0,77	-	0,84	1,03	1,05
Geranial	14,63	11,11	11,93	12,72	12,24	13,38	12,29	13,02	13,69	13,19	13,14	13,33
2-undecanona	0,50	0,35	0,39	0,40	0,42	0,45	-	0,40	-	-	-	0,48
α -copaeno	0,89	1,10	0,84	0,82	0,86	0,91	0,94	0,82	-	0,95	1,05	1,04
(E) - β - farneseno	0,36	-	-	0,40	0,35	-	-	-	-	-	-	-
Allo-aromadendreno	0,39	-	0,37	-	0,42	0,46	-	0,38	-	-	-	0,46
γ -muuroleno	0,64	1,09	0,49	0,64	0,75	0,80	0,51	0,53	-	0,69	0,81	0,70
Ar-curcumeno	4,55	4,40	4,08	4,28	4,80	4,84	4,26	3,76	4,93	4,31	4,97	4,84
Valenceno	1,41	0,79	1,49	1,40	1,41	1,46	1,56	1,28	1,57	1,38	1,52	1,60
α -zingibereno	19,67	13,48	19,43	18,28	22,30	21,31	18,55	16,48	19,00	16,81	18,60	19,74
Trans - β - Guaieno	2,45	2,24	2,40	2,60	2,72	2,85	2,50	2,34	2,97	2,74	3,01	2,77
α -bisaboleno	7,10	5,76	6,75	6,82	7,74	7,64	6,13	5,77	6,86	6,45	7,00	6,78
γ - cadineno	3,62	3,21	3,48	3,74	4,09	4,13	3,44	3,29	4,04	3,69	4,04	3,87
β -sesquifelandreno	8,04	7,27	7,57	8,05	9,05	8,96	7,21	6,80	8,43	7,76	8,52	8,19
Germacreno B	0,70	0,73	0,62	0,69	0,77	0,74	0,57	0,50	-	0,60	-	0,61
Zingerona	0,38	1,52	-	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-
gingerol+shogaol	7,65	8,93	8,69	13,39	9,70	7,97	6,84	6,33	14,48	8,85	4,24	3,28
Não identificados	7,46	4,45	2,23	1,49	2,85	1,93	1,64	1,60	-	1,71	1,19	2,17

^aP3: Extratos retidos na coluna de captura na fase difusional.^b C1, E1, I1: 200 bar e 25°C; C2, E2, I2: 200 bar e 35°C; C3, E3, I3: 250 bar and 25°C; C4, E4, I4: 250 bar e 35°C. C: CO₂; E: CO₂ + EtOH, e I: CO₂ + IsoC3.

3.2.1 - Quantificação da Mistura Gingeróis e Shogaóis por Espectrofotometria de UV/ Visível

A tabela 4.12 mostra uma comparação entre a proporção relativa da fração de óleo essencial e da mistura dos gingeróis e shogaóis (antioxidantes) por CG e da concentração dos compostos antioxidantes por espectrofotometria no Ultravioleta/Visível. Em alguns casos há ocorrência de massa maior dos compostos estudados do que a massa coletada de extrato no caso da espectrometria de UV.

Tal fato leva a crer na possibilidade da existência de um ou mais compostos absorverem no mesmo comprimento de onda que o utilizado para a realização das medidas (280 nm), oriundos da fração do óleo essencial nos extratos (monoterpenos, monoterpênicos oxigenados, sesquiterpenos, etc.) ou da presença de outras substâncias não detectadas por CG, pelo fato de possuírem baixa volatilidade, por exemplo os triglicerídios, ou por serem termolábeis.

Diante destas hipóteses, foram obtidos os espectros no UV/Visível do óleo essencial de gengibre, extraído por destilação por arraste a vapor e do óleo de amendoim por este possuir triglicerídios. No primeiro caso verificou-se bandas de absorção apenas entre os comprimentos de onda de 200 a 260 nm e no segundo na região de 220 nm.

Logo, concluiu-se que ainda faz-se necessário um estudo mais aprofundado de qual composto absorve no mesmo comprimento de onda que os gingeróis e shogaóis, para a seguir proceder-se a quantificação dos mesmos por esta técnica. O apêndice G apresenta os espectros de UV/ Visível da maioria dos extratos coletados de uma mesma condição de extração e também a curva de calibração feita para o cálculo das concentrações dos compostos antioxidantes. Por fim é importante destacar que a escolha do solvente utilizado para as análises, bem como do comprimento de onda utilizados foram baseados em dados descritos na literatura [HE *et al.*, 1997].

Tabela 4.12: Comparação entre a proporção relativa de óleo essencial mistura de gingeróis e shogaóis e a concentração dos compostos antioxidantes por UV/Visível.

Extrato	CROMATOGRAFIA		UV
	Óleo essencial (%) [#]	Gingeróis (%) [#]	Gingeróis (%) [#]
CO₂			
200bar/25°C – 1 h	62,58	37,42	47,29
200bar/25°C – 2 h	47,48	52,52	89,72
200bar/25°C – 4,5 h	37,49	62,51	-
200bar/25°C – 5,5 h	-	-	16,18
200bar/35°C – 1 h	51,76	48,24	62,15
200bar/35°C – 2 h	26,41	73,59	90,96
200bar/35°C – 4,5 h	6,86	93,14	-
200bar/35°C – 6 h	-	-	68,73
250bar/25°C – 1 h	66,72	33,28	70,24
250bar/25°C – 2 h	58,20	41,80	85,48
250bar/25°C – 4,5 h	34,08	65,92	-
250bar/25°C – 4 h	-	-	128,47*
250bar/35°C – 1 h	61,40	38,77	38,92
250bar/35°C – 2 h	56,06	43,97	72,56
250bar/35°C – 4,5 h	35,37	64,63	67,60
CO₂+Etanol			
200bar/25°C – 1 h	56,99	43,01	87,23
200bar/25°C – 2 h	50,70	50,62	77,67
200bar/25°C – 4,5 h	15,28	84,81	97,64
200bar/35°C – 1 h	53,59	46,41	62,88
200bar/35°C – 2 h	50,31	49,69	84,11
200bar/35°C – 4 h	-	-	134,30*
200bar/35°C – 4,5 h	15,80	84,20	-
250bar/25°C – 1 h	51,32	48,68	92,18
250bar/25°C – 2 h	49,49	50,51	79,66
250bar/25°C – 4,5 h	18,74	81,26	69,48
250bar/35°C – 1 h	51,49	48,51	72,56
250bar/35°C – 2 h	44,91	55,10	67,05
250bar/35°C – 4,5 h	20,04	79,96	-
250bar/35°C – 5 h	-	-	61,34
CO₂+Isopropanol			
200bar/25°C – 1 h	57,51	42,49	65,96
200bar/25°C – 2 h	29,55	70,45	57,84
200bar/25°C – 4,5 h	19,83	80,17	70,82
250bar/35°C – 1 h	49,92	50,08	65,64
250bar/35°C – 2 h	40,79	59,21	93,82
250bar/35°C – 4,5 h	27,59	72,41	83,97
200bar/35°C – 1 h	53,86	46,14	80,92
200bar/35°C – 2 h	35,48	64,52	56,19
200bar/35°C – 4,5 h	20,94	79,07	94,92
250bar/25°C – 1 h	58,95	41,05	85,29
250bar/25°C – 2 h	47,54	52,46	82,22
250bar/25°C – 4,5 h	23,14	76,86	77,52

[#]Porcentagem calculada em relação ao extrato total;

*Este resultado confirma o fato de não ser possível quantificar os gingeróis diretamente no extrato, pois certamente existem interferentes absorvendo no mesmo comprimento de onda.

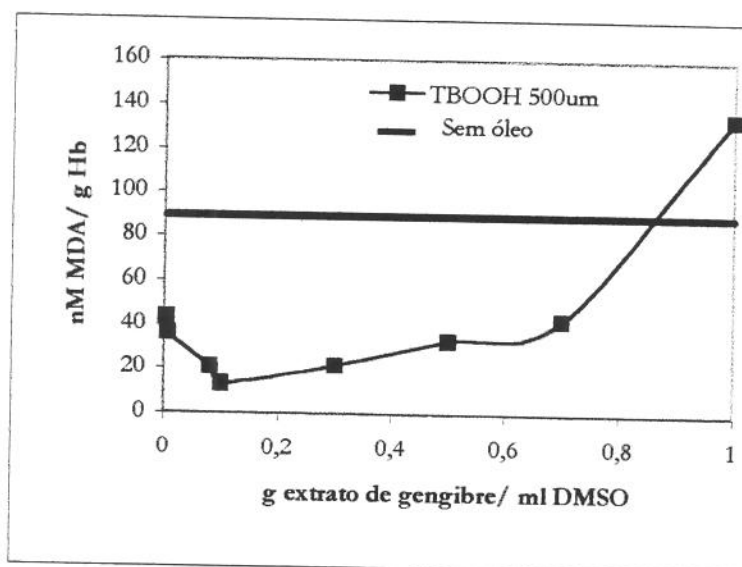
4.3- Ação Antioxidante

4.3.1 - Peroxidação da Membrana Lipídica da Hemoglobina

Testes preliminares foram realizados para encontrar-se uma concentração apropriada de agente oxidante, bem como uma faixa de concentração do óleo ideal para estudo do comportamento de inibição da peroxidação da membrana lipídica da hemoglobina. Para o agente oxidante foi utilizada uma concentração de 500 μM e a concentração do óleo variou de 0,005 g extrato de gengibre/ml dimetilsulfóxido a 1 g extrato de gengibre/ml dimetilsulfóxido (DMSO). A tabela 4.13 apresenta as porcentagens de inibição máximas para peroxidação e as respectivas concentrações dos extratos analisados. Todos os extratos de gengibre testados apresentaram comportamento similar, ou seja, para concentrações de extrato de gengibre compreendidas entre 0,005 e 0,08 g extrato de gengibre/ ml de DMSO a ação antioxidante não é muito intensa oscilando de 30 a 50% de inibição, enquanto que para valores compreendidos entre 0,08 a 0,3 g extrato de gengibre/ ml de DMSO a proteção varia de 70 a 85% apresentando o seu máximo de proteção dentro deste range de concentração do extrato de gengibre. Para valores acima desta faixa a proteção contra a oxidação começa a decair até que para valores entre 0,8 e 1 g extrato de gengibre/ ml de DMSO ocorre uma inversão do efeito antioxidante para efeito prooxidante do extrato de gengibre o que concorda com o encontrado por ARUOMA *et al.* [1995]. Um branco com extrato e agente oxidante (TBOOH) foi realizado. Neste teste observou-se que oxidação do extrato pelo TBOOH forneceu maiores concentrações de malondialdeído que as encontradas para o sistema extrato, hemoglobina, TBOOH. Ficou evidente que a existência de interação entre estes três componentes do sistema faz com que o comportamento do mesmo seja diferente e melhor do que para extrato e TBOOH. Uma sugestão seria a avaliação isolada de cada um dos compostos antioxidantes presentes no extrato de gengibre. A figura 4.7 apresenta um gráfico que mostra o comportamento da ação antioxidante do extrato de gengibre variando-se a concentração deste para uma concentração fixa de agente oxidante.

Tabela 4.13: Porcentagens máximas de inibição da peroxidação da hemoglobina e respectivas concentrações do extrato de gengibre.

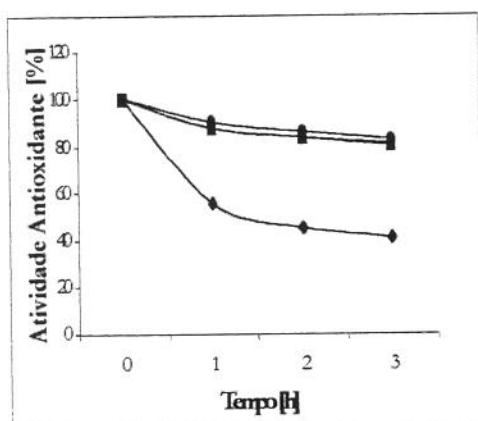
Amostra	Concentração de óleo (g extrato de gengibre/ ml de DMSO)	% de inibição
250bar/25°C/CO ₂ – 1 h de extração	0,1	68,58
250bar/25°C/CO ₂ – 2 h de extração	0,1	85,27
200bar/35°C/CO ₂ – 2 h de extração	0,08	70,
200bar/35°C/CO ₂ – 5,5 h de extração	0,1	76,41

**Figura 4.7:** Comportamento da ação antioxidante do extrato de gengibre variando-se a concentração deste para uma concentração fixa de agente oxidante (TBOOH) igual a 500 µM.

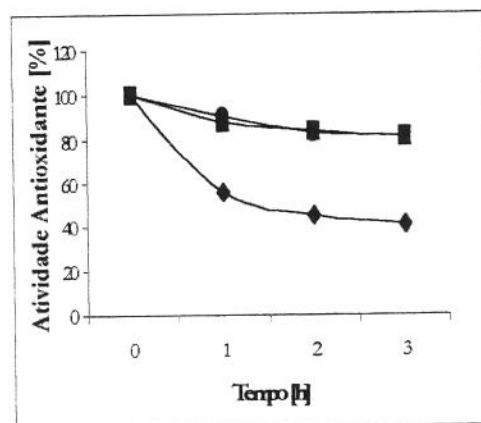
4.3.2 -Oxidação acoplada do Ácido Linolêico e do β -caroteno

Os extratos de gengibre obtidos apresentaram valores de ação antioxidante muito próximos para quase todas as condições experimentais utilizadas neste trabalho o que pode ser melhor visualizado na figura 4.8. A tabela 4.14 mostra as ação antioxidante dos extratos de gengibre obtidos. E a figura 4.9 apresenta uma comparação entre a ação antioxidante de cada extrato produzido para a condição de 200 bar/ 25°C e etanol 1,17% (m/m) e a massa total gerada durante o processo de extração de cada extrato analisado (massa pontual). Através deste gráfico pode-se perceber que a ação antioxidante não está relacionada com a

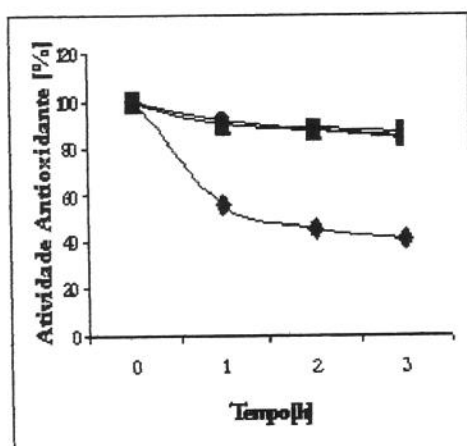
massa total de cada extrato coletado, mas sim da composição química do mesmo. Através da cromatografia gasosa constatou-se que os compostos antioxidantes, gingeróis e shogaóis, estão presentes em todos os extratos explicando o fato de todos os extratos de gengibre possuírem em média ação antioxidante de cerca de 80%.



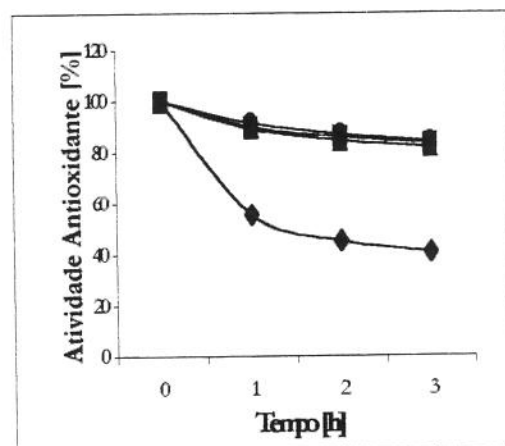
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.8: Ação antioxidante dos extratos de gengibre obtidos com $\text{CO}_2 + \text{EtOH}$, onde (a) E1 (200 bar/ 25°C), (b) E2 (200 bar/35°C), (c) E3 (250 bar/25°C) e (d) E4 (250 bar/35°C). ◆: controle; ■: F2, primeira hora de extração, correspondente a taxa constante de extração, ▲: F4, segunda hora de extração, correspondente a taxa decrescente de extração; ●: F9, quarta hora e meia de extração, para (a), (c) e (d) e F13, sexta hora e meia de extração para (b), correspondente a fase difusional da extração.

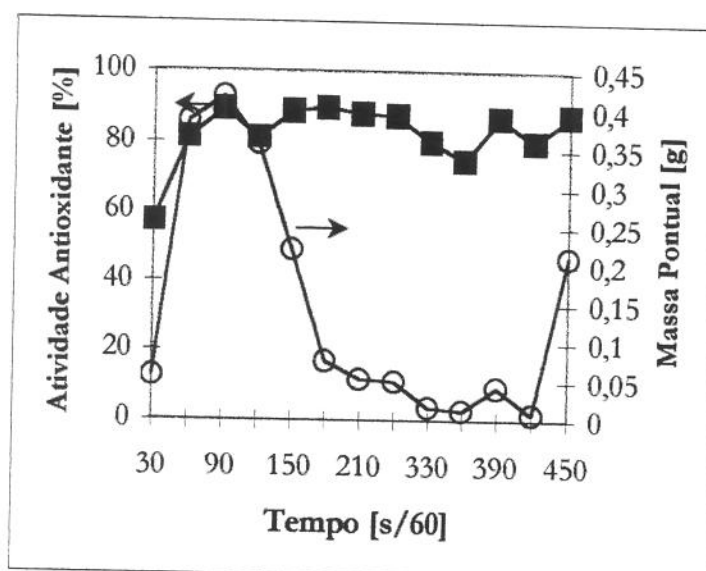


Figura 4.9: Comparação entre a ação antioxidante de cada extrato de gengibre coletado para a condição de 200 bar/ 25°C e etanol 1,17%(m/m) e a massa pontual. Os extratos coletados com 270 minutos e 300 minutos foram os únicos não analisados nesta condição de extração.

Tabela 4.14: Ação Antioxidante (AA) dos extratos de gengibre para 3 horas de reação.

	CO ₂	AA [%]	CO ₂ + EtOH	AA [%]	CO ₂ + IsoC3	AA [%]
Taxa constante	200bar /25°C	85,14	200bar /25°C	80,62	200bar /25°C	83,17
	1 h		1 h		1 h	
Taxa Decrescente	200bar /25°C	88,45	200bar /25°C	81,33	200bar /25°C	85,84
	2 h		2 h		2 h	
Fase Difusional	200bar /25°C	69,63	200bar /25°C	83,11	200bar /25°C	85,63
	4,5 h		4,5 h		5,5 h	
Taxa constante	200bar /35°C	87,16	200bar /35°C	81,38	200bar /35°C	82,24
	1 h		1 h		1 h	
Taxa Decrescente	200bar /35°C	86,77	200bar /35°C	81,28	200bar /35°C	83,92
	2 h		2 h		2 h	
Fase Difusional	200bar /35°C	67,91	200bar /25°C	81,01	200bar /25°C	83,59
	4 h		6,5 h		4,5 h	
Taxa constante	250bar /25°C	88,38	250bar /25°C	86,17	250bar /25°C	85,97
	1 h		1 h		1 h	
Taxa Decrescente	250bar /25°C	88,63	250bar /25°C	84,71	250bar /25°C	84,01
	2 h		2 h		2 h	
Fase Difusional	250bar /25°C	72,75	250bar /25°C	84,23	250bar /25°C	85,08
	6,5 h		4,5 h		5 h	
Taxa constante	250bar /35°C	77,75	250bar /35°C	83,30	250bar /35°C	84,90
	1 h		1 h		1 h	
Taxa Decrescente	250bar /35°C	78,96	250bar /35°C	81,92	250bar /35°C	83,16
	2 h		2 h		2 h	
Fase Difusional	250bar /35°C	69,63	250bar /35°C	83,97	250bar /35°C	84,91
	5,5 h		4,5 h		4,5 h	

4.4 - Ação Anticancerígena

O teste de ação anticancerígena foi realizado com uma fração obtida com dióxido de carbono e etanol na pressão de 200 bar e 35°C. Os resultados podem ser melhor visualizados através do gráfico da figura 4.10. Nota-se que os melhores resultados foram obtidos para os cânceres de mama, mama resistente e o de pulmão, onde a porcentagem máxima de morte foi de aproximadamente 90% para uma concentração de extrato de 125 µg/ml no caso do câncer de mama resistente. Nos outros casos não houve morte celular significativa muito embora tenha havido decréscimo do crescimento celular para esta mesma concentração de extrato, em relação a concentração inicial.

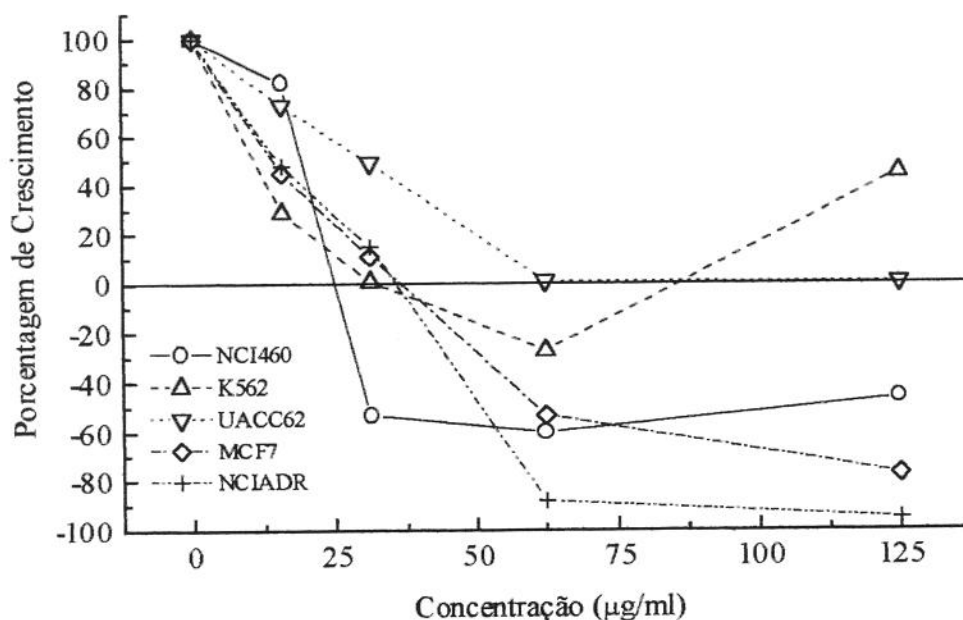


Figura 4.10: Comparação entre o comportamento das diferentes linhagens de câncer testadas com a variação da concentração de extrato de gengibre. NCI640: câncer de pulmão; K562: leucemia; UACC62: melanoma; MCF7: câncer de mama; NCIADR: câncer de mama resistente.

4.5 - Ação Bactericida

A tabela 4.15 mostra as concentrações mínimas de inibição encontradas para cada extrato avaliado referente às bactérias testadas. Os testes mostraram-se bastante significativos principalmente para a *Mycobacterium kansasii* onde para todos os extratos analisados a exceção do extrato obtido na condição de extração CO₂/200bar/35°C na fase difusional a concentração mínima de inibição (MIC) foi de 32 µg/ml o que é um valor bastante baixo. Para as outras bactérias estudadas os resultados também foram bons para a maioria dos extratos avaliados. Pode-se concluir que a partir destes testes outros mais específicos devem ser feitos isolando-se as substâncias antioxidantes dos extratos e verificando-se a ação bactericida destas frente a estas bactérias. É importante ressaltar que as concentrações mínimas de inibição do crescimento destas bactérias foram avaliadas com extratos e não com substâncias isolados, logo é esperado que os valores sejam ainda menores quando avaliadas para as substâncias puras. HISERODT *et al.* [1998] concluíram que para uma substância isolada o MIC é mais baixo do que para a fração bruta, por exemplo, no trabalho destes pesquisadores, o 10-gingerol apresentou um MIC de 25 µg/ml, enquanto que para a fração bruta o valor foi maior que 100 µg/ml.

Tabela 4.15: Concentrações mínimas de inibição (µg/ml), MIC, dos extratos avaliados.

Extratos	*Ra	+Rv	#Ma	*Mk	*Mi	*Mm
CO ₂ /200bar/35°C -1h	128	64	512	32	256	256
CO ₂ +EtOH/200bar/25°C -1h	64	64	256	32	256	256
CO ₂ +IsopC3/200bar/25°C -1h	128	64	512	32	256	256
CO ₂ /200bar/25°C -2h	128	64	256	32	256	256
CO ₂ /200bar/35°C -2h	128	256	256	32	256	256
CO ₂ /250bar/25°C -2h	128	128	512	32	256	256
CO ₂ /200bar/35°C - 4,5h	>256	>256	>2048	>256	>256	>2048
CO ₂ +EtOH/200bar/35°C - 4,5h	128	128	512	32	512	512

*Ra: *Mycobacterium tuberculosis avirulenta*

+Rv: *Mycobacterium tuberculosis virulenta*

#Ma: *Mycobacterium avium*

*Mk: *Mycobacterium kansasii*

*Mi: *Mycobacterium intracellulare*

*Mm: *Mycobacterium malmoeense*

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A análise estatística mostrou que taxa de transferência de massa foi adequadamente descrita como uma função da pressão, da vazão de solvente e do tipo de solvente tendo-se utilizado a vazão de solvente e de CO₂ como co-variáveis. O efeito da temperatura sobre o M_{CER} não foi significativo, enquanto que a pressão e o tipo de solvente, bem como a interação entre estes fatores foram significativos. Já o rendimento total foi descrito pelos efeitos da vazão de solvente, vazão de CO₂, pressão, tipo de solvente, temperatura e interação entre pressão e tipo de solvente. Os efeitos significantes foram temperatura e a interação entre pressão e tipo de solvente. O aumento da temperatura de 25 para 35°C aumentou o rendimento total de 1,94% para 2,5%. Observou-se também um decréscimo no rendimento devido a interação entre os efeitos pressão e tipo de solvente para todos os tipos de solvente empregados quando a pressão aumentou de 200bar para 250bar.

A análise cromatográfica mostrou de um modo geral que o extrato de gengibre (monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos gingeróis e shogaóis) tanto no período de taxa constante de extração como no de taxa decrescente apresentam um perfil cromatográfico muito semelhante. Para os extratos obtidos na fase difusional pode-se observar a preponderância dos gingeróis e shogaóis para todas as condições empregadas.

A espectrofotometria de UV/Visível mostrou-se inadequada para a quantificação dos gingeróis e shogaóis. Ainda faz-se necessário um estudo mais aprofundado de qual composto absorve no mesmo comprimento de onda que os gingeróis e shogaóis para a seguir proceder-se a quantificação dos mesmos por esta técnica.

Os testes de peroxidação lipídica da membrana da hemoglobina apresentaram comportamento similar, ou seja, para concentrações de óleo compreendidas entre 0,005 e

0,08 g extrato de gengibre/ ml de DMSO a ação antioxidante não é muito intensa oscilando de 30 a 50% de inibição, enquanto que para valores compreendidos entre 0,08 a 0,3 g extrato de gengibre/ ml de DMSO a proteção varia de 70 a 85% apresentando o seu máximo de proteção dentro deste range de concentração do óleo. Para valores acima desta faixa a proteção contra a oxidação começa a decair até que para valores entre 0,8 e 1 g extrato de gengibre/ ml de DMSO ocorre uma inversão do efeito antioxidante para efeito prooxidante do óleo de gengibre. A existência de interação entre hemoglobina, extrato de gengibre e agente antioxidante também foi verificada. Para os testes de reação acoplada do β - caroteno e do ácido linoléico constatou-se que os extratos obtidos apresentaram valores de ação antioxidante, cerca de 80%, muito próximos para quase todas as condições experimentais utilizadas neste trabalho.

Os extratos mostraram-se eficazes para os cânceres de mama, mama resistente e de pulmão, onde a porcentagem máxima de morte foi de aproximadamente 90% para uma concentração de extrato de 125 μ g/ml no caso do cancer de mama resistente.

Os testes de ação bactericida revelaram significativa ação principalmente para a *Mycobacterium kansasii* onde para todos os extratos analisados a exceção do extrato obtido na condição de extração CO₂/200bar/35°C da fase difusional o MIC (concentração mínima de inibição) foi de 32 μ g/ml.

SUGESTÕES

Estudo da cinética de extrações de condições que utilizem maiores porcentagens de co-solventes.

Estudo tanto da ação bactericida como da ação anticancerígena dos compostos isoladamente das classes gingeróis e shogaóis , por exemplo do 6-gingerol e 6-shogaol.

Adequação da metodologia para determinação de gingeróis e shogaóis por espectrofotometria de UV com eliminação dos possíveis interferentes.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 1st Ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, p.468, 1995.
- AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; SCOTT, B.C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. & ARUOMA, O. I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chemistry and Toxicology**, v.32, n.1, p.31-36, 1993.
- ARUOMA, O. I.; SPENCER, J. P. E.; WARREN, D.; JENNER, P.; BUTLER, J. & HALLIWELL, B. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chemistry**, v.60, n.2, p.149-156, 1995.
- BADALYAN, A. G.; GORDON, T. W.; CHUN, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. **Journal of Supercritical Fluid**, v.13, p.319-324, 1998.
- BARANOWSKY, J. D. High performance liquid chromatography separation of pungency components of ginger. **Journal of Chromatography**, v.319, p.475-477, 1984.

- BARTLEY, J. P. A new method for the determination of oungente compounds in ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.68 n.2, p.215-222, 1995.
- BARTLEY, J. P & FOLEY, P. Supercritical fluid extraction of australian-grauwn ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.66 n.3, p.365-371, 1994.
- BATH, M.M.; ZHOU, C.; KUTE, K.M. & ROSENTHAL, G.A. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n. 11, p. 2876-2878, 1995.
- BOTT, T.R. Fundamental of carbon dioxide in solvente extraction. **Chemical Industry**, v.19 n.6,p. 394-396, 1982.
- BROD, F. R., OLIVEIRA, R. A., PARK, K. J. **Estudo de um Secador Convectivo Conjugado de Fluxo Perpendicular e Paralelo**. XXIX Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, Fortaleza, Ceará, julho 2000.
- BRUNNER, G. **Gás Extraction: An introduction to fundamentals os Supercritical Fluis and applications to separations processes**. 1ª Ed., Steikopff Darmstadt, New York, Springer, 1994, v. 4, p.387.
- BRODKEY, R. S. & HERSHEY, H. C. **Trasnport Phenomena**. New York, McGraw-Hill, 1988.
- CHARPENTIER, A. B., SEVENANTS, M. R. **Supercritical Fluid Extraction and Chromatography**. 2ª Ed., Copyright, p.254, 1987.

- CHEN, C.C. & HO, C.T. Gas chromatographic analysis of thermal degradation products of gingerol compounds in steam-distilled oil from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal of Chromatography**, v.387, p.499-504, 1987.
- CHEN, C. C.; ROSEN, R.T.& HO, C.T. Chromatography analyses of isomeric shogaol compounds derived from isolated gingerol compounds of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal of Chromatography**, v.360, p.175-184, 1986.
- CYGNAROWICZ, M. L. & SEIDER, W. D. Design and control of a process to extract β -carotene with supercritical carbon dioxide. **Biotechnology Products**, v.6, n.1, p. 82-91, 1990.
- DUNFORD, N. T. & TEMELLI, F. Extraction of phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.72,n. 9, p.1009-1015, 1995.
- FERREIRA, S.R.S. **Cinética de transferência de massa na extração supercrítica da oleoresina essencial de pimenta-do-reino**. Campinas, 1996, p.218. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV,Z.L.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A. & PETENATE, J.A. Supercritical Fluid Extraction of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **The Journal of Supercritical Fluid**, v.14, 235-245, 1999.
- FERRUA, F. Q. **Estudo da cinética de extração do cravo-da-índia em leito fixo com CO₂ líquido**. Campinas, 1993, p. 156. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- FRANÇA, L. F. **Extração de carotenos com CO₂ supercrítico das fibras resultantes da prensagem na indústria de óleo de palma**. Campinas, 1999, p.176 Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.A.; MACHADO, N.T. & BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from bariti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the amazon region. **The Journal of Supercritical Fluid**, v.14, p.247-256, 1999.
- GOVINDARAJAN, V.S. Ginger: chemistry, tecnology and quality evaluation. CRC – critical revision. **Food Science Nutrition**, v.17, p.1-96, 1982.
- HE, X.G.; BERNAT, M.W.; LIAN,L.Z. & LIN,L.Z. High - performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of pungent constituents of ginger. **Journal of Chromatography**, v.796, p.327-334, 1997.
- HISERODT, R.D.; FRANZBLAU, S.G. & ROSEN, R.T. Isolation of 6-, 8-, and 10-gingerol from ginger rhizome by HPLC and preliminary evaluation of inhibition of *Mycobacteriom avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2504-2508, 1998.
- KIKUZAKI, H. & NAKATANI, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. **Journal of Food Science**, v.58,n.6,p.1407-1410, 1993.
- LEE, Y. B.; KIM, Y. S. & ASHMORE, C. R. Antioxidant property in ginger rhizome and its applications to meat products. **Journal of Food Science**, v.51,n.1,p.20-23, 1986.

- MADHAVI, D.L., DESHPANDE, S. S., SALUNKHE, D. K. **Food Antioxidants. Techological, Toxicological and Healh Perspectives.** New York, Marcel Dekker Inc.,1996.
- MCLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D.B. **The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data.** John Wiley and Sons: New York, v.1, 1989.
- MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M. O.M & PETENATE, A.J. Extraction of the soluble material from the shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO₂ and other solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.11, p.91-102, 1997.
- MONTEIRO, A. R. **Extração do óleo essencial/oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com CO₂ supercrítico: uma avaliação do pré-tratamento e das variáveis de processo.** Campinas, 1999, p.176 Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NISHIMURA, O. Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis amd modified multidimensional gas chromatography- mass spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2941-2945, 1995.
- NOBREGA, L. P., MONTEIRO, A. R., MEIRELES, M. A. A., MARQUES, M. O. M. Comparision of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin obtained with ethanol and isopropanol with that obtained with pressurized CO₂. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.4, p.408-412, 1997.

- PAULAITIS, E. M.; KRUKONIS, V. J.; KURNIK, R. K. & REID, R.C. Supercritical fluid extraction. **Review in Chemistry**, v.1, n.2, p.179-250, 1983.
- PRATT, D. E., BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, **Journal of Food Science**, v.44, p.1720-1722, 1979.
- PELLERIN, P. Extraction of natural raw materials for the flavor industry. **Perfumer & Flavorist**, p.37-41, 1991.
- PURSEGLOVE, J.W., BROWN, E.G., GREEN, C.L., ROBBINS, S.R.J. Tropical Agriculture Series. **Spices**, v.2, p.447-531, 1981.
- ROY, C. B.; GOTO, M. & HIROSE, T. Extraction of ginger oil with supercritical carbon dioxide: experimental and modeling. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.35, n.2, p.607-612, 1996.
- RODRIGUES, V. M. **Determinação da solubilidade dos óleos essenciais de: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) e erva doce (*Pimpinella anisium*) em CO₂ pressurizado.** Campinas, 1996, p.176 Exame de qualificação(Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RODRIGUES, V. M., MEIRELES, M. A. A., MARQUES, M. O. M. **Proceedings of 5th International Symposium on Supercritical Fluids.** Westin Atlanta, Georgia – USA, April, 2000.Cdrom.
- SPIRO & KANDIAH, M. Extraction of ginger rhizome: partition constants and other equilibrium properties in organic solvents and in supercritical carbon dioxide. **International Journal of Food Science and Technology**, v.25, p.566-575, 1990.

- SPIRO, M.; KANDIAH, M.& PRICE, W. Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with dichloromethane, ethanol, 2-propanol and na acetone-water misture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.25, p.157-167, 1990.
- STOCKS, J.; DORMANDY, L. The autoxidation of human red blood cell lipid induced by hydrogen peroxide. **British Journal of Haematol**, v.20, p.95-98,1971.
- TAVEIRA MAGALHÃES, M.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; DUARTE, F. R.; GODOY, R. L. O. & LOPES, D. Gengibre. (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte 1- aspectos gerais, óleo essencial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.1, p.64-69,1997a
- TAVEIRA MAGALHÃES, M.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; DUARTE, F. R.; CORNEJO, F. E. P. & MARQUES, L. M. R Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte 2- secagem, óleo essencial e oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.132-136, 1997b
- TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extaction**. John Wiley & Sons Inc., Canada, p.181, 1996.
- WU, J. J. & YANG, J.S. Effects of γ irradiation on the volatile compounds of ginger rhizome (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.2574-2577, 1994.
- YONEY, Y.; OHINATA, H.; YOSHIDA, R.; YUKIO, S. & YOKOYAMA, C. Extraction of ginger flavor with liquid or supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.8, n.2, p.156-161, 1995.

ANEXO A

Treinamento

O treinamento foi realizado na unidade de extração 2 do LASEFI com duas matérias-primas distintas, o cravo e o capim-limão. Tais material foram utilizados porque já foram amplamente estudadas no LASEFI, conhecendo-se portanto o comportamento das mesmas. O treinamento foi realizado para aprendizado de operação do equipamento, bem como do preparo do material utilizado durante as extrações e também da matéria-prima. A figura A.1 apresenta a curva de extração obtida para o cravo e a figura A.2 a curva de extração do gengibre.

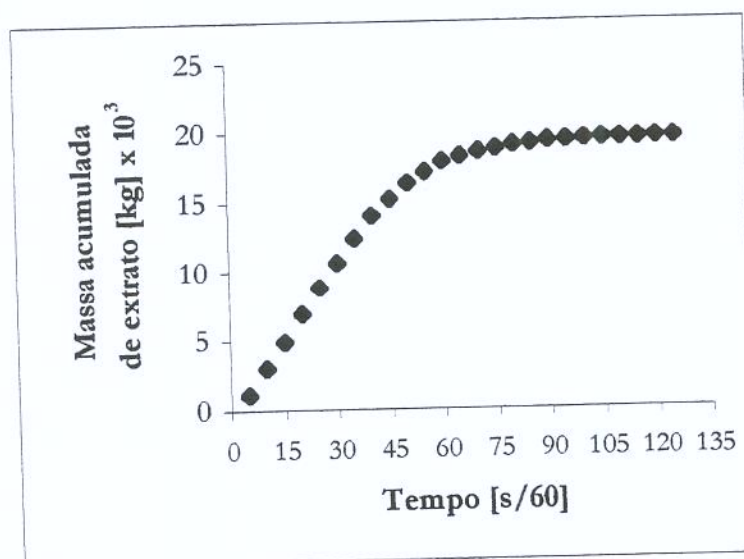


Figura A.1: Curva de extração do cravo.

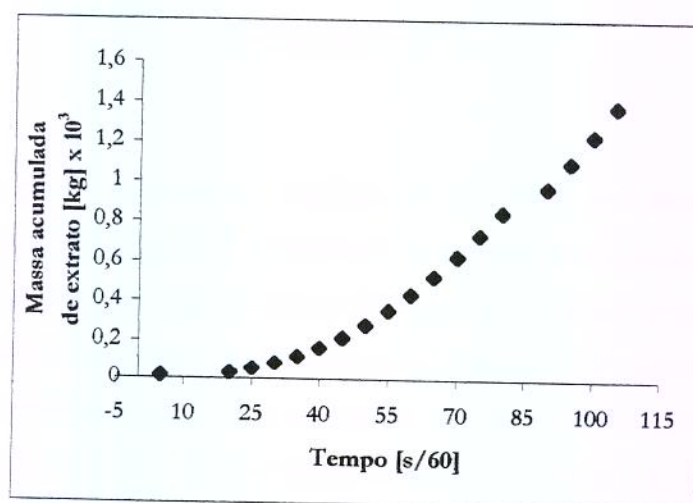


Figura A.2: Curva de extração do gengibre.

ANEXO B

Dados dos Experimentos

Experimento 1

Tabela B.1: Experimento realizado a 200 bar e 25°C com CO₂ e vazão experimental de $5,87 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0855	0,1654	0,1654	0,2068
60	0,2067	0,2673	0,4327	0,5409
90	0,2859	0,3594	0,7921	0,9902
120	0,1593	0,2326	1,0247	1,2810
150	0,1194	0,1581	1,1828	1,4787
180	0,0480	0,0671	1,2499	1,5626
210	0,0403	0,0564	1,3063	1,6331
240	0,0383	0,0536	1,3599	1,7001
270	0,0313	0,0887	1,4486	1,8110
300	0,0314	0,0314	1,4800	1,8502
330	0,0252	0,0252	1,5052	1,8817
360	0,0340	0,0340	1,5392	1,9242
390	0,0263	0,0263	1,5655	1,9571
420	0,0255	0,0255	1,5910	1,9890
Despressurização	0,0911	0,0911	1,6821	2,1029

Massa total de extrato retida nos porapack's = 0,4270 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

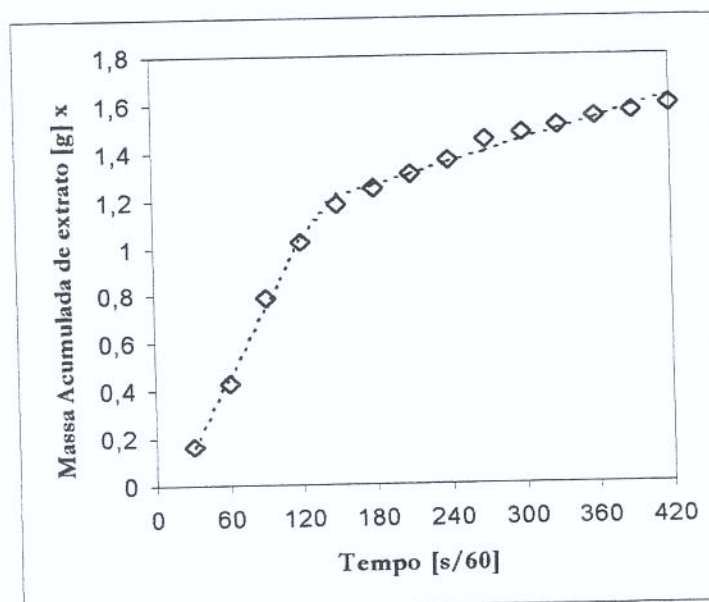


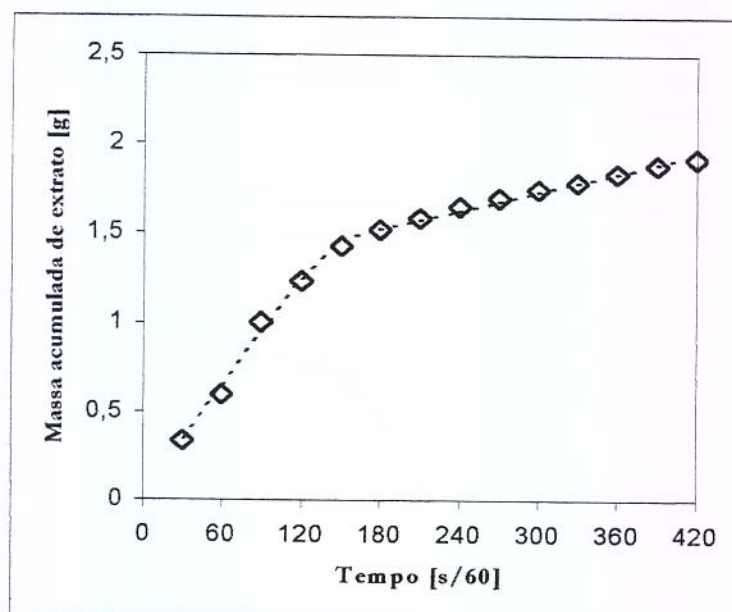
Figura B.1: Curva de extração do experimento 1.

Experimento 2**Tabela B.2:** Experimento realizado a 200 bar e 35°C com CO₂ e vazão experimental de $5,9 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,2220	0,3669	0,3369	0,4192
60	0,1662	0,2305	0,5974	0,7434
90	0,2401	0,4055	1,0029	1,2480
120	0,1727	0,2277	1,2306	1,5314
150	0,1503	0,1981	1,4287	1,7779
180	0,0597	0,0913	1,5200	1,8915
210	0,0422	0,0646	1,5846	1,9719
240	0,0431	0,0642	1,6488	2,0518
270	0,0306	0,0456	1,6943	2,1084
300	0,0329	0,0490	1,7433	2,1694
330	0,0277	0,0412	1,7846	2,2208
360	0,0345	0,0514	1,8360	2,2847
390	0,0310	0,0462	1,8821	2,3421
420	0,0251	0,0374	1,9195	2,3886
Despressurização	0,2070	0,2070	2,1285	2,6487

Massa total de extrato retida no porapack = 0,6414 g

* Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

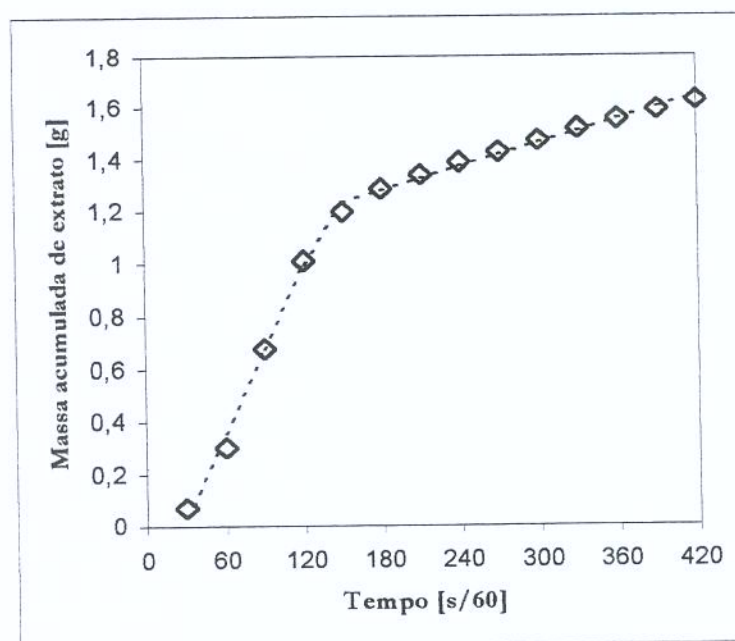
**Figura B.2:** Curva de extração do experimento 2.

Experimento 3**Tabela B.3:** Experimento realizado a 250 bar e 25°C com CO₂ e vazão experimental de $5,91 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0321	0,0702	0,0702	0,0868
60	0,1976	0,2307	0,3009	0,3720
90	0,3249	0,3753	0,6762	0,8361
120	0,2881	0,3337	1,0099	1,2486
150	0,1522	0,1874	1,1973	1,4803
180	0,0702	0,0865	1,2838	1,5873
210	0,0414	0,0538	1,3376	1,6538
240	0,0366	0,0476	1,3851	1,7125
270	0,0302	0,0392	1,4244	1,7611
300	0,0376	0,0453	1,4700	1,8175
330	0,0378	0,0455	1,5152	1,8734
360	0,0299	0,0360	1,5511	1,9178
390	0,0299	0,0351	1,5863	1,9613
420	0,0334	0,0383	1,6246	2,0087
Despressurização	0,1455	0,1671	1,7917	2,2153

Massa total de extrato retida no porapack = 0,3057 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

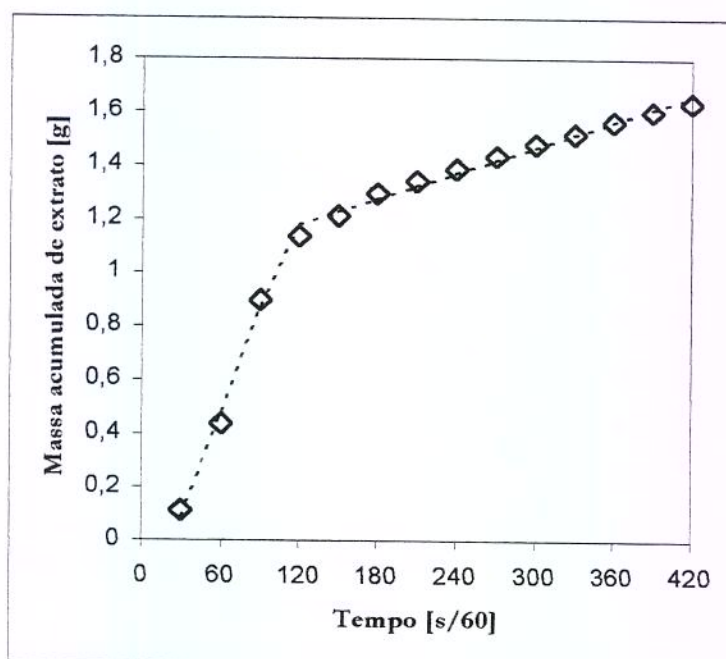
**Figura B.3:** Curva de extração do experimento 3.

Experimento 4**Tabela B.4:** Experimento realizado a 250 bar e 35°C com CO₂ e vazão experimental de $5,87 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0453	0,1096	0,1096	0,1381
60	0,2520	0,3273	0,4369	0,5505
90	0,3814	0,4606	0,8975	1,1308
120	0,1983	0,2395	1,1370	1,4325
150	0,0535	0,0766	1,2136	1,5290
180	0,0572	0,0823	1,2959	1,6327
210	0,0367	0,0475	1,3434	1,6926
240	0,0339	0,0439	1,3873	1,7479
270	0,0382	0,0496	1,4369	1,8104
300	0,0374	0,0452	1,4821	1,8673
330	0,0315	0,0380	1,5201	1,9152
360	0,0361	0,0436	1,5637	1,9701
390	0,0335	0,0406	1,6043	2,0213
420	0,0287	0,0333	1,6376	2,0632
Despressurização	0,1848	0,2157	1,8533	2,3350

Massa total de extrato retida no porapack = 0,4045 g

* Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

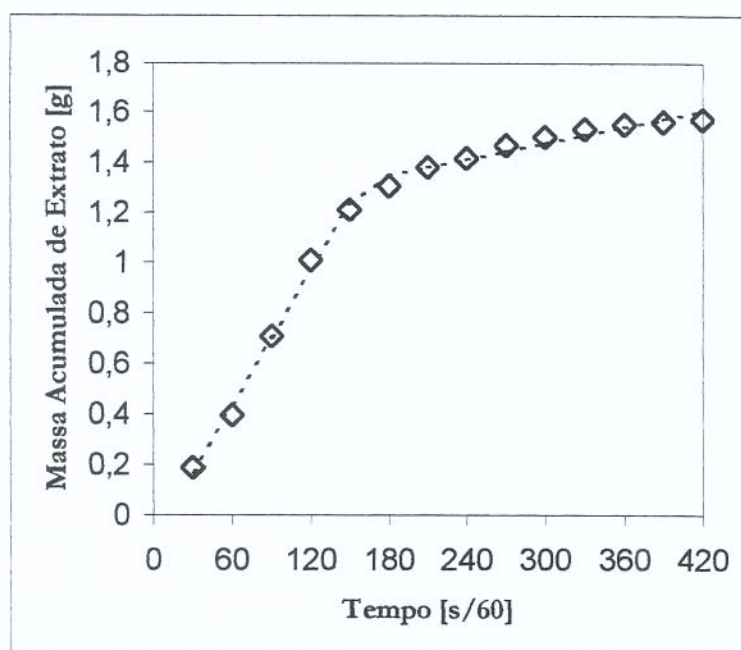
**Figura B.4:** Curva de extração do experimento 4.

Experimento 5**Tabela B.5:** Experimento realizado a 200 bar e 25°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,85 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,1361	0,1873	0,1873	0,2355
60	0,1632	0,2062	0,3935	0,4948
90	0,2684	0,3138	0,7073	0,8895
120	0,2587	0,3024	1,0097	1,2697
150	0,1697	0,2011	1,2108	1,5226
180	0,0810	0,0960	1,3067	1,6432
210	0,0627	0,0743	1,381	1,7367
240	0,0301	0,0357	1,4167	1,7816
270	0,0386	0,0502	1,4669	1,8447
300	0,0256	0,0333	1,5002	1,8866
330	0,0229	0,0298	1,5300	1,9240
360	0,0138	0,0179	1,5479	1,9466
390	0,0096	0,0107	1,5586	1,9600
420	0,0094	0,0104	1,5690	1,9731
Despressurização	0,2438	0,2708	1,8398	2,3136

Massa total de extrato retida no porapack = 0,3062 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentando-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

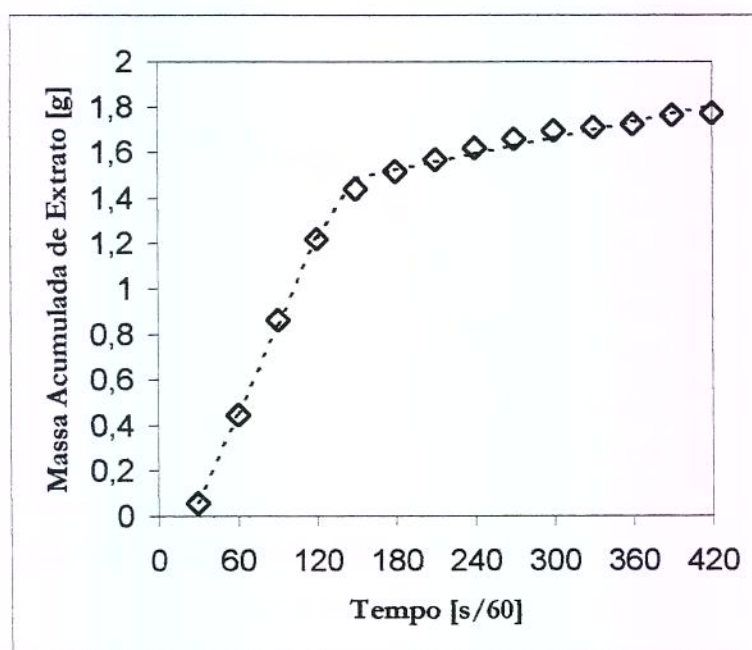
**Figura B.5:** Curva de extração do experimento 5.

Experimento 6**Tabela B.6:** Experimento realizado a 200 bar e 35°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,77 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0053	0,0568	0,0568	0,0710
60	0,2847	0,3871	0,4439	0,5547
90	0,3603	0,4175	0,8614	1,0763
120	0,3084	0,3574	1,2188	1,5229
150	0,1926	0,2204	1,4391	1,7982
180	0,0669	0,0765	1,5157	1,8939
210	0,0456	0,0522	1,5678	1,9590
240	0,0434	0,0497	1,6175	2,0211
270	0,0247	0,0399	1,6573	2,0708
300	0,0221	0,0357	1,693	2,1155
330	0,0100	0,0161	1,7091	2,1356
360	0,0075	0,0121	1,7212	2,1507
390	0,0221	0,0418	1,7630	2,2029
420	0,0079	0,0079	1,7709	2,2128
Despressurização	0,2114	0,2114	1,9823	2,4769

Massa total de extrato retida no porapack = 0,3967 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentando-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

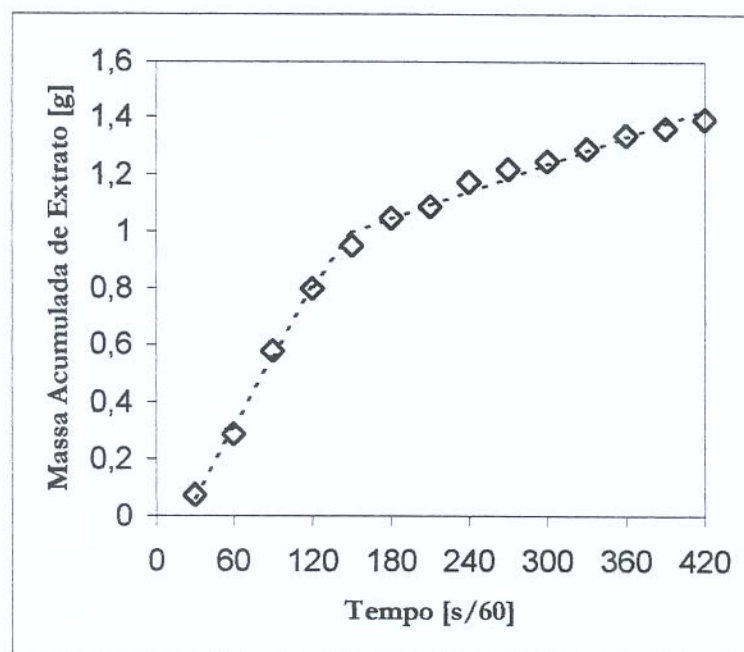
**Figura B.6:** Curva de extração do experimento 6.

Experimento 7**Tabela B.7:** Experimento realizado a 250 bar e 25°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,77 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0291	0,0727	0,0727	0,0909
60	0,1801	0,2118	0,2845	0,3556
90	0,2632	0,2937	0,5782	0,7228
120	0,1975	0,2203	0,7985	0,9981
150	0,1254	0,1482	0,9467	1,1834
180	0,0823	0,0973	1,0440	1,3050
210	0,0356	0,0421	1,0861	1,3576
240	0,0723	0,0855	1,1716	1,4645
270	0,0363	0,0448	1,2164	1,5205
300	0,0219	0,0271	1,2435	1,5544
330	0,0353	0,0436	1,2871	1,6089
360	0,0395	0,0488	1,3359	1,6699
390	0,0194	0,0237	1,3596	1,6995
420	0,0266	0,0326	1,3922	1,7403
Despressurização	0,1228	0,1503	1,5425	1,9281

Massa total de extrato retida no porapak = 0,2552 g

* Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapak's.

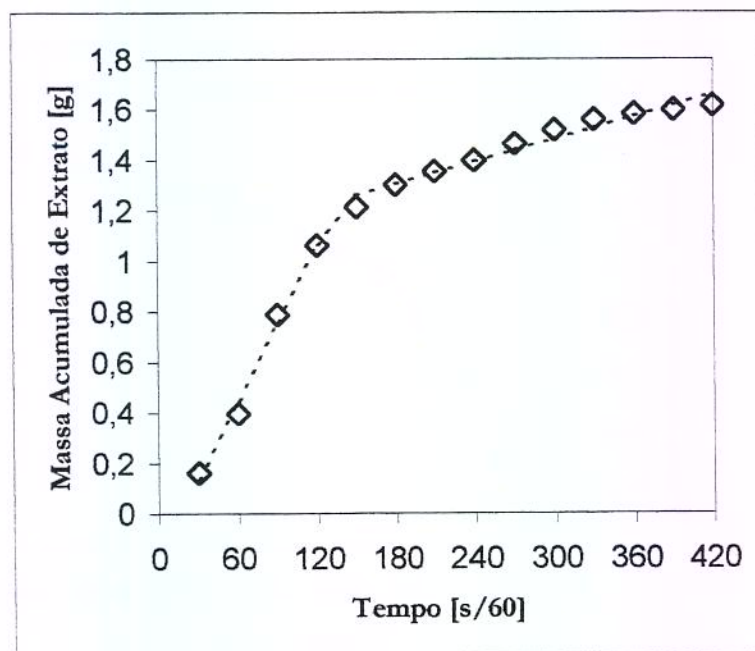
**Figura B.7:** Curva de extração do experimento 7.

Experimento 8**Tabela B.8:** Experimento realizado a 250 bar e 35°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de etanol e vazão experimental de $5,77 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,1173	0,1606	0,1606	0,2015
60	0,1955	0,2348	0,3954	0,4960
90	0,3493	0,3919	0,7873	0,9876
120	0,2465	0,2765	1,0638	1,3344
150	0,1253	0,1497	1,2135	1,5222
180	0,0734	0,0877	1,3012	1,6322
210	0,0440	0,0526	1,3538	1,6982
240	0,0366	0,0437	1,3975	1,7530
270	0,0401	0,0651	1,4626	1,8347
300	0,0348	0,0565	1,5191	1,9055
330	0,0258	0,0419	1,5610	1,9581
360	0,0134	0,0218	1,5827	1,9853
390	0,0149	0,0149	1,5976	2,0040
420	0,0179	0,0179	1,6155	2,0265
Despressurização	0,1922	0,1922	1,8077	2,2710

Massa total de extrato retida no porapack = 0,2807 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

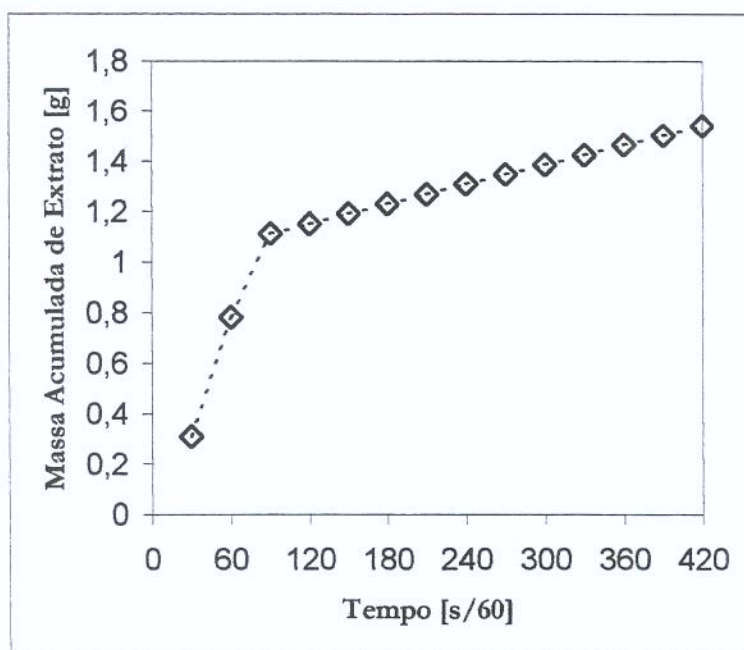
**Figura B.8:** Curva de extração do experimento 8.

Experimento 9**Tabela B.9:** Experimento realizado a 200 bar e 25°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,92 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,1922	0,3081	0,3081	0,3851
60	0,3930	0,4732	0,7831	0,9789
90	0,2501	0,3226	1,0394	1,2993
120	0,0440	0,0568	1,1607	1,4509
150	0,0287	0,0475	1,2082	1,5103
180	0,0241	0,0399	1,2481	1,5601
210	0,0245	0,0406	1,2886	1,6108
240	0,0216	0,0358	1,3244	1,6555
270	0,0082	0,0148	1,3392	1,6740
300	0,0358	0,0648	1,4040	1,7550
330	0,0210	0,0380	1,4420	1,8025
360	0,0185	0,0335	1,4755	1,8444
390	0,0082	0,0106	1,4861	1,8576
420	0,0094	0,0121	1,4982	1,8728
Despressurização	0,1662	0,2141	1,7123	2,1404

Massa total de extrato retida no porapak = 0,4668 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentando-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapak's.

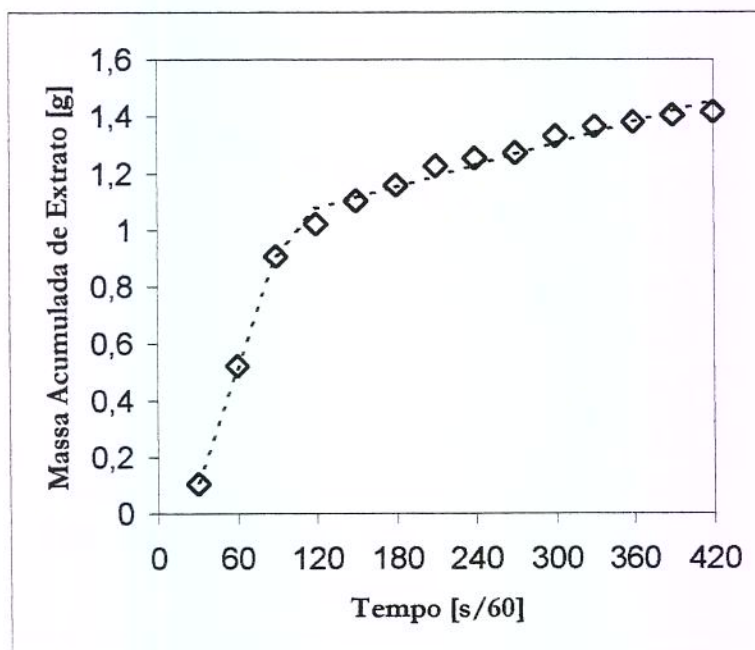
**Figura B.9:** Curva de extração do experimento 9.

Experimento 10**Tabela B.10:** Experimento realizado a 200 bar e 35°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,8 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0097	0,1049	0,1049	0,1311
60	0,3528	0,4160	0,5209	0,6511
90	0,3282	0,3861	0,9070	1,1338
120	0,0984	0,1157	1,0227	1,2784
150	0,0595	0,0800	1,1027	1,3784
180	0,0419	0,0563	1,1590	1,4488
210	0,0499	0,0671	1,2261	1,5326
240	0,0205	0,0276	1,2537	1,5671
270	0,0109	0,0187	1,2724	1,5905
300	0,0339	0,0582	1,3306	1,6633
330	0,0200	0,0343	1,3649	1,7061
360	0,0084	0,0144	1,3793	1,7241
390	0,0188	0,0248	1,4041	1,7551
420	0,0089	0,0117	1,4158	1,7698
Despressurização	0,1101	0,1452	1,561	1,9512

Massa total de extrato retida no porapack = 0,3891 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapack's.

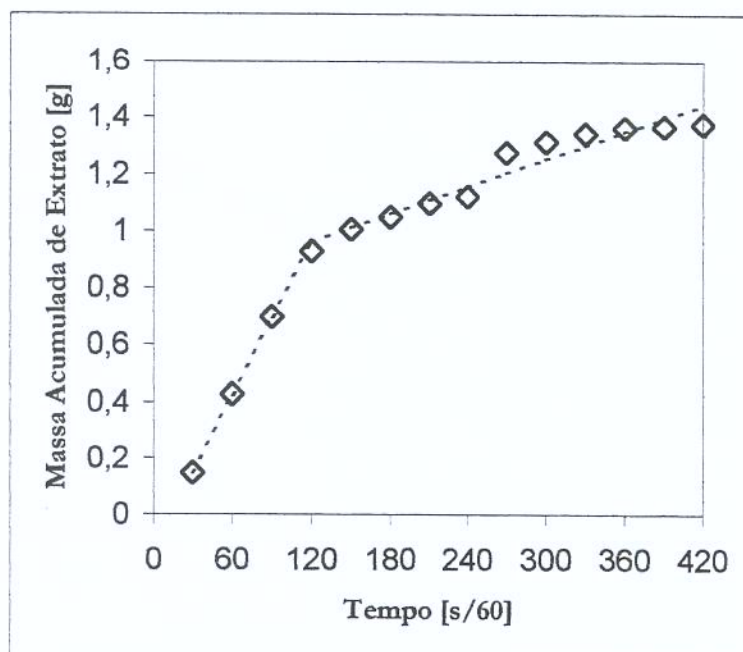
**Figura B.10:** Curva de extração do experimento 10.

Experimento 11**Tabela B.11:** Experimento realizado a 250 bar e 25°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,8 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual* [g]	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0883	0,1484	0,1484	0,1855
60	0,2331	0,2774	0,4258	0,5323
90	0,2235	0,2694	0,6952	0,8690
120	0,1929	0,2325	0,9277	1,1596
150	0,0558	0,0752	1,0029	1,2536
180	0,0335	0,0452	1,0481	1,3101
210	0,0353	0,0476	1,0957	1,3696
240	0,0173	0,0233	1,1190	1,3988
270	0,0419	0,1554	1,2744	1,5930
300	0,0105	0,0389	1,3133	1,6416
330	0,0078	0,0289	1,3422	1,6778
360	0,0053	0,0197	1,3619	1,7024
390	0,0041	0,0045	1,3664	1,7080
420	0,0079	0,0087	1,3750	1,7188
Despressurização	0,2505	0,2744	1,6494	2,0618

Massa total de extrato retida no porapak = 0,4417 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapak's.

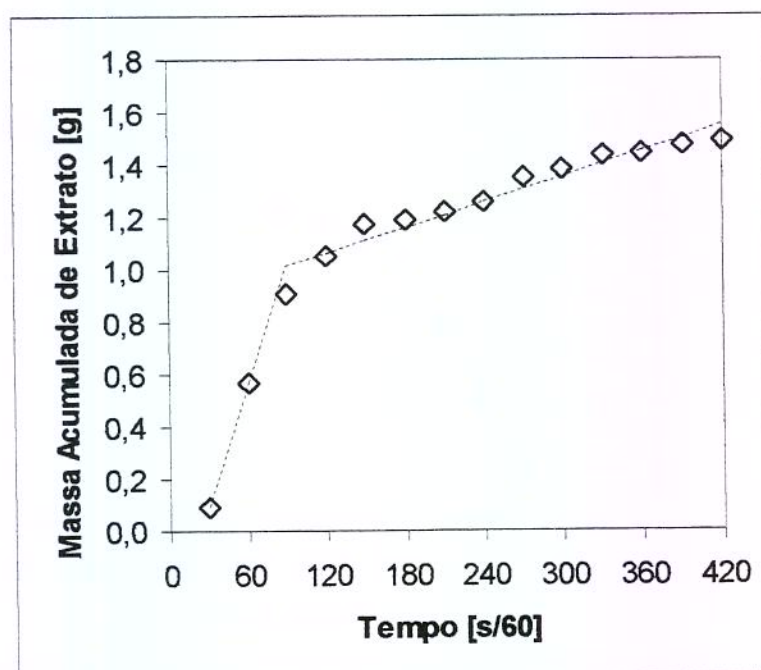
**Figura B.11:** Curva de extração do experimento 11.

Experimento 12**Tabela B.12:** Experimento realizado a 250 bar e 35°C com CO₂ e 1,17% (m/m) de isopropanol e vazão experimental de $5,73 \cdot 10^{-5}$ kg CO₂/s.

Tempo [s/60]	Massa Pontual [g]	Massa Pontual*	Massa Acumulada* [g]	Rendimento [%]
30	0,0088	0,0924	0,0924	0,1155
60	0,3998	0,4735	0,5659	0,7074
90	0,2778	0,3430	0,9089	1,1361
120	0,1170	0,1444	1,0533	1,3166
150	0,0851	0,1199	1,1732	1,4665
180	0,0118	0,0166	1,1899	1,4874
210	0,0224	0,0316	1,2214	1,5268
240	0,0258	0,0364	1,2578	1,5723
270	0,0629	0,0949	1,3527	1,6909
300	0,0236	0,0356	1,3883	1,7354
330	0,0319	0,0481	1,4364	1,7955
360	0,0084	0,0127	1,4491	1,8114
390	0,0203	0,0243	1,4734	1,8418
420	0,0189	0,0226	1,4960	1,8700
Despressurização	0,2117	0,2535	1,7495	2,1871

Massa total de extrato retida no porapak = 0,4423 g

*Massa Pontual e acumulada foram corrigidas acrescentado-se à massa de cada frasco coletado a massa de extrato retida nos porapak's.

**Figura B.12:** Curva de extração do experimento 12.

ANEXO C

Programa de Ajuste Linear – SAS 6.12

```
options ls=80 ps=50;
Title 'Ensaio cinetico: 200bar/25oC CO2, Kelly';
data k20025;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-135,0);
Cards;
30  0.1654
60  0.4327
90  0.7921
120 1.0247
150 1.1828
180 1.2499
210 1.3063
240 1.3599
270 1.4486
300 1.4800
330 1.5052
360 1.5392
390 1.5655
420 1.591
Proc Reg;
    Model mext = tmin AL1;
    Output out = a p=mextthat r= Mres;
Proc print;
Axis1 order = (0 to 1.60 by 0.2);
Proc gplot; Plot Mres*mextthat;
Proc gplot;
    Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value = star color = black;
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2 mextthat*tmin/legend overlay vaxis = axis1;
Run;
```

ANEXO D

Programa de Ajuste Não Linear – SAS 6.12

```

options ls=80 ps=50;
Title 'Ensaio cinetico: 200bar/25oC CO2, Kelly';
data k20025;
input tmin mext;
AL1 = max(tmin-135,0);
Cards;
30      0.1654
60      0.4327
90      0.7921
120     1.0247
150     1.1828
180     1.2499
210     1.3063
240     1.3599
270     1.4486
300     1.4800
330     1.5052
360     1.5392
390     1.5655
420     1.591
Proc Nlin;
           parms    b0 = -0.13263
                   b1 =  0.009827
                   b2 = -0.00303
                   knot1 = 135;
           AL1 = max(tmin-knot1,0);
           Model mext = b0 + b1*tmin + b2*AL1;
           Output out = a p=mexthat r= Mres;
Axis order = (0 to 1.69 by 0.1);
Proc gplot; Plot Mres*mexthat;
Proc gplot;

```

```
Symbol1 value = diamond color = black; Symbol2 value =  
star color = black;  
Plot1 mext*tmin/legend overlay vaxis = axis1; Plot2  
mexthat*tmin/legend overlay vaxis = axis1;  
Run;
```

ANEXO E

Saída do Programa de Ajuste Não linear - SAS 6.12

*CO2/200bar/25°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1326	0.00983	-0.00303	135.0	8.3311
1	-0.1306	0.00979	-0.00827	136.3	0.00999
2	-0.1306	0.00979	-0.00827	135.5	0.00952

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.006037
Object	0.046391
Objective	0.009523
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	22.3052	5.5763	881.93	<.0001
Residual	10	0.00952	0.000952		
Uncorrected Total	14	22.3147			
Corrected Total	13	2.5290			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1306	0.0378	-0.2148	-0.0464
b1	0.00979	0.000460	0.00877	0.0108
b2	-0.00827	0.000474	-0.00933	-0.00722
knot1	135.5	4.5131	125.4	145.5

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8864053	0.5114857
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9710083	-0.7451197
b2	0.8864053	-0.9710083	1.0000000	0.6151003
knot1	0.5114857	-0.7451197	0.6151003	1.0000000

*CO₂/200bar/35°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0494	0.0100	-0.00825	120.0	0.7446
1	0.0197	0.0106	-0.00857	127.9	0.0188
2	0.0503	0.00999	-0.00824	139.7	0.00951
3	0.0503	0.00999	-0.00824	140.2	0.00936

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	3
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.003416
Object	0.016257
Objective	0.009356
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	32.2756	8.0689	1074.31	<.0001
Residual	10	0.00936	0.000936		
Uncorrected Total	14	32.2850			
Corrected Total	13	3.0246			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	0.0503	0.0375	-0.0332	0.1338
b1	0.00999	0.000456	0.00897	0.0110
b2	-0.00824	0.000470	-0.00928	-0.00719
knot1	140.2	4.6626	129.8	150.6

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8864053	0.5439774
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9710083	-0.7739557
b2	0.8864053	-0.9710083	1.0000000	0.6503642
knot1	0.5439774	-0.7739557	0.6503642	1.0000000

*CO2/250bar/25°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.2860	0.0107	-0.00917	141.0	0.00682
1	-0.2843	0.0106	-0.00914	141.4	0.00681
2	-0.2843	0.0106	-0.00914	141.4	0.00681

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	7.273E-6
Object	1.296E-7
Objective	0.006809
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	22.4024	5.6006	1524.59	<.0001
Residual	10	0.00681	0.000681		
Uncorrected Total	14	22.4092			
Corrected Total	13	3.1213			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.2843	0.0320	-0.3555	-0.2131
b1	0.0106	0.000389	0.00978	0.0115
b2	-0.00914	0.000401	-0.0100	-0.00825
knot1	141.4	3.6187	133.3	149.4

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8864053	0.5514126
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9710083	-0.7804672
b2	0.8864053	-0.9710083	1.0000000	0.6584158
knot1	0.5514126	-0.7804672	0.6584158	1.0000000

*CO2/250bar/35°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.3075	0.0132	-0.0115	112.0	0.00707
1	-0.3066	0.0131	-0.0115	112.1	0.00707
2	-0.3066	0.0131	-0.0115	112.1	0.00707

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	1.662E-6
Object	7.166E-9
Objective	0.007074
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	23.4483	5.8621	1246.45	<.0001
Residual	10	0.00707	0.000707		
Uncorrected Total	14	23.4554			
Corrected Total	13	2.6521			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.3066	0.0406	-0.3971	-0.2160
b1	0.0131	0.000627	0.0117	0.0145
b2	-0.0115	0.000633	-0.0129	-0.0101
knot1	112.1	3.4128	104.5	119.7

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.9175166	0.6217889
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9910312	-0.8310535
b2	0.9175166	-0.9910312	1.0000000	0.7782416
knot1	0.6217889	-0.8310535	0.7782416	1.0000000

*CO₂+Etanol/200bar/25°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.0988	0.00890	-0.00783	160.0	0.00920
1	-0.0972	0.00888	-0.00782	160.5	0.00919
2	-0.0972	0.00888	-0.00782	160.5	0.00919

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC (knot1)	5.838E-6
Object	5.252E-8
Objective	0.009191
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	22.8185	5.7046	976.68	<.0001
Residual	10	0.00919	0.000919		
Uncorrected Total	14	22.8277			
Corrected Total	13	2.7022			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.0972	0.0318	-0.1681	-0.0264
b1	0.00888	0.000320	0.00817	0.00959
b2	-0.00782	0.000345	-0.00859	-0.00705
knot1	160.5	4.2895	150.9	170.0

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9045340	0.8374358	0.4351060
b1	-0.9045340	1.0000000	-0.9258201	-0.6716213
b2	0.8374358	-0.9258201	1.0000000	0.4166372
knot1	0.4351060	-0.6716213	0.4166372	1.0000000

*CO₂+Etanol/200bar/35°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.3351	0.0131	-0.0119	138.0	0.00689
1	-0.3307	0.0130	-0.0118	138.7	0.00685
2	-0.3307	0.0130	-0.0118	138.7	0.00685

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000028
Object	3.175E-6
Objective	0.006846
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	29.6043	7.4011	1812.31	<.0001
Residual	10	0.00685	0.000685		
Uncorrected Total	14	29.6111			
Corrected Total	13	3.7290			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.3307	0.0320	-0.4021	-0.2592
b1	0.0130	0.000390	0.0121	0.0139
b2	-0.0118	0.000402	-0.0127	-0.0109
knot1	138.7	2.7423	132.6	144.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8864053	0.5341121
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9710083	-0.7652647
b2	0.8864053	-0.9710083	1.0000000	0.6396705
knot1	0.5341121	-0.7652647	0.6396705	1.0000000

*CO₂+Etanol/250bar/25°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1859	0.00827	-0.00668	141.0	0.00712
1	-0.1843	0.00824	-0.00665	141.5	0.00712
2	-0.1843	0.00824	-0.00665	141.5	0.00712

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC (knot1)	0.000012
Object	1.739E-7
Objective	0.007118
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	15.8434	3.9608	1033.47	<.0001
Residual	10	0.00712	0.000712		
Uncorrected Total	14	15.8505			
Corrected Total	13	2.2141			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1843	0.0327	-0.2571	-0.1115
b1	0.00824	0.000398	0.00735	0.00912
b2	-0.00665	0.000410	-0.00757	-0.00574
knot1	141.5	5.0871	130.1	152.8

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8864053	0.5520865
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9710083	-0.7810557
b2	0.8864053	-0.9710083	1.0000000	0.6591453
knot1	0.5520865	-0.7810557	0.6591453	1.0000000

*CO₂+Etanol/250bar/35°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1766	0.0104	-0.00889	136.0	0.0120
1	-0.1736	0.0103	-0.00885	136.6	0.0119
2	-0.1736	0.0103	-0.00885	136.7	0.0119

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000024
Object	7.259E-7
Objective	0.011944
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	23.4239	5.8560	768.28	<.0001
Residual	10	0.0119	0.00119		
Uncorrected Total	14	23.4358			
Corrected Total	13	2.7648			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1736	0.0423	-0.2679	-0.0793
b1	0.0103	0.000515	0.00919	0.0115
b2	-0.00885	0.000531	-0.0100	-0.00766
knot1	136.7	4.7702	126.0	147.3

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9128709	0.8864053	0.5199036
b1	-0.9128709	1.0000000	-0.9710083	-0.7526481
b2	0.8864053	-0.9710083	1.0000000	0.6242484
knot1	0.5199036	-0.7526481	0.6242484	1.0000000

*CO₂+Isopropanol/200bar/25°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1780	0.0161	-0.0148	79.0000	0.00981
1	-0.1669	0.0158	-0.0145	79.8771	0.00976
2	-0.1669	0.0158	-0.0145	79.8943	0.00976

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000215
Object	0.000076
Objective	0.009758
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	22.0322	5.5081	469.96	<.0001
Residual	10	0.00976	0.000976		
Uncorrected Total	14	22.0420			
Corrected Total	13	1.3855			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1669	0.0699	-0.3225	-0.0113
b1	0.0158	0.00147	0.0126	0.0191
b2	-0.0145	0.00148	-0.0178	-0.0112
knot1	79.8943	4.0376	70.8979	88.8907

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9486833	0.9470291	0.7118314
b1	-0.9486833	1.0000000	-0.9982563	-0.8758344
b2	0.9470291	-0.9982563	1.0000000	0.8589666
knot1	0.7118314	-0.8758344	0.8589666	1.0000000

*CO₂+Isopropanol/200bar/35°C

Iterative Phase
Dependent Variable next
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.2944	0.0134	-0.0122	100.0	0.00823
1	-0.2912	0.0134	-0.0121	100.4	0.00821
2	-0.2912	0.0134	-0.0121	100.4	0.00821

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000023
Object	1.023E-6
Objective	0.00821
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	18.9079	4.7270	741.61	<.0001
Residual	10	0.00821	0.000821		
Uncorrected Total	14	18.9161			
Corrected Total	13	1.8348			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.2912	0.0438	-0.3887	-0.1936
b1	0.0134	0.000675	0.0119	0.0149
b2	-0.0121	0.000681	-0.0136	-0.0106
knot1	100.4	3.0165	93.7042	107.1

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.9175166	0.5212198
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9910312	-0.7480186
b2	0.9175166	-0.9910312	1.0000000	0.6847714
knot1	0.5212198	-0.7480186	0.6847714	1.0000000

*CO₂+Isopropanol/250bar/25°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.1178	0.00900	-0.00739	120.0	0.0194
1	-0.1237	0.00911	-0.00750	118.7	0.0194
2	-0.1237	0.00911	-0.00750	118.8	0.0194

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000157
Object	0.000011
Objective	0.019357
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	16.8477	4.2119	316.54	<.0001
Residual	10	0.0194	0.00194		
Uncorrected Total	14	16.8671			
Corrected Total	13	1.8575			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.1237	0.0672	-0.2734	0.0261
b1	0.00911	0.00104	0.00680	0.0114
b2	-0.00750	0.00105	-0.00983	-0.00517
knot1	118.8	9.4088	97.7965	139.7

Approximate Correlation Matrix				
	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9258201	0.9175166	0.6632792
b1	-0.9258201	1.0000000	-0.9910312	-0.8633499
b2	0.9175166	-0.9910312	1.0000000	0.8155671
knot1	0.6632792	-0.8633499	0.8155671	1.0000000

*CO₂+Isopropanol/250bar/35°C

Iterative Phase
Dependent Variable mext
Method: Gauss-Newton

Iter	b0	b1	b2	knot1	Sum of Squares
0	-0.2553	0.0126	-0.0115	88.0000	0.7214
1	-0.3811	0.0158	-0.0142	88.2669	0.0240
2	-0.3811	0.0158	-0.0142	88.2170	0.0240

NOTE: Convergence criterion met.

Estimation Summary

Method	Gauss-Newton
Iterations	2
R	0
PPC	0
RPC(knot1)	0.000566
Object	0.00025
Objective	0.023974
Observations Read	14
Observations Used	14
Observations Missing	0

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	4	20.4357	5.1089	280.25	<.0001
Residual	10	0.0240	0.00240		
Uncorrected Total	14	20.4597			
Corrected Total	13	2.0396			

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
b0	-0.3811	0.1095	-0.6250	-0.1372
b1	0.0158	0.00231	0.0106	0.0209
b2	-0.0142	0.00231	-0.0193	-0.00900
knot1	88.2170	7.6976	71.0656	105.4

Approximate Correlation Matrix

	b0	b1	b2	knot1
b0	1.0000000	-0.9486833	0.9470291	0.7681956
b1	-0.9486833	1.0000000	-0.9982563	-0.9156903
b2	0.9470291	-0.9982563	1.0000000	0.9017591
knot1	0.7681956	-0.9156903	0.9017591	1.0000000

ANEXO F

Cromatogramas

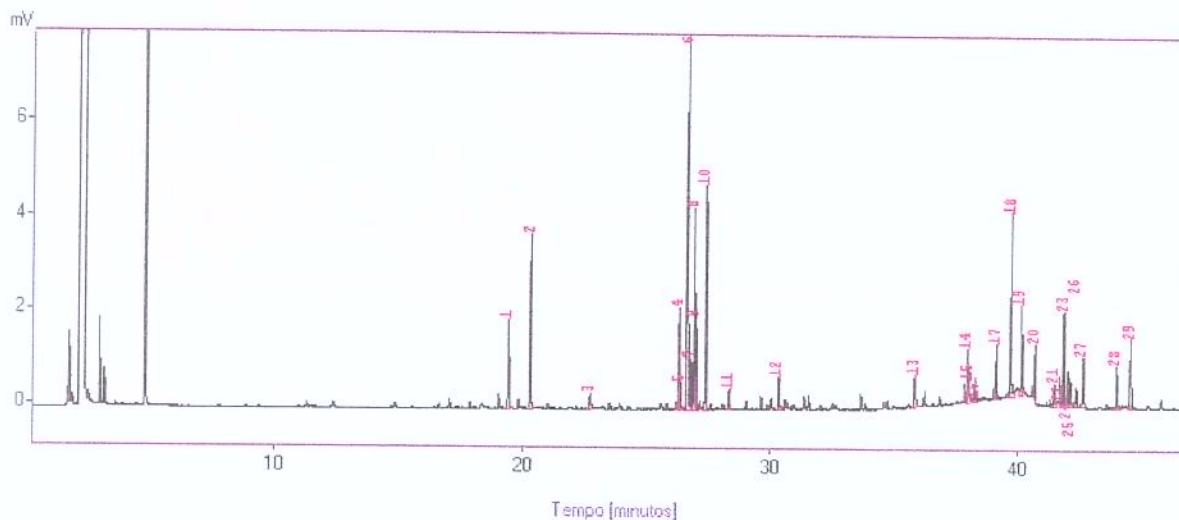


Figura F.1: Cromatograma da fase de taxa crescente de extração (CO₂/200 bar/25°C).

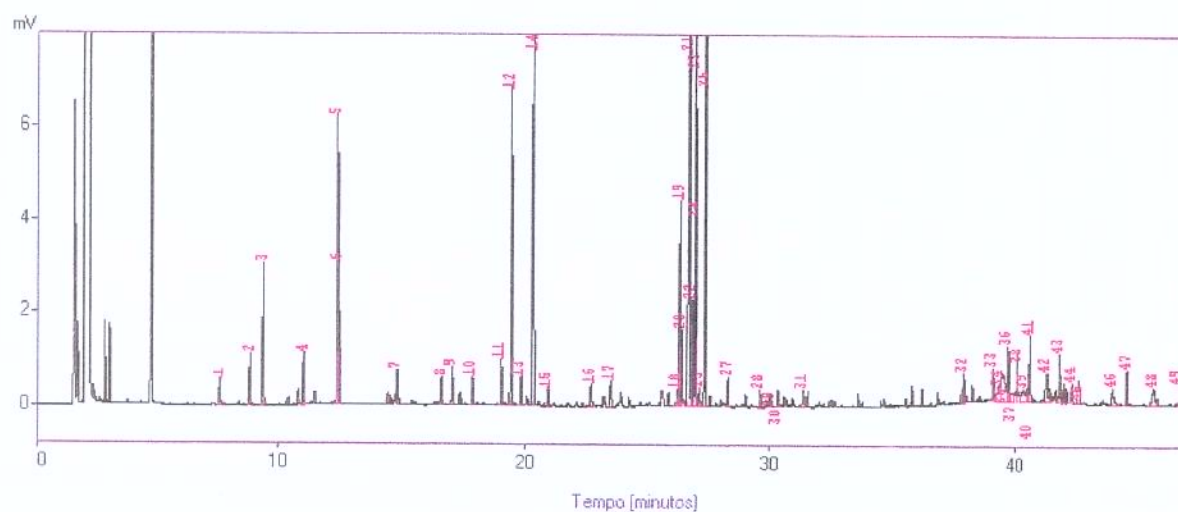


Figura F.2: Cromatograma da fração retida na coluna de porapack na fase de taxa crescente de extração (CO₂/200 bar/25°C).

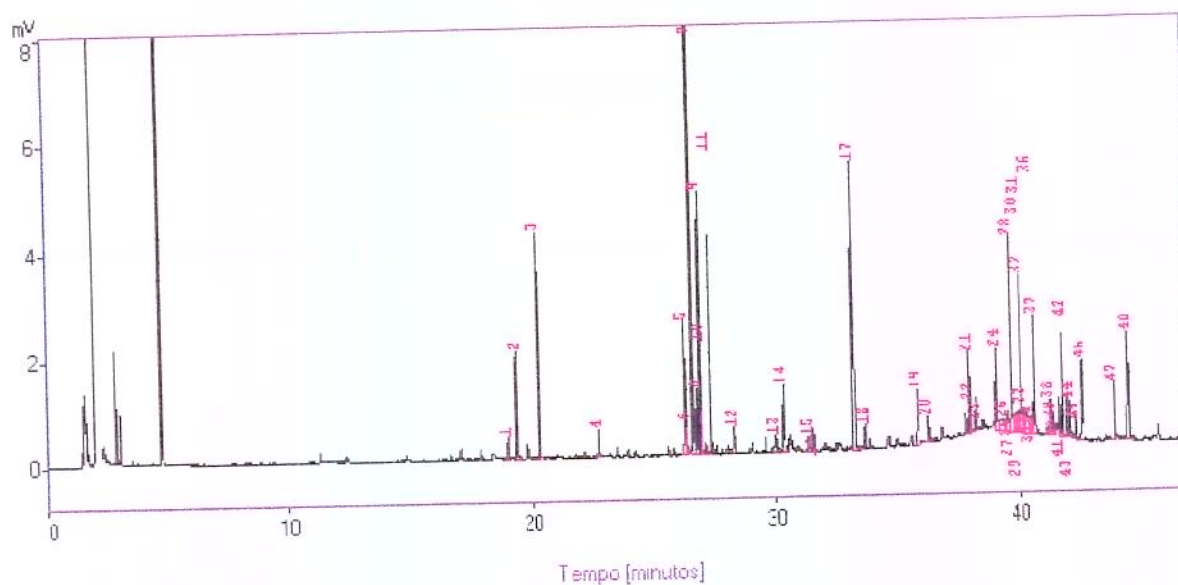


Figura F.3.: Cromatograma da fase de taxa decrescente (CO₂/200 bar/ 25°C).

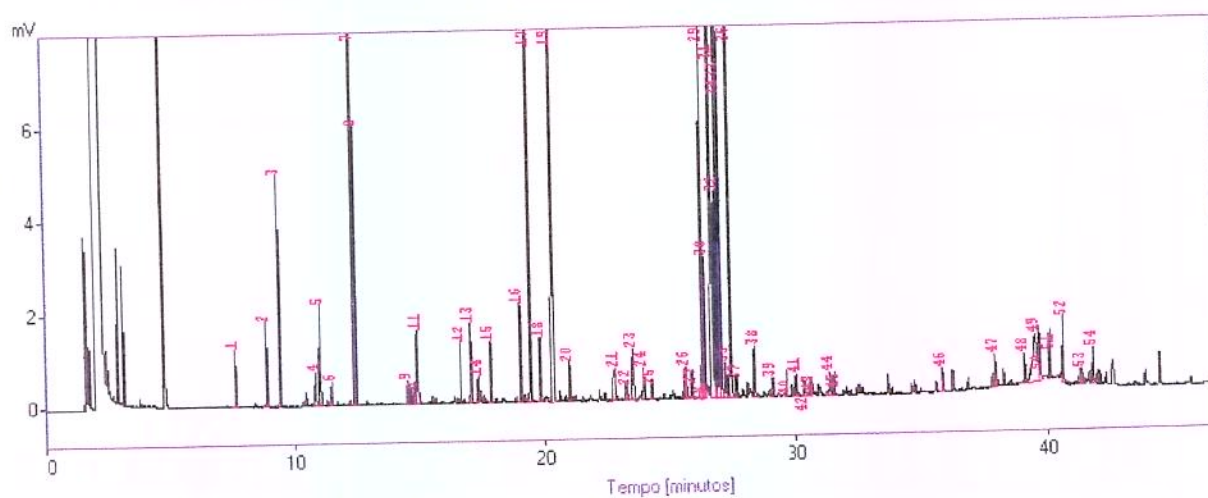


Figura F.4: Cromatograma da fração retida na coluna de porapak na fase de taxa decrescente de extração (CO₂/200 bar/25°C).

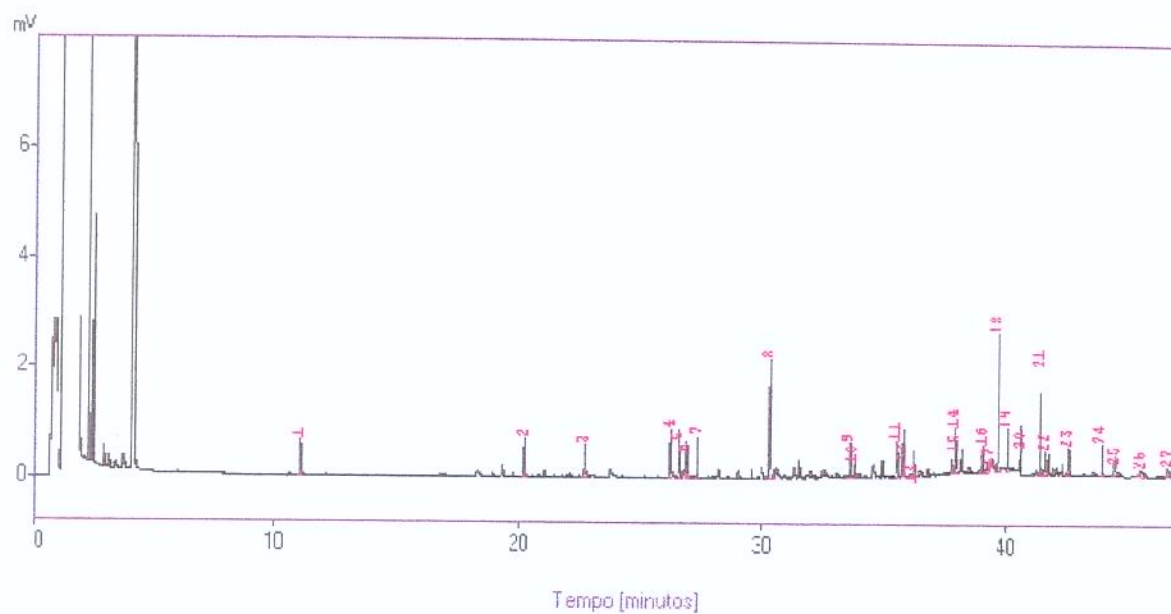


Figura F.5: Cromatograma da fase difusional (CO₂/200bar/25°C).

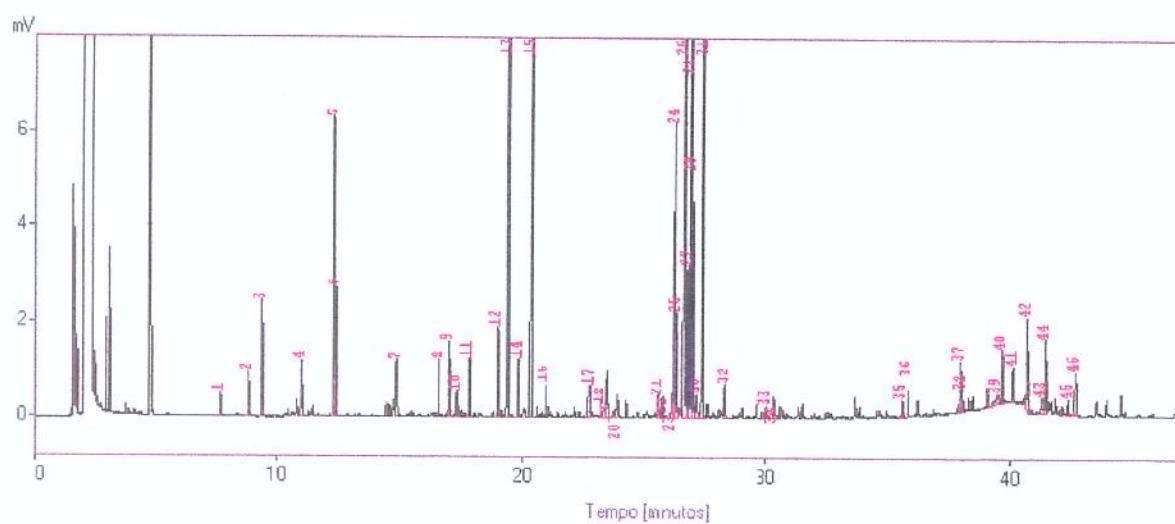


Figura F.6: Cromatograma da fração retida na coluna de porapak na fase difusional (CO₂/200 bar/25°C)

ANEXO G

Espectro de UV

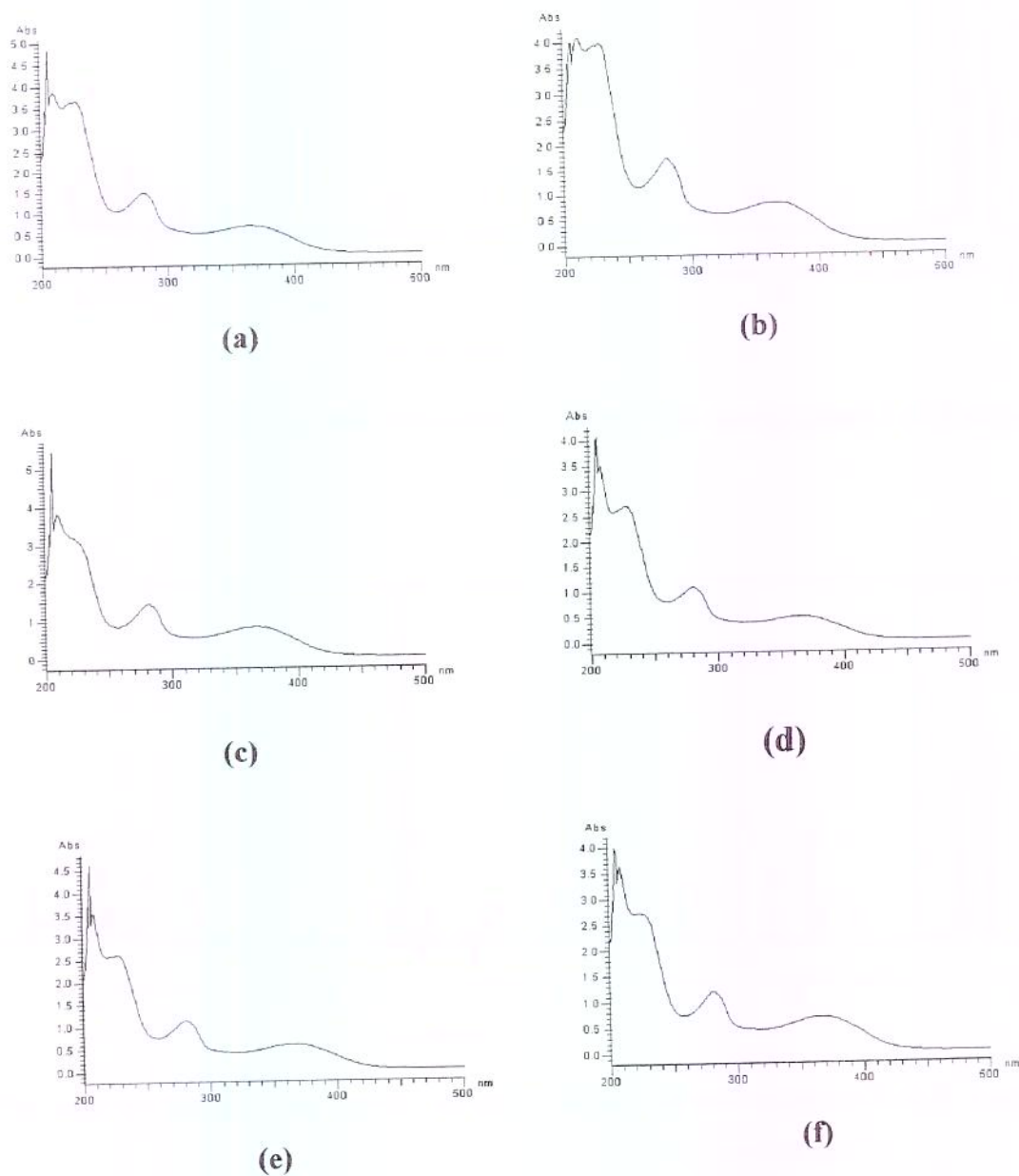


Figura G.1: Espectros de UV dos extratos de gengibre da condição de extração CO_2 + Etanol/ 250bar/25°C. De (a) até (c) fase constante de extração; de (d) até (f) fase decrescente de extração. (a) 30 minutos; (b) 1h; (c) 1,5 h; (d) 2 h; (e) 2,5 h; (f) 3 h.

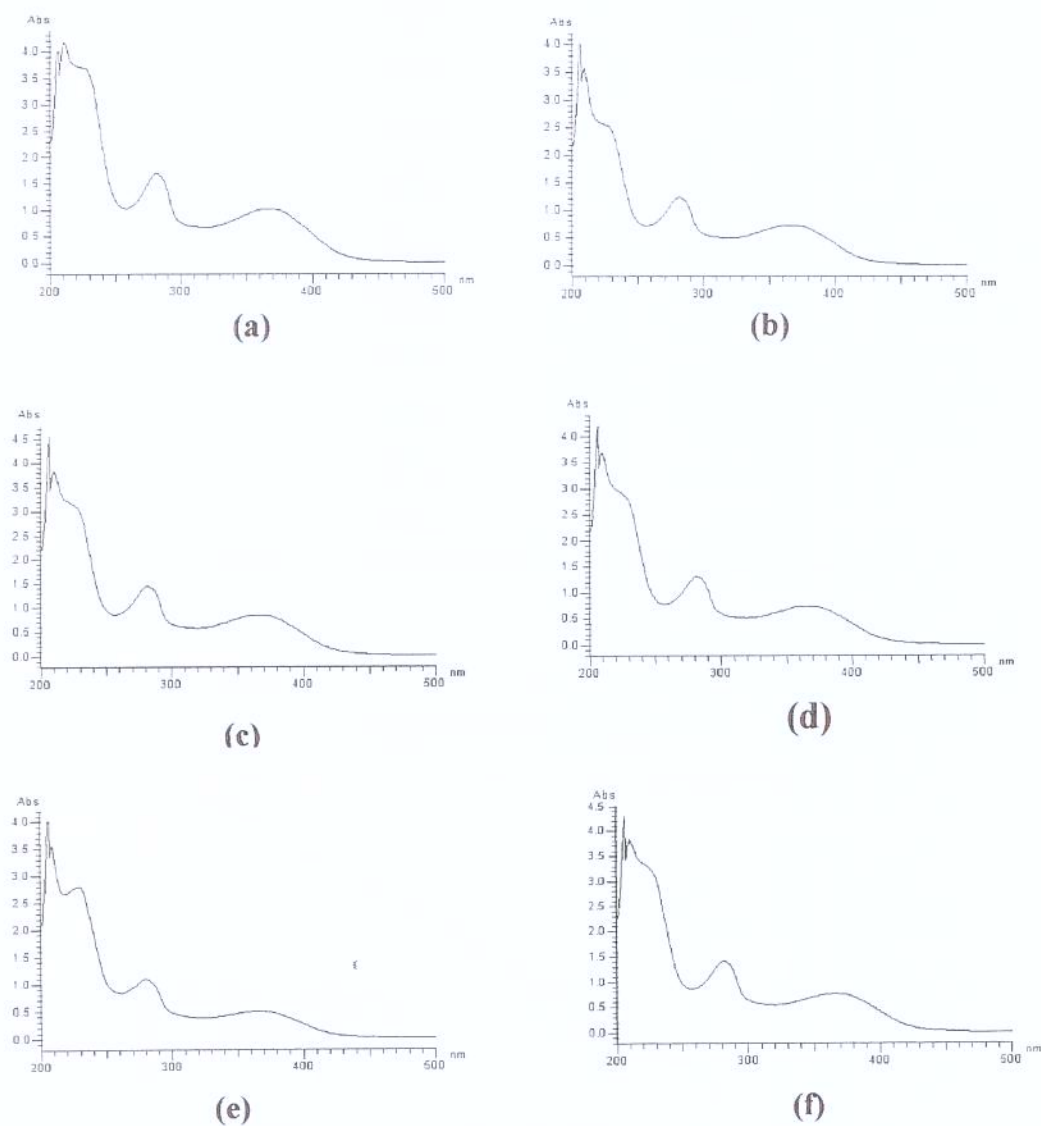
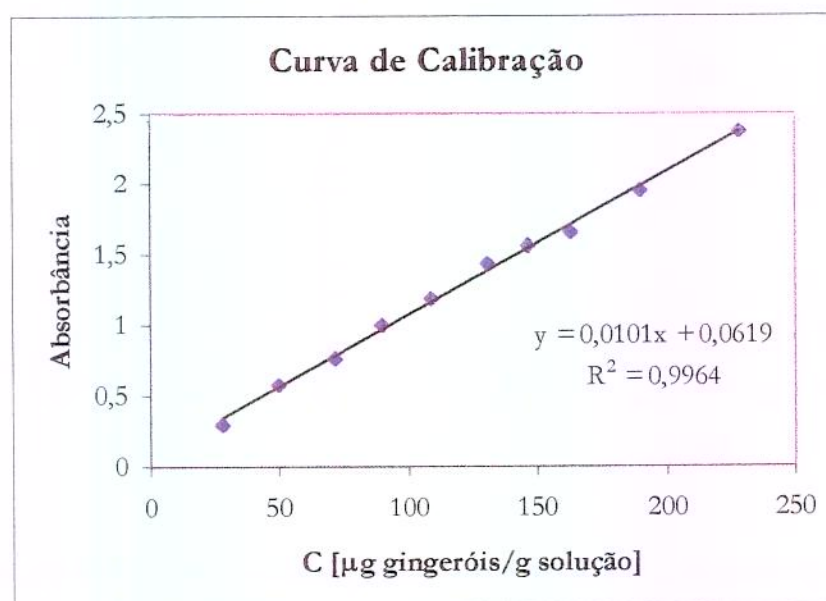


Figura G.2: Espectros de UV dos extratos de gengibre da condição de extração CO_2 + Etanol/ 250bar/25°C. De (a) até (F) fase difusional; (a) 4 h; (b) 4,5 h; (c) 5,5 h; (d) 6 h; (e) 6,5 h; (f) 7 h.

Tabela G.1: Dados para construção da curva de calibração.

C (μg mistura gingeróis e shogaóis/g solução)	Absorbância (280 nm)
28,19	0,29
49,52	0,581
71,74	0,769
89,6	1,003
108,58	1,195
131,09	1,445
146,37	1,569
162,75	1,658
189,93	1,957
228,3	2,369

**Figura G.3:** Curva de calibração para quantificação da mistura de gingeróis e shogaóis nos extratos de gengibre em 280 nm.

ANEXO H

Cromatografia de Placa

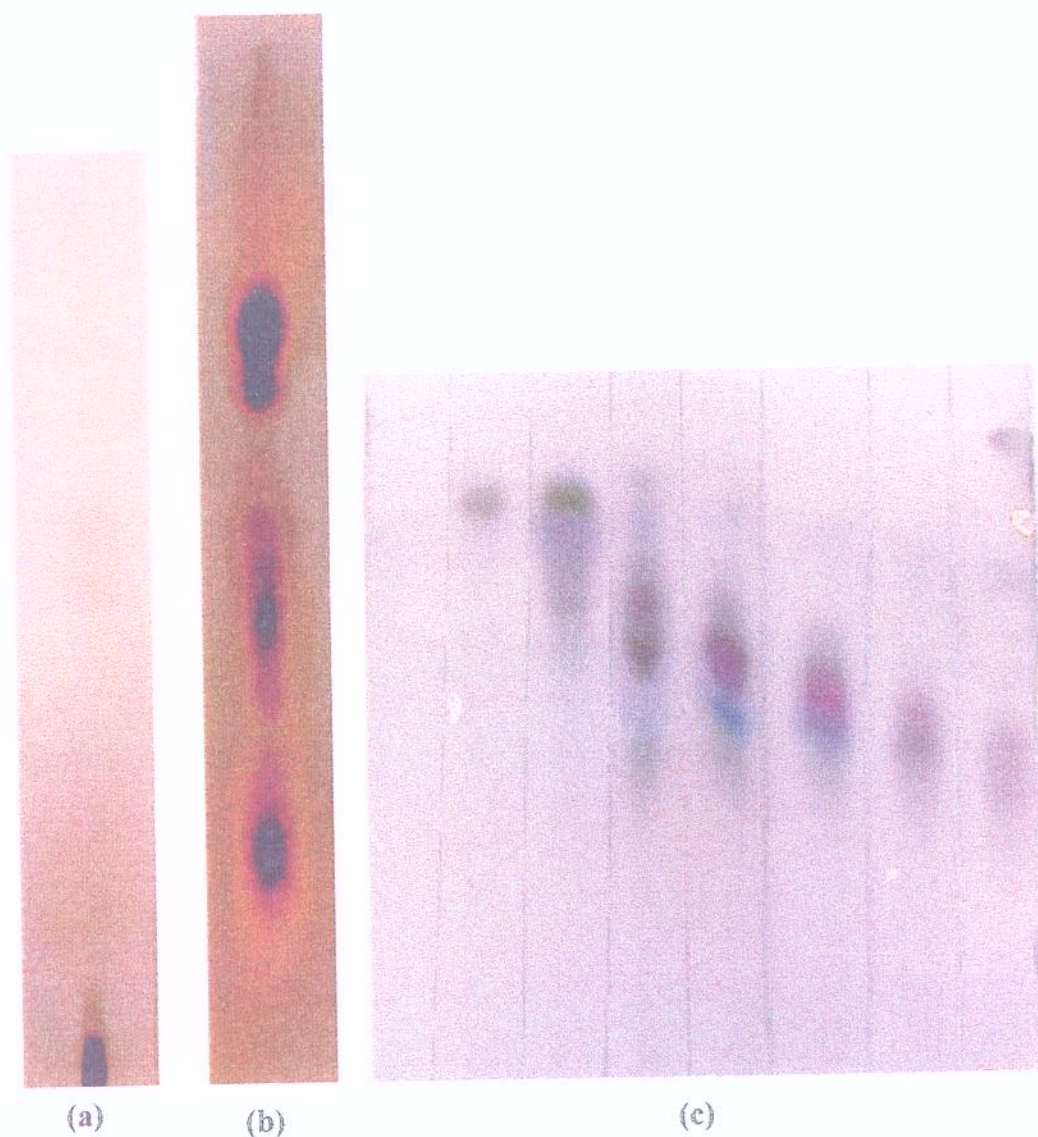


Figura H.1: Cromatografia de placa delgada dos extratos de gengibre. Eluentes: (a) Hexano puro; (b) 60% Hexano e 40% Acetato de etila; (c) 80% Hexano e 20% Acetato de etila.

ERRATA

Página 23

Item 3.1.1

Substitui-se a temperatura de secagem de 30°C para 35°C.

Página 39

Item 4.3

Substitui-se Qsolv por Solvente.

Página 51

Tabela 4.12

Onde está escrito gingeróis (%) lê-se mistura de gingeróis e shogaóis (%).

Página 106

Anexo G

Na figura G.3 lê-se no título da abscissa C[μ g gingeróis + shogaóis/ g solução].

Em todo o texto

Em todo o texto onde está escrito peroxidação lipídica da hemoglobina lê-se peroxidação lipídica da membrana celular; e onde está escrito hemoglobina lê-se eritrócito.