UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Obtenção dos extratos de orégano andino via destilação por arraste a vapor e extração com dióxido de carbono supercrítico: Estudo econômico e do processo

Helmut Joél Navarro Díaz

Bacharel em Engenharia de Indústrias Alimentares

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**

Campinas, 2010

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE BC
Nº CHAMADA
T/UNICAMP N228o
V
TOMBO 87883
PROC. 16-134-10
C D
PREÇO 11,00
DATA 17/09/10
CÓD. T 774171

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

N228o

Navarro Díaz, Helmut Joél
Obtenção dos extratos de orégano andino via destilação por arraste a vapor e extração com dióxido de carbono supercrítico: estudo econômico e do processo / Helmut Joél Navarro Díaz. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

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

1. Orégano. 2. Destilação por arraste a vapor. 3. Extração supercrítica. 4. Atividade antioxidante. 5. Custos de manufatura. I. Meireles, Maria Angela de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Obtaining of extracts from Andean oregano via steam distillation and supercritical carbon dioxide extraction: economic and process study
Palavras-chave em inglês (Keywords): Oregano, Steam distillation, Supercritical extraction, Antioxidant activity, Cost of manufacture
Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles
Fernando Antônio Cabral
Marcio Antônio Mazzuti
Patrícia Franco Leal
Losiane Cristina Paviani
Data da Defesa: 18/08/2010
Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos

E1
R-1287

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação Obtenção dos extratos de orégano andino via destilação por arraste a vapor e extração com dióxido de carbono supercrítico: estudo econômico e do processo, defendida em 18 / 08 / 2010 por Helmut Joél Navarro Díaz, aprovado pela comissão julgadora em 18/08/2010

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

Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral
DEA – FEA / UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Marcio Antônio Mazzuti
URI-CER
Membro

Dra. Patrícia Franco Leal
INOVA / UNICAMP
Membro

Dra. Losiane Cristina Paviani Diehl
DEA – FEA / UNICAMP
Membro

2010 22496

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Dedicada a mis queridos padres **Juan** y **Rosario**,

abuelos **Guido** e **Isabel**

y hermanos **Nataly** y **Johnny**.

Agradecimentos

A Deus, por tudo!

À Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles, pela oportunidade, ensinamentos, facilidades e recursos que fizeram possível a realização deste trabalho.

Aos professores da FEA/UNICAMP, pelos diversos ensinamentos, dentro e fora das salas de aula.

Ao meu tio Jorge, pelos conselhos, inspiração e exemplo como acadêmico.

Ao Sr. José Chuquicondor, pela doação da matéria-prima utilizada neste trabalho.

Aos meus tios Jorge e Verónica, por acolher-me como um dos seus filhos e fazer-me sentir junto a meus primos Christian, Ingrid, Javier, Pamela, Susana, Pablo, Maik e Kevin, o calor de um lar ainda que longe de casa.

Aos meus pais Juan e Rosario, avôs Guido e Isabel e irmãos Nataly e Johnny pelo amor, carinho e palavras de alento que me animaram e ajudaram a superar momentos difíceis.

Ao técnico do laboratório Ariovaldo, pela ajuda com os equipamentos e conselhos em prol da melhor realização dos experimentos.

Aos secretários da pós-graduação Cosme e Marcos, pela paciência e auxilio com os trâmites burocráticos.

Aos amigos e colegas do LASEFI, Ivor, Carolina, Priscilla, Rodrigo, Gláucia, Flávia, Talita, Natalia, Juliana, Patrícia, Thais, Danielle, André e Diego, pelos conselhos acadêmicos, o auxilio com os experimentos e todos os bons momentos que compartimos.

Aos amigos e colegas da pós-graduação do DEA/FEA/UNICAMP, Bebel, Simone, Lorena, Kátia, Irede, Ana Paula, Thiago, Luiz, Marcio, Juliano, Marquinhos, Geraldo,

Nilson, Héctor, Mirko, Hugo, Margarita, Júlio, Cristina, Andrea, pelos momentos de estudo e descontração, foi muito bom conhecer vocês.

Aos amigos da UNICAMP, Romina, Noelia, Julice, Angela, Silvia, Paula, Sylvia, Vivian, Maira, César e Frank, foi muito legal ter compartilhado esse tempo com vocês.

"Tus estudios te harán grande y a nosotros orgullosos"

Rubén Lazarte Aragón

SUMÁRIO

SUMÁRIO ix
ÍNDICE DE FIGURAS xiii
ÍNDICE DE TABELAS xv
RESUMO xvii
ABSTRACT xix

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 7
2.1 OBJETIVO GERAL 7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 7

3 REVISÃO DE LITERATURA 9
3.1 ORÉGANO 9
3.2 ÓLEO VOLÁTIL OU ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO 10
3.3 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR 12
3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA 14

4 MATERIAL E MÉTODOS 19
4.1 MATÉRIA-PRIMA 19
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA 20
4.2.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE 20
4.2.2 GRANULOMETRIA DO MATERIAL E DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA 22
4.2.3 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE REAL DAS PARTÍCULAS 23
4.2.4 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE DO LEITO 24
4.2.5 CÁLCULO DA POROSIDADE TOTAL DO LEITO MAIS PARTÍCULAS 24
4.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO 25
4.3.1 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR 25
4.3.1.1 **Procedimento Experimental 27**
4.3.1.2 **Rendimento de Extração 28**
4.3.1.3 **Cinéticas de Extração 28**
4.3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA 29
4.3.2.1 **Procedimento Experimental 30**

4.3.2.2 **Rendimento de Extração** 33
4.3.2.3 **Cinéticas de Extração** 33
4.4 AJUSTE DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO 33
4.5 ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA 35
4.5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 35
4.5.2 FENÓIS TOTAIS 37
4.5.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS 38
4.5.4 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA 39
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 40
4.7 ANÁLISE ECONÔMICA 40
4.7.1 AUMENTO DE ESCALA 41
4.7.2 CUSTO FIXO DE INVESTIMENTO (FCI) 42
4.7.3 CUSTO DA MATÉRIA-PRIMA (CRM) 43
4.7.4 CUSTO DA MÃO DE OBRA (COL) 43
4.7.5 CUSTO DO TRATAMENTO DE RESÍDUOS (CWT) 44
4.7.6 CUSTO DAS UTILIDADES (CUT) 44

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 MATÉRIA-PRIMA 45
5.1.1 UMIDADE 45
5.1.2 GRANULOMETRIA E DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA 45
5.1.3 DENSIDADE REAL DAS PARTÍCULAS 47
5.1.4 DENSIDADE APARENTE DO LEITO 47
5.1.5 POROSIDADE TOTAL DO LEITO MAIS PARTÍCULAS 48
5.2 TREINAMENTO E TESTES PRELIMINARES 48
5.3 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR 52
5.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA 56
5.5 AJUSTE DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO 63
5.6 ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA 68
5.6.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 68
5.6.2 FENÓIS TOTAIS 74
5.6.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS 82
5.6.4 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS 84
5.7 ANÁLISE ECONÔMICA 90
5.7.1 AUMENTO DE ESCALA 90
5.7.2 CUSTO DE MANUFATURA 90

6 CONCLUSÃO 97

7 RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES 99

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

9 ANEXOS 109

9.1 TABELAS DOS DADOS LABORATORIAIS 109

9.2 FIGURAS DOS DADOS LABORATORIAIS PARA ANÁLISE ECONÔMICA 112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Diagrama de equilíbrio para uma substância pura (adaptado de Sandler, 1989). 15

Figura 3.2. Áreas selecionadas para algumas aplicações de extração usando CO_2 em diferentes pressões (variação no poder de solvatação) (BROGLE, 1982). 17

Figura 4.1. Esquema do equipamento de destilação utilizado na determinação da umidade (Baseado no esquema apresentado por Jacobs, 1973). 21

Figura 4.2. Diagrama da unidade de destilação por arraste a vapor (baseado no diagrama apresentado por Leal, 2008) 25

Figura 4.3. Diagrama da unidade de SFE, Spe-ed (Baseado no manual da unidade Spe-ed, Applied Separations). 29

Figura 5.1. Valores médios da massa das partículas retidas nas peneiras de mesh 24, 32, 48 e 80. 46

Figura 5.2. Cinética de extração do óleo volátil de orégano chileno obtido por SD a 163 ºC. 53

Figura 5.3. Cinética de extração do óleo volátil de orégano grande obtido por SD a 164 ºC. 54

Figura 5.4. Cinética de extração do óleo volátil de orégano floreado obtido por SD a 164 ºC. 55

Figura 5.5. Isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano chileno (□ = 40 ºC, ■ = 50 ºC). 59

Figura 5.6. Isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano floreado (□ = 40 ºC, ■ = 50 ºC). 59

Figura 5.7. Cinética de extração do extrato supercrítico (50 ºC, 200 bar) de orégano chileno. 62

Figura 5.8. Ajuste por spline linear a 3 retas da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano chileno obtido por SD a 163 ºC e determinação do t_{CER2} 64

Figura 5.9. Ajuste por spline linear a 3 retas da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano grande obtido por SD a 164 ºC. 64

Figura 5.10. Ajuste por spline linear a 3 retas da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano floreado obtido por SD a 164 ºC. 65

Figura 5.11. Ajuste por spline linear a 3 retas da cinética de extração do extrato supercrítico (50 ºC, 200 bar) de orégano chileno e determinação do t_{CER2} 67

Figura 5.12. Atividade antioxidante dos óleos voláteis das folhas de orégano obtidos nos ensaios de SD (□ = orégano grande, ■ = orégano floreado, ○ = orégano chileno). 70

Figura 5.13. Atividade antioxidante dos extratos supercríticos de orégano chileno obtidos nos ensaios de rendimento global (□ = 40 ºC, ■ = 50 ºC). 72

Figura 5.14. Atividade antioxidante dos extratos supercríticos de orégano floreado obtidos nos ensaios de rendimento global (□ = 40 ºC, ■ = 50 ºC). 73

Figura 5.15. Curva de calibração do ácido gálico para o ensaio de fenóis totais pelo método do reagente Folin-Ciocalteu. 75

Figura 5.16. Fenóis totais, expressos em GAE, presentes nas frações de óleo volátil de orégano recuperadas nos primeiros minutos da extração cinética via SD (□ = orégano grande, ■ = orégano floreado, ○ = orégano chileno). 77
Figura 5.17. Fenóis totais, expressos em GAE, presentes nas isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano chileno (□ = 40 °C, ■ = 50 °C). 80
Figura 5.18. Fenóis totais, expressos em GAE, presentes nas isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano floreado (□ = 40 °C, ■ = 50 °C)..... 81
Figura 5.19. Estimativa do COM para a cinética de extração do óleo volátil de orégano chileno obtido via SD, temperatura de vapor 163 °C (□ = COM, ■ = Rendimento). 91
Figura 5.20. Estimativa do COM para a cinética de extração do óleo volátil de orégano grande obtido via SD, temperatura de vapor 164 °C (□ = COM, ■ = Rendimento). 93
Figura 5.21. Estimativa do COM para a cinética de extração do óleo volátil de orégano floreado obtido via SD, temperatura de vapor 164 °C (□ = COM, ■ = Rendimento). 93
Figura 5.22. Estimativa do COM para a cinética de extração do extrato supercrítico de orégano chileno, temperatura 50 °C e pressão 200 bar (□ = COM, ■ = Rendimento). 95
Figura 9.1. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SD do óleo volátil de orégano chileno. 112
Figura 9.2. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SD do óleo volátil de orégano grande. 112
Figura 9.3. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SD do óleo volátil de orégano floreado. 113
Figura 9.4. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SFE do extrato de orégano chileno. 113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1. Umidade das folhas de orégano. 45
Tabela 5.2. Densidade aparente do leito das folhas de orégano. 47
Tabela 5.3. Porosidade total do leito mais partículas de orégano. 48
Tabela 5.4. Rendimento total do óleo volátil obtido via SD das folhas de orégano. 52
Tabela 5.5. Rendimento global dos extratos supercríticos das folhas de orégano. 58
Tabela 5.6. Parâmetros da etapa CER das cinéticas de extração via SD e SFE das folhas de orégano. 67
Tabela 5.7. Atividade antioxidante das frações do óleo volátil das folhas de orégano obtidos nos ensaios de SD. 69
Tabela 5.8. Atividade antioxidante dos extratos supercríticos das folhas de orégano obtidos nos ensaios de rendimento global com S/F = 30. 71
Tabela 5.9. Fenóis Totais GAE das frações dos óleos voláteis das folhas de orégano obtidas nos ensaios de SD. 76
Tabela 5.10. Fenóis Totais GAE dos extratos supercríticos das folhas de orégano obtidos nos ensaios de rendimento global com S/F = 30. 78
Tabela 5.11. Compostos identificados por GC-MS nos extratos aquosos e supercríticos das folhas de orégano. 83
Tabela 5.12. Composição química identificada por GC-FID das frações dos óleos voláteis de orégano recuperadas nos primeiros minutos dos ensaios de SD. 87
Tabela 5.13. Composição química identificada por GC-FID dos extratos supercríticos de orégano chileno obtidos nos ensaios de rendimento global, S/F = 30. 88
Tabela 5.14. Composição química identificada por GC-FID dos extratos supercríticos de orégano floreado obtidos nos ensaios de rendimento global, S/F = 30. 89
Tabela 9.1. Dados experimentais das frações do óleo volátil de orégano chileno recuperado via SD ao longo do tempo de extração. 109
Tabela 9.2. Dados experimentais das frações do óleo volátil de orégano grande recuperado via SD ao longo do tempo de extração. 110
Tabela 9.3. Dados experimentais das frações do óleo volátil de orégano floreado recuperado via SD ao longo do tempo de extração. 110
Tabela 9.4. Dados experimentais das frações do extrato de orégano chileno recuperado via SFE ao longo do tempo de extração. 111

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Autor : Helmut Joél Navarro Díaz

Título : Obtenção dos extratos de orégano andino via destilação por arraste a vapor e extração com dióxido de carbono supercrítico: Estudo econômico e do processo

Orientador : Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles

Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais (LASEFI) – Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

RESUMO

Neste trabalho é apresentado um estudo comparativo entre os processos de destilação por arraste a vapor e extração com dióxido de carbono supercrítico aplicados à obtenção do óleo volátil e do extrato supercrítico bruto de orégano, respectivamente. Foram realizadas determinações da atividade antioxidante, fenóis totais e composição química dos extratos, assim como um estudo econômico estimando os custos de manufatura dos extratos obtidos mediante ambas tecnologias. O orégano é conhecido no mundo das especiarias pelo seu aroma característico devido ao seu óleo volátil. O óleo volátil de orégano apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobianas que o fazem interessante para as indústrias de alimentos, química e farmacêutica. No Peru existem comunidades de produtores rurais que cultivam orégano em zonas elevadas dos Andes e que poderiam beneficiar-se criando associações capazes de adquirir tecnologias que lhes permitam produzir o óleo volátil desta planta ou pela demanda do orégano com elevado teor de voláteis para industrialização de produtos com maior valor agregado. Neste sentido, a engenharia de processos se faz relevante e o presente trabalho visa apresentar alternativas para obtenção de produtos de

maior valor agregado frente a comercialização das matérias-primas. Adicionalmente os processos de extração descritos anteriormente podem ser aplicados ao orégano amadurecido até sua etapa de floração, até então indesejável, para produzir óleo volátil rico em compostos monoterpênicos cíclicos de interesse comercial e com uma qualidade diferenciada. Este orégano amadurecido é normalmente misturado com o colhido no tempo de maturidade comercial e vendido pelo mesmo preço. Também, ele teve rendimento de óleo volátil de 1,17 % quando extraído com vapor superaquecido, que foi 20 % maior que o rendimento do orégano comercial. O rendimento do extrato supercrítico do orégano floreado, obtido na menor condição testada (100 bar e 40 °C) foi de 1,3 %, o qual chegou até 2,6 % quando extraído a 300 bar e 50 °C. Os óleos voláteis e extratos supercríticos de orégano apresentaram entre 40 % e 60 % da atividade antioxidante do padrão BHT. A atividade antioxidante dos extratos de orégano foi determinada pelo método da reação acoplada do β-caroteno e o ácido linoléico. Os óleos voláteis apresentaram cerca de 20 % maior teor de compostos fenólicos que os extratos supercríticos, no entanto os maiores rendimentos da tecnologia supercrítica permitiram recuperar mais destes compostos. O método para quantificar os fenóis totais nos extratos de orégano foi o do reagente Folin-Ciocalteu. Nas análises cromatográficas determinou-se que o trans-hidrato de sabineno e timol foram os compostos químicos majoritários dos óleos voláteis e extratos supercríticos dos oréganos testados. No estudo econômico, o óleo volátil obtido a partir do orégano amadurecido apresentou custo de manufatura de US$ 274,00/kg, enquanto que custo de manufatura do óleo volátil de orégano comercial não foi menor que US$ 352,00/kg.

Palavras chave: Orégano, destilação por arraste a vapor, extração supercrítica, atividade antioxidante, custos de manufatura.

MASTER DISSERTATION

Author : Helmut Joél Navarro Díaz

Title : Obtaining of extracts from Andean oregano via steam distillation and supercritical carbon dioxide extraction: Economic and process study

Major Professor : Dr. Maria Angela de Almeida Meireles

Laboratory of Supercritical Technology: Extraction, Fractionation, and Identification of Vegetable Extracts (LASEFI) – Department of Food Engineering (DEA) – School of Food Engineering (FEA) – University of Campinas (UNICAMP)

ABSTRACT

In this work, it is presented a comparative study between steam distillation and supercritical carbon dioxide extraction processes with application to the obtaining of volatile oils and raw supercritical extracts from oregano, respectively. It was performed determinations of the antioxidant activity, total phenol content and chemical composition of the extracts, as well as an economical study for the estimation of the cost of manufacturing of the extracts recuperated with both technologies. Oregano it is known in the spices world for its characteristic aroma due to its volatile oil. The oregano volatile oil presents antioxidant and antimicrobial properties that make it interesting for the food, chemical and pharmaceutic industries. In Peru there are communities of rural producers that cultivate oregano in the Andes highlands and they could have a business opportunity creating associations capable of acquire technologies for the production of the volatile oil from this plant, or by the demand of high volatile oil oregano for industrial purposes. In this way, process engineering becomes relevant and the present work aims to show alternatives for aggregate value production instead of raw material commercialization. Additionally, the extraction

processes describe before can be applied to flower aged oregano, so far rejected, and to produce volatile oil rich in cyclic monoterpenes compounds with commercial interest and improve quality. This flowered aged oregano is normally mixed with the oregano harvested at the commercial aged and sold without any price difference. Also, it presented a volatile oil yield of 1,17 % when extracted with superheated vapor, this was 20 % higher than the yield obtained with commercial aged oregano. Supercritical extract yield of flowered oregano at 100 bar and 40 °C was 1,3 %, when extracted at 300 bar and 50 °C the yield achieved 2,6 %. Oregano volatile oils and supercritical extracts showed antioxidant activities between 40 % and 60 % of the antioxidant standard BHT. The antioxidant activity of the oregano extracts was determined by the coupled oxidation reaction of β-carotene and linoleic acid. Volatile oils presented around 20 % higher concentration of phenol compounds when compared with supercritical extracts. Nevertheless, higher extraction yield of supercritical technology allowed to recovery more of these compounds. The method used to quantify the total phenols in the oregano extracts was the method of the Folin-Ciocalteu reagent. The chromatographic analyses determined that trans-sabinene hydrate and thymol were the major chemical compounds of the volatile oils and supercritical extracts of the oreganos tested. In the economic study, the volatile oil obtained from flowered aged oregano had a cost of manufacture of US$ 274.00/kg, while the estimated cost of manufacture of the volatile oil from the commercial oregano was not lower than US$ 352,00/kg.

Keywords: Oregano, steam distillation, supercritical extraction, antioxidant activity, cost of manufacture.

1 INTRODUÇÃO

O orégano é uma especiaria de crescente demanda no mercado latino-americano, onde o Brasil é o maior importador desta planta na América do Sul, sendo os maiores produtores o Chile, o Peru e a Argentina. A secagem e seleção das folhas de orégano é praticamente o único beneficiamento que recebe a planta antes da sua comercialização. Um melhor aproveitamento desta matéria-prima poderia ser feito com a extração do óleo volátil, por exemplo, o qual está relacionado ao tempo de maduração da planta e o habitat em que é cultivada.

No Peru, as culturas de orégano encontram-se principalmente na região sul do país, nas províncias de Tacna, Arequipa e Moquegua. Em Arequipa existem zonas apropriadas para a agricultura, como o vale de Huambo, situadas acima dos 3000 m de altitude. Nestas zonas, o cultivo de orégano tem-se adaptado muito bem, uma vez que as condições climáticas e do solo permitem a obtenção de um produto de boa qualidade. Estas culturas são produzidas por agricultores rurais que possuem propriedades de poucos hectares que não negociam diretamente no mercado, obtendo baixa renda na venda de seus produtos; isto os impede de adquirir tecnologias para o melhoramento dos seus produtos e os mantêm em condições de vida muito humildes.

Em geral, os indicadores de qualidade do orégano são: as características físicas das folhas secas, o teor de óleo volátil e a composição química do óleo volátil. No entanto, a comercialização atual desta planta nos mercados da América do Sul somente considera os primeiros dois itens para determinar o seu valor, podendo haver prejuízo econômico dos

produtores de alguma das diversas espécies de orégano cultivadas nestes países (CABANA-HUAMANÍ, 2001).

Existem dois tipos de orégano comercializados no Peru, o orégano do tipo 1 (folhas inteiras grandes) e o orégano do tipo 2 (folhas pequenas e quebradas). Por uma demanda do mercado interno peruano, todas as folhas inteiras e de maior tamanho (tipo 1) são comercializadas dentro do país, enquanto que as folhas menores e quebradas (tipo 2) são destinadas à exportação. O orégano do tipo 1 tem um preço maior que o do tipo 2, pois é considerado de melhor qualidade pela sua melhor aparência e maior período de validade. As folhas inteiras retêm por tempos mais prolongados os compostos voláteis que caracterizam a planta.

Quando o orégano não pode ser colhido no tempo normal de maturidade, geralmente por causa de chuvas intensas, ele se desenvolve até sua etapa de floração. Este orégano, embora possua maior teor de óleo volátil, não é desejado pelos agricultores por preferirem mais colheitas por ano, e porque o preço será determinado pela classificação de tamanho (tipo 1 e 2) apresentada anteriormente. Normalmente é comercializado em mistura com o orégano colhido no tempo de maturidade normal. Destaca-se que mercados como o europeu ou asiático, onde existem varias indústrias dedicadas à extração de compostos voláteis de matrizes vegetais, estabelecem o preço das plantas em função do teor de óleo volátil presente nelas.

O mercado atual, cada vez mais globalizado, demanda os melhores produtos, mas também os quer aos menores preços. Leal (2008) reporta que o mercado de óleos voláteis requer produtos limpos (sem indícios de substâncias contaminantes), de alta qualidade (elevada pureza e estabilidade), que tenham bom abastecimento/produtividade e que possuam preços competitivos. Para alcançar esses padrões de qualidade e ser competitivo

no mercado de extratos vegetais, Povh (2000) indicou que são necessários estudos em todas as áreas do processo de obtenção destes extratos. Como por exemplo, no melhoramento genético das espécies vegetais, nas técnicas de cultivo, e no desenvolvimento dos processos de extração.

Os alimentos industrializados demandam uma grande variedade de aditivos e com as restrições impostas aos aditivos sintéticos, os aditivos naturais têm-se posicionado muito bem no mercado, principalmente aqueles que apresentam propriedades funcionais.

Com o intuito de obter produtos com alta pureza e estabilidade, algumas tecnologias têm sido investigadas. Povh (2000) indicou que o potencial de cada processo é limitado pelo compromisso entre os custos e a seletividade da operação; sendo que para grandes volumes de produção, a tendência é optar pela destilação por arraste a vapor ou pela extração com solventes, pois requerem equipamentos convencionais, mas tendem a promover alterações no produto final. Por outro lado, a extração com dióxido de carbono (CO_2) supercrítico exige um investimento maior, mas é extremamente específica em sua atuação e, portanto, mais indicada para produtos naturais.

A destilação usando vapor d'água superaquecido como solvente de arraste para a recuperação de óleos voláteis de plantas (folhas, galhos e flores) é um processo bastante conhecido, simples e que pode operar perfeitamente com equipamentos pouco sofisticados; isto, o torna atrativo às grandes e pequenas indústrias. Ele tem sido o processo convencional mais empregado industrialmente no século passado, para extração de óleos voláteis porque utiliza um solvente inócuo ao produto final (PRADO; LEAL; MEIRELES, 2009).

A extração com fluidos supercríticos é reconhecidamente uma importante alternativa aos processos convencionais de extração a partir de matrizes sólidas e semi-

sólidas. A força de solvatação, diretamente relacionada à densidade, o grande poder de difusão e as baixas viscosidade e tensão superficial, são propriedades que tornam os fluidos supercríticos interessantes como solventes de extração. A extração com dióxido de carbono supercrítico tem demonstrado ser uma tecnologia limpa, por não deixar resíduos no extrato final, e muito eficiente na recuperação de extratos vegetais, pela seletividade do solvente (ROSA; MEIRELES, 2009).

Com o uso destas tecnologias (destilação com vapor d'água superaquecido e extração com fluidos supercríticos) podem ser obtidos produtos de interesse para as indústrias de aroma, incluindo as companhias de bebidas, alimentos e cosméticos. A expectativa de crescimento da demanda de óleos voláteis com propriedades funcionais vem da indústria de alimentos, devido ao incremento na demanda por alimentos processados que estejam intimamente ligados ao uso de produtos/aditivos que aumentem a vida de prateleira (antioxidantes) e que tragam algum beneficio à saúde (funcionalidade). Rizvi (1994) apontou que estes ingredientes devem proceder de fontes naturais, pois o uso daqueles obtidos por processos químicos (sintéticos) tem sido severamente restringido na indústria de alimentos devido aos efeitos colaterais tais como alergias e possíveis ligações com o desenvolvimento de câncer que foram constatadas em animais de laboratório.

A produção coletiva e organizada, mediante associações ou cooperativas de produtores rurais, tem permitido que estes produtores comercializem seus produtos em maior escala, chegando assim a grandes mercados e inclusive exportando a mercados internacionais. Constituídos dessa maneira, os produtores rurais (especialmente do vale de Huambo no Peru) têm a oportunidade de adquirir tecnologias que lhes permitam oferecer produtos com maior valor agregado, aumentando seus lucros e permitindo-lhes alcançar o desenvolvimento e prosperidade que muitos foram buscar nos centros urbanos e nem todos

conseguiram. Neste sentido, o estudo dos processos de extração por arraste a vapor e com CO_2 supercrítico para a obtenção de extratos naturais de orégano apresentado neste trabalho, visa ser uma ferramenta na concretização desse objetivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral obter extratos das folhas secas de orégano com diferentes graus de maturação a través dos processos de destilação por arraste a vapor e extração supercrítica com dióxido de carbono, com isso tornou-se possível a comparação dos processos de extração, bem como a análise dos extratos obtidos e o estabelecimento dos custos de produção, visando estimular o aproveitamento integral desta planta, através de meios industriais, por parte de associações/cooperativas de produtores rurais, para propiciar a geração de pólos de desenvolvimento nas comunidades campesinas, especialmente os produtores de orégano do vale de Huambo no Peru.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos referentes a execução das diferentes etapas do projeto, foram os seguintes:

- Caracterização física das matérias-primas a serem usadas nos ensaios de extração;
- Obtenção do óleo volátil de orégano utilizando vapor superaquecido mediante a técnica da destilação por arraste a vapor e a construção das cinéticas de extração;
- Obtenção dos extratos de orégano usando dióxido de carbono supercrítico em diferentes condições de temperatura e pressão, e a construção das isotermas de rendimento global a partir destas condições;

- Obtenção do extrato de orégano via tecnologia supercrítica numa condição determinada dentre as isotermas de rendimento global e a construção das cinéticas de extração;
- Ajuste das cinéticas de extração do óleo volátil e do extrato supercrítico utilizando como modelo um *spline* linear;
- Determinação da atividade antioxidante e quantidade de fenóis totais dos óleos voláteis e dos extratos supercríticos obtidos nas diversas condições operacionais, avaliando-se o efeito das variáveis de operação;
- Determinação dos principais compostos presentes nos óleos voláteis e nos extratos de orégano usando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para a identificação e cromatografia gasosa para a quantificação dos compostos;
- Estimativa dos custos de manufatura dos óleos voláteis e dos extratos supercríticos de orégano considerando o aumento para escala industrial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ORÉGANO

O nome "orégano" é dado a varias espécies dentre uma variedade de gêneros, mas usualmente refere-se ao gênero *Origanum*. Dentro deste gênero existem diferenças morfológicas e químicas, assim como existem também muitas espécies em transição (híbridos) no mundo todo, que fazem estas diferenças mais variadas. Usando o sistema de classificação Ietswaart, amplamente aceito, têm-se reconhecido 43 espécies e 18 híbridos (KINTZIOS, 2004).

Dentro do gênero *Origanum* a família Lamiaceae tem caules quadrados com folhas opostas aromáticas. As flores estão arranjadas em aglomerados na base das folhas superiores. Cada flor produz, quando matura, quatro pequenas sementes. As folhas estão dotadas com pequenas glândulas contendo óleo volátil que dá a planta o seu aroma As espécies mais comuns e amplamente confundidas nos mercados internacionais como orégano são: *Origanum majorana* L. e *Origanum vulgare* L. Ambas são ervas perenes da família Lamiaceae, que apresentam uma altura entre 20 cm. a 40 cm. Elas são nativas da zona Mediterrânea, particularmente das áreas elevadas. Nestas áreas, o orégano é colhido principalmente dos cultivos silvestres, uma ou duas vezes por ano no período de floração (MAKRI, 2002).

Na América do Sul, o orégano foi exitosamente inserido nos países da região Andina. No entanto, as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos não aproveitam plenamente o já conhecido potencial desta planta. O comércio limita-se às folhas secas selecionadas por qualidade (teor de óleo volátil) e por tamanho (CABANA-

HUAMANÍ, 2001). Propriedades funcionais como a atividade antioxidante e atividade antimicrobiana dos extratos de plantas do gênero *Origanum* têm sido bastante estudadas com resultados positivos (KINTZIOS, 2002; KINTZIOS, 2004; ŞAHIN et al., 2004; SARAC; UGUR, 2008). A composição química dos extratos, suas propriedades funcionais e o rendimento de extração podem variar dependendo da espécie *Origanum* usada (KINTZIOS, 2002), da localidade dos plantios dentro da mesma espécie (ŞARER et al., 1985; W'GLARZ et al., 2006), o grau de maturação do plantio (PUTIEVSKY; RAVID; HUSAIN, 1985) e do processo de extração utilizado para a recuperação (VÁGI et al., 2005).

Kintzios (2002) cita que os processos tradicionalmente usados para a obtenção do óleo volátil e da oleorresina de orégano são a hidrodestilação, a destilação por arraste a vapor e o Soxhlet usando etanol como solvente.

3.2 ÓLEO VOLÁTIL OU ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

Os óleos voláteis ou óleos essenciais são misturas de ésteres, éteres, álcoois, fenóis, aldeídos, ácidos, cetonas e hidrocarbonetos de estrutura aromática ou terpênica que são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, ou seja, a rota do isoprenóide (POVH, 2000). Os óleos voláteis são definidos como a parte volátil da planta que é recuperada com destilação por arraste a vapor, mas os óleos voláteis também podem ser produzidos fracionando-se a oleorresina obtida na extração com solventes orgânicos (em baixas ou altas pressões). Os compostos majoritários que formam um óleo volátil pertencem às classes químicas dos monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$) e sesquiterpenos oxigenados. Outros terpenos como os diterpenos ($C_{20}H_{32}$) e triterpenos ($C_{30}H_{48}$) não são voláteis, mas são amplamente encontrados em

certos alimentos e são importantes compostos bioativos (MEIRELES, 2009). Estes compostos químicos são os responsáveis pelas propriedades organolépticas e funcionais dos óleos voláteis e em função destas propriedades são empregados nas indústrias de alimentos, de perfumaria, química e farmacêutica (POVH, 2000).

Os óleos voláteis podem ser extraídos por vários processos como a extração com solventes orgânicos, a extração com fluidos supercríticos e a destilação por arraste a vapor, a qual tem sido a técnica mais comumente usada para sua recuperação (PRADO; LEAL; MEIRELES, 2009). Os óleos voláteis são destilados da planta toda ou de partes separadas: folhas, sementes, flores, caules, raízes e até cascas de fruta. Neste caso, em oposição à desodorização dos óleos, os componentes devem ser extraídos da matriz sólida antes da evaporação, para isto, a destilação em batelada usando vapor como solvente de arraste é utilizada na maioria das vezes (CERPA; MATO; COCERO, 2009).

O orégano é amplamente conhecido no mundo das ervas e especiarias pelos seus óleos voláteis. Em geral, o óleo volátil de orégano apresenta rendimento baixo (entre 1 % e 2 %), apresentando cor amarelo ou amarelo esverdeado, possui um aroma que é pungente, fragrante, cálido, aromático e penetrante, e seu gosto é aguçado, quente, picante, ligeiramente amargo, herbáceo e suavemente aromático com um discreto gosto amargo ao final. Sua oleorresina é verde escura, viscosa e semi-sólida com um conteúdo de óleo volátil entre 40 % e 50 % (PRAKASH, 1990). Skoula e Harbone (2002) indicaram que, comercialmente, vêm sendo chamadas de orégano aquelas espécies que são ricas em compostos monoterpenos fenólicos, principalmente carvacrol e ocasionalmente timol, enquanto que as espécies ricas em monoterpenos bicíclicos (*cis*- e *trans*-hidrato de sabineno) vêm sendo chamadas de manjerona. Os óleos voláteis do primeiro grupo, caracterizam-se pelo seu aroma pungente e os do segundo grupo pelo seu aroma mais doce.

Indicaram também que é muito comum que quando o carvacrol e/ou timol é o composto principal, o óleo volátil pode apresentar outros compostos como: gama-terpineno, p-cimeno, éteres metílicos de timol e carvacrol, acetatos de timol e carvacrol, e até p-cimeneno, p-cimen-8-ol, p-cimen-7-ol, timoquinona e timohidroquinona. Ademais, quando *cis*- e/ou *trans*-hidrato de sabineno é o composto principal, alfa-tujeno, sabineno, *cis*- e *trans*-acetato do hidrato de sabineno, *cis*- e *trans*-sabinol, sabino-cetona e acetato de sabinil também estão presentes.

O óleo volátil de orégano é usado como aditivo de sabor em alimentos e de aroma em sopas, sabões em pó e perfumes. Em nível industrial, existem produtos feitos a base de óleo volátil de orégano que são comercializados como antioxidantes naturais hidrossolúveis e são utilizados no processamento de carnes frescas embaladas a vácuo (FUNDACIÓN CHILE, 2004).

3.3 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR

A destilação é uma técnica usada para a recuperação de compostos voláteis de elevado ponto de ebulição a partir de uma matriz complexa e inerte, utilizando vapor saturado ou superaquecido como agente de separação e de energia. Existem três variações deste processo: a destilação com vapor direto, a destilação com água ou hidrodestilação e a destilação com vapor superaquecido (CERPA; MATO; COCERO, 2009).

A destilação por arraste a vapor (SD) é um processo de destilação modificado. É um dos principais processos de extração de óleos voláteis a partir de matrizes sólidas, tais como plantas medicinais, aromáticas e especiarias. Esta tecnologia envolve vários processos físico-químicos e está sujeita a considerações teóricas como a hidrodifusão, a hidrólise de compostos do óleo volátil e a decomposição ocasionada pelo calor (POVH, 2000).

Industrialmente, é preferível a destilação com vapor superaquecido porque as caldeiras padrão produzem vapor a pressões moderadas. Nestas pressões, o vapor é saturado, mas quando é injetado no extrator ele sofre uma expansão isoentálpica convertendo-se em vapor superaquecido. Entre as vantagens da destilação por arraste a vapor podem ser citadas: a obtenção de produtos livres de solventes orgânicos, a alta capacidade de processamento, os baixos custos de investimento inicial e a disponibilidade do conhecimento desta tecnologia. As limitações desta técnica são: a degradação térmica de alguns compostos, o alto consumo de energia no processo (CERPA; MATO; COCERO, 2009) e sua seletividade para compostos voláteis (PRADO; LEAL; MEIRELES, 2009).

Embora os óleos voláteis possam ser extraídos por hidrodestilação, os altos tempos de contato levam à degradação ou hidrólise. Estes inconvenientes são evitados utilizando a destilação com vapor superaquecido. Os trabalhos de investigação existentes sobre a composição química e a atividade biológica dos óleos voláteis foram desenvolvidos com produtos obtidos por hidrodestilação, que é o processo mais usado para obter óleos voláteis em escala laboratorial. Mas, em escala industrial emprega-se comumente a destilação com vapor superaquecido. Apesar do fenômeno envolvido em ambas as técnicas ser o mesmo, o rendimento de extração em cada uma pode ser diferente, assim como a composição química dos óleos voláteis obtidos está sujeita a variação (PRADO; LEAL; MEIRELES, 2009).

O processo de destilação por arraste a vapor aproveita a pressão de vapor da água e a pressão de vapor do óleo volátil para permitir a vaporização da mistura a temperaturas menores do que às dos pontos de ebulição de ambas substâncias. O material majoritariamente destilado é a água e isto contribui para permitir que os óleos voláteis (mistura de terpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos) sejam destilados a temperaturas próximas de 100 °C, que é a temperatura normal de ebulição da água. A lei de

Dalton governa este principio em que a pressão de vapor total da mistura de vapores (vapor d'água e vapores do óleo volátil) é igual à soma das pressões parciais de cada substância como se representa na Equação 3.1. A lei de Dalton é válida para materiais mutuamente insolúveis ou líquidos imiscíveis, mas levemente solúveis (LEAL, 2008).

$$p_T = p_{H_2O} + \sum_i p_i \tag{3.1}$$

Onde p_T é o valor da pressão total da mistura, p_{H_2O} é a pressão parcial da água e p_i é a pressão parcial da cada substância presente no óleo volátil.

3.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

A extração com fluidos supercríticos (SFE) é uma operação unitária por contato que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos: alto poder de solvatação, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (BRUNNER, 1994).

O processo SFE emprega como solvente um fluido a temperatura e pressão próximas ou acima do ponto crítico. O ponto crítico de cada substância é caracterizado por sua temperatura crítica (T_c), pressão crítica (p_c) e volume crítico (V_c); abaixo do ponto crítico a substância pode existir como um líquido ou um gás. Acima do ponto crítico existe a região supercrítica, sendo que as variações das propriedades termodinâmicas nesta região podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e solventes (SANDLER, 1989), conforme apresentado na Figura 3.1. Próximo do ponto crítico, as propriedades físico-químicas mudam drasticamente e as fases gasosa e líquida tornam-se indistinguíveis.

Os fluidos supercríticos apresentam características únicas que possibilitam sua utilização como solventes. A densidade destes fluidos é relativamente alta (próxima à do

líquido) e como conseqüência disto eles possuem alto poder de solvatação. Variações na densidade podem ser facilmente realizadas mediante pequenas alterações na pressão ou temperatura do sistema, principalmente na região próxima ao ponto crítico. Este efeito proporciona aos fluidos supercríticos uma solubilidade seletiva e também permite um fácil processo de separação solvente-soluto. A separação pode ser obtida reduzindo-se a pressão ou aumentando a temperatura da mistura que sai da coluna de extração. Outras características importantes são a baixa viscosidade (característica dos gases) e o alto coeficiente de difusão, os quais propiciam alto poder de penetração na matriz sólida. Estas propriedades favorecem altas taxas de extração quando estes fluidos são utilizados (ROSA; MEIRELES, 2009).

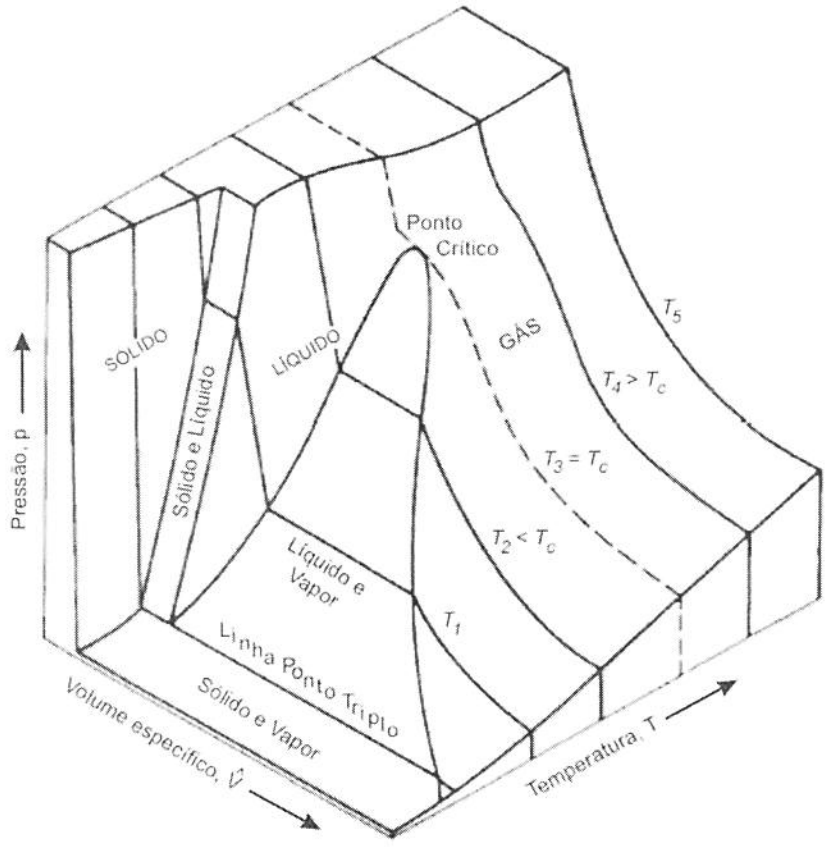

Figura 3.1. Diagrama de equilíbrio para uma substância pura (adaptado de Sandler, 1989).

A tecnologia sub e supercrítica é uma tecnologia limpa e GRAS (*Generally Recognized As Safe*), pois não deixa resíduos de solventes tóxicos no produto final, permite operar a temperaturas baixas, obtendo extratos mais próximos da forma natural que apresentam na matriz de onde são recuperados e o impacto ambiental é menor que o das tecnologias convencionais. Portanto, ela é considerada como "indústria verde", característica que a tornou ainda mais interessante tendo em vista que as regulamentações referentes ao uso de solventes orgânicos tornaram-se mais rígidas e restritivas, incluindo a proibição de alguns solventes tradicionais. Brunner (1994) considera que do ponto de vista da seletividade, a SFE pode ser considerada uma tecnologia de grande potencial. O fluido supercrítico apresenta diferentes densidades (poder de solvatação) a diferentes condições de pressão e temperatura, sendo possível aperfeiçoar a seletividade da extração.

O fluido supercrítico mais usado como solvente de extração é o dióxido de carbono (CO_2), cujo ponto crítico é encontrado a 7,38 MPa e 304,2 K (73,8 bar e 31 °C). Este fluido possui pressão crítica moderada e temperatura crítica baixa, que permite a operação em temperaturas próximas à temperatura ambiente. Ele não é tóxico nem inflamável e pode ser obtido facilmente em alta pureza e a baixo custo. O CO_2 é um bom solvente para compostos hidrofóbicos ou pouco hidrofílicos. Geralmente, quando a pressão do sistema é aumentada, compostos mais hidrofílicos podem ser obtidos. Se compostos ainda mais polares são desejados, a polaridade do solvente pode ser modificada usando solventes orgânicos mais polares, como o acetato de etila, etanol ou metanol. Estes solventes orgânicos agregados são chamados de co-solventes (ROSA; MEIRELES, 2009).

A Figura 3.2 apresenta as áreas das condições de temperatura e pressão, nas quais são realizadas algumas aplicações das extrações com CO_2 supercrítico. Esta figura apresenta também as curvas de densidade do CO_2, permitindo apreciar como pequenas

mudanças das condições de operação na região próxima ao ponto crítico provocariam grandes mudanças na densidade do solvente, que conseqüentemente afetariam a solubilidade dos compostos a serem extraídos.

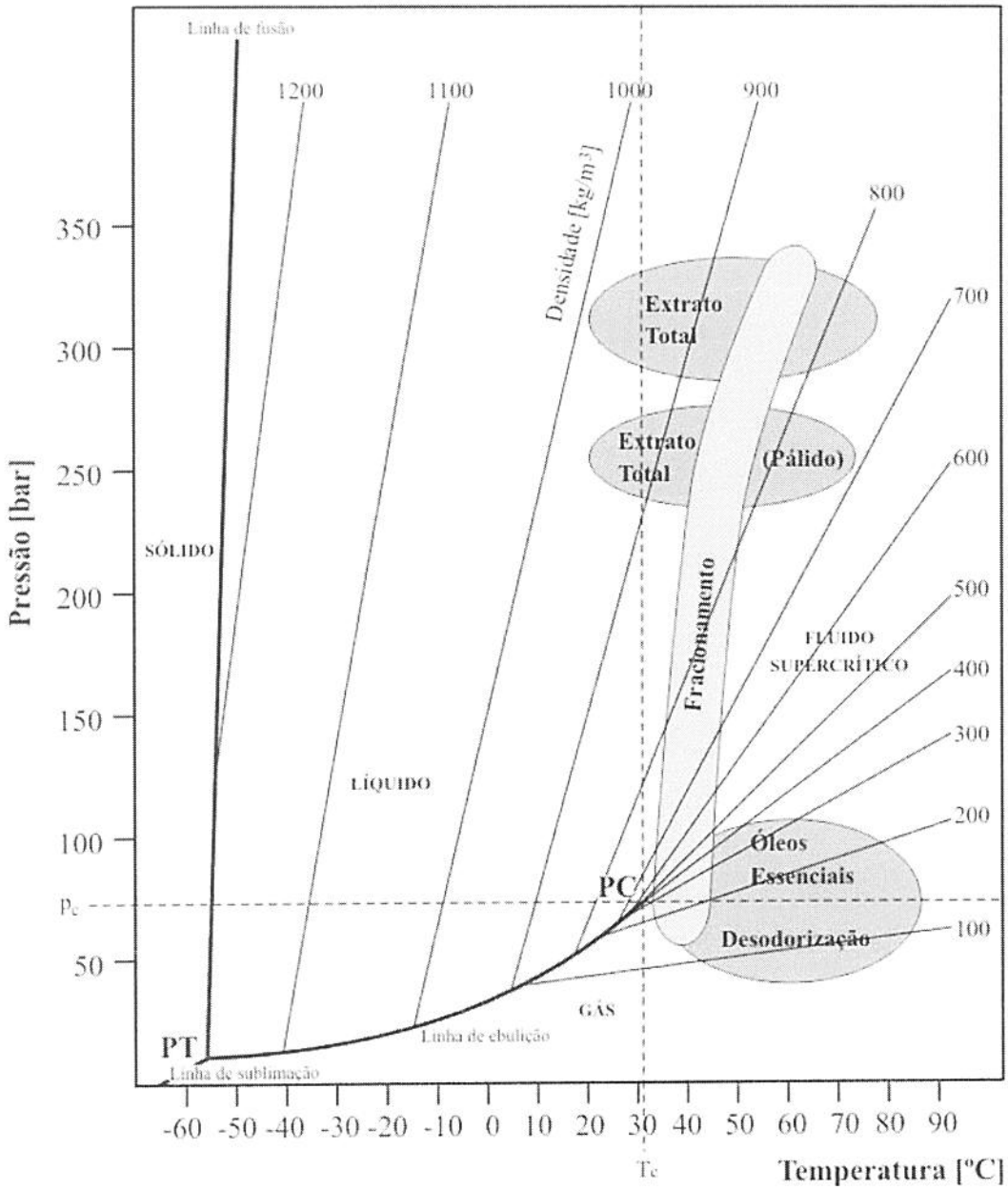

Figura 3.2. Áreas selecionadas para algumas aplicações de extração usando CO_2 em diferentes pressões (variação no poder de solvatação) (BROGLE, 1982).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizadas folhas secas de orégano procedentes do Peru, especificamente, do vale de Huambo, localizado na província de Caylloma na região de Arequipa. Este vale Andino possui zonas cultiváveis entre os 3000 m e 3200 m de altitude. No Peru, ainda não foi feita uma identificação botânica de todas as espécies de orégano atualmente cultivadas em todas as regiões do país. No entanto, é conhecido que muitas delas seriam híbridos de outras espécies. É muito provável que a espécie do orégano andino de origem peruana utilizada neste estudo seja o híbrido *Origanum* × *majoricum* Cambessedes, proveniente da península ibérica (Espanha e Portugal), cujos parentais são o *Origanum majorana* e o *Origanum vulgare* ssp. *virens* (SKOULA; HARBORNE, 2002). Estas folhas foram diferenciadas pelo grau de maturidade e tamanho em duas classes, aqui denominadas como: orégano grande e orégano floreado.

O **orégano grande** consiste das folhas inteiras de orégano colhidas no tempo da maturidade comercial, que no local de cultivo (vale de Huambo, Peru) é de 4 a 6 meses. Foram separadas por simples peneiragem das folhas pequenas e das quebradas. Este orégano foi colhido em junho de 2007, com 5 meses de cultura.

O **orégano floreado** consiste das folhas pequenas e quebradas colhidas no tempo de floração da planta. Foram separadas das folhas inteiras por peneiragem. Este orégano foi colhido em fevereiro de 2008, com 8 meses de cultura.

Nos mesmos lugares da colheita foram realizadas: a secagem da planta (ao sol por três a quatro dias), a limpeza após a secagem (para remoção de poeira e demais

contaminantes) e a seleção das folhas secas (por tamanho) Nestas etapas a perda de voláteis é mínima. A embalagem para o transporte até o Brasil foi feita na cidade de Arequipa em sacos plásticos devidamente vedados.

Foram utilizadas também folhas secas de orégano adquiridas em janeiro de 2008 da empresa Flores e Ervas (Piracicaba, SP), com laudo indicando a espécie como *Origanum vulgare* L., com origem no Chile. Estas folhas foram secas ao sol em setembro de 2007, umidade de 12,2 % pelo método de aquecimento em estufa, cinzas totais 6,0 % e cinzas insolúveis 1,2 %. Este orégano foi denominado como **orégano chileno**.

Todas as matérias-primas foram transladadas até o Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de Extratos Vegetais (LASEFI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) na cidade de Campinas (São Paulo, Brasil), onde foram realizados os experimentos. Uma vez recebidas as matérias-primas no LASEFI, as mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos vedados e mantidos sob refrigeração em temperatura inferior a -5 °C.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.2.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

O teor de umidade foi determinado pelo método da destilação do solvente imiscível (JACOBS, 1973): aproximadamente 15 g das folhas secas de orégano foram colocadas em um balão de fundo redondo de 250 cm^3 junto com 75 cm^3 de xilol (Cetus, lote 17.463, São Paulo, SP). Conectou-se o separador Bidwell-Stirling ao condensador Liebig e ao balão de 250 cm^3 conforme apresentando na Figura 4.1; mais xilol foi adicionado até encher o tubo de recepção do separador. Em seguida, ligou-se a manta aquecedora (Fisaton, modelo 102, São Paulo, SP) para dar inicio à destilação. A destilação foi feita até não condensar mais

nenhuma gota de água. Como medida prévia à finalização da destilação, 10 cm^3 de xilol foram adicionados pela parte superior do condensador para remover as gotas de água aderidas nas superfícies interiores do condensador e do separador. Nos casos que não foi possível a completa remoção dessas gotas com o xilol, uma haste com um pedaço de borracha na ponta foi utilizada para a remoção das mesmas. Finalmente, procedeu-se à leitura do volume de água recuperado, que por ser mais densa que o xilol, ficava na parte inferior do tubo coletor graduado.

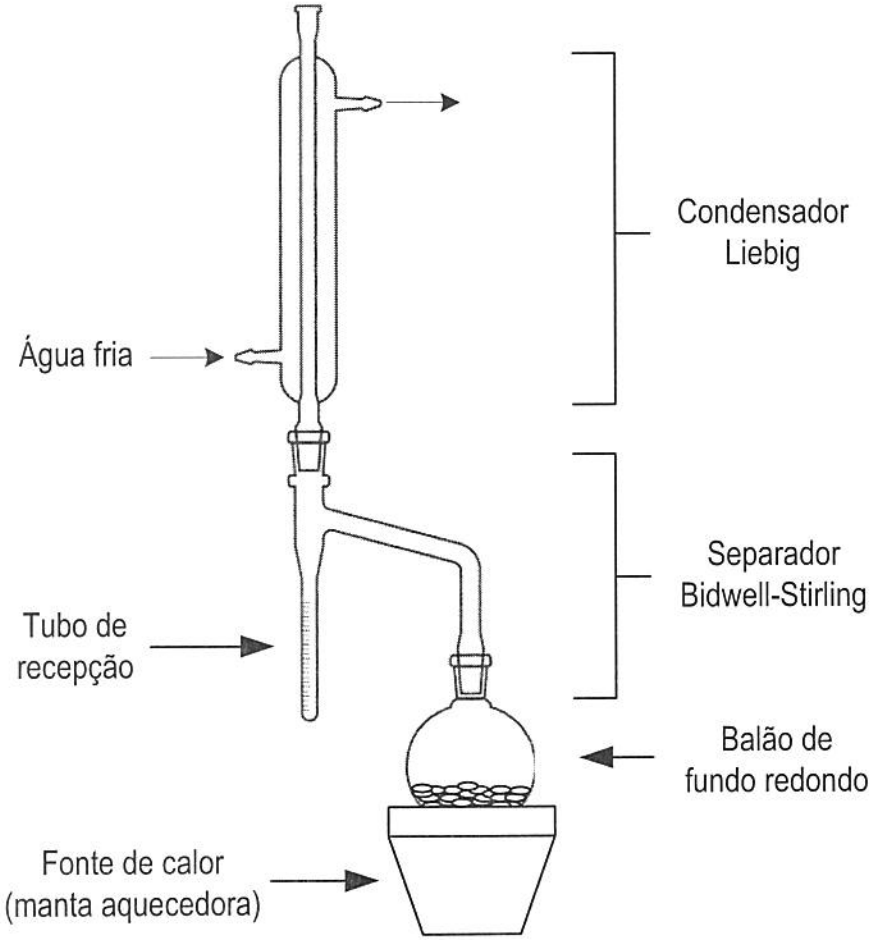

Figura 4.1. Esquema do equipamento de destilação utilizado na determinação da umidade (Baseado no esquema apresentado por Jacobs, 1973).

O valor da umidade das folhas de orégano foi calculado usando a Equação 4.1.

$$Umidade = \frac{m_{água}}{m_{MP}} \times 100 \quad (4.1)$$

Na Equação 4.1 a umidade é expressa em percentagem; m_{MP} é a massa em gramas da matéria-prima que foi utilizada no ensaio; e $m_{água}$ é a massa de água em gramas que foi condensada na destilação e ficou no tubo receptor, este valor foi calculado usando o volume de água medido no tubo coletor e a densidade da água nas condições de temperatura e pressão ambientes.

4.2.2 GRANULOMETRIA DO MATERIAL E DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA

A matéria-prima foi triturada em moinho tipo Wiley (Marconi, modelo MA340, Piracicaba, SP). A distribuição granulométrica foi realizada acondicionando aproximadamente 50 g em um jogo de peneiras da série padrão de Tyler (Daigger, EUA) com meshes de 16, 24, 32, 48 e 80. A separação das partículas foi realizada por agitação mecânica através de um agitador de peneiras (Bertel, modelo 1868, Caieiras, SP). As massas retidas em cada peneira foram pesadas em balança semi-analítica (Marte, modelo AS 2000, São Paulo, SP). Após a pesagem, a matéria-prima foi acondicionada em sacolas plásticas que depois foram vedadas na menor presença possível de ar. As sacolas contendo a matéria-prima foram armazenadas em freezer horizontal (Metalfrio, modelo HC-4, São Paulo, SP) em temperatura inferior a -5 °C, para posterior uso nos experimentos. A operação em unidades SFE laboratoriais restringe o uso de partículas muito finas (podem ser arrastadas pelo solvente) e muito grandes (podem comprometer a porosidade do leito).

Com base nessas premissas, as partículas selecionadas para os ensaios de SFE foram as que ficaram retidas nas peneiras de mesh 24, 32, 48 e 80.

Para a determinação do diâmetro médio das partículas foi utilizado o método ANSI/ASAE S319.4 FEB 2008, recomendado pela *American Society of Agricultural and Biological Engineers* ASABE (2008). Neste método, o cálculo do diâmetro médio geométrico é realizado utilizando a Equação 4.2.

$$d_{gw} = \log^{-1}\left[\frac{\sum_{i=1}^{n}(W_i \log D_i)}{\sum_{i=1}^{n} W_i}\right] \tag{4.2}$$

Na Equação 4.2, d_{gw} é o diâmetro médio geométrico expresso em milímetros; W_i é a massa em gramas retida na i-ésima peneira; D_i corresponde ao valor de: $(d_i \times d_{i+1})^{1/2}$; d_i é a abertura nominal da i-ésima peneira em milímetros; e d_{i+1} é a abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira também em milímetros.

4.2.3 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE REAL DAS PARTÍCULAS

A densidade real das partículas foi determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp por picnometria de gás hélio. O método utiliza um picnômetro gasoso (Micromeritics, modelo AccuPyc II 1340, EUA). Nesta técnica, as moléculas do gás rapidamente enchem até os menores poros da amostra, onde somente a verdadeira fase sólida da amostra desloca o gás. O equipamento mede a quantidade de gás que é deslocado pela amostra sólida. Para o cálculo do volume de amostra sólida, são utilizadas as pressões observadas quando a célula contendo a amostra é cheia com o gás (hélio) e depois esvaziada a uma segunda célula vazia.

4.2.4 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE APARENTE DO LEITO

A densidade aparente do leito (d_a) foi calculada usando o volume total da coluna de extração (V_t) e a massa total de matéria-prima (m_t) que foi necessária para enchê-la. A Equação 4.3 foi utilizada para realizar este cálculo.

$$d_a = \frac{m_t}{V_t} \tag{4.3}$$

A coluna de extração da unidade de destilação por arraste a vapor é cilíndrica e tem um volume de 914 cm^3 (diâmetro interno 4,6 cm e comprimento 55 cm). Este volume foi usado para calcular a densidade aparente do leito das folhas inteiras dos oréganos chileno, grande e floreado, nos ensaios cinéticos SD.

A unidade de extração supercrítica possui uma coluna de extração de aço inox de forma cilíndrica com volume total de 300 cm^3. Este volume foi totalmente preenchido com as folhas trituradas do orégano chileno nos ensaios cinéticos SFE. Nos ensaios de rendimento global SFE, realizados com as folhas trituradas dos oréganos chileno e floreado, somente uma parte do volume foi preenchido com a matéria-prima e depois completado com esferas de vidro.

4.2.5 CÁLCULO DA POROSIDADE TOTAL DO LEITO MAIS PARTÍCULAS

A porosidade total do leito contendo as partículas de orégano foi calculada com a Equação 4.4 que relaciona os valores da densidade aparente do leito e da densidade real das partículas da matéria-prima dentro das colunas de extração.

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{d_a}{d_r} \right) \tag{4.4}$$

Na Equação 4.4, ε é a porosidade do total do leito e partículas; d_a é a densidade aparente do leito; e d_r é a densidade real das partículas.

4.3 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

4.3.1 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR

A unidade de SD utilizada foi a mesma montada e descrita por Leal (2008) e que é apresentada na Figura 4.2.

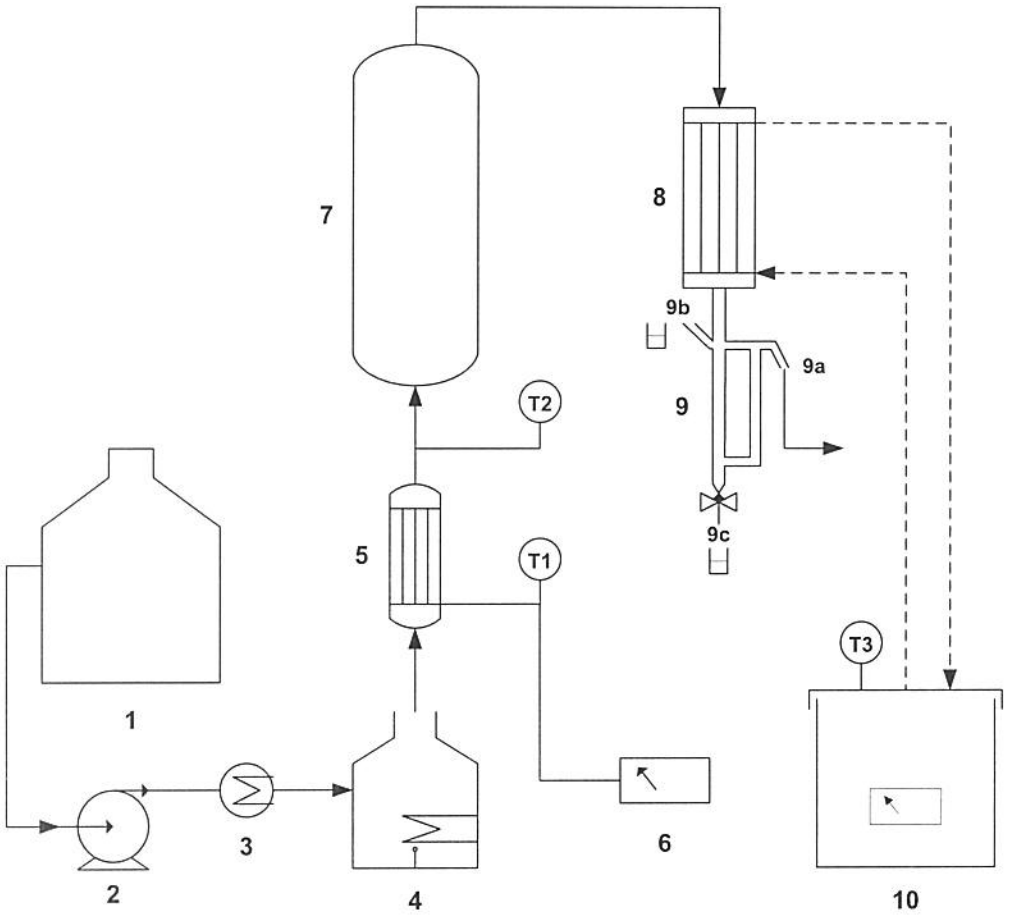

Figura 4.2. Diagrama da unidade de destilação por arraste a vapor (baseado no diagrama apresentado por Leal, 2008).

O equipamento da Figura 4.2 contém:

1 - Tanque reservatório para água destilada com capacidade de 15 dm^3 (alimentação da caldeira);

2 - Bomba (Cole Parmer, modelo 7554-30, Chicago, EUA) com controlador de velocidade (Barmant, Barnington, EUA);

3 - Fita de aquecimento;

4 - Caldeira de vapor (capacidade de produção de vapor de $1{,}16 \times 10^{-4}$ kg/s) que é constituída por um balão de 5 dm^3 de capacidade e uma manta de aquecimento (Fisatom, modelo 652, São Paulo, SP). A caldeira possui uma saída de segurança que abrirá caso a pressão interna do balão seja $\geq$ 1 bar;

5 - Trocador de calor de aço inox do tipo casco tubo para superaquecimento do vapor (Autic, Campinas, SP), desenhado por Leal (2008);

6 - Controlador de temperatura microprocessado (Coel, modelo HW500, São Paulo, SP) com painel digital indicador de temperatura (temperatura do vapor dentro do trocador de calor e temperatura da resistência);

7 - Coluna de extração de vidro com capacidade de 914 cm^3 (diâmetro interno de 4,6 cm e comprimento de 55 cm);

8 - Condensador de vidro tipo serpentina cujo fluido de resfriamento é a mistura de etileno glicol em água (40 %);

9 - Separador de vidro que permite coletas separadas do hidrolato (saída 9a) e do óleo volátil (saída 9b para coleta de pequenas frações ou durante a extração e saída 9c para coleta de grandes frações ou drenado do separador);

10 - Banho térmico (Marconi, modelo MA-184, Piracicaba, SP) para resfriamento.

4.3.1.1 **Procedimento Experimental**

- Verificar a limpeza do equipamento e da área de trabalho;
- Ligar o banho de refrigeração (10) com a antecedência necessária para que atinja a temperatura de 0 °C antes de começar a destilação; não programar para temperaturas menores do que -1 °C;
- Alimentar o tanque reservatório (1) e a caldeira (4) com água destilada;
- Ligar o aquecimento da caldeira (4) para aquecimento da água até ebulição;
- Após o inicio da geração de vapor, ligar o controlador (6) do trocador de calor (5) e configurá-lo na temperatura de operação pré-estabelecida;
- Ligar a bomba (2) e a fita de aquecimento (3) da tubulação que alimenta a caldeira, para garantir que o nível de água seja constante;
- Deixar passar o vapor pelo equipamento vazio (pré-aquecimento da coluna de extração) até observar que a condensação de vapor na coluna de extração (7) diminui.
- Fechar a válvula de entrada de vapor e colocar a célula de nylon contendo a matéria-prima dentro da coluna de extração (7); fechar o sistema e permitir a entrada de vapor;
- Monitorar o termopar dentro do trocador de calor (5) para registrar o perfil da temperatura do vapor;
- Monitorar o volume de hidrolato removido do sistema para determinar a vazão do condensado;
- Recolher o extrato do separador (9) optando por uma das duas formas: i) para coleta do óleo volátil após término da destilação, abrir a válvula de saída do separador

(9c), retirar cuidadosamente todo o hidrolato e finalmente coletar o óleo volátil; ii) para coleta do óleo volátil durante a destilação, utilizar a saída alternativa do separador (9b) retirando o óleo volátil com ajuda de uma seringa, no caso de haver pouca quantidade de extrato, introduzir solvente imiscível em água para solubilizá-lo e retirar a mistura com ajuda de uma seringa, deixar o frasco contendo a mistura na capela com exaustão, pesar o frasco coletor a cada 30 min até verificar que o solvente já foi removido;

- Desligar o aquecimento do gerador de vapor (4), a fita de aquecimento (3) da tubulação que alimenta o gerador de vapor, a bomba (2), o controlador do trocador de calor (6) e o banho de refrigeração (10);
- Remover a célula de nylon com os resíduos da matéria-prima;
- Limpar o equipamento cuidadosamente, com água destilada e etanol, para não deixar resíduos de óleo volátil que possam contaminar ensaios posteriores.

4.3.1.2 **Rendimento de Extração**

O rendimento de extração do óleo volátil de orégano foi expresso em percentagem em base seca. O cálculo foi feito dividindo a massa do extrato obtido pela massa de matéria-prima usada na extração (uma vez descontando o valor da umidade determinado como descrito no Item 4.2.1) e multiplicando este resultado por 100.

4.3.1.3 **Cinéticas de Extração**

As cinéticas de extração do óleo volátil de orégano representam a massa de óleo volátil cumulativa em função do tempo de processo. A informação provida pelas cinéticas

de extração é o tempo requerido para uma extração em batelada. Estas cinéticas foram construídas para cada classe de orégano estudada (chileno, grande, floreado). Foram realizadas duplicatas de todas as extrações, sendo que as cinéticas apresentadas nos resultados foram construídas a partir dos valores médios destes dados.

4.3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

O equipamento SFE utilizado foi o Spe-ed (Applied Separations, modelo 7071, Allentown, EUA) que trabalha em pressão máxima de 670 bar e temperatura de até 240 °C (Figura 4.3).

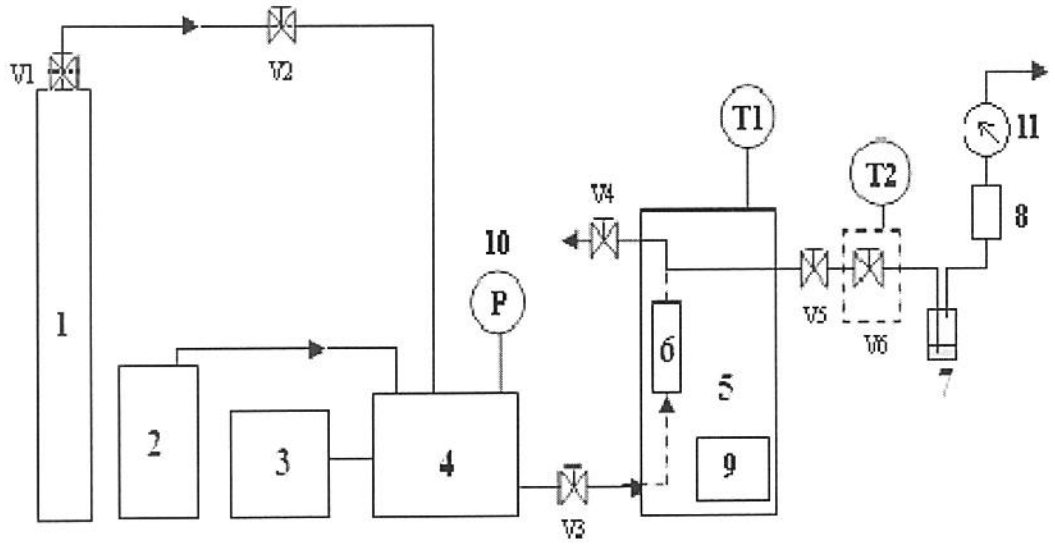

Figura 4.3. Diagrama da unidade de SFE, Spe-ed (Baseado no manual da unidade Spe-ed, Applied Separations).

O sistema da Figura 4.3 consiste em:

1 - Cilindro de CO_2 (99,0 %, Gama Gases, São Bernardo do Campo, SP);

2 - Compressor (Schulz S.A., modelo MSV 6, Joinville, SC);

3 - Banho de refrigeração (Marconi, modelo MA-184, Piracicaba, SP) para resfriamento do CO_2 antes da pressurização;

4 - Sistema de pressurização do CO_2 que consiste em bomba pneumática 1:110 (booster);

5 - Forno de aquecimento elétrico;

6 - Coluna de extração (Thar Desings, modelo CL 1373, Pittsburgh, EUA) com capacidade de 300 cm^3;

7 - Frasco coletor;

8 - Medidor de vazão (rotâmetro)

9 - Painel digital controlador e indicador de temperatura no forno (T1) e na válvula de expansão (T2);

10 - Indicador digital da pressão subministrada pela bomba pneumática;

11 - Totalizador de volume do CO_2 gasto.

A identificação das válvulas é:

V1 – válvula do cilindro de CO_2;

V2 – válvula da linha de entrada do CO_2;

V3 – válvula de entrada do fluido pressurizado no extrator;

V4 – válvula de segurança para purga do extrator;

V5 – válvula de saída da coluna de extração;

V6 – válvula de expansão (micrométrica).

4.3.2.1 **Procedimento Experimental**

- Verificar a limpeza do equipamento e da área de trabalho;

- Ligar o banho de resfriamento do CO_2 (3) com a antecedência necessária para que atinja a temperatura de -10 °C antes de começar a extração. A máxima temperatura do banho deve ser -5 °C;
- Verificar se as válvulas V3, V4, V5 e V6 encontram-se fechadas;
- Abrir a válvula V1 do cilindro de CO_2 (1) e em seguida a válvula V2 da linha de CO_2. Verificar no indicador digital (10) se a pressão é maior do que 50 bar; esta é a menor pressão na que a unidade SFE consegue trabalhar com CO_2 líquido;
- Inserir a matéria-prima no extrator (6) compactando o leito, caso haja espaço vazio dentro do extrator, completar com esferas de vidro (de até 4 mm de diâmetro). As esferas de vidro devem ir na base do extrator, ou seja, na entrada do CO_2; colocar uma camada de lã de vidro na extremidade superior interna do extrator, na saída da mistura contendo o soluto;
- Para a recuperação de voláteis, inserir uma coluna de vidro (10 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro interno) empacotada com Porapak Q (Supelco, mesh 80 a 100, área superficial de 0,5 a 0,6 m^2/kg, 340 kg/m^3, Milford, EUA) na corrente de saída do solvente, após o frasco coletor;
- Ligar o compressor (2);
- Programar as temperaturas do forno (5) e da válvula V6, estas podem ser controladas através do painel digital (9);
- Instalar o extrator (6) dentro do forno de aquecimento (5) e conectar as linhas de entrada de solvente e saída do extrator. Verificar se não existem vazamentos utilizando a pressão do cilindro de CO_2, abrir a válvula V3;

- Uma vez alcançada a temperatura de extração, pressurizar o sistema através do ajuste da bomba pneumática (4) na pressão de operação pré-estabelecida;
- Atingida a pressão de trabalho na coluna de extração (6), aguardar o período estático pré-fixado (10 minutos), posteriormente abrir cuidadosamente as válvulas V5 e V6 até atingir a vazão de solvente desejada para o ensaio;
- O extrato é recolhido em frasco de vidro de 50 cm^3 (7), imerso em banho de gelo;
- Terminado o tempo pré-estabelecido de extração, despressurizar o sistema. Fechar as válvulas V1 e V2, para deter a alimentação de CO_2, e reduzir a pressão da bomba (4). Para manter a vazão de saída constante durante a despressurização, abrir conforme necessário as válvulas V5 e V6, quando o rotâmetro (8) indicar que não há mais fluxo, o sistema estará na pressão ambiente;
- Por precaução e para garantir a total despressurização da célula de extração, abrir a válvula V4;
- Desligar o banho termostático (3) e o painel do forno de aquecimento (9);
- Abrir o forno (5), retirar a célula de extração (6) e limpar o equipamento, especialmente a linha de saída com abundante etanol, seguidamente fechar o sistema e deixar passar CO_2 diretamente do cilindro para remoção dos resíduos de etanol;
- Previamente à pesagem dos frascos usados para coletar o extrato durante o experimento, secá-los, retirar o lacre e deixá-los repousar na capela de exaustão de gases por alguns minutos para liberar possível CO_2 ainda presente.

4.3.2.2 **Rendimento de Extração**

Os valores de rendimento de extração dos extratos supercríticos das folhas de orégano chileno e floreado foram calculados como indicado no Item 4.3.1.2. O rendimento global (X_0) representa a máxima quantidade de extrato que pode ser recuperada em uma dada condição de pressão e temperatura. Os efeitos da pressão e temperatura sobre o valor de X_0 do orégano foram estudados para duas isotermas (40 °C e 50 °C) construídas usando pressões que variaram desde 100 até 300 bar. Como nem sempre extrações exaustivas são realizáveis em laboratório, o rendimento de extração foi determinado para um valor de S/F (massa de solvente / massa de alimentação) igual a 30 ($X_{0,S/F=30}$).

4.3.2.3 **Cinéticas de Extração**

As cinéticas de extração dos extratos supercríticos de orégano chileno foram construídas como descrito no Item 4.3.1.3.

4.4 AJUSTE DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO

Yoda (2001) indicou que nos processos de extração podem-se determinar as seguintes etapas:

- Etapa de taxa de extração constante (etapa CER) – predomínio da transferência de massa devido à convecção na fase fluida;
- Etapa de taxa de extração decrescente (etapa FER) – os efeitos convectivos na fase fluida e os difusionais na fase sólida determinam a velocidade do processo;
- Etapa de taxa de extração controlada pela difusão no sólido (etapa DC) – predomínio do fenômeno difusional.

Segundo Meireles (2008) a etapa CER é caracterizada pelos seguintes parâmetros cinéticos: (1) taxa de transferência de massa (M_{CER}), (2) duração da etapa CER (t_{CER}), (3) rendimento durante a etapa CER (R_{CER}) e (4) razão mássica do soluto em fase fluida na saída do extrator (Y_{CER}). Estes parâmetros são importantes para estimar os custos de produção, imprescindíveis em qualquer análise econômica.

Com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos para o período de velocidade constante de extração, os dados experimentais foram ajustados a um *spline* de três retas. Para isto, foram empregados o procedimento PROC REG do *software* SAS Learning Edition 4.1 (2002) e o procedimento PROC NLIN do mesmo *software*.

Meireles (2008) indicou que uma cinética de extração pode ser ajustada por uma família de "N" retas e que o valor da massa de extrato recuperada (ou do rendimento da extração) pode calcular-se com a Equação 4.5; no caso específico de um ajuste a "3" retas esta massa é calculada usando a Equação 4.6.

$$m_{EXT} = \left(b_0 - \sum_{i=1}^{i=N} C_i b_{i+1} \right) + \sum_{i=1}^{i=N} b_i t \tag{4.5}$$

$$m_{EXT} = \left(b_0 - C_1 b_2 - C_2 b_3\right) + \left(b_1 + b_2 + b_3\right) \times t \tag{4.6}$$

Nas Equações 4.5 e 4.6 m_{EXT} é a massa do extrato recuperada (ou o rendimento da extração); b_0 ... b_i são os coeficientes lineares das retas do ajuste; C_i é o valor do tempo na intersecção entre a i-ésima e a (i+1)-ésima retas; e t é o tempo de extração.

O emprego do *software* SAS facilitou os cálculos. O procedimento PROC NLIN utiliza cálculos iterativos, pelo que são requeridos valores iniciais dos coeficientes lineares das retas do ajuste e dos tempos nas intersecções entre as retas. Inicialmente, utilizou-se o procedimento PROC REG para estimar os valores dos coeficientes lineares, que no

programa são nomeados como Intercept (b_0), tmin (b_1), AL1 (b_2), e AL2 (b_3). Posteriormente, utilizaram-se estes dados como valores de entrada para o procedimento PROC NLIN. Os valores iniciais dos parâmetros C_1 e C_2, que no programa são designados knot1 e knot2, respectivamente, foram estimados visualmente do primeiro ajuste da cinética de extração feito pelo procedimento PROC REG. Finalmente, foram obtidos os valores do modelo ajustado, onde C_1 (knot1) e C_2 (knot2) são os parâmetros t_{CER} e t_{FER}, respectivamente (RODRIGUES et al., 2002).

Para as cinéticas de extração onde no período t_{CER} apresentaram-se valores de extração do material solúvel (rendimento) inferiores ao 70 %, calculou-se um novo tempo de duração da etapa de taxa de extração constante (denominado t_{CER2}) descrito e recomendado por Leal (2008). Este novo tempo foi estimado para o ponto de intersecção entre as projeções das retas da etapa CER e da etapa DC.

4.5 ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA

4.5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante (AA) dos extratos de orégano foi baseada na reação de oxidação acoplada do β-caroteno e o ácido linoléico (MARCO, 1968).

Os valores de AA dos extratos foram comparados com os de dois padrões puros, o butil-hidroxi-tolueno (BHT) (99 %, Sigma-Aldrich, lote 06407HH-407, Alemanha) e a Quercetina (98 %, Sigma-Aldrich, lote 034K3482, Alemanha) de uso atual na indústria como compostos antioxidantes. A metodologia utilizada foi desenvolvida por Marco (1968) e posteriormente modificada por Miller (1971), que consiste em medir a descoloração do β-caroteno resultante da oxidação por produtos de degradação do ácido linoléico.

O procedimento é descrito a seguir: aproximadamente 1 mg de β-caroteno (97 %, Sigma-Aldrich, lote 1345610, EUA) foi dissolvido em 10 cm^3 de clorofórmio (99 %, Cetus, lote 17.408, São Paulo, SP). A concentração foi testada misturando 0,2 cm^3 desta solução com 5 cm^3 de clorofórmio e em seguida fazendo as leituras de absorbância desta nova solução em espectrofotômetro UV-vis (Hitachi, modelo U-3010, Tóquio, Japão), com comprimento de onda de 470 nm, onde leituras de absorbância entre 0,6 e 0,9 indicavam uma concentração apropriada de β-caroteno. Um mililitro da solução inicial de β-caroteno e clorofórmio foi pipetado à um balão que continha 20 mg de ácido linoléico (99 %, Sigma-Aldrich, lote 086K2120, Índia) e 200 mg de Tween 40 (99 %, Sigma-Aldrich, lote L032K0104, EUA). O clorofórmio foi removido usando rota-evaporador (Heildoph Instruments, modelo Laborota 4001, Viertried, Alemanha) com controlador de vácuo (Heildoph Instruments, modelo Rotavac Control, Viertried, Alemanha) a 50 °C e pressão de 120 mbar. Posteriormente, 50 cm^3 de água destilada, previamente oxigenada mediante borbulhamento constante de ar por 30 min foram lentamente adicionados ao concentrado livre de clorofórmio sob agitação vigorosa para formar uma emulsão. As soluções antioxidantes foram preparadas através de diluição em etanol dos extratos das folhas de orégano e os padrões, cuidadosamente pesados em balança analítica (Sartorius, modelo A200S, Goettingen, Alemanha), até concentração de 0,075 mg/cm^3.

As reações foram conduzidas adicionando 5 cm^3 da emulsão aos tubos de ensaio que continham 0,2 cm^3 das soluções antioxidantes, uma vez agitados os tubos, era imediatamente feita a primeira leitura de absorbância em 470 nm. Em seguida, os tubos eram tampados e colocados em banho térmico (Marconi, modelo MA 127/BO, Piracicaba, SP) a 50 °C até o final do teste. O controle continha 0,2 cm^3 de etanol no lugar da solução antioxidante. As determinações foram feitas em duplicata. A solução branco usada para

zerar o espectrofotômetro foi feita com 20 mg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40 e 50 cm^3 de água destilada e oxigenada (a mesma usada anteriormente).

A Equação 4.7 (BURDA; OLESZEK, 2001) foi utilizada para calcular o valor da AA das soluções testadas.

$$AA = \left[1 - \frac{\left(Abs_e^0 - Abs_e^t\right)}{\left(Abs_c^0 - Abs_c^t\right)}\right] \times 100 \qquad (4.7)$$

Na Equação 4.7, o valor da AA é expresso em percentagem; Abs_e^0 é a absorbância da solução antioxidante no inicio da reação; Abs_c^0 é a absorbância da solução de controle no inicio da reação; Abs_e^t é a absorbância da solução antioxidante no tempo de reação *t*; e Abs_c^t é a absorbância da solução de controle no tempo de reação *t*.

4.5.2 FENÓIS TOTAIS

Para determinar a quantidade de fenóis totais nos extratos de orégano utilizou-se o método do reagente Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), com algumas adequações para extratos vegetais sugeridas por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999).

Uma solução estoque foi preparada em balão volumétrico de 100 cm^3 dissolvendo 0,5 g de ácido gálico (Sigma-Aldrich, lote 023K01171, EUA) em 10 cm^3 de etanol e depois completando o volume com água destilada, sendo que esta solução tem validade máxima de 2 dias se conservada a menos de 5 °C. Em seguida, foram preparadas as soluções de calibração, (necessárias para a construção da curva padrão) em balões volumétricos de 10 cm^3, diluindo com água destilada frações da solução estoque para conseguir concentrações de ácido gálico iguais a 0,05 mg/cm^3, 0,10 mg/cm^3, 0,15 mg/cm^3, 0,25 mg/cm^3 e 0,50

mg/cm^3, respectivamente. As soluções de amostra foram preparadas dissolvendo 10 mg dos extratos de orégano em 1 cm^3 de etanol e em seguida diluindo a mistura com água destilada até o volume final de 10 cm^3. Também foi feita uma diluição 1:10 do reagente Folin-Ciocalteau (Dinâmica, lote 23690, Diadema, SP) em água destilada. O carbonato de sódio anidro (Cetus, lote 16.999, São Paulo, SP) foi diluído com água destilada até uma concentração final de 75 mg/cm^3. Para a solução branco foi utilizada água destilada.

Previamente ao inicio das reações, novas diluições (1:10) das soluções de calibração e de amostra foram feitas. As reações foram conduzidas misturando 2 cm^3 destas novas diluições (calibração, amostra ou branco) com 10 cm^3 da solução do reagente Folin-Ciocalteu. Transcorrido 1 min e antes de 8 min adicionaram-se 8 cm^3 da solução de carbonato de sódio. Deixou-se em banho térmico (Marconi modelo MA 127/BO, Piracicaba, SP) a 50 °C por 5 min e imediatamente depois a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis (Hitachi, modelo U-3010, Tóquio, Japão) usando cumprimento de onda de 760 nm.

O conteúdo de fenóis totais nos extratos de orégano foi calculado em equivalentes de ácido gálico (GAE) utilizando a equação da reta (resultante da regressão linear da curva padrão) para transformar os valores de absorbância das amostras em miligramas de ácido gálico equivalentes.

4.5.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises qualitativas dos extratos de orégano foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp por cromatografia gasosa (GC: *gas chromatography*) acoplada à espectrometria de massas (MS: *mass spectrometry*), que

utilizou equipamento GC-MS (Hewlett-Packard, modelo 5970, EUA) dotado com coluna capilar, 5 % difenil e 95 % dimetil polisiloxano, HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm), e detector espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear, EI (70 eV). O gás de arraste foi hélio (99,9995 %) a uma taxa de 1,1 cm^3/min.

As amostras foram preparadas dissolvendo 10,0 mg dos extratos em 1,0 cm^3 de acetato de etila (pureza 99,9 %). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do injetor, 280 °C; razão do *split* 1:20; programação do aquecimento da coluna, de 60 °C a 300 °C com taxa de 5 °C/min e mantendo 300 °C por 20 min; temperatura do detector, 300 °C; e volume de amostra injetada 1,0 mm^3. Para a identificação dos compostos detectados na amostra foram utilizadas as bases de dados de espectros de massas WILEY275 e NIST05. O *software* AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System*) foi utilizado para a interpretação dos espectros de massa quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado na biblioteca.

4.5.4 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA

A composição química de todos os extratos, aquosos e supercríticos, recuperados nas diferentes condições de extração dos orégãnos estudados neste trabalho foi determinada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID: *flame ionization detector*). Foi utilizado o equipamento GC-FID (Shimadzu, CG 17A, Kyoto, Japão), dotado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Folsom, EUA). O gás de arraste usado foi hélio (99,9 % de pureza, White Martins, Campinas, SP).

As condições cromatográficas empregadas foram as seguintes: injetou-se 1,0 mm^3 de solução de amostra com concentração de 5 mg/cm^3 de acetato de etila (PA, Merck, lotes K38466423 808 e K39390823 847, Darmstadt, Alemanha); razão do *split* 1:20; a vazão do gás de arraste foi 1,1 cm^3/min; a coluna foi programada para aquecer de 60 °C a 300 °C numa taxa de 5 °C/min e manter-se em 300 °C por 20 min; as temperaturas do injetor e detector foram 280 °C e 300 °C, respectivamente.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o teste de Tukey para determinar diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos rendimentos de extração via SD, das isotermas de rendimento global dos ensaios de SFE, e dos valores de AA e de fenóis totais de todos os extratos. A determinação dos valores mínimos de significância foi realizada empregando o procedimento PROC ANOVA do *software* SAS Learning Edition 4.1 (2002). O coeficiente de confiança usado foi de 95 % para todos os casos.

4.7 ANÁLISE ECONÔMICA

A metodologia de Turton et al. (2003) foi utilizada para estimar o custo de manufatura (COM: *cost of manufacturing*). Esta metodologia define o COM como a soma ponderada de cinco fatores: o custo fixo de investimento (FCI: *fixed cost of investment*), o custo da mão de obra (COL: *cost of operating labor*), o custo da matéria-prima (CRM: *cost of raw material*), o custo do tratamento de resíduos (CWT: *cost of waste treatment*) e o custo das utilidades (CUT: *cost of utilities*). O COM foi calculado usando a Equação 4.8.

$$COM = 0{,}304 \times FCI + 2{,}73 \times COL + 1{,}23 \times (CRM + CWT + CUT) \qquad (4.8)$$

Para o processo SD, planilhas de cálculo no *software* Microsoft Office Excel 2007® foram utilizadas para estimar os valores do COM dos óleos voláteis dos diferentes tipos de orégano estudados. O cálculo dos cinco fatores necessários para o uso da Equação 4.8 foi baseado nas considerações propostas por Leal (2008). No caso do processo de SFE, os valores do COM foram calculados utilizando o processo "supercrítico sem co-solvente" desenvolvido para o *software* SuperPro Designer® v6.0 (2006), que foi programado seguindo as considerações de cálculo dos cinco fatores da Equação 4.8 propostas por Rosa e Meireles (2005). Todas as considerações adotadas para o cálculo do COM dos processos SD e SFE são descritas nos subitens a seguir. A estimativa do COM aqui proposta é classificada como custo Classe 5 ou 4, ou seja, custos utilizados para Planos de Negócios segundo a *Association for the Advancement of Cost Engineering International* (AACEI), conforme descrito por Leal (2008).

4.7.1 AUMENTO DE ESCALA

No procedimento de aumento de escala (*scale-up*) usado tanto para SFE quanto para SD foi assumido que o rendimento de extração e o tempo do processo em escala industrial são similares aos da escala laboratorial quando mantida constante a razão entre a massa de solvente e a massa de alimentação (S/F).

Para a estimativa do COM no caso de SD foi selecionada uma unidade industrial com duas colunas de extração com volume interno de 0,5 m^3. No caso de SFE foi selecionada uma unidade industrial equipada com duas colunas de extração de 0,4 m^3 de volume interno. Em ambos os casos as duas colunas de extração permitiriam a operação das unidades em regime pseudo-permanente.

A massa de alimentação a ser utilizada em cada ciclo de extração foi calculada assumindo que a densidade aparente da matéria-prima na escala laboratorial e na escala industrial são idênticas. A vazão mássica do solvente na escala industrial ($\dot{M}_{S_ind}$) foi calculada com a Equação 4.9 que correlaciona os valores na escala laboratorial da massa de alimentação de matéria-prima (M_{F_lab}), da massa de solvente (M_{S_lab}), do tempo de ciclo de extração (t_{ciclo}) e da massa de alimentação na escala industrial (M_{F_ind}) calculada como descrito por Leal et al. (2009).

$$\dot{M}_{S_ind} = \frac{M_{F_ind} \times \left(M_{S_lab} / t_{ciclo}\right)}{M_{F_lab}} \tag{4.9}$$

4.7.2 CUSTO FIXO DE INVESTIMENTO (FCI)

FCI refere-se ao valor do investimento inicial a realizar, neste caso o valor de compra de uma planta industrial.

Para SD considerou-se uma unidade industrial não automatizada com um custo de US$ 50.000,00 (LEAL, 2008). Neste valor não foi incluído o custo da caldeira que produzirá o vapor d'água, uma vez que o valor da caldeira é considerado dentro do custo das utilidades, no custo da produção de vapor (Item 4.7.6).

Para SFE foi considerada uma unidade industrial com sistema de reciclo de CO_2 e um custo de US$ 1.750.000,00 (PRADO, 2009).

A depreciação anual do valor de ambas unidades de extração foi fixada em 10 %.

4.7.3 CUSTO DA MATÉRIA-PRIMA (CRM)

O CRM considera o preço de todos os materiais que estão relacionados à produção. O custo das partículas sólidas usadas na extração e que contêm o soluto desejado, deve contabilizar o custo da própria matéria-prima e os custos de pré-processamento requeridos como secagem, moagem e seleção.

Para SD, a matéria-prima utilizada não precisou de pré-processamento, uma vez que ela foi usada inteira e o orégano é geralmente comercializado seco. Industrialmente pode também ser usado orégano in natura. Em Fevereiro de 2009 foi cotado no Chile o valor do orégano seco para exportação em US$ 2.135,00 por tonelada (O. chileno). Segundos dados fornecidos pelos produtores rurais do vale de Huambo (Arequipa - Peru), entre Maio e Junho de 2009 o preço do orégano seco do tipo 1 (folhas inteiras grandes) ficou em torno de US$ 3.000,00 por tonelada (O. grande); e o orégano seco do tipo 2 (folhas pequenas e quebradas) teve um valor ao redor de US$ 2.000,00 por tonelada (O. floreado).

Para SFE incluíram-se os custos de pré-processamento estimados por Rosa e Meireles (2005) usando o *software* SuperPro Designer®, estes custos tiveram um valor de US$ 30,00 por tonelada de matéria-prima. Também foram considerados os custos do CO_2 de reposição; o preço do CO_2 utilizado foi US$ 100,00 por tonelada de matéria-prima e a perda durante o processo foi estimada em 2 %.

4.7.4 CUSTO DA MÃO DE OBRA (COL)

Para o cálculo do COL usaram-se informações de horas-homem por horas-operação de acordo com as tabelas apresentadas por Ulrich (1984).

Leal (2008) considerou que para a operação das unidades de SD e SFE são necessários três e dois operadores por turno, respectivamente; com um custo de US$ 3,00

por hora. O tempo total de operação anual para ambas as unidades de extração foi calculado considerando 330 dias de operação por ano com três turnos diários de 8 horas cada um, o que corresponde a um tempo total de operação de 7920 h/ano.

4.7.5 CUSTO DO TRATAMENTO DE RESÍDUOS (CWT)

O CWT foi considerado como nulo, devido a que não haverá resíduos sólidos a serem tratados, pois os únicos resíduos dos processos SD e SFE são a matriz vegetal úmida e o material sólido exaurido, respectivamente. Em ambos os casos, estes resíduos podem ser vendidos para fazer fertilizante ou podem ser diretamente incorporados ao solo, pois são resíduos não poluentes e conseqüentemente não precisam de tratamento. As perdas de CO_2 no processo de SFE não precisam de tratamento, desde que em pequenas quantidades o CO_2 não é perigoso.

4.7.6 CUSTO DAS UTILIDADES (CUT)

Para SD, o CUT inclui o custo da água fria (US$ 0,0148 por tonelada de matéria-prima) e o custo da produção de vapor d'água (US$ 16,22 por tonelada de matéria-prima) que foram calculados com base nos valores propostos por Turton et al. (2003). O custo da produção de vapor inclui também o custo da caldeira.

Para SFE, a estimativa do CUT considerou a energia envolvida no ciclo do CO_2 para o que foi usado o diagrama de temperatura-entropia do CO_2 (SANDLER, 1989). O custo das utilidades usadas foi US$ 0,0133/Mcal para o vapor d'água, US$ 0,0837/Mcal para a água fria e o valor da eletricidade foi de US$ 0,0703/Mcal; estes valores foram estimados por Rosa e Meireles (2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATÉRIA-PRIMA

5.1.1 UMIDADE

A umidade das folhas secas de orégano, determinada como descrito no Item 4.2.1, são apresentadas na Tabela 5.1. É de salientar que o laudo da empresa Flores e Ervas indicava uma umidade das folhas inteiras de orégano chileno igual a 12,2 %. Nos ensaios de SD utilizaram-se as folhas inteiras, no caso de SFE foi preciso moer e peneirar a matéria-prima previamente. Novas determinações de umidade para as folhas moídas foram feitas para avaliar a perda de umidade neste pré-tratamento. As folhas de orégano grande não foram moídas, pois não foram usadas no processo SFE.

Tabela 5.1. Umidade das folhas de orégano.

	Orégano grande	**Orégano floreado**	**Orégano chileno**
Folhas inteiras (SD)	11,4 %	10,8 %	12,6 %
Folhas moídas (SFE)	--	9,4 %	11,5 %

5.1.2 GRANULOMETRIA E DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA

As folhas de orégano foram moídas, peneiradas e caracterizadas em seu diâmetro médio de partícula seguindo as instruções descritas no Item 4.2.2. O valor do diâmetro médio geométrico foi calculado utilizando a Equação 4.2, sendo que este valor para o orégano chileno foi de 0,51 ± 0,01 mm e para o orégano floreado foi de 0,53 ± 0,04 mm.

A Figura 5.1, apresenta os valores médios da massa das partículas retidas nas peneiras selecionadas (mesh 24, 32, 48 e 80). Observa-se que o orégano floreado, que apresenta maior diâmetro médio geométrico que o orégano chileno, teve maior quantidade de partículas retidas nas peneiras de maior tamanho de poro (diâmetro mesh 24 = 0,71 mm e diâmetro mesh 32 = 0,50 mm).

A proporção das partículas selecionadas para os ensaios de SFE foi maior nos mesh 32 e 48, em menor proporção apresentaram-se as partículas de mesh 80. Considerando o valor da massa da menor proporção como 1, a relação entre o valor das massas das partículas retidas nas peneiras de mesh 24, 32, 48 e 80 foi respectivamente 2,1:2,4:2,5:1,0 para o orégano chileno; para o orégano floreado esta relação foi 2,6:3,4:3,0:1,0 para os mesmos números de mesh.

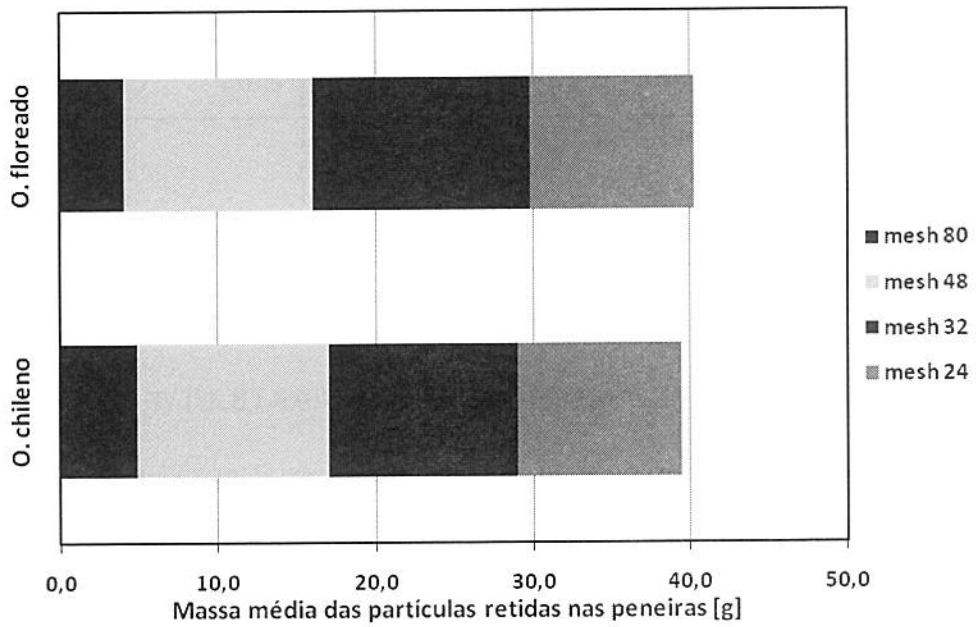

Figura 5.1. Valores médios da massa das partículas retidas nas peneiras de mesh 24, 32, 48 e 80.

5.1.3 DENSIDADE REAL DAS PARTÍCULAS

A densidade real de partícula do orégano chileno foi de 1,69 g/cm^3 ± 0,01 g/cm^3 e para o orégano floreado foi de 1,64 g/cm^3 ± 0,09 g/cm^3. Estes resultados são a média de 10 determinações.

5.1.4 DENSIDADE APARENTE DO LEITO

Os valores da densidade aparente (d_a) do leito das folhas de orégano estão apresentados na Tabela 5.2, eles foram calculados como descrito no Item 4.2.4; utilizaram-se os valores médios das massas das matérias-primas que foram empregadas em cada ensaios de SD e SFE, respectivamente.

Na Figura 5.3, observa-se uma diferença entre as densidades aparentes dos leitos dos oréganos floreado e o chileno nos ensaios de rendimento global SFE, esta diferença deve-se a que as folhas trituradas do orégano chileno apresentam maior densidade real de partículas. A diferença entre as densidades aparentes dos leitos das folhas trituradas do orégano chileno nos ensaios de rendimento global e cinética de extração SFE, é pequena e pode ser considerada desprezível, pois se deve aos erros experimentais no momento que o leito era empacotado.

Tabela 5.2. Densidade aparente do leito das folhas de orégano.

	d_a (O. grande)	**d_a (O. floreado)**	**d_a (O. chileno)**
SD, cinéticas de extração	93 kg/m^3	93 kg/m^3	93 kg/m^3
SFE, rendimento global	--	326 kg/m^3	314 kg/m^3
SFE, cinéticas de extração	--	--	317 kg/m^3

5.1.5 POROSIDADE TOTAL DO LEITO MAIS PARTÍCULAS

A porosidade total do leito (ε) contendo as partículas de orégano chileno e floreado foi calculada para os leitos das duas unidades de extração estudadas (SD e SFE). Estes valores foram calculados como descrito no Item 4.2.5. Os resultados destes cálculos estão apresentados na Tabela 5.3. Observa-se que existe maior porosidade do leito mais partículas nos ensaios SD.

Tabela 5.3. Porosidade total do leito mais partículas de orégano.

	ε (O. floreado)	**ε (O. chileno)**
SD, cinéticas de extração	0,943	0,945
SFE, rendimento global	0,801	0,814
SFE, cinéticas de extração	--	0,812

5.2 TREINAMENTO E TESTES PRELIMINARES

Como uma etapa prévia e necessária à realização das extrações foi realizado um treinamento nas unidades já montadas e em operação no LASEFI, tanto para a SD quanto para a SFE. Em ambos os casos foram feitas algumas extrações sob supervisão, para aprender a técnica de cada processo. Depois, foram realizadas outras extrações com o objetivo de treinar o operador para diminuir o erro operacional; nesta etapa foram realizadas algumas modificações nos procedimentos visando diminuir os erros experimentais observados. Os ensaios preliminares serviram também para definir alguns parâmetros de operação como a quantidade de matéria-prima, tempo de extração, proporção solvente/matéria-prima, etc. Para as técnicas analíticas também foram realizados testes preliminares para treinar o operador e ajudar a definir as características do método a ser

utilizado, não foram realizadas modificações nos métodos, mas sim algumas adequações para o uso das amostras.

Os ensaios de SD realizaram-se na unidade descrita no Item 4.3.1, observando-se problemas de condensação excessiva na superfície interna da coluna de extração como conseqüência da perda de carga do vapor d'água no interior da coluna, a condensação foi tanta que houve refluxo deste condensado até a fonte geradora de vapor. Observou-se também que a temperatura do vapor lida pelo termopar variava mais de 50 °C desde o inicio até o final da extração, juntando isto ao fato que a grande maioria do óleo volátil recuperava-se nos minutos iniciais, a reprodutibilidade dos resultados ficava comprometida. Foram providenciadas medidas para corrigir estas observações, o que resultou no procedimento de operação descrito no Item 4.3.1.1. A temperatura do trocador de calor para o aquecimento do vapor foi fixada em 250 °C e o tempo de extração em 70 min. A unidade de destilação foi dimensionada para operar com carga completa de matéria-prima, verificou-se que aproximadamente $8{,}50 \times 10^{-2}$ kg de folhas secas orégano foram suficientes para preencher a célula de extração.

Nos ensaios preliminares de SFE utilizando a unidade descrita no Item 4.3.2, observou-se que os extratos recolhidos nas condições intermediárias (200 bar e 50 °C) daquelas a serem utilizadas no projeto, apresentaram consistência pastosa e ocasionaram problemas de entupimento na linha de saída (válvula de expansão); além disso, a quantidade de compostos voláteis recuperada nas colunas com Porapak Q foi muito pequena (1 %), podendo ser considerada desprezível e o rendimento de extração não foi muito alto (2,5 %); também com o valor da razão S/F igual a 30 ($X_{0,S/F=30}$), a fração do soluto residual foi tão pequena que permitiu assumir que todo o extrato presente na matriz vegetal foi recuperado.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Para solucionar o inconveniente do entupimento na linha de saída foi incrementada a vazão do solvente de $8,5 \times 10^{-5}$ kg/s para $1,4 \times 10^{-4}$ kg/s. As vazões maiores permitiam fluxo constante, mas impossibilitavam o uso das colunas com Porapak Q que estouruvam, sendo elas retiradas dos ensaios, mas fazendo com que o rendimento diminuísse devido à perda pelo arraste dos compostos voláteis. Embora houvesse uma redução alta no rendimento (aproximadamente 20 %), optou-se pela nova vazão, pois o entupimento da linha de saída prejudicava não só o rendimento, mas todo o ensaio que poderia resultar inconcluso e também poderia danificar a unidade de extração.

Na determinação da AA dos extratos de orégano foram testadas diversas concentrações da solução de amostra (extrato dissolvido em etanol) a ser utilizada, pois a metodologia não a especificava. Foram testadas concentrações de 20 mg/cm^3, 10 mg/cm^3, 0,75 mg/cm^3, 0,075 mg/cm^3, e 0,0075 mg/cm^3. Observou-se que quando as amostras tinham concentrações de 20 mg/cm^3 e 10 mg/cm^3, alguns extratos supercríticos apresentavam problemas de solubilidade, especialmente os obtidos em pressões acima de 200 bar, deixando partículas em suspensão que afetavam a leitura dos resultados. Na concentração de 0,75 mg/cm^3 a coloração de algumas amostras tinha leitura própria no comprimento de onda do teste, interferindo com a leitura da absorbância da solução final. As amostras com concentrações menores não apresentaram nenhum dos problemas já mencionados, mas na concentração 0,0075 mg/cm^3 o erro experimental foi maior e devido as pequenas quantidades de extrato, os valores de AA foram muito próximos ao do controle, inclusive os dos padrões puros, não permitindo estabelecer diferenças significativas entre as amostras. Por conseguinte, a concentração selecionada para realizar todas as determinações foi 0,075 mg/cm^3, como apresentado no Item 4.5.1.

Na determinação de fenóis totais, as soluções de amostra foram preparadas dissolvendo os extratos em água destilada, o que foi um problema para os extratos supercríticos por não serem totalmente hidrossolúveis. Apesar de a técnica permitir o uso de até 10 % de etanol para ajudar a solubilizar os extratos, mesmo com esta quantidade de etanol, alguns extratos apresentavam problemas de solubilidade, sendo necessário aquecer a solução etanólica em banho térmico (50 °C) para ajudar a solubilizar os extratos e só após a solução foi diluída com a água destilada.

Quando realizaram-se as primeiras análises de identificação da composição química dos extratos aquosos e supercríticos de orégano por cromatografia gasosa foi usada a programação de Kovats para óleos voláteis (ADAMS, 2001), onde os resultados dos perfis de composição química entre o óleo volátil e o extrato supercrítico foram muito similares. Em geral, na extração com fluidos supercríticos é recuperada a maioria dos compostos presentes nos óleos voláteis e outros compostos de maior peso molecular, refletindo no aumento do rendimento de extração. Esperava-se encontrar compostos em tempos de retenção maiores que 40 min. Por este motivo, foram feitos testes com outra programação para a análise, usando desta vez temperaturas maiores que auxiliassem na eluição de todos os compostos presentes nos extratos para sua posterior identificação. As novas condições cromatográficas permitiram observar picos nos extratos supercríticos em tempos de retenção superiores a 40 min, o óleo volátil manteve o mesmo perfil. Com estas novas condições de análise foi determinada a composição química dos extratos de orégano, mediante GC-MS (Item 4.5.3) e depois a quantificação relativa destes compostos em cada extrato, usando GC-FID (Item 4.5.4).

5.3 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR

A extração do óleo volátil via SD das folhas de orégano foi realizada na unidade descrita no Item 4.3.1 seguindo o procedimento experimental detalhado no Item 4.3.1.1.

Em todos os experimentos utilizou-se aproximadamente $8{,}50 \times 10^{-2}$ kg de folhas secas dos diferentes tipos de orégano estudados (chileno, grande e floreado). A temperatura do trocador de calor foi fixada em 250 °C para obter temperaturas do vapor superiores a 150 °C, garantindo que a extração fosse feita com vapor superaquecido. A vazão média do vapor d'água foi de $1{,}7 \times 10^{-4}$ kg/s. Durante a primeira meia hora de extração, a coleta das frações de óleo volátil foi feita a cada 5 min, a partir do minuto 30 e até o final (70 min) as amostras foram coletadas a cada 10 min. Devido às pequenas quantidades de óleo volátil que foram retiradas foi preciso utilizar 1 cm^3 de n-hexano para solubilizar o extrato e separá-lo do hidrolato. Uma vez removido o solvente, foi registrado o peso da fração recuperada e com estes dados calculou-se o rendimento total de óleo volátil para cada amostra, estes dados estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Rendimento total do óleo volátil obtido via SD das folhas de orégano.

Amostra	Temperatura do vapor (°C)	Rendimento SD* (%)
O. chileno	163 ± 1	0,99 ± 0,02 a
O. grande	164 ± 1	0,97 ± 0,02 a
O. floreado	164 ± 2	1,17 ± 0,01 b

* Médias com diferentes letras são estatisticamente diferentes (teste de Tukey, p=0,05). Dados reportados como média ± erro padrão.

As médias dos valores de temperatura de vapor usadas nos ensaios de SD ficaram ao redor de 164 °C, como observado na Tabela 5.4. Estas temperaturas de operação

garantem que a extração foi realizada com vapor superaquecido, pois são maiores que a do vapor saturado na pressão ambiente.

Usando cada um dos valores de rendimento das frações de óleo volátil, expressos em gramas de extrato por 100 gramas de matéria-prima (MP) em base seca, obtidos ao longo do tempo de operação foram construídas as cinéticas de extração via SD de todos os orégãnos sob estudo.

A Figura 5.2 apresenta a cinética de extração do óleo volátil para o orégano chileno, onde é observado que nos primeiros minutos de extração foi recuperada uma grande parte do óleo volátil obtido.

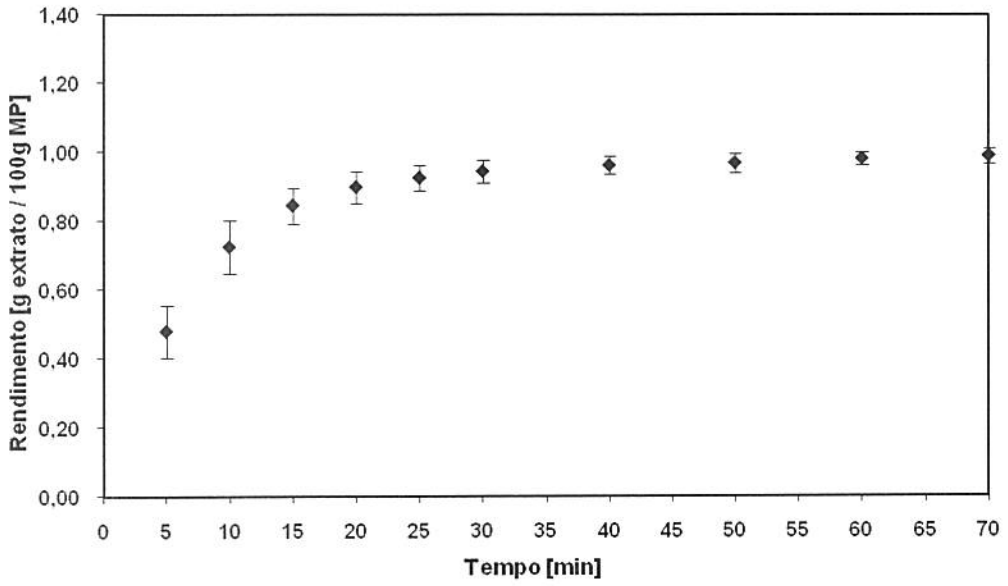

Figura 5.2. Cinética de extração do óleo volátil de orégano chileno obtido por SD a 163 °C.

Na Figura 5.2, a tendência da cinética de extração sugere que após 30 min de processo a fração de óleo volátil possível de se extrair é muito pequena quando comparada

ao total extraído. O valor de rendimento acumulado até o final da extração (70 min), expresso em base seca, para o óleo volátil de orégano chileno foi igual a 0,99 % como apresentado na Tabela 5.4.

Na Figura 5.3, apresenta-se a cinética de extração do óleo volátil para o orégano grande, cujo rendimento em base seca ao final da extração foi de 0,97 %. Este valor de rendimento é muito próximo ao apresentado pelo orégano chileno, como observado na Tabela 5.4. Comparando as médias pelo teste de Tukey observa-se que ambos os valores (rendimentos de extração por SD dos oréganos chileno e grande) são estatisticamente similares.

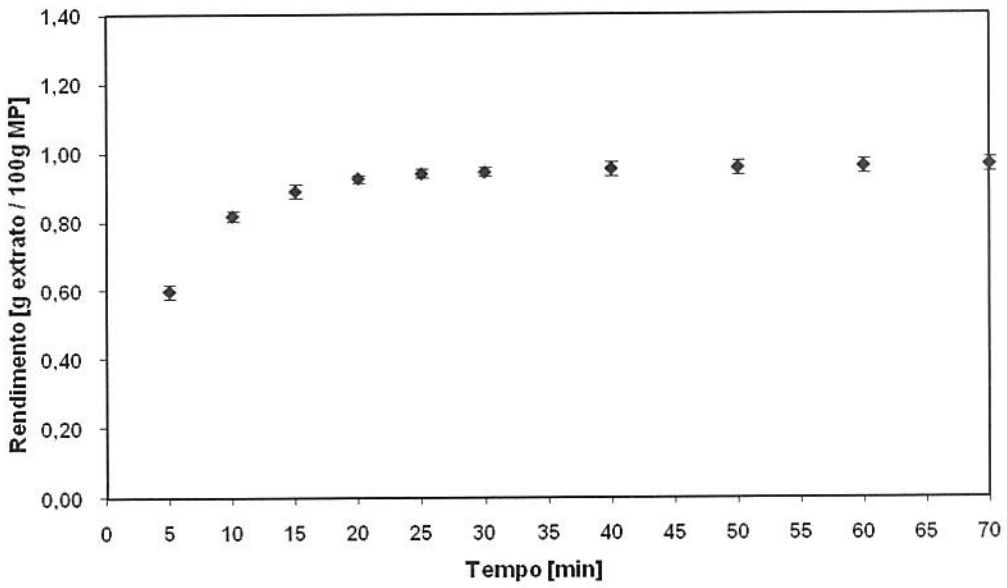

Figura 5.3. Cinética de extração do óleo volátil de orégano grande obtido por SD a 164 °C.

Na Figura 5.4, apresenta-se a cinética de extração do óleo volátil para o orégano floreado com rendimento em base seca acumulado de 1,17 %. Este valor de rendimento de

óleo volátil foi cerca de 20 % maior e estatisticamente diferente dos valores dos rendimentos obtidos com os outros oréganos (chileno e grande).

Skoula e Harborne (2002) apresentaram uma classificação das diferentes espécies do gênero *Origanum* segundo o rendimento aproximado de óleo volátil que cada planta apresenta, distinguindo três classes: pobre (rendimento menor que 0,5 %), intermediário (rendimento entre 0,5 % e 2,0 %) e rico em óleo volátil (rendimento maior que 2,0 %). De acordo com esta classificação, os três tipos de orégano estudados estariam classificados como de rendimento de óleo volátil intermediário.

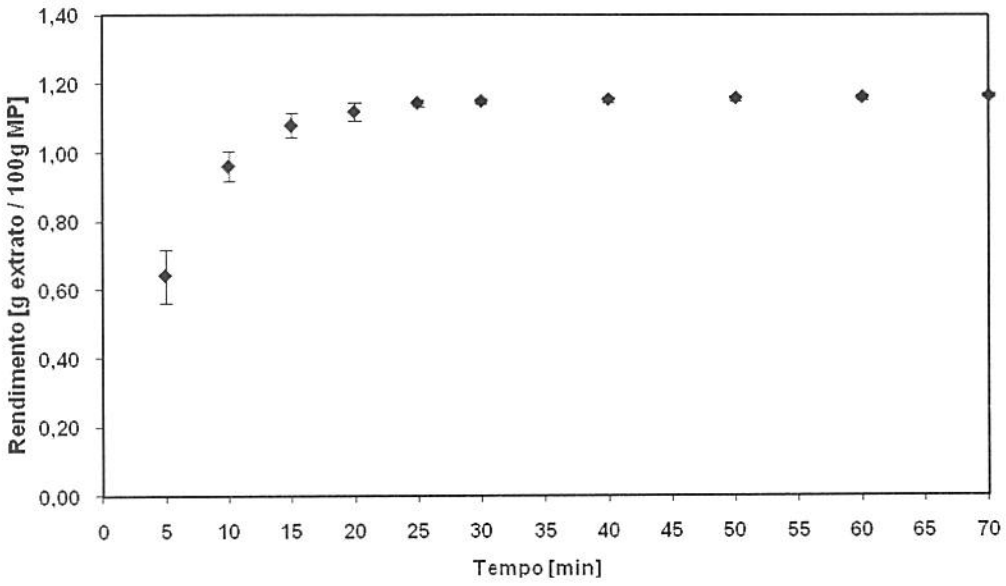

Figura 5.4. Cinética de extração do óleo volátil de orégano floreado obtido por SD a 164 °C.

Já mencionou-se a proximidade nos valores de rendimento total do óleo volátil para o orégano chileno e o orégano grande, mas quando comparados, estes óleos voláteis

possuem características físicas diferentes. O óleo volátil do orégano chileno é um líquido viscoso, de cor amarela e possui odor característico amargo, enquanto que o óleo volátil do orégano grande é um líquido menos viscoso, de cor amarela muito clara (quase translúcido) e odor característico menos amargo. Estas diferenças tão marcantes das características físicas entre os óleos voláteis já seriam suficientes para confirmar que os oréganos grande e floreado (de origem peruana) pertencem a uma espécie diferente à do orégano chileno.

O óleo volátil do orégano floreado apresentou um rendimento cerca de 20 % maior que os outros oréganos testados, corroborando as informações da literatura (KINTZIOS, 2004) que cita uma maior quantidade de óleo volátil presente nas folhas de orégano quando a planta amadurece até a floração. Como esperado, por serem da mesma espécie e procedência, o óleo volátil do orégano floreado teve características físicas similares às do óleo volátil do orégano grande.

Como observado nos perfis das três cinéticas de extração apresentadas nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4, a maior quantidade do óleo volátil foi extraído nos primeiros 10 minutos de operação. Este comportamento no processo SD deve-se ao fato que o óleo volátil do orégano apresenta-se principalmente nas células superficiais da planta (PRAKASH, 1990); fato que facilita a solubilidade e o carregamento do óleo volátil pelo vapor superaquecido.

5.4 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

O equipamento utilizado para a SFE das folhas secas de orégano foi descrito no Item 4.3.2, seguiu-se o procedimento experimental descrito no Item 4.3.2.1.

Foram feitos ensaios para a determinação do rendimento global das folhas secas dos oréganos chileno e floreado, em ambos os casos sendo construídas as isotermas de rendimento global para as temperaturas 40 °C e 50 °C, variando as pressões de operação

desde 100 bar até 300 bar. O valor de S/F foi igual a 30, com uma vazão de CO_2 média de $1,4 \times 10^{-4}$ kg/s, resultou em um tempo médio de extração de 90 min. Em todos os experimentos foram utilizados $2,5 \times 10^{-2}$ kg (aproximadamente) de matéria-prima sendo necessário o uso de esferas de vidro para completar o volume da célula de extração. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

O rendimento global comporta-se de forma similar à solubilidade dos extratos de orégano em CO_2 supercrítico. Esta solubilidade é afetada pelas variações de densidade de CO_2 nas diferentes condições de temperatura e pressão, e pela pressão de vapor do soluto. Na Tabela 5.5 estão relacionados os valores de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano com os valores de densidade de CO_2 nas diferentes condições de operação empregadas.

Na Tabela 5.5, observa-se que o valor do rendimento de extração aumenta com o aumento da densidade do CO_2, isto é válido dentro de cada condição de temperatura, para ambas as matérias-primas. Porém, o maior valor da densidade do CO_2 (910 kg/m^3) não corresponde com os maiores rendimentos de ambos oréganos, os que foram obtidos quando a densidade do CO_2 foi 870 kg/m^3. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato que em determinadas condições de pressão e temperatura, um dos principais efeitos do processo, a densidade do solvente ou a pressão de vapor do soluto, irá predominar sobre o outro, conforme descrito por Silva (2008). Ou seja, a solubilidade dos compostos a serem extraídos, que depende dos dois efeitos, será afetada quando a variação de um deles predomine sobre o outro.

A Figura 5.5 e Figura 5.6 apresentam o comportamento do rendimento global dos extratos de orégano chileno e orégano floreado, respectivamente, em função da temperatura e da pressão.

Tabela 5.5. Rendimento global dos extratos supercríticos das folhas de orégano.

Condições de operação SFE		Densidade	$X_{0,S/F=30}$	$X_{0,S/F=30}$
Temperatura (°C)	Pressão (bar)	do CO_2* (kg/m^3)	O. chileno** (% massa b.s.)	O. floreado** (% massa b.s.)
40	100	629	1,09 ± 0,01 ab	1,3 ± 0,1 a
	150	780	2,10 ± 0,07 cd	2,0 ± 0,1 d
	200	840	2,39 ± 0,05 cdef	2,1 ± 0,1 cd
	250	879	2,48 ± 0,01 cdefg	--
	300	910	2,59 ± 0,07 cefg	2,3 ± 0,2 cdef
50	100	384	0,67 ± 0,10 b	0,8 ± 0,4 ab
	150	700	2,23 ± 0,04 cdf	2,0 ± 0,2 cd
	200	784	2,71 ± 0,07 efg	2,3 ± 0,2 cdf
	250	834	2,87 ± 0,01 eg	--
	300	870	2,99 ± 0,01 g	2,6 ± 0,3 cefg

*Valores obtidos para as condições operacionais a partir das tabelas de propriedades termofísicas de sistemas fluidos (NIST, 2009).
** Médias com diferentes letras são estatisticamente diferentes (teste de Tukey, p=0,05). Dados reportados como média ± erro padrão.

Observa-se que para ambas as matérias-primas, nas duas temperaturas estudadas, o rendimento global aumentou com o aumento da pressão de operação. No entanto, este parâmetro diminuiu com o aumento da temperatura (comportamento retrógrado) em pressões menores que 140 bar aproximadamente. A região onde as isotermas se cruzam é conhecida como pressão do ponto de inversão do rendimento global ou pressão de reversão. Este mesmo comportamento deveria ser observado para a solubilidade dos extratos em CO_2 supercrítico, pois o conhecimento da pressão do ponto de inversão da solubilidade é importante para os processos de fracionamento dos extratos, que normalmente são realizados com separadores em série operando com diferentes condições de pressão e temperatura.

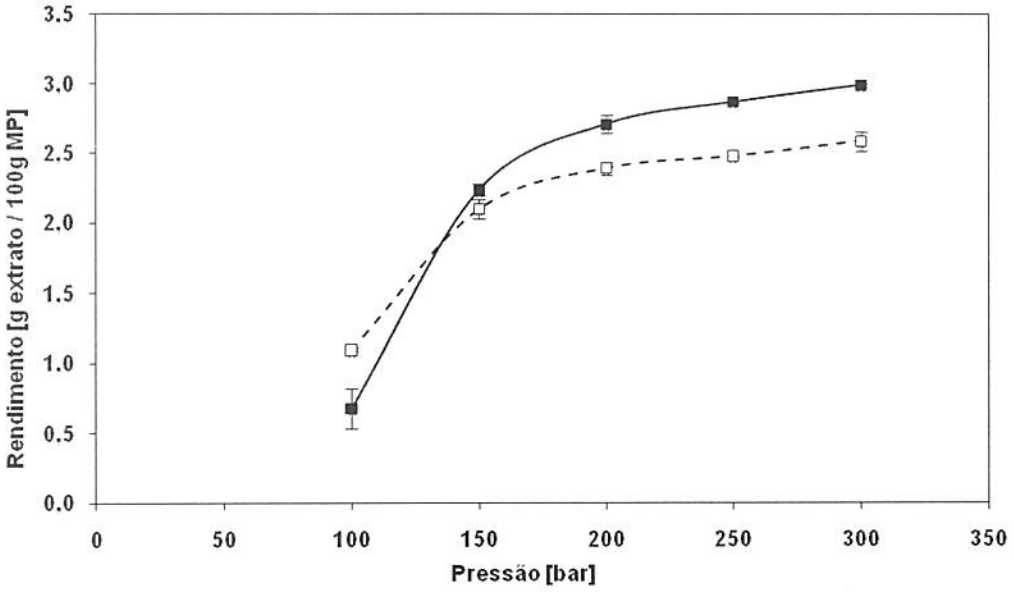

Figura 5.5. Isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano chileno (□ = 40 °C, ■ = 50 °C).

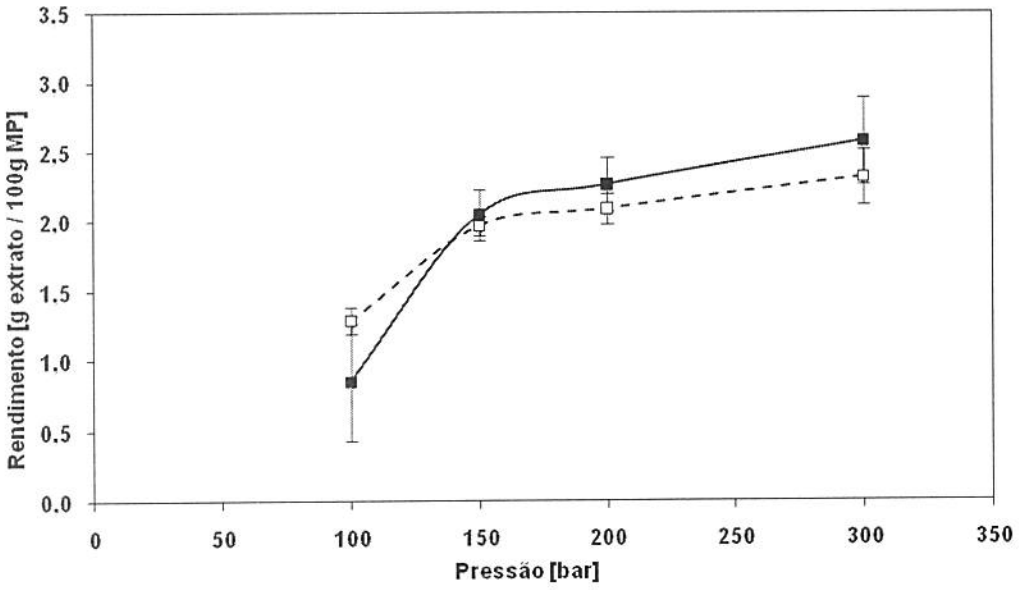

Figura 5.6. Isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano floreado (□ = 40 °C, ■ = 50 °C).

Após a realização dos experimentos de rendimento global ($X_{0,S/F=30}$) do orégano chileno, observou-se que a pressão de reversão teve valores menores que 150 bar sem diferença estatistica significativa entre os valores de rendimento de ambas isotermas nas pressões acima de 200 bar. Considerando estas observações, os experimentos de $X_{0,S/F=30}$ do orégano floreado foram realizados nas mesmas condições daqueles do orégano chileno, exceto na pressão de 250 bar, que foi retirado do planejamento, pois apresentou pouca relevância na descrição do perfil das isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos das folhas de orégano chileno. Os perfis similares nas curvas isotermas apresentadas nas Figuras 5.5 e 5.6, e os testes de diferença significativa das médias confirmaram a decisão.

Comparando os valores de $X_{0,S/F=30}$, obtidos em cada condição de temperatura e pressão, apresentados na Tabela 5.5, observa-se que a 100 bar os rendimentos dos extratos de orégano floreado (1,3 % a 40 °C e 0,8 % a 50 °C) são maiores que os do orégano chileno (1,09 % a 40 °C e 0,67 % a 50 °C) em ambas temperaturas, porém são estatisticamente similares. Este fato se reverte nas outras pressões, sendo que o orégano chileno apresenta os maiores valores de rendimento global. Simándi et al. (1998) indicaram que quando a pressão de extração é inferior a 100 bar a porcentagem de óleo volátil presente nos extratos de orégano é superior a 80 %. Isto explica a obtenção de rendimentos maiores do orégano floreado sobre o orégano chileno, nas pressões de 100 bar, pois nos ensaios de SD já foi determinada a maior presença de óleo volátil neste tipo de orégano.

A cor dos extratos supercríticos variou com a pressão e com o tipo de orégano. Para o orégano chileno os extratos obtidos variaram de cores claras a cores escuras conforme aumentou a pressão de operação, passando por amarelo claro (100 bar), alaranjado escuro (150 bar), marrom (200 bar), até atingir a cor marrom escuro (250 bar e 300 bar). No caso

do orégano floreado, verificou-se também o escurecimento dos extratos em função do aumento das pressões de operação; eles começaram com tonalidades de amarelo (100 bar), depois alaranjados (150 bar e 200 bar), e finalmente alaranjados escuros (300 bar).

Os extratos apresentaram consistência pastosa, exceto os obtidos a 100 bar, que tinham consistência viscosa. Esta diferença na fluidez dos extratos obtidos na pressão de 100 bar deve-se a maior concentração de óleo volátil presente. Nos extratos obtidos a pressões maiores, outros compostos mais pesados são extraídos, diminuindo a concentração do óleo volátil no extrato, juntamente com sua fluidez.

Estas diferenças físicas entre os extratos supercríticos de orégano, junto às apresentadas anteriormente entre os óleos voláteis da mesma planta, teriam relação direta com diferenças na sua composição química, tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

Para os ensaios cinéticos SFE, a condição de extração escolhida foi uma condição intermediária, dentre as condições de temperatura e pressão usadas no planejamento, que apresente elevado rendimento. Os maiores rendimentos dos extratos de orégano chileno foram obtidos nas pressões de 200 bar e acima. No caso do orégano floreado, não foi possível a realização dos ensaios cinéticos SFE pela falta de matéria-prima para completá-los. A partir dos resultados dos ensaios de rendimento global, supõe-se que o orégano chileno apresenta maior quantidade de compostos solúveis em CO_2 supercrítico, diferentes aos recuperados no óleo volátil. Isto permite uma valoração dos dados cinéticos SFE obtidos com o orégano chileno, embora a justificativa do trabalho peça o uso do orégano floreado. A cinética de extração construída a partir destes experimentos está apresentada na Figura 5.7. A vazão do solvente foi a mesma dos ensaios de $X_{0,S/F=30}$ ($1,4 \times 10^{-4}$ kg/s). Dessa vez a célula de extração de 300 cm^3 foi totalmente preenchida com $9,5 \times 10^{-2}$ kg de

folhas secas de orégano, obtendo-se um valor de densidade aparente do leito igual a 317 kg/m^3, como reportado na Tabela 5.2. A proximidade entre este valor de densidade aparente do leito com o calculado nos ensaios de $X_{0,S/F=30}$ (314 kg/m^3) indica boa repetibilidade na compactação do leito quando preenchido totalmente de matéria-prima ou quando a célula de extração era parcialmente preenchida com folhas de orégano e o volume completado com esferas de vidro. Estes valores próximos garantiriam similares condições de contato entre o solvente e as partículas contendo o soluto para ambos os casos.

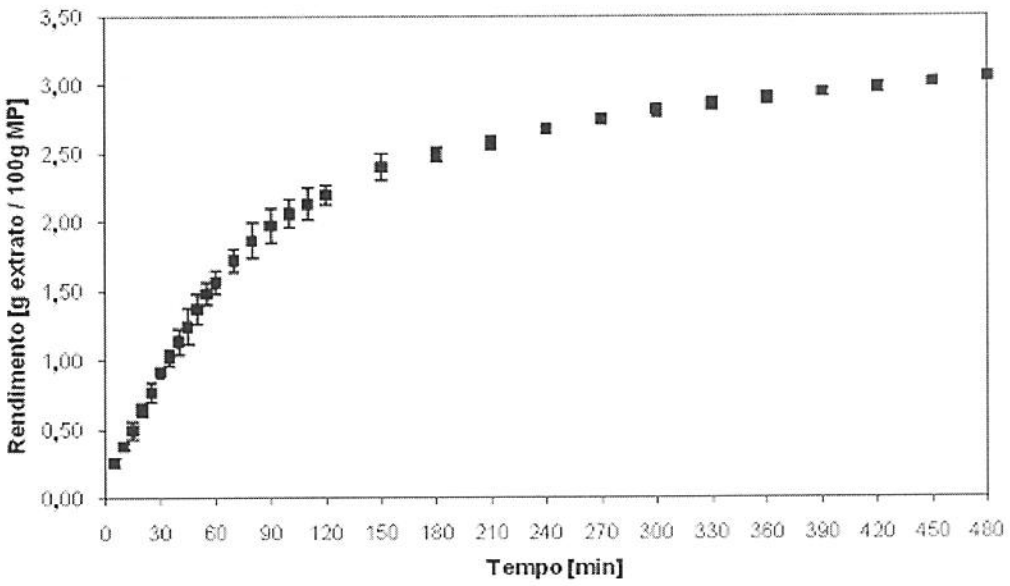

Figura 5.7. Cinética de extração do extrato supercrítico (50 °C, 200 bar) de orégano chileno.

O valor do rendimento acumulado no final dos 480 min de extração foi 3,05 %, neste ponto o valor da razão S/F é igual a 42. Quando o S/F foi igual a 30 o valor do rendimento de extração acumulado foi aproximadamente 2,86 %, que é muito próximo ao valor obtido nos ensaios de rendimento global ($X_{0,S/F=30}$ = 2,71 %) nas mesmas condições

de temperatura, pressão e vazão do solvente, indicando baixo erro operacional e boa reprodutibilidade nos experimentos. A diferença de rendimento cumulado nos experimentos com S/F = 42 e S/F = 30 é menor que 7 %. Para obter este incremento no rendimento de extração foram necessárias mais de duas horas de operação e um gasto de solvente 40 % maior, então se confirma que foi adequado assumir a razão S/F = 30 para os ensaios de rendimento global.

5.5 AJUSTE DAS CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO

Como já mencionado no Item 4.4, as cinéticas de extração dos processos de SD e SFE foram ajustadas a um *spline* de três retas. A primeira reta descreve a taxa de transferência de massa no período CER (**1**), a segunda, descreve a taxa de transferência de massa no período FER (**2**), e a terceira, descreve a taxa de transferência de massa no período DC (**3**).

A Figura 5.8 apresenta o ajuste da cinética de extração do óleo volátil via SD das folhas de orégano chileno. A duração dos períodos de extração constante e decrescente calculados com o *software* SAS foi: t_{CER} = 7,2 min e t_{FER} = 21,1 min. Usando a Equação 4.5 foi calculado o valor do rendimento de extração da etapa CER (R_{CER} = 0,69 %), este rendimento corresponde ao 69,2 % do material solúvel recuperado. Um novo tempo de duração do período de CER foi calculado (t_{CER2} = 9,5 min); neste tempo maior o rendimento da fração de óleo volátil recuperada aumentou para 73,3 % (R_{CER2} = 0,73 %).

Para as folhas de orégano grande, a curva de ajuste a três retas da extração do óleo volátil via SD é apresentado na Figura 5.9. Neste caso, o t_{CER} teve um valor de 6,4 min e o t_{FER} teve um valor de 18,1 min. O R_{CER} foi calculado em 0,77 %, que corresponde a um valor de rendimento do material solúvel recuperado igual ao 79,1 %.

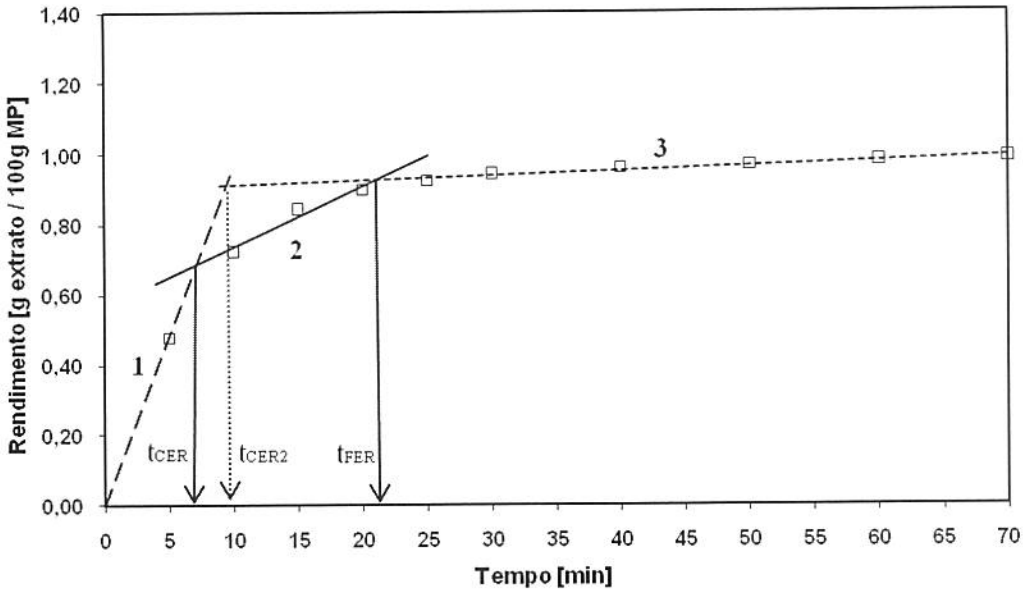

Figura 5.8. Ajuste por *spline* linear a 3 retas da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano chileno obtido por SD a 163 °C e determinação do t_{CER2}.

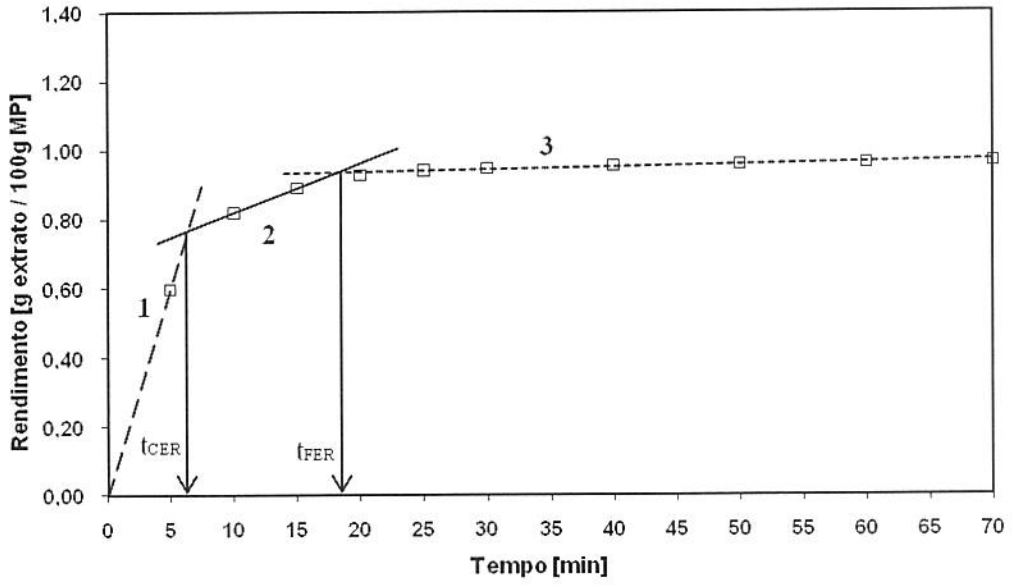

Figura 5.9. Ajuste por *spline* linear a 3 retas da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano grande obtido por SD a 164 °C.

O ajuste da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano floreado via SD é apresentado na Figura 5.10. O t_{CER} foi estimado em 6,9 min, e o t_{FER} em 17,2 min. O valor do R_{CER} foi 0,89 %, que corresponde ao 75,8 % do total de óleo volátil recuperado.

As três cinéticas de extração do óleo volátil de orégano (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10) apresentaram perfis similares. Foi observado que a maior parte do óleo volátil foi recuperada nos primeiros minutos de extração, o que reflete nos tempos tão curtos de t_{CER}. Meireles (2008) explica que o valor do tempo de ciclo de um processo é importante para as estimativas do custo de manufatura do mesmo e recomenda-se a aproximação deste valor ao t_{CER}, quando constatado que uma grande parte do extrato foi recuperada até esse momento. Valores entre 70 % e 90 % do material solúvel podem ser recuperados durante a etapa CER caso a matéria-prima for adequadamente preparada.

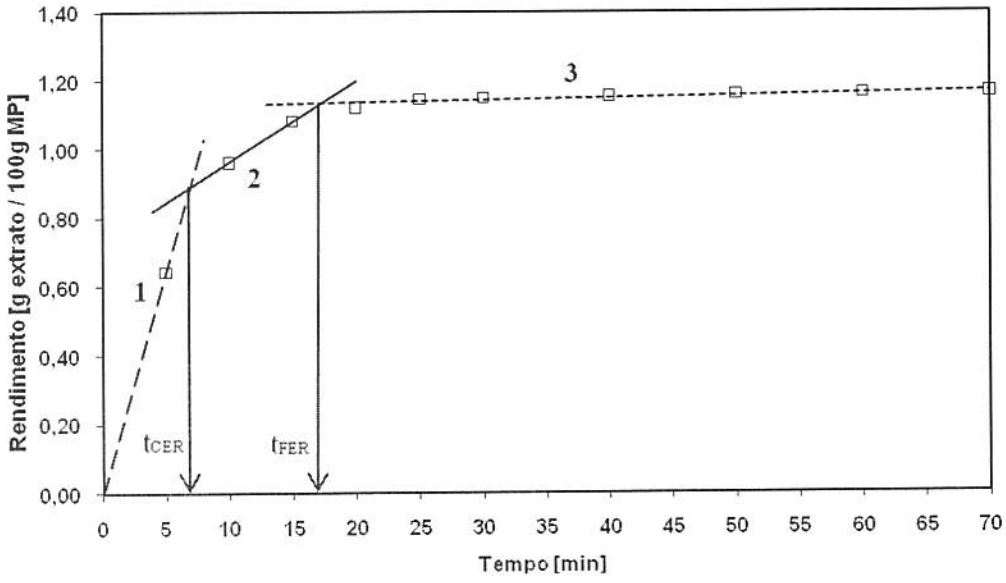

Figura 5.10. Ajuste por *spline* linear a 3 retas da cinética de extração do óleo volátil das folhas de orégano floreado obtido por SD a 164 °C.

A Figura 5.11 apresenta o ajuste da cinética de extração com CO_2 supercrítico das folhas de orégano chileno. Neste ajuste de três retas, o t_{CER} foi igual a 58,0 min e o t_{FER} igual a 139,8 min. No final do período CER, o rendimento da extração foi 1,60 %, que corresponde ao 51,4 % de todo o extrato recuperado nos 480 minutos de extração. Foi calculado o valor de t_{CER2}, igual a 87,2 min, onde o rendimento de extração neste novo tempo do período CER, foi igual a 1,90 %. Nestas circunstâncias, a fração do total de extrato recuperado foi de 61,2 %. Este valor é menor que o valor de rendimento esperado (> 70 %), devido as características próprias da cinética de extração, cuja reta da etapa DC possui uma tendência crescente muito acentuada, fazendo aumentar o valor do rendimento no final da extração, provocando uma diminuição no rendimento das frações de extrato obtidas nas outras etapas. Para explicar este comportamento na etapa de predomínio difusional, sugere-se que sejam feitos estudos de solubilidade dos extratos de orégano no CO_2 supercrítico durante todo o processo de extração.

A Tabela 5.6 apresenta os valores dos parâmetros da etapa CER para as cinéticas de extração de óleo volátil obtidas via SD dos oréganos chileno, grande e floreado e a cinética de extração do extrato obtido via SFE do orégano chileno (Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11). Os parâmetros apresentados são: t_{CER} e R_{CER}; t_{CER2} e R_{CER2} (quando necessário); e a fração do total de óleo volátil que foi recuperada nesta etapa. Na Tabela 5.6 observa-se que os menores tempos de t_{CER} foram obtidos para os oréganos grande e floreado, com valores de R_{CER} maiores aos obtidos para o orégano chileno, indicando maiores taxas de transferência de massa do soluto na fase sólida (folhas) para fase gasosa (vapor superaquecido) da espécie vegetal dos oréganos grande e floreado, quando comparada com a espécie do orégano chileno.

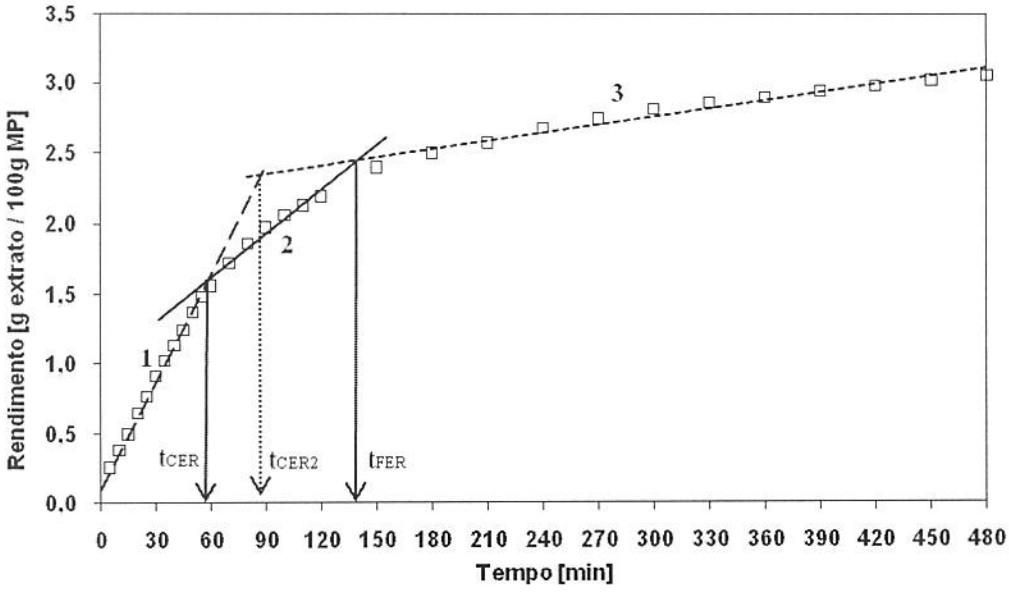

Figura 5.11. Ajuste por *spline* linear a 3 retas da cinética de extração do extrato supercrítico (50 °C, 200 bar) de orégano chileno e determinação do t_{CER2}.

Tabela 5.6. Parâmetros da etapa CER das cinéticas de extração via SD e SFE das folhas de orégano.

	SD			SFE
	O. chileno	**O. grande**	**O. floreado**	**O. chileno**
t_{CER} (min)	7,2	6,4	6,9	58,0
R_{CER} (%)	0,69	0,77	0,89	1,60
Fração do total recuperado (%)	69,2	79,1	75,8	51,4
t_{CER2} (min)	9,5	--	--	87,2
R_{CER2} (%)	0,73	--	--	1,90
Fração do total recuperado (%)	73,3	--	--	61,2

5.6 ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA

5.6.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O procedimento descrito no Item 4.5.1 foi aplicado para determinar a AA dos extratos aquosos e supercríticos das folhas secas de orégano. As análises incluem a comparação da AA dos extratos com a dos padrões BHT, antioxidante artificial amplamente usado pela indústria química e de alimentos, e a Quercetina, que é um flavonóide conhecido pelas suas propriedades antioxidantes.

A análise da AA do óleo volátil dos oréganos chileno, grande e floreado, obtido nas extrações por SD foi realizada somente para as frações recuperadas nos primeiros 10 min de extração (os 2 primeiros pontos de cada cinética apresentada no Item 5.3), pois o baixo rendimento das demais frações impedia a amostragem necessária para uma apropriada realização do teste. No caso dos extratos supercríticos, a determinação da AA realizou-se a todas as amostras obtidas nos ensaios de rendimento global das folhas secas dos oréganos chileno e floreado (todos os pontos das isotermas apresentadas no Item 5.4).

Os valores percentuais da AA dos diferentes extratos foram calculados com a Equação 4.7 usando o tempo de reação t = 60 min; estes valores são calculados em função das diferenças na queda da absorbância entre as soluções antioxidantes e o controle ao inicio e o final do teste. Para comparar os valores de AA de todas as amostras, estes foram padronizados estabelecendo a AA do BHT como 100 %.

A Tabela 5.7 apresenta os valores de AA das frações do óleo volátil dos oréganos chileno, floreado e grande, obtidos nas extrações cinéticas via SD, bem como os valores de AA dos padrões usados. Cada valor de AA é obtido a partir da média de duas determinações; junto a eles são apresentados os valores da incerteza (erro padrão das

médias) e as letras de agrupamento do teste de Tukey para estabelecer as diferenças estatisticamente significativas entre as médias.

Observa-se uma tendência repetida para os três tipos de orégano, onde as frações de óleo volátil recuperadas na segunda coleta (10 min) apresentaram maiores valores de AA que as obtidas nos 5 primeiros minutos de extração. Esta tendência é mais facilmente observada na Figura 5.12 que foi construída com os dados da Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Atividade antioxidante das frações do óleo volátil das folhas de orégano obtidos nos ensaios de SD.

Óleo volátil	**Tempo SD (min)**	**Atividade Antioxidante* (%)**
O. chileno	5	44 ± 1 a
	10	56 ± 1 b
O. floreado	5	39 ± 1 c
	10	52 ± 2 d
O. grande	5	38 ± 2 c
	10	51 ± 2 d
BHT		100 ± 1 e
Quercetina		65 ± 1 f

* Médias com diferentes letras são estatisticamente diferentes (teste de Tukey, p=0,05). Dados reportados como média ± erro padrão.

A Figura 5.12 apresenta os valores de AA das amostras de óleo volátil de orégano em função do tempo de coleta, assim como as referências dos padrões antioxidantes puros. Observa-se também proximidade nos valores de AA dos extratos quando coletados no mesmo intervalo de destilação, embora o teste de Tukey mostra que existe diferença significativa entre o orégano chileno e os outros oréganos, em ambos os tempos (5 min e 10

min). O padrão Quercetina apresentou valores de AA maiores que aqueles das amostras de óleo volátil de orégano. O valor médio de AA da Quercetina foi igual a 65 %; este valor foi entre 17 % (orégano chileno, 10 min) e 68 % (orégano grande, 5 min) maior que os dos óleos voláteis que foram analisados.

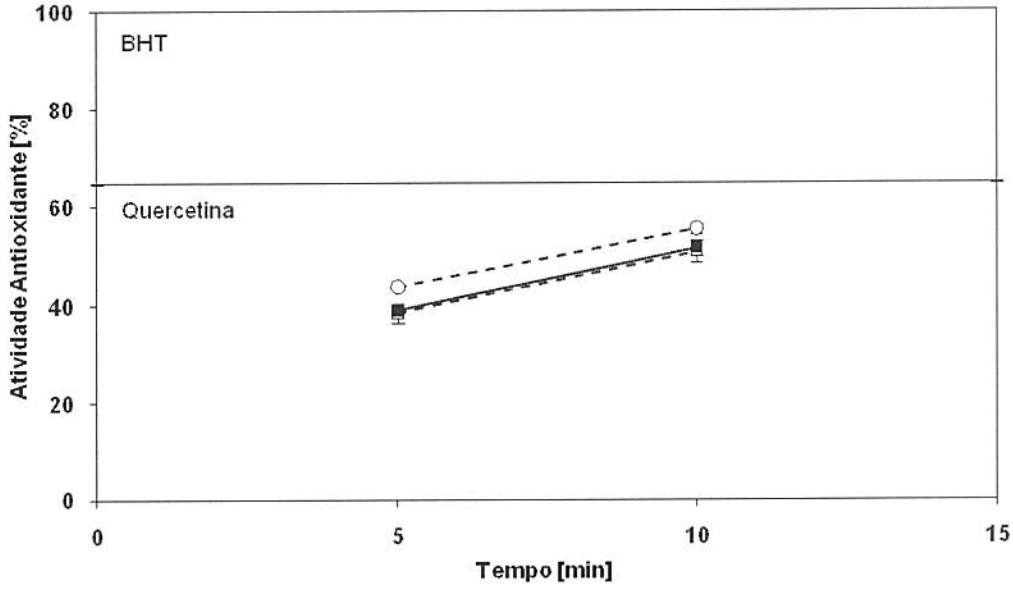

Figura 5.12. Atividade antioxidante dos óleos voláteis das folhas de orégano obtidos nos ensaios de SD (□ = orégano grande, ■ = orégano floreado, ○ = orégano chileno).

Na Tabela 5.8 estão apresentados os valores de AA dos extratos supercríticos das folhas secas dos oréganos chileno e floreado, obtidos nas diferentes condições de temperatura e pressão testadas nos ensaios SFE de rendimento global. Observa-se que no caso do orégano chileno, os extratos que apresentaram maiores valores de AA dentro de cada isoterma foram os obtidos a 250 bar. Estes extratos apresentaram valores de AA muitos próximos ao valor de AA do padrão Quercetina; a análise estatística estabelece que

não há diferenças significativas entre eles. Para o orégano floreado o extrato que apresentou maior valor de AA foi o obtido a 50 °C e 150 bar, embora ele não apresente diferença significativa com os valores de AA dos extratos obtidos entre 100 bar e 200 bar das duas isotermas. Considerando a proximidade dos valores de AA da Quercetina na Tabela 5.8, determinados junto aos extratos do orégano chileno e do floreado, pode ser estabelecida uma boa repetibilidade para os resultados do teste de todos os extratos analisados.

Tabela 5.8. Atividade antioxidante dos extratos supercríticos das folhas de orégano obtidos nos ensaios de rendimento global com S/F = 30.

Condições de operação SFE		**Atividade Antioxidante***			
Temperatura	**Pressão**	**O. chileno**		**O. floreado**	
(°C)	**(bar)**	**(%)**		**(%)**	
40	100	55 ± 3	abcde	48 ± 2	hi
	150	55 ± 4	abcd	49 ± 2	ehi
	200	56 ± 4	abc	51 ± 3	cdei
	250	59 ± 3	abf	--	
	300	44 ± 3	gh	40 ± 1	gk
50	100	51 ± 1	cdei	48 ± 1	hi
	150	51 ± 2	cdei	53 ± 2	bcdei
	200	58 ± 3	abf	48 ± 1	hi
	250	61 ± 3	af	--	
	300	49 ± 3	dehi	37 ± 3	k
BHT		100 ± 1	j	100 ± 1	j
Quercetina		64 ± 1	f	63 ± 3	f

* Médias com diferentes letras são estatisticamente diferentes (teste de Tukey, p=0.05). Dados reportados como média ± erro padrão.

As Figuras 5.13 e 5.14 foram construídas com os dados de AA dos extratos supercríticos dos oréganos chileno e floreado, apresentados na Tabela 5.8. A Figura 5.13

apresenta as curvas isotermas dos valores de AA dos extratos obtidos via SFE do orégano chileno em função das pressões de operação utilizadas, enquanto a Figura 5.14 apresenta as curvas isotermas da AA dos extratos supercríticos do orégano floreado, também em função das pressões de operação empregadas.

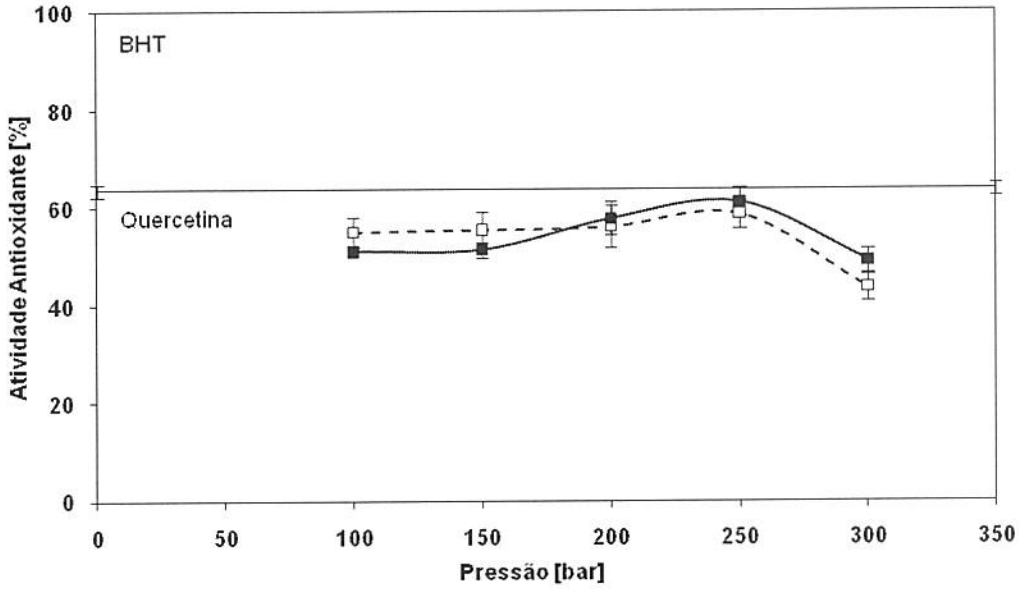

Figura 5.13. Atividade antioxidante dos extratos supercríticos de orégano chileno obtidos nos ensaios de rendimento global (□ = 40 °C, ■ = 50 °C).

Os perfis das curvas na Figura 5.13 sugerem que a maioria dos extratos possui propriedades antioxidantes similares e que, com o aumento da pressão, os valores de AA dos extratos supercríticos aumentam discretamente até chegar a um valor máximo na pressão de 250 bar. Com o aumento da pressão de operação até 300 bar, observa-se uma diminuição significativa dos valores de AA dos extratos recuperados em ambas temperaturas (40 °C e 50 °C). O incremento na AA dos extratos a 250 bar faz com que o

perfil das curvas isotermas tenha uma aproximação ao valor de AA do padrão Quercetina; neste ponto, pelo teste de Tukey, os valores de AA dos extratos supercríticos de orégano e da Quercetina não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

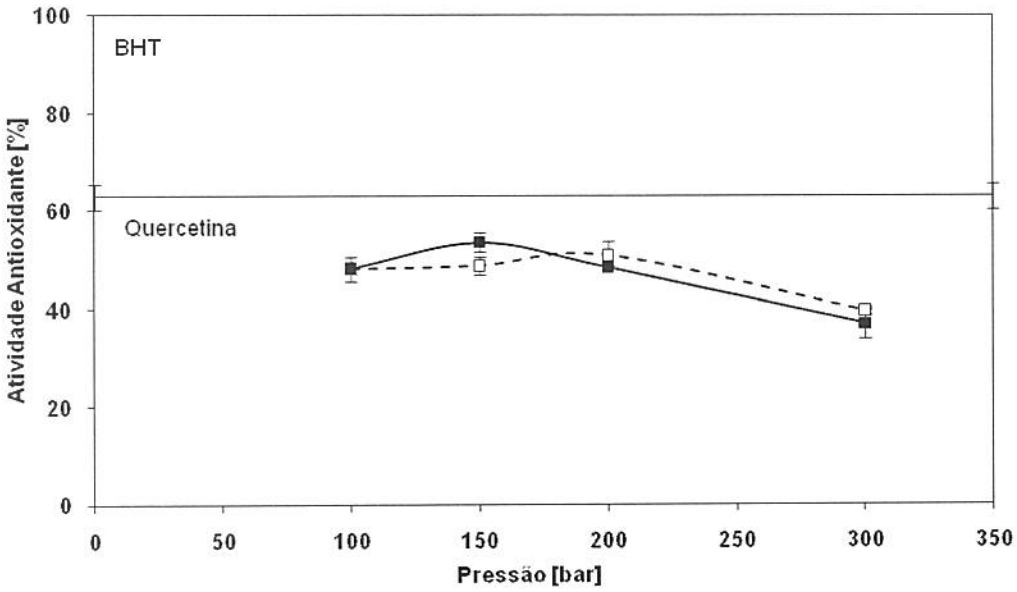

Figura 5.14. Atividade antioxidante dos extratos supercríticos de orégano floreado obtidos nos ensaios de rendimento global (□ = 40 °C, ■ = 50 °C).

Na Figura 5.14, os perfis das curvas indicam valores próximos e constantes de AA dos extratos de orégano floreado obtidos entre as pressões de 100 bar e 200 bar. Observa-se também decréscimo significativo do valor de AA dos extratos de orégano floreado quando atingida a pressão de 300 bar. Como não foram realizadas extrações na pressão de 250 bar não foi possível determinar se as curvas de AA dos oréganos chileno e floreado, apresentadas nas Figuras 5.13 e 5.14, teriam perfis similares. Em geral os valores de AA

dos extratos supercríticos do orégano floreado apresentaram-se menores aos obtidos para os do orégano chileno.

Os padrões antioxidantes utilizados (BHT e Quercetina) possuem grau de pureza elevado e seus valores de AA foram determinados usando a mesma concentração utilizada na determinação da AA dos extratos aquosos e supercríticos de orégano. Portanto, esperava-se que os padrões tivessem maiores valores de AA que os extratos; no entanto, o uso dos padrões serviu para estimar o poder antioxidante dos extratos de orégano, que foi entre 40 % e 60 % da AA do BHT e entre 60 % e 95 % da AA da Quercetina. Outros métodos de determinação de AA deveriam ser testados para confirmar a ação antioxidante dos extratos de orégano. Considerando os resultados obtidos, observa-se que os óleos voláteis e os extratos supercríticos das folhas dos oréganos estudados têm potencial para serem fontes de compostos antioxidantes naturais.

5.6.2 FENÓIS TOTAIS

A determinação dos fenóis totais presentes nos extratos de orégano foi feita como indicado no Item 4.5.2.

Primeiramente foi construída a curva padrão utilizando todas as soluções de calibração mais a solução branco (que foi o ponto zero da reta). Esta curva padrão é apresentada na Figura 5.15, onde é apresentado também o ajuste linear da curva padrão. A Equação 5.1 é a equação da reta do ajuste linear da curva padrão cujo valor do R^2 foi igual a 0,9938.

$$y = 1{,}2677x - 0{,}0098 \tag{5.1}$$

A Equação 5.1 é usada para converter os valores de absorbância, obtidos para cada amostra após a realização do teste, em valores de concentração equivalente de ácido gálico. Estes valores posteriormente são corrigidos com os valores da concentração inicial de cada amostra para obter a quantidade de fenóis totais GAE (em miligramas) presentes em cada grama de óleo volátil ou extrato supercrítico dos oréganos testados.

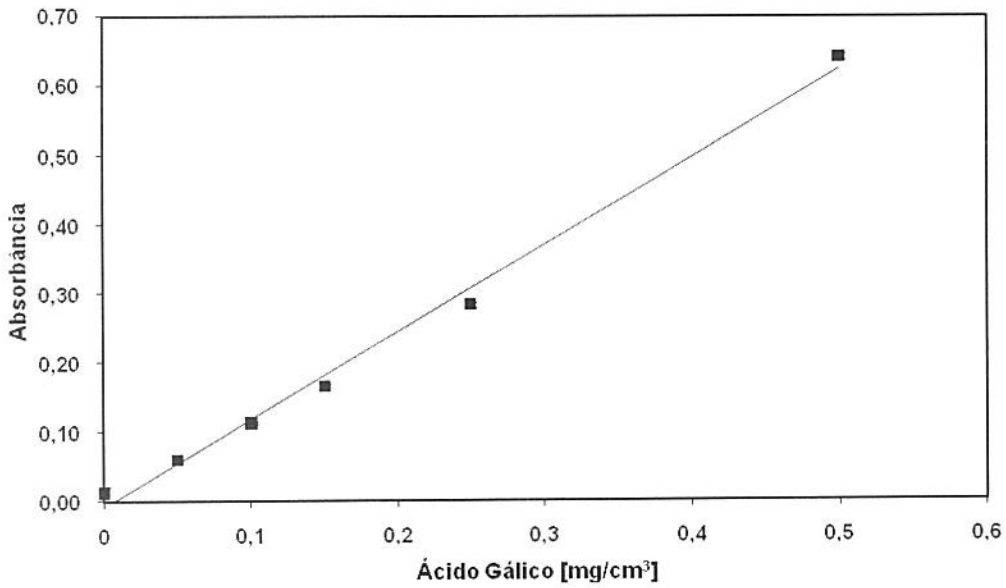

Figura 5.15. Curva de calibração do ácido gálico para o ensaio de fenóis totais pelo método do reagente Folin-Ciocalteu.

A curva de calibração deve ser feita toda vez que a determinação de fenóis totais seja realizada, pois diminui os erros experimentais da preparação das soluções reagentes. Nesta análise, todas as amostras (incluindo as duplicatas) foram preparadas no mesmo dia, utilizando-se as mesmas soluções para todos os ensaios.

A Tabela 5.9 apresenta os valores de fenóis totais dos óleos voláteis dos oréganos chileno, floreado e grande, obtidos nas extrações cinéticas via SD, expressos em miligramas de GAE por grama de óleo volátil testado. Como no caso da determinação da AA, só puderam ser empregadas as frações de óleo volátil recuperadas nas duas primeiras coletas da extração (tempo de extração t=5 min e t=10 min). O resultado destas determinações mostra o elevado conteúdo de compostos fenólicos nas frações dos óleos voláteis de orégano, especialmente no caso da fração de óleo volátil do orégano chileno recuperada no segundo período da coleta cinética (entre 5 e 10 minutos de extração) que apresenta um valor de fenóis totais GAE de quase 100 %. Em geral, as frações de óleo volátil do orégano chileno apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos que as dos oréganos grande e floreado; nestas duas últimas, no entanto, os valores de fenóis totais são muito próximos.

Tabela 5.9. Fenóis Totais GAE das frações dos óleos voláteis das folhas de orégano obtidas nos ensaios de SD.

Óleo volátil	**Tempo SD (min)**	**Fenóis Totais GAE* (mg/g)**
O. chileno	5	856 ± 21 a
	10	998 ± 17 b
O. floreado	5	654 ± 39 c
	10	850 ± 27 a
O. grande	5	681 ± 35 c
	10	855 ± 12 a

* Médias com diferentes letras são estatisticamente diferentes (teste de Tukey, p=0,05). Dados reportados como média ± erro padrão.

A Figura 5.16 apresenta os perfis do aumento no valor dos fenóis totais GAE nas frações de óleo volátil de orégano em função do tempo de coleta. Comparando estes perfis com os apresentados pelos valores de AA dos mesmos extratos (Figura 5.12), pode observar-se que existe uma relação direta entre o valor da AA e o conteúdo de fenóis totais de cada amostra. Esta relação indica que a AA dos óleos voláteis de orégano depende de maneira diretamente proporcional da quantidade de compostos fenólicos presentes nestes extratos.

Os valores de fenóis totais tão próximos entre os óleos voláteis do orégano grande e o orégano chileno permitem supor que a composição química destes extratos seja similar, considerando que ambos tipos de orégano pertencem a mesma espécie, diferenciando-se apenas pelo estado de maturação da planta.

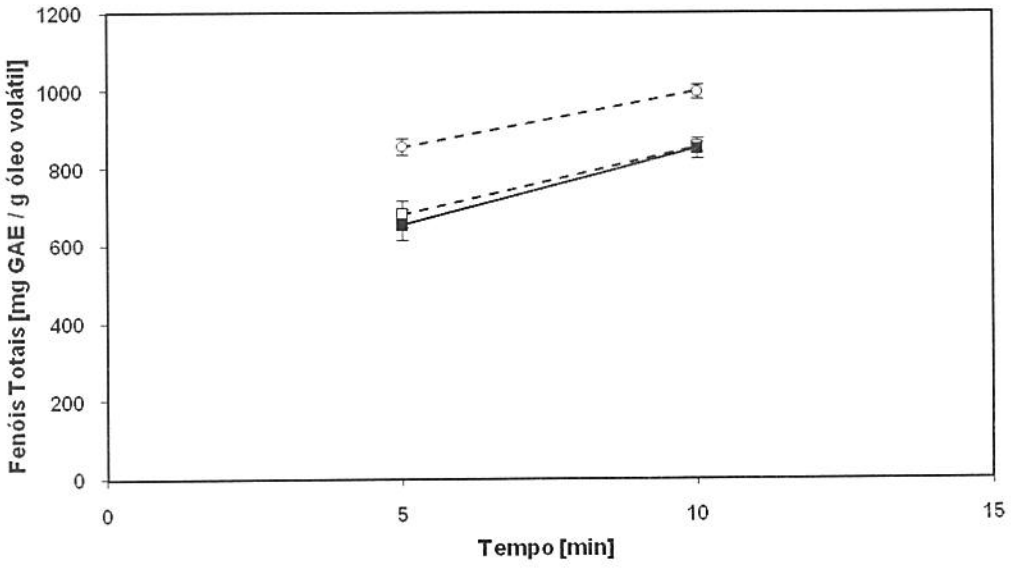

Figura 5.16. Fenóis totais, expressos em GAE, presentes nas frações de óleo volátil de orégano recuperadas nos primeiros minutos da extração cinética via SD (□ = orégano grande, ■ = orégano floreado, ○ = orégano chileno).

Na Tabela 5.10 estão apresentados os valores de fenóis totais GAE de todos os extratos das folhas secas dos oréganos chileno e floreado, obtidos nas diferentes condições de temperatura e pressão testadas nos ensaios de rendimento global via SFE. Observa-se que em geral os valores da quantidade de fenóis totais presentes nos extratos supercríticos foram menores aos valores obtidos pelos óleos voláteis das mesmas plantas. Como no caso dos óleos voláteis, os extratos supercríticos do orégano chileno apresentaram valores de fenóis totais GAE superiores aos apresentados pelos extratos supercríticos do orégano floreado.

Tabela 5.10. Fenóis Totais GAE dos extratos supercríticos das folhas de orégano obtidos nos ensaios de rendimento global com S/F = 30.

Condições de operação SFE		**Fenóis Totais GAE***	
Temperatura (°C)	**Pressão (bar)**	**O. chileno (mg/g)**	**O. floreado (mg/g)**
40	100	876 ± 16 a	549 ± 25 f
	150	675 ± 15 b	509 ± 23 g
	200	625 ± 16 c	490 ± 25 gh
	250	675 ± 18 b	--
	300	677 ± 11 b	484 ± 26 h
50	100	972 ± 15 d	613 ± 23 c
	150	688 ± 11 b	587 ± 28 i
	200	668 ± 18 b	510 ± 26 g
	250	686 ± 11 b	--
	300	727 ± 12 e	498 ± 26 gh

* Médias com diferentes letras são estatisticamente diferentes (teste de Tukey, p=0,05). Dados reportados como média ± erro padrão.

Entre os extratos de orégano chileno, os obtidos na menor pressão de operação (100 bar) das duas isotermas apresentaram o maior conteúdo de compostos fenólicos; os demais extratos apresentaram valores menores de fenóis totais, mas muito próximos entre eles. Na determinação dos fenóis totais dos óleos voláteis de orégano foi verificado um elevado conteúdo destes compostos; portanto, a maior presença de compostos fenólicos nos extratos de orégano obtidos na pressão de 100 bar pode indicar um elevado teor de óleo volátil nestes extratos. Isto confirma as informações apresentadas no Item 5.4, respeito da maior percentagem de óleo volátil presente nos extratos supercríticos de orégano quando as extrações são realizadas usando pressões relativamente baixas (menores a 100 bar).

Analisando os resultados dos extratos de orégano floreado, observa-se que a quantidade de fenóis totais GAE dos extratos recuperados a 100 bar não é muito superior à dos extratos obtidos nas demais pressões, como foi no caso dos extratos de orégano chileno. Foi determinado, que o óleo volátil do orégano chileno possui maior quantidade de fenóis totais que o óleo volátil do orégano floreado, embora o rendimento na extração via SD seja maior neste último. Estas circunstâncias indicariam a presença de outros compostos não fenólicos presentes nas folhas do orégano floreado, que seriam recuperados nas extrações com vapor superaquecido ou com CO_2 supercrítico, diminuindo o teor de fenóis totais em ambos os extratos desta planta.

A Figura 5.17 mostra a variação da quantidade de fenóis totais presentes nos extratos supercríticos das folhas de orégano chileno obtidos nos ensaios de $X_{0,S/F=30}$ em função das condições de extração (temperatura e pressão). O perfil das curvas isotermas dos valores de fenóis totais GAE dos extratos supercríticos de orégano chileno em função das pressões de extração denota que embora a presença de fenóis totais nos extratos diminua após o aumento da pressão de operação a mais de 100 bar, a proporção dos compostos

fenólicos presente nos extratos obtidos nas demais condições de temperatura e pressão manteve-se quase constante. Isto é importante de destacar visando uma otimização na recuperação de compostos fenólicos a partir destes extratos, pois como visto no Item 5.4, os rendimentos de extração aumentam em pressões maiores.

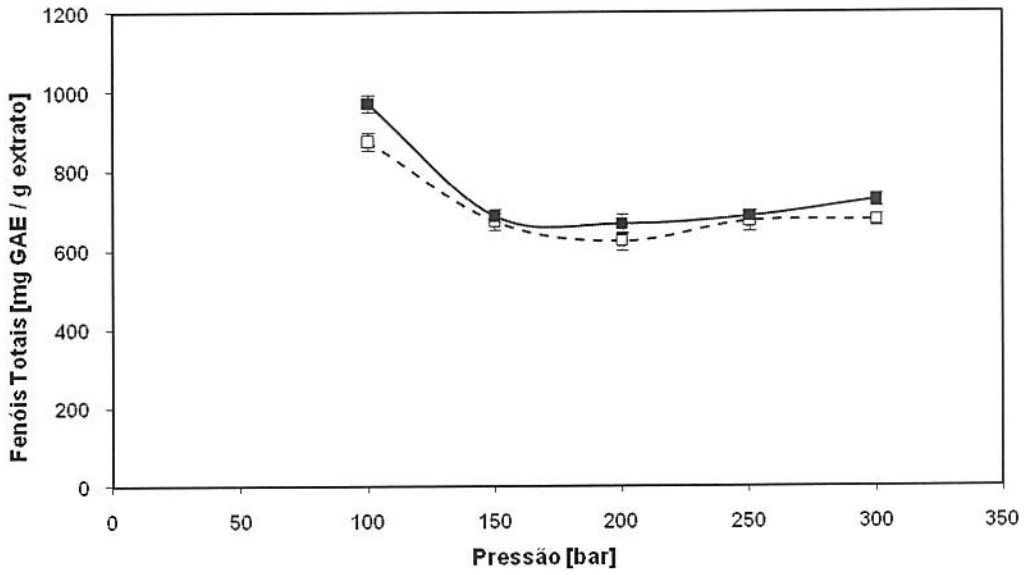

Figura 5.17. Fenóis totais, expressos em GAE, presentes nas isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano chileno (□ = 40 °C, ■ = 50 °C).

Usando os valores resultantes da determinação de fenóis totais GAE dos extratos supercríticos de orégano floreado construíram-se curvas isotermas dos valores de fenóis totais em função das pressões de extração, estas curvas estão apresentadas na Figura 5.18. Nesta figura observa-se uma tendência linear e quase constante das curvas isotermas de fenóis totais GAE, mas com valores ligeiramente maiores nas pressões menores (100 bar e 150 bar).

Ao comparar as Figuras 5.12, 5.13 e 5.14, que apresentam os valores de AA dos extratos dos oréganos testados, com os seus respectivos pares, Figuras 5.16, 5.17 e 5.18, que apresentam o conteúdo de fenóis totais, observa-se que a relação direta estabelecida anteriormente entre os valores de fenóis totais e os de AA das frações de óleo volátil dos três tipos de orégano não é análoga para os extratos supercríticos do orégano chileno e do floreado; pois, os extratos obtidos nas condições SFE que renderam os maiores valores de AA não foram os que apresentaram os maiores valores de fenóis totais. Portanto, o poder antioxidante dos extratos supercríticos dos oréganos estudados deve ser influenciado pela presença de outras substâncias além dos compostos fenólicos.

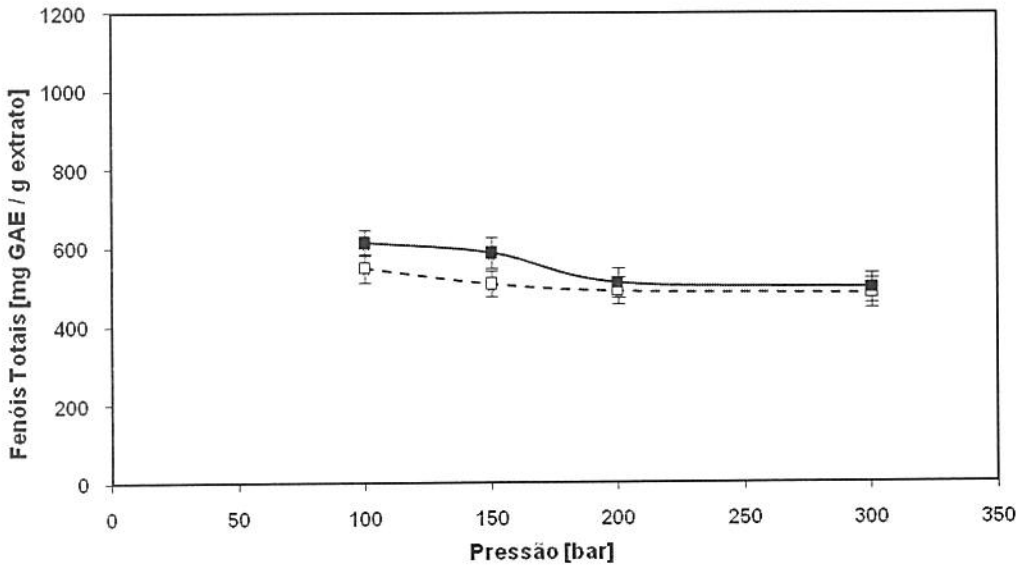

Figura 5.18. Fenóis totais, expressos em GAE, presentes nas isotermas de rendimento global dos extratos supercríticos de orégano floreado (□ = 40 °C, ■ = 50 °C).

5.6.3 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises feitas em GC-MS permitiram a separação e identificação de um total de 20 compostos repartidos entre os extratos aquosos e supercríticos das folhas dos oréganos estudados. Entre as substâncias identificadas encontrou-se principalmente monoterpenos cíclicos, monoterpenos acíclicos e sesquiterpenos. Para a realização desta análise as amostras foram preparadas misturando alíquotas de todas as frações obtidas em cada processo de extração e para cada tipo de orégano estudado, resultando 5 amostras, três dos óleos voláteis dos oréganos chileno, grande e floreado obtidos via SD e duas dos extratos dos oréganos chileno e floreado obtidos via SFE. A Tabela 5.11 apresenta a distribuição de todas as substâncias presentes nos diferentes extratos de cada tipo de orégano avaliado por GC-MS (percentagem em área ≥ 1 %).

Na Tabela 5.11 observa-se que o óleo volátil do orégano grande é o extrato que apresenta maior quantidade dos compostos identificados (16 compostos). O óleo volátil do orégano floreado apresenta um perfil químico similar ao óleo volátil do orégano grande, diferenciando-se somente pela menor presença de compostos sesquiterpenos (biciclogermacreno e beta-bisaboleno). O óleo volátil do orégano chileno apresenta 15 dos 20 compostos identificados. No caso dos extratos obtidos via SFE a situação muda drasticamente. Os extratos supercríticos do orégano chileno apresentam apenas 6 compostos químicos com concentrações superiores a 1 %. Os extratos supercríticos do orégano floreado apresentaram também menor quantidade de substâncias (10 compostos) que os óleos voláteis extraídos da mesma planta. Estas diferenças na composição química dos extratos obtidos com vapor superaquecido e com CO_2 supercrítico podem ser resultado das características próprias de cada processo de extração, pois os processos SFE são

caracterizados pela seletividade do solvente na extração, enquanto que com a extração via SD são obtidos outros compostos produto da degradação térmica provocada pela temperatura de destilação.

Tabela 5.11. Compostos identificados por GC-MS nos extratos aquosos e supercríticos das folhas de orégano.

Compostos	SD			SFE	
	OC	OF	OG	OC	OF
sabineno	+	+	+	-	-
mirceno	+	-	-	-	-
alfa-terpineno	+	+	+	-	-
p-cimeno	+	+	+	-	-
delta-3-careno	+	-	-	-	-
gama-terpineno	+	+	+	-	-
cis-hidrato de sabineno	+	+	+	+	+
terpinoleno	+	-	-	-	-
trans-hidrato de sabineno	+	+	+	+	+
4-terpineol	+	+	+	+	+
alfa-terpineol	+	+	+	+	+
éter metílico de timol	+	+	+	-	-
éter metílico de carvacrol	+	+	+	-	+
acetato de linalila	-	+	+	-	+
timol	+	+	+	+	+
beta-cariofileno	+	+	+	-	+
germacreno-D	-	+	+	-	+
biciclogermacreno	-	-	+	-	-
beta-bisaboleno	-	-	+	-	-
hidrocarboneto ($C_{25}H_{52}$)	-	-	-	+	+

OG = orégano grande; OF = orégano floreado; OC = orégano chileno; "+" = percentagem em área maior e igual ao 1 %; "-" = percentagem em área menor ao 1 %.

5.6.4 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMAS

A composição química, determinada por GC-FID, dos extratos de orégano obtidos via SD e SFE estão apresentadas nas Tabelas 5.12, 5.13 e 5.14.

A Tabela 5.12 apresenta a composição química das frações dos óleos voláteis dos oréganos chileno, floreado e grande, recuperadas nos primeiros minutos dos ensaios de SD. A diferença das determinações de AA e fenóis totais, as frações de óleo volátil analisadas via GC-FID foram não somente as recuperadas nas duas primeiras coletas da extração, mas nas 4 primeiras coletas. Ou seja, foram analisadas as frações coletadas nos 20 primeiros minutos da extração que, como visto nas cinéticas de extração, correspondem à recuperação de aproximadamente 80 % do óleo volátil extraído. Observa-se que existem grandes variações (crescentes e decrescentes) na percentagem da área de pico dos compostos majoritários em função do tempo de coleta. Os compostos majoritários das frações de óleo volátil do orégano chileno recuperadas nos 5 primeiros minutos de destilação são o trans-hidrato de sabineno (39,3 % área), o timol (14,6 % área) e o gama-terpineno (11,1 % área); a concentração destes compostos, diretamente relacionada à percentagem em área dos cromatogramas, variou nas distintas frações do óleo volátil coletadas nos demais tempos de extração (10 min, 15 min e 20 min). Nas frações de óleo volátil coletadas entre os 15 e 20 minutos de extração (quarta coleta), os compostos majoritários são o timol (26,3 % área), o 4-terpineol (12,6 % área), o gama-terpineno (10,1 % área) e o trans-hidrato de sabineno (7,1 % área). Os óleos voláteis dos oréganos grande e floreado apresentaram perfis químicos semelhantes entre si, mas um pouco diferentes do perfil apresentado pelo óleo volátil do orégano chileno. A percentagem em área dos compostos majoritários das frações de óleo volátil do orégano floreado analisadas variou ao longo do tempo de operação de

54,5 % a 11,8 % para o trans-hidrato de sabineno, de 6,5 % a 25,5 % para o timol, de 5,5 % a 9,6 % para o acetato de linalila e de 1,5 % a 10,5 % para o beta-cariofileno. Os compostos majoritários do óleo volátil de orégano grande foram os mesmos que os do orégano floreado, a percentagem em área destes compostos variou em função do tempo de extração entre 48,2 % e 10,8 % para o trans-hidrato de sabineno, entre 7,4 % e 24,1 % para o timol, entre 7,1 % e 15,0 % para o acetato de linalila e entre 1,8 % e 10,7 % para o beta-cariofileno.

A Tabela 5.13 mostra a composição química dos extratos supercríticos do orégano chileno, obtidos nas diferentes condições de extração dos ensaios de rendimento global com um valor de S/F = 30. Em ambas isotermas os compostos majoritários são identificados rapidamente, sendo estes o trans-hidrato de sabineno, o timol e o hidrocarboneto $C_{25}H_{52}$. Observa-se que as variações da temperatura e pressão de extração afeta principalmente a concentração dos compostos majoritários. As concentrações do trans-hidrato de sabineno e do timol diminuem devido à maior extração do hidrocarboneto $C_{25}H_{52}$, que é um composto mais pesado, como conseqüência do aumento da pressão. Na isoterma de 40 °C o incremento no rendimento do hidrocarboneto $C_{25}H_{52}$ é menos drástico que na isoterma de 50 °C onde se observa que entre as pressões de 50 bar e 100 bar a percentagem em área aumentou de 3,1 % até 22,1 %. A diminuição das percentagens em área do trans-hidrato de sabineno e do timol devidas ao aumento da pressão na isoterma de 40 °C foram de 36,4 % a 33,0 % e de 31,5 % a 23,5 %, respectivamente. Na isoterma de 50 °C o aumento das pressões de operação diminuiu as percentagens em área do trans-hidrato de sabineno de 34,7 % a 31,1 % e do timol de 34,2 % a 23,0 %.

Na Tabela 5.14 estão apresentadas as composições químicas dos extratos supercríticos de orégano floreado, obtidos nos ensaios de rendimento global com um valor

de S/F = 30. Neste caso, a composição química dos extratos é pouco afetada pelos parâmetros de extração (temperatura e pressão). Da mesma forma que os extratos supercríticos do orégano chileno, os compostos majoritários foram o trans-hidrato de sabineno (~ 50 % área) e o timol (~ 13 % área), embora em concentrações diferentes. Observa-se que o hidrocarboneto $C_{25}H_{52}$ aumenta sua concentração devido ao aumento da pressão, mas sem ultrapassar o 8 % em área. Observam-se também concentrações significativas de outros compostos como o acetato de linalila (~ 4 % área) e o beta cariofileno (~ 2,5 % área).

Nas Tabelas 5.12, 5.13 e 5.14 observou-se que o principal composto presente nos extratos de orégano estudados é o trans-hidrato de sabineno, que segundo Skoula e Harborne (2002) é o composto que caracteriza a espécie *Origanum majorana* (manjerona). Esta espécie caracteriza-se também pelo alto rendimento de óleo volátil (maior ao 2,0 %), que é muito superior ao rendimento obtido com os oréganos deste trabalho, e a ausência de compostos sesquiterpenos, mas que foram verificados nos oréganos grande e floreado. Portanto, com as informações prévias a respeito das espécies destes oréganos e as informações da composição química e teor de óleo volátil poder-se-ia afirmar que os oréganos estudados são espécies híbridas de orégano, tendo como parentais à manjerona e provavelmente alguma subespécie do *Origanum vulgare* (pelo rendimento intermediário de óleo volátil e a presença de sesquiterpenos). Isto estaria de acordo como as informações do Item 4.1 ao respeito da espécie de orégano provindo do vale de Huambo no Peru, mas estabeleceria discrepâncias com as informações do laudo da compra do orégano chileno, pois a espécie *Origanum vulgare* L., amplamente estudada por Skoula e Harbone (2002), apresenta concentrações menores aos 10 % do óleo volátil, no total de compostos do tipo sabinil (trans-hidrato de sabineno, cis-hidrato de sabineno, sabineno, etc).

Tabela 5.12. Composição química identificada por GC-FID das frações dos óleos voláteis de orégano recuperadas nos primeiros minutos dos ensaios de SD.

Compostos	Área (%)											
	Orégano Chileno				Orégano Floreado				Orégano Grande			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
sabineno	4,9	3,7	1,7	1,3	3,0	1,0	0,4	0,3	3,0	1,4	1,2	0,1
mirceno	1,7	1,4	0,6	0,4	1,2	0,5	0,2	0,2	1,1	0,7	0,6	0,2
alfa-terpineno	2,3	3,9	4,2	4,2	1,1	1,3	1,4	1,3	1,6	1,9	2,3	0,6
p-cimeno	6,3	4,8	3,0	2,8	3,5	1,5	0,8	0,7	4,2	2,5	2,2	0,6
delta-3-careno	2,1	1,0	1,5	1,5	1,8	0,9	0,6	0,5	1,6	0,6	1,1	0,3
gama-terpineno	11,1	13,1	11,6	10,1	4,8	4,3	4,1	4,0	5,9	6,1	6,9	2,6
cis-hidrato de sabineno	2,1	2,7	2,7	1,9	3,9	3,8	3,2	2,0	3,8	3,4	2,5	1,6
terpinoleno	0,5	1,1	1,7	1,8	0,4	0,7	0,9	1,0	0,5	0,9	1,2	0,6
trans-hidrato de sabineno	39,3	26,5	13,5	7,1	54,5	40,9	24,7	11,8	48,2	32,1	18,1	10,8
4-terpineol	4,2	6,7	10,4	12,5	2,4	5,2	8,0	7,0	3,1	5,7	5,8	5,1
alfa-terpineol	1,6	1,6	1,8	1,9	1,9	2,3	2,4	1,8	1,6	1,8	1,5	1,3
éter metílico de timol	1,3	1,4	1,6	1,7	1,4	1,5	1,5	1,8	1,3	1,5	1,8	1,8
éter metílico de carvacrol	1,2	1,4	1,6	1,8	2,1	2,3	2,3	2,8	2,2	2,6	3,2	3,1
acetato de linalila	0,1	0,1	0,1	0,2	5,5	7,4	7,8	9,6	7,1	10,2	12,4	15,0
timol	14,6	18,7	23,5	26,3	6,5	13,6	20,4	25,5	7,4	13,2	17,7	24,1
beta-cariofileno	0,7	1,6	2,6	3,2	1,5	4,6	7,7	10,5	1,8	5,0	7,7	10,7
germacreno-D	0,3	0,6	0,9	0,9	0,7	2,3	4,0	5,8	0,8	2,4	3,6	5,6
biciclogermacreno	tr	0,3	0,5	0,9	tr	0,3	0,9	1,6	0,3	0,9	1,5	3,2
beta-bisaboleno	tr	0,2	0,3	0,5	tr	0,4	0,9	1,6	0,3	0,8	1,3	2,6
hidrocarboneto ($C_{25}H_{52}$)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	94,4	90,7	84,0	81,2	96,2	94,9	92,2	89,9	95,9	93,7	92,5	89,8

tr = traço (< 0,1 %); a, b, c, d = frações de óleo volátil recuperadas nos ensaios SD entre os tempos t=0 min e t=5 min (a), t=5 min e t=10 min (b), t=10 min e t=15 min (c), t=15 min e t=20 min (d).

Tabela 5.13. Composição química identificada por GC-FID dos extratos supercríticos de orégano chileno obtidos nos ensaios de rendimento global, S/F = 30.

Compostos	Área (%)									
	Isoterma de rendimento global SFE (40 °C)					Isoterma de rendimento global SFE (50 °C)				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
sabineno	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	0,1
mirceno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
alfa-terpineno	tr	-	tr	-	tr	tr	-	-	-	-
p-cimeno	0,2	0,3	0,4	0,4	0,6	tr	0,4	0,2	0,4	0,3
delta-3-careno	tr	tr	0,1	0,1	0,2	-	tr	tr	0,1	tr
gama-terpineno	0,3	0,5	0,6	0,6	0,8	0,2	0,5	0,4	0,6	0,4
cis-hidrato de sabineno	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0
terpinoleno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-hidrato de sabineno	36,4	33,0	32,1	34,0	33,0	34,7	31,1	30,7	31,5	31,1
4-terpineol	1,8	1,7	1,6	1,6	1,6	1,9	1,5	1,4	1,5	1,5
alfa-terpineol	1,8	1,4	1,4	1,4	1,4	2,0	1,3	1,3	1,3	1,3
éter metílico de timol	0,4	0,5	0,6	0,6	0,6	0,3	0,6	0,5	0,6	0,5
éter metílico de carvacrol	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
acetato de linalila	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3
timol	31,5	25,9	24,1	24,4	23,5	34,2	22,1	22,8	22,4	23,0
beta-cariofileno	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
germacreno-D	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
biciclogermacreno	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,3	0,3	0,4
beta-bisaboleno	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
hidrocarboneto ($C_{25}H_{52}$)	4,7	13,7	16,6	17,8	19,2	3,1	22,1	24,1	23,0	21,0
TOTAL	81,1	80,6	81,1	84,5	84,5	80,3	83,1	84,9	84,8	82,5

tr = traço (< 0,1 %); a, b, c, d, e = pressões de extração utilizadas para construir as isotermas de rendimento global, p=100 bar (a), p=150 bar (b), p=200 bar (c), p=250 bar (d), p=300 bar (e).

Tabela 5.14. Composição química identificada por GC-FID dos extratos supercríticos de orégano floreado obtidos nos ensaios de rendimento global, S/F = 30.

Compostos	Área (%)							
	Isoterma de rendimento global SFE (40 °C)				Isoterma de rendimento global SFE (50 °C)			
	a	b	c	d	a	b	c	d
sabineno	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
mirceno	tr	tr	0,1	0,1	-	tr	tr	0,1
alfa-terpineno	0,1	tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1
p-cimeno	0,4	0,3	0,6	0,5	0,2	0,3	0,5	0,5
delta-3-careno	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
gama-terpineno	0,6	0,4	0,8	0,7	0,4	0,5	0,7	0,8
cis-hidrato de sabineno	2,7	2,4	2,5	2,5	2,5	2,4	2,5	2,5
terpinoleno	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-hidrato de sabineno	52,5	51,2	49,4	47,1	51,3	51,3	50,1	48,4
4-terpineol	1,4	1,1	1,2	1,6	1,3	1,1	1,1	1,3
alfa-terpineol	2,3	2,0	2,0	2,0	2,3	2,0	1,9	1,9
éter metílico de timol	1,0	0,9	1,0	0,9	0,9	0,9	1,0	0,9
éter metílico de carvacrol	1,5	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,4	1,4
acetato de linalila	4,5	4,1	4,1	3,9	4,4	4,2	4,2	4,1
timol	14,9	12,7	12,7	12,6	14,8	12,9	12,4	12,5
beta-cariofileno	2,6	2,2	2,3	2,3	2,5	2,4	2,4	2,3
germacreno-D	1,4	1,2	1,2	1,1	1,4	1,3	1,2	1,2
biciclogermacreno	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
beta-bisaboleno	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
hidrocarboneto ($C_{25}H_{52}$)	3,1	6,0	6,3	7,2	4,2	5,8	6,0	6,8
TOTAL	90,9	87,8	87,7	86,2	89,6	88,5	87,4	86,8

tr = traço (< 0,1 %); a, b, c, d = pressões de extração utilizadas para construir as isotermas de rendimento global, p=100 bar (a), p=150 bar (b), p=200 bar (c), p=300 bar (d).

5.7 ANÁLISE ECONÔMICA

5.7.1 AUMENTO DE ESCALA

No Item 4.7.1 estão indicados o procedimento, as considerações e o cálculo dos dados necessários para estabelecer o aumento de escala (da escala laboratorial à industrial) dos processos SD e SFE. O aumento de escala é o passo prévio para a realização da estimativa de custos de cada processo. Os resultados dos cálculos são apresentados a seguir.

Para o processo SD, a densidade aparente das três classes de orégano (chileno, grande e floreado), foi 93 kg/m^3. Considerando a escala industrial, a massa de matéria-prima para cada ciclo foi estimada em 46,5 kg de folhas secas de orégano e a vazão mássica do solvente foi calculada usando a Equação 4.9, obtendo-se o valor de $\dot{M}_{S_ind} = 0{,}09$ kg/s.

Para o processo SFE, o orégano chileno apresentou valor de densidade aparente igual a 317 kg/m^3. Utilizando este dado a quantidade de matéria-prima necessária para preencher a coluna de extração de 0,4 m^3 foi estimada em 127 kg de folhas (secas e moídas) de orégano chileno. A vazão mássica do fluido supercrítico (CO_2) na unidade industrial foi calculada como sendo 0,19 kg/s.

5.7.2 CUSTO DE MANUFATURA

As variações no COM dos extratos dos oréganos testados obtidos nos processos SD e SFE em função do tempo de extração estão apresentadas nas Figuras 5.19 à 5.22. Estes valores do COM estão expressos em dólares americanos por quilograma de extrato (US$/kg). Juntamente com estas estimativas de custos, são apresentados os valores do rendimento de extração dos oréganos testados, para estabelecer uma relação entre o COM e o rendimento de extração.

Na Figura 5.19 é apresentada a estimativa do COM da cinética de extração do óleo volátil de orégano chileno recuperado via SD com temperatura média do vapor superaquecido utilizado na extração igual a 163 °C.

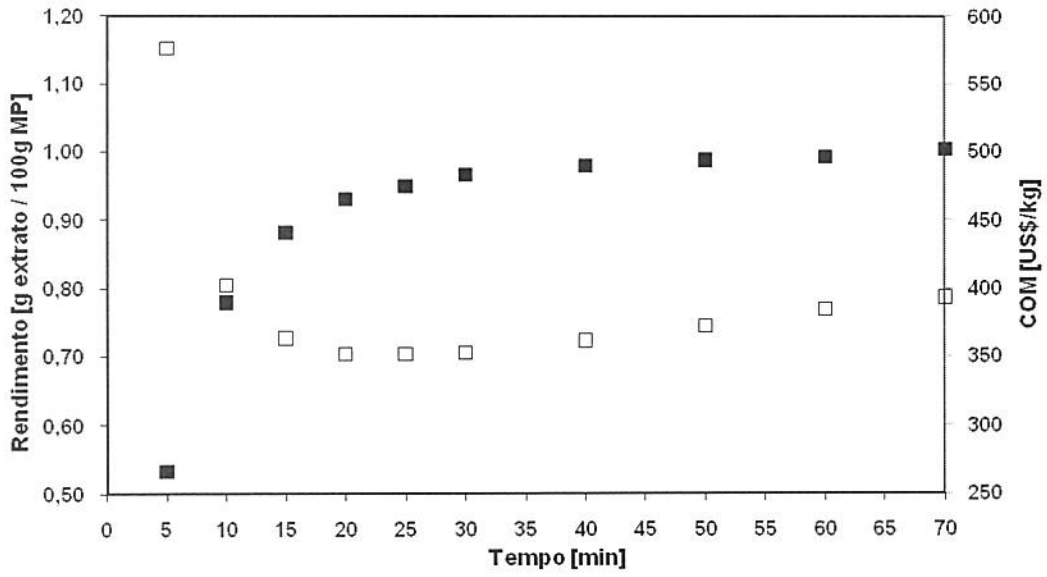

Figura 5.19. Estimativa do COM para a cinética de extração do óleo volátil de orégano chileno obtido via SD, temperatura de vapor 163 °C (□ = COM, ■ = Rendimento).

Como apontado no Item 5.3, o rendimento de extração é alto nos primeiros minutos da destilação (superior ao 90 % do total extraído nos primeiros 20 minutos de processo). Na Figura 5.19 observa-se a relação entre o rendimento e o COM do óleo volátil de orégano chileno em função do tempo de extração. Os valores do COM apresentam um perfil decrescente nos primeiros minutos da extração, caindo rapidamente desde US$ 576,00 por quilograma de óleo volátil extraído até alcançar um valor mínimo de US$ 352,00/kg nos 20 minutos de extração (rendimento acumulado 0,93 %); depois desse tempo o COM vai

aumentando ligeiramente até o final da extração. Considerando os valores de tempo das etapas de extração, determinados no ajuste com *spline* de três retas (Item 5.5), verifica-se que o valor do COM para o t_{CER2} (9,5 min) é um pouco superior a US$ 402,00/kg. A diferença significativa (US$ 50,00/kg) entre os valores do COM no t_{CER2} e o tempo 20 min, pode ser atribuido à rápida extração do óleo volátil e a que nestes tempos do processo SD o fator que mais influenciou o custo total foi o CRM (~ 90 % do COM). As percentagens com que cada fator da Equação 4.8 influenciou no COM são apresentadas na Figura 8.1, nos anexos deste trabalho.

As Figuras 5.20 e 5.21 apresentam a relação entre as cinéticas de extração e as estimativas do COM dos óleos voláteis dos oréganos grande e floreado, respectivamente, obtidos por SD com temperatura média do vapor superaquecido igual a 164 °C. Como no caso do orégano chileno (descrito anteriormente) o comportamento dos valores do COM dos óleos voláteis dos oréganos grande e floreado é similar. O valor do COM decresce até um valor mínimo para depois aumentar constantemente, conforme aumenta o tempo de extração.

Na Figura 5.20 o valor mínimo do COM do óleo volátil do orégano grande foi US$ 477,00/kg após 20 minutos de destilação, que corresponde a um rendimento acumulado de 0,93 %. O COM para o t_{CER} calculado no Item 5.5 (6,4 min) teve um valor igual a US$ 656,00/kg, que é muito maior do valor mínimo estimado. Novamente pode verificar-se que a taxa de extração constante ficaria em segundo plano na hora de estimar tempos de extração que aportem o maior beneficio econômico, devido aos curtos tempos de extração que permitem recuperar uma grande fração do óleo volátil de orégano via SD.

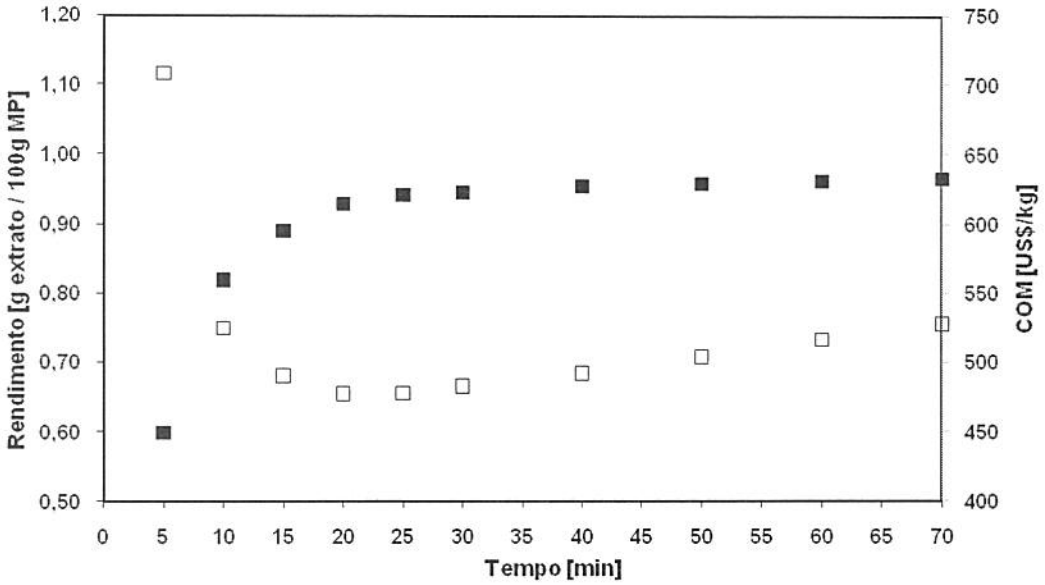

Figura 5.20. Estimativa do COM para a cinética de extração do óleo volátil de orégano grande obtido via SD, temperatura de vapor 164 ºC (□ = COM, ■ = Rendimento).

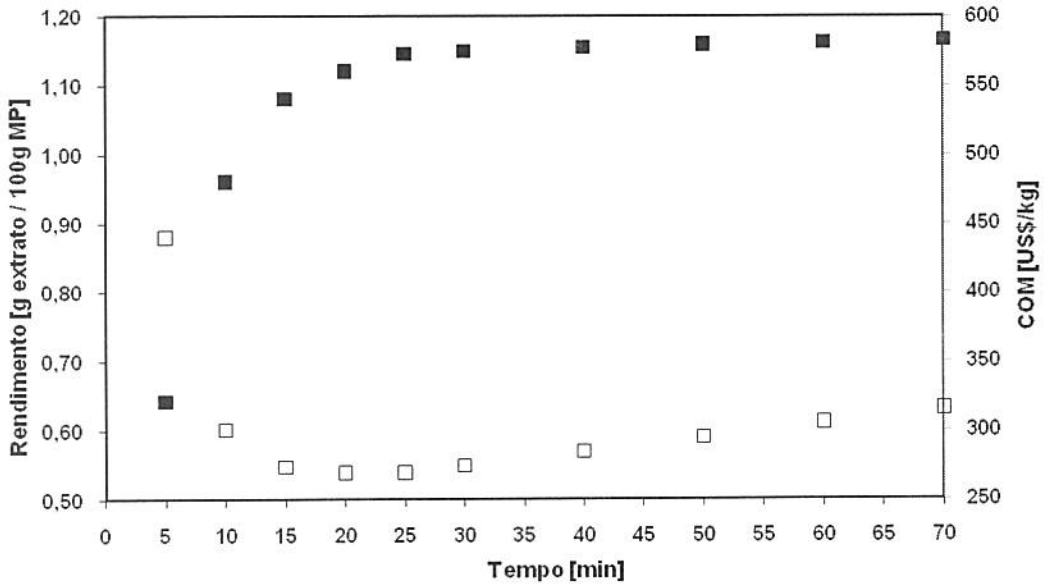

Figura 5.21. Estimativa do COM para a cinética de extração do óleo volátil de orégano floreado obtido via SD, temperatura de vapor 164 ºC (□ = COM, ■ = Rendimento).

Na Figura 5.21 observa-se que os maiores valores de rendimento do orégano floreado permitiram obter valores do COM muito menores aos dos oréganos chileno e grande. O menor COM estimado foi US$ 270,00/kg após 20 minutos de extração (rendimento acumulado 1,12 %), mas após 15 minutos (rendimento acumulado 1,08 %) obteve-se um COM igual a US$ 274,00/kg. Esta pequena diferença pode ser considerada desprezível pela grandeza dos valores em questão, o que permitiria optar por extrações de 15 min. O COM para o t_{CER} = 6,9 min (Item 5.5) foi US$ 387,00/kg.

As diferenças nos valores do COM dos óleos voláteis das três classes de orégano, apresentadas nas Figuras 5.19, 5.20 e 5.21, estão diretamente relacionadas às diferenças entre os valores de rendimento de óleo volátil destas plantas e os valores de CRM. As Figuras 8.1, 8.2 e 8.3 (anexos) apresentam as frações do custo total que correspondem aos diversos fatores utilizados para calcular o COM. O CWT não é apresentado, pois, não é considerado para o cálculo do COM, devido à ausência de resíduos a ser tratados. O CRM é superior a 90 % nos primeiros minutos das extrações e até os tempos que são estimados os valores mínimos do COM, somente no final da extração (minuto 70) o CRM chega a diminuir sua influência até 75 % do COM. Considerando estas premissas é lógico que o orégano floreado apresente os menores valores de COM uma vez que possui o menor preço e o maior teor de óleo volátil.

Na Figura 5.22 mostra-se a estimativa do COM da cinética de extração dos extratos supercríticos de orégano chileno obtidos a 50 °C e 200 bar (Item 5.4). O valor mínimo do COM (US$ 217,00/kg) é alcançado no minuto 100 da extração, que corresponde a um rendimento acumulado de 2,06 %. O valor de COM para o t_{CER2} = 87,2 min, do *spline* a três retas (Item 5.5), foi igual a US$ 221,00/kg. Observa-se que ambos os valores do COM, o mínimo (t = 100 min) e o do t_{CER2} (87,2 min), são muito próximos, esta diferença pode ser

ocasionada pelos erros experimentais. Isto demonstra que o ajuste da cinética de extração do extrato supercrítico de orégano chileno permitiu obter um valor de tempo de ciclo apropriado, do ponto de vista econômico, para ser utilizado em estimativas de custos de produção. É de salientar que essa proximidade entre o valor de COM para o tempo determinado nos ajustes das cinéticas de extração e o valor mínimo de COM, não aconteceu com os ajustes das cinéticas de extração dos óleos voláteis obtidos com vapor superaquecido. Isto pode ser explicado pelo fato de que as três cinéticas geradas não apresentavam pontos suficientes para validar o ajuste. Este critério pode ser considerado para reconhecer quando utilizar os valores dos parâmetros do período de extração constante (CER), estimados a partir do ajuste das cinéticas de extração.

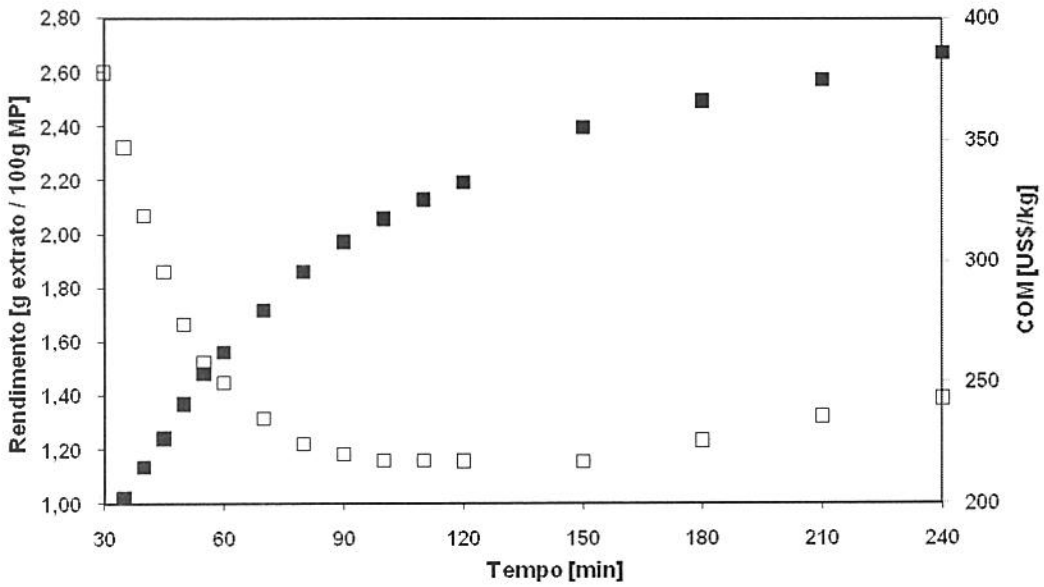

Figura 5.22. Estimativa do COM para a cinética de extração do extrato supercrítico de orégano chileno, temperatura 50 °C e pressão 200 bar (□ = COM, ■ = Rendimento).

É interessante notar que, embora o valor do FCI seja muito mais elevado para o processo SFE do que para o SD, quando comparados no processamento da mesma matéria-prima (orégano chileno), os valores mínimos do COM foram menores para SFE do que para SD. Isto pode dever-se a que em ambos os casos a maior fração do COM pertence ao CRM (Figuras 8.1 e 8.4) e a que com o processo SFE obtêm-se rendimentos de extração maiores aos do processo SD.

6 CONCLUSÃO

O orégano floreado apresentou maior rendimento de óleo volátil que os outros oréganos testados (grande e chileno) na extração com vapor superaquecido. No entanto, na extração com CO_2 supercrítico o orégano chileno foi o que apresentou os maiores valores de rendimento.

As cinéticas de extração conseguiram ser ajustadas mediante *spline* de três retas, descrevendo com elas as três etapas de extração e determinando os parâmetros cinéticos da etapa de velocidade constante de extração.

Os valores de AA das frações de óleo volátil dos oréganos estudados guardam relação direta com a presença de fenóis totais neles, indicando que a AA destas frações de óleo volátil seria dependente da quantidade de compostos fenólicos presentes.

Os extratos supercríticos dos oréganos estudados não apresentaram relação alguma entre os valores de AA e o conteúdo de fenóis totais nos mesmos extratos. Portanto, os valores de AA destes extratos não dependeriam somente dos compostos fenólicos, mas também de outras substâncias recuperadas via SFE.

Os extratos aquosos e supercríticos do orégano chileno foram os que apresentaram os maiores valores de AA, porém todos os óleos voláteis e os extratos supercríticos dos oréganos estudados apresentaram valores positivos de AA, indicando que possuem potencial para serem excelentes fontes de compostos antioxidantes naturais.

As análises cromatográficas mostraram que os óleos voláteis de orégano possuem maior quantidade de compostos químicos que os extratos supercríticos da mesma planta.

Resultados que podem estar associados a algumas características como a degradação térmica de algumas substâncias em SD ou a alta seletividade do solvente em SFE.

As altas concentrações de trans-hidrato de sabineno e rendimento de óleo volátil intermediário nos extratos de ambas plantas estudadas permitem indicar que podem ser espécies hibridas de orégano associadas a espécie *Origanum majorana*.

Na análise econômica determinaram-se os custos de manufatura em escala industrial dos extratos aquosos e supercríticos de orégano, sendo que apesar do maior investimento inicial envolvido em SFE, os extratos supercríticos foram os que apresentaram menores custos de manufatura.

Os valores de COM do óleo volátil de orégano floreado foram muito menores que os do orégano grande. Sendo que ambos os oréganos são comercializados juntos, a oportunidade de negócios para a produção de óleo volátil a partir das folhas de orégano que chegaram à etapa da floração cresce em importância.

Este trabalho demonstra as vantagens do investimento em tecnologia para a obtenção de produtos com maior valor agregado que beneficiaria às associações de produtores rurais que atualmente estão dedicadas somente a produção da planta.

7 RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES

- Identificar a classificação taxonômica das duas espécies de orégano utilizadas neste estudo;
- Testar mais métodos de determinação de AA nos extratos aquosos e supercríticos de orégano, para validar seu poder antioxidante e determinar a influência que cada agente antioxidante aportaria;
- Verificar a relação entre os fenóis totais presentes no óleo volátil e extrato supercrítico com a AA destes extratos;
- Estudar o fracionamento do extrato supercrítico de orégano para separar a parte volátil (compostos do óleo volátil), compará-la com o óleo volátil obtido com vapor superaquecido e estabelecer as diferenças na composição química, propriedades funcionais e COM entre ambos os extratos;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001, 456 p.

AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL ENGINEERS, ASABE. Method of determining and expressing fineness of feed materials by sieving, ANSI/ASAE S319.4 FEB 2008, 2008.

BROGLE, H. CO_2 as a solvent: its properties and applications. Chemistry and Industry. 12, 1982, 358-390.

BRUNNER, G. Gas extraction: an introduction to Fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. Nova Iorque: Springer, 1994, 386 p.

BURDA, S., OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 2001, 2774-2779.

CABANA-HUAMANÍ, H.B. Control de la roya (*Puccinia sp.*) en el cultivo de orégano (*Origanum vulgare* L.) con cinco fungicidas. 2001. Monografia (Engenheiro Agrônomo). Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru.

CERPA, M.G., MATO, R.B., COCERO, M.J. Fundamentals of steam distillation. In: MEIRELES, M.A.A. (ed.) Extracting bioactive compounds for food products: theory and application. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009, p. 11-18.

FUNDACIÓN CHILE. Orégano (*Origanum vulgare*). Santiago de Chile. Set. 2004. Disponível em: <http://www.agrogestion.com/oregano/main.htm>, acesso em: 23 Out. 2007.

INTELLIGEN Inc. Software SuperPro Designer® Version 6.0. Copyright © 2006.

JACOBS, M.B. Determination of moisture. In: The chemical analysis of food and food products. 3th ed. New York: Robert E. Krieger Publishing Co. Inc., 1973, p. 22-23.

KINTZIOS, S.E. Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: KINTZIOS, S.E. (ed.) Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*. Londres: Taylor & Francis Inc., 2002, Cap. 1, p. 3-8.

KINTZIOS, S.E. Oregano. In: PETER, K.V. (ed.) Handbook of herbs and spices (vol. 2). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2004, Cap. 14, p. 215-229.

LEAL, P.F. Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor. 2008, 275 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

LEAL, P.F., TAKEUCHI, T.M., PRADO, J.M., MEIRELES, M.A.A. Cost of manufacturing of volatile oil from condimentary plants. In: MEIRELES, M.A.A. (ed.) Extracting bioactive compounds for food products: theory and application. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009, p. 47-73.

MAKRI, O. Cultivation of oregano. In: KINTZIOS, S.E. (ed.) Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*. Londres: Taylor & Francis Inc., 2002, Cap. 6, p. 153-162.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society. 45, 1968, 594-598.

MEIRELES, M.A.A. Extracting of bioactive compounds from Latin American plants. In: MARTINEZ, J. (Org.) Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008, p. 243-274.

MEIRELES, M.A.A. Extraction and purification of bioactive compounds. In: MEIRELES, M.A.A. (ed.) Extracting bioactive compounds for food products: theory and application. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009, p. 1-8.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society, 48, 1971, 91.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY, NIST. Propriedades termofísicas de sistemas fluidos. NIST Livro de Química na Web. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>, acesso em 20 Fev. 2009.

POVH, N.P. Obtenção do óleo essencial da camomila (*Matricaria recutita* [L.] Rauschert) por diferentes métodos: destilação por arraste a vapor, extração com solventes orgânicos e extração com CO_2 supercrítico. 2000. 217 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PRADO, I.M. Uso de simulador no estudo de aumento de escala e viabilidade econômica do processo de extração supercrítica de produtos naturais. 2009, 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PRADO, J.M., LEAL, P.F., MEIRELES, M.A.A. Obtaining volatile oils by steam distillation: State of the art. In: MEIRELES, M.A.A. (ed.) Extracting bioactive compounds for food products: theory and application. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009, p. 35-47.

PRAKASH, V. Leafy spices. Boca Raton: CRC Press Inc., 1990, 114 p.

PUTIEVSKY, E., RAVID, E., HUSAIN, S.Z. Differences in the yield of plant material, essential oils and their main components during the life cycle of *Origanum vulgare* L. In: BAERHEIM SVENDSEN, A., SCHEFFER, J.J.C. (eds.) Essential oils and aromatic plants: Proceedings of the 15th international symposium on essential oils. Noordwijkerhout, Países Baixos, 19-21 Julho, 1984. Dordrecht: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1985, p. 185-189.

RIZVI, S.S.H, Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials, 1ª Ed., Londres: Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, 1994, 257 p.

RODRIGUES, V.M., SOUSA, E.M.B.D., MONTEIRO, A.R., CHIAVIONE-FILHO, O., MARQUES, M.O.M., MEIRELES, M.A.A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO_2: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure plus solute plus solvent. The Journal of Supercritical Fluids. 22 (1), 2002, 21-36.

ROSA, P.T.V., MEIRELES, M.A.A. Fundamentals of supercritical extraction from solid matrices. In: MEIRELES, M.A.A. (ed.) Extracting bioactive compounds for food products: theory and application. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009, p. 272-288.

ROSA, P.T.V., MEIRELES, M.A.A. Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction. Journal of Food Engineering. 67, 2005, 235-240.

ŞAHIN, F., GÜLLÜCE, M., DAFERERA, D., SÖKMEN, A., SÖKMEN, M., POLISSIOU, M., AGAR, G., ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and

methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 15, 2004, 549-557.

SANDLER, S.I. Chemical and Engineering Thermodynamics, 2ª Ed., Nova Iorque: Wiley Series, 1989, 622 p.

SARAC, N., UGUR, A. Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Origanum onites* L., *Origanum vulgare* L. Subspecies *hirtum* (Link) Ietswaart, *Satureja thymbra* L., and *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal. Growing Wild in Turkey. Journal of Medicinal Food. 11, 2008, 658-573.

ŞARER, E., SCHEFFER, J.J.C., JANSSEN, A., BAERHEIM SVENDSEN, A. Composition of the essential oil of *Origanum majorana* grown in different localities in Turkey. In: In: BAERHEIM SVENDSEN, A., SCHEFFER, J.J.C. (eds.) Essential oils and aromatic plants: Proceedings of the 15th international symposium on essential oils. Noordwijkerhout, Países Baixos, 19-21 Julho, 1984. Dordrecht: Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, 1985, p. 209-212.

SAS Institute Inc. *Software* SAS learning edition 4.1. SAS 9.1.3 service pack 4. Copyright © 2002-2003.

SILVA, D.C.M.N. Extração supercrítica de plantas aromáticas e medicinais (Lavanda brasileira (Aloysia gratissima), Quebra pedra (Phyllanthus amarus) e Ginseng brasileiro (Pfaffia paniculata)): dados experimentais, composição e avaliação da atividade biológica. 2008. 213 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SIMÁNDI, B.; OSZAGYÁN, M.; LEMBERKOVICS, É.; KÉRY, Á.; KASZÁCS, J.; THYRION, F.; MÁTYÁS, T. Supercritical carbon dioxide extraction and

fractionation of oregano oleoresin. Food Research International. 31(10), 1998, 723-728.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16, 1965, 144-158.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 299, 1999, 152-178.

SKOULA, M., HARBORNE, J.B. The taxonomy and chemistry of *Origanum* sp. In: KINTZIOS, S.E. (ed.) Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*. Londres: Taylor & Francis Inc., 2002, Cap 3, p. 67-108.

TURTON, R., BAILIE, R.C., WHITING, W.B., SHAEIWITZ, J.A. Analysis, synthesis, and design of chemical process. 2ª Ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2003, 987 p.

ULRICH, G.D. A guide to chemical engineering process designer and economics. New York: John Wiley & Sons, 1984, 472 p.

VÁGI, E., SIMÁNDI, B., SUHAJDA, Á., HÉTHELYI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Research International. 38, 2005, 51-57.

W'GLARZ, Z., OSIDSKA, E., GESZPRYCH, A., PRZYBYB, J. Intraspecific variability of wild marjoram (*Origanum vulgare* L.) naturally occurring in Poland. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 8, 2006, 23-26.

YODA, S.K. Estudo da cinética de extração dos glicosídeos de *Stevia rebaudiana* Bertoni com mistura CO_2 + água. 2001, 202 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

9 ANEXOS

9.1 TABELAS DOS DADOS LABORATORIAIS

Tabela 9.1. Dados experimentais das frações do óleo volátil de orégano chileno recuperado via SD ao longo do tempo de extração.

Tempo de extração (min)	Massa de extrato	
	Primeira extração (mg)	Segunda extração (mg)
5	315,2	395,5
10	180,7	182,8
15	102,3	75,6
20	42,2	36,0
25	24,9	14,7
30	15,9	12,4
40	15,8	9,7
50	4,7	5,9
60	14,3	3,5
70	3,3	8,7

A massa das folhas secas de orégano chileno usada foi igual a 84,61 g na primeira extração e 84,83 g na segunda extração.

Tabela 9.2. Dados experimentais das frações do óleo volátil de orégano grande recuperado via SD ao longo do tempo de extração.

Tempo de extração (min)	Massa de extrato	
	Primeira extração (mg)	Segunda extração (mg)
5	439,0	459,9
10	183,0	148,3
15	35,7	72,1
20	33,7	23,5
25	9,4	11,0
30	3,0	2,8
40	3,2	10,6
50	2,3	3,0
60	3,1	2,0
70	2,4	3,2

A massa das folhas secas de orégano grande usada foi igual a 84,78 g na primeira extração e 84,84 g na segunda extração.

Tabela 9.3. Dados experimentais das frações do óleo volátil de orégano floreado recuperado via SD ao longo do tempo de extração.

Tempo de extração (min)	Massa de extrato	
	Primeira extração (mg)	Segunda extração (mg)
5	445,0	528,9
10	261,0	223,8
15	94,8	86,9
20	34,4	26,4
25	29,4	8,3
30	3,6	2,6
40	3,5	3,7
50	3,2	3,9
60	3,2	2,3
70	3,2	2,0

A massa das folhas secas de orégano floreado usada foi igual a 84,98 g na primeira extração e 85,09 g na segunda extração.

Tabela 9.4. Dados experimentais das frações do extrato de orégano chileno recuperado via SFE ao longo do tempo de extração.

Tempo de extração (min)	Massa de extrato	
	Primeira extração (mg)	Segunda extração (mg)
5	228,9	201,3
10	79,1	124,4
15	82,3	117,6
20	132,2	119,1
25	95,2	111,1
30	140,6	101,2
35	125,9	57,4
40	111,0	82,3
45	105,2	74,9
50	98,0	116,7
55	81,2	107,3
60	69,0	65,2
70	133,1	130,6
80	139,9	102,0
90	90,5	95,4
100	63,8	81,9
110	63,6	54,0
120	38,9	72,4
150	179,5	160,9
180	64,5	101,9
210	64,7	63,7
240	69,1	102,0
270	72,0	49,0
300	57,3	54,5
330	39,3	36,9
360	34,2	35,6
390	31,2	44,1
420	34,3	28,4
450	30,6	38,2
480	24,8	30,2

A massa das folhas secas de orégano chileno usada foi igual a 95,15 g na primeira extração e 95,06 g na segunda extração.

9.2 FIGURAS DOS DADOS LABORATORIAIS PARA ANÁLISE ECONÔMICA

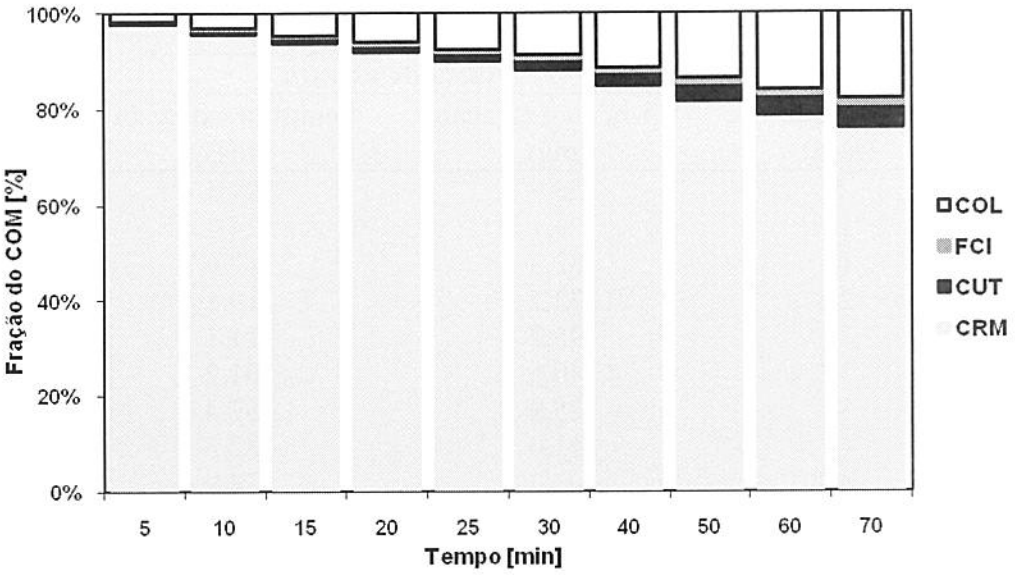

Figura 9.1. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SD do óleo volátil de orégano chileno.

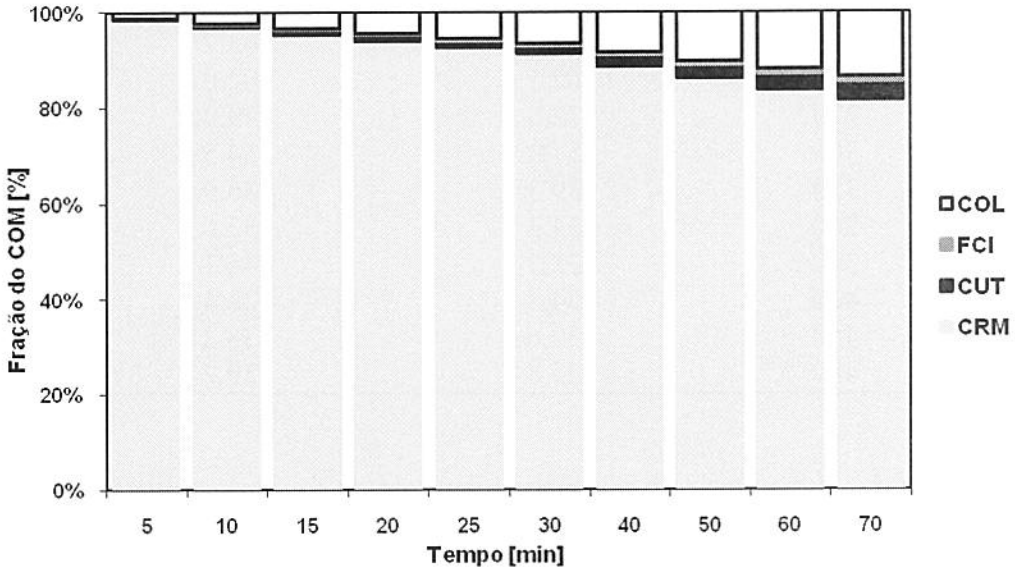

Figura 9.2. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SD do óleo volátil de orégano grande.

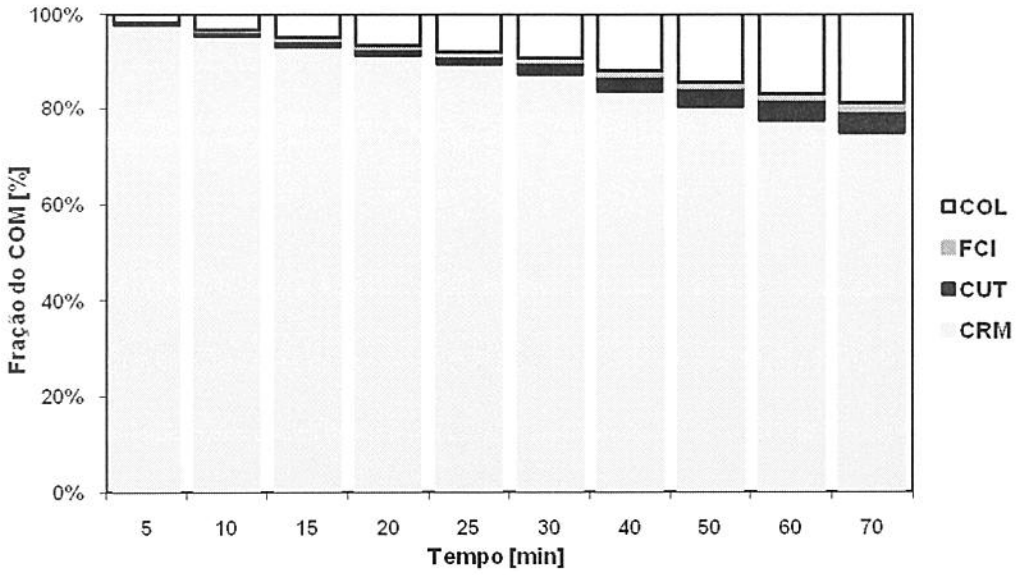

Figura 9.3. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SD do óleo volátil de orégano floreado.

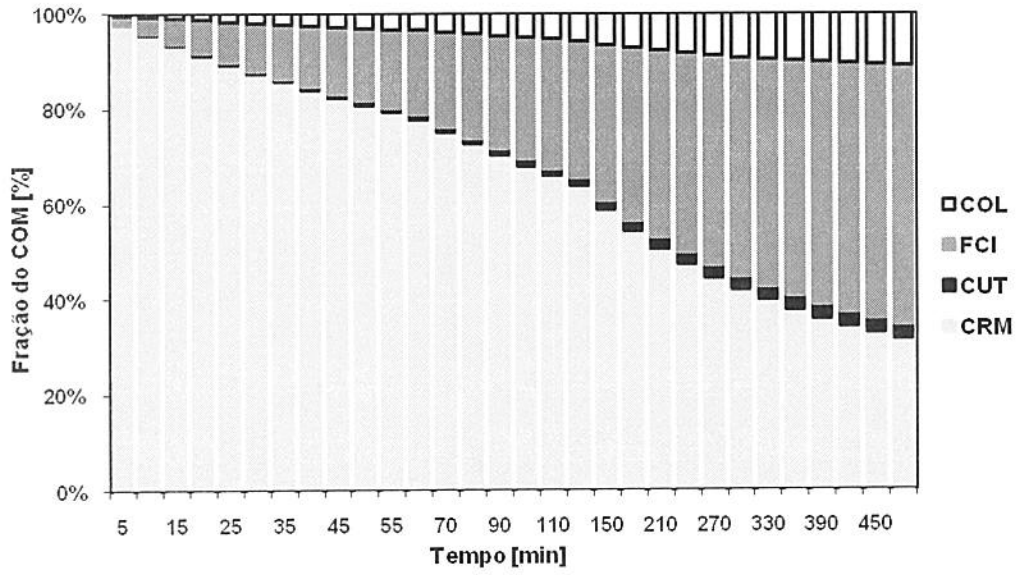

Figura 9.4. Frações do COM que cada fator (CRM, CUT, FCI e COL) representa, para a cinética de extração via SFE do extrato de orégano chileno.